

## 双萤光素酶报告基因检测试剂盒 Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

### 试剂盒内容:

	Cat No	Product Name	Size
试剂盒	ZC320-1	Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit	100T
组分 A	ZC320X-1	Luciferase Lysis Buffer	10ml
组分 B	ZC320X-2	Firefly Luciferase Assay Buffer	10ml
组分 C	ZC320X-3	D-Luciferin	2mg
组分 D	ZC320X-4	Renilla Luciferase Assay Buffer	10ml
组分 E	ZC320X-5	Coelenterazine	400ug

### 保存条件:

最好在-80℃保存。将 组分 C 加入到组分 B 后, 该混合液不可反复冻融, 建议进行小批量分装, 并于-20℃(最长可储存 1 个月)或-80℃(最长可储存 1 年)条件下储存。Renilla Luciferase Assay solution (D+E) 应新鲜配制, 当天使用。

### 产品简介:

双萤光素酶报告基因检测试剂盒为检测基因的表达量提供有效的手段, 在 DLR 检测中, 萤火虫萤光素酶 (Firefly luciferase) 和海肾萤光素酶 (Renilla luciferase) 的活性可在单个样品中依次检测。先以萤光素 (Luciferin) 为底物来检测萤火虫萤光素酶的活性, 然后加入抑制萤火虫萤光素酶催化的物质, 同时加入腔肠素 (Coelenterazine) 检测海肾萤光素酶的活性, 实现双萤光素酶报告基因检测。通过萤光素酶和其底物这一生物发光体系, 可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。通常把感兴趣基因的转录调控元件或 5' 启动子区克隆在 Luciferase 的上游, 或把 3'-UTR 区克隆在 Luciferase 的下游, 构建成报告基因 (Reporter gene) 质粒, 然后转染细胞, 用适当药物等处理细胞后裂解细胞, 通过检测萤光素酶活性的高低来判断药物处理等对目的基因的转录调控作用。海肾萤光素酶更多地被用作检测转染效率的内参, 以消除细胞数量和转染效率的差异。

萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的最强发光波长为 560nm。海肾萤光素酶催化 coelenterazine 发光的最强发光波长为 465nm。

本试剂盒的光信号可以通过化学发光仪、酶标仪或液闪测定仪进行测定。该试剂盒具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广, 无细胞内源性干扰等特点。

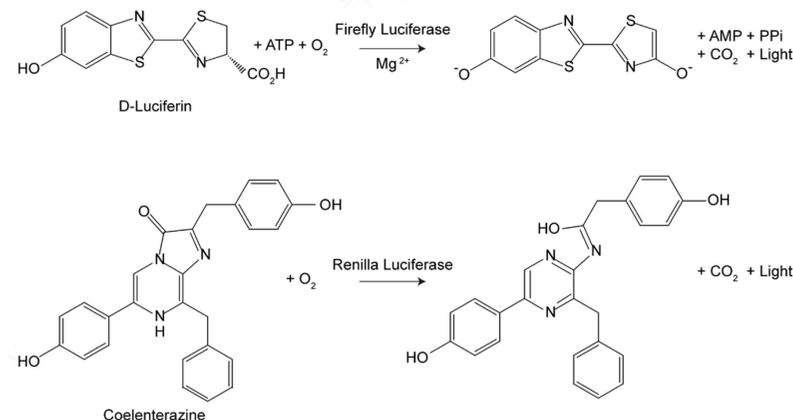


Figure 1. Bioluminescent reactions catalyzed by firefly luciferase and Renilla luciferase.

## 使用方法:

### 1. 裂解细胞:

将报告基因细胞裂解液充分混匀后,按如下方式加入报告基因细胞裂解液,充分裂解细胞。

1.1 对于贴壁细胞:吸尽细胞培养液后,参考下表加入适量的报告基因细胞裂解液;对于悬浮细胞:离心去上清后,参考下表加入适量报告基因细胞裂解液。

Cell Culture Plate	96-well plates	48-well plates	24-well plates	12-well plates	6-well plates
Luciferase Lysis Buffer uL/per well	20uL	65uL	100uL	250uL	500uL

注:裂解产物可室温保存 6 h, -70℃可长期存放(裂解产物不能反复冻融);

注:如果萤光素酶的表达水平比较低,可以尝试使用更少的裂解液,例如6孔板的每孔用量可以最小为100微升。

1.2 充分裂解后,10,000-15,000g离心3-5分钟,取上清用于测定。

注:细胞裂解后可以立即测定萤光素酶,也可以先冻存,待以后再测定。冻存样品需融解,并达到室温后再进行测定。

### 2. Preparation of Firefly Working Solution

2.1 将所有组分恢复至室温。

2.2 配置10 mg/mL D-luciferin 储存液。2mg 组份 C 溶解在200uL 超纯水中。储存液-20℃可以储存6个月反复冻融5次。

2.3 工作液配置:用组分B按照1:50稀释以上D-luciferin 储存液,配制成0.2 mg/mL 的D-Luciferin 工作液。

注:萤火虫萤光素酶工作液不能反复冻融超过5次,若单次实验用量较少,建议按单次使用量分装成小规格。

### 3. Preparation of Renilla Working Solution

3.1 将所有组分恢复至室温。

3.2 配置2 mg/mL Coelenterazine 储存液。400ug 组份 C 溶解在200uL 超纯水中。储存液-20℃可以储存3个月反复冻融5次。

3.3 工作液配置:用组分D按照1:50稀释以上coelenterazine 储存液,配制成0.04 mg/mL 的 coelenterazine 工作液。

注:Coelenterazine 工作液现配现用,配置后在3小时内使用。

## 4. 化学发光值检测

4.1 按仪器操作说明书开启具有检测化学发光功能的仪器如酶标仪。

4.2 每个样品测定时,取样品20-100uL(如果样品量足够,请加入100 μL;如果样品量不足可适当减少用量,但检测孔用量需保持一致)。Luciferase Lysis Buffer 为空白对照。

4.3 加入100uL D-Luciferin 工作液,用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定RLU(relative light unit)值。

注:由于该发光为瞬时发光,建议加入D-Luciferin 工作液后,立即进行检测。

4.4 加入100uL Coelenterazine 工作液,用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定RLU(relative light unit)值。

4.5 在以海肾萤光素酶为内参的情况下,用萤火虫萤光素酶测定得到的RLU值除以海肾萤光素酶测定得到的RLU值。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。如果以萤火虫萤光素酶为内参,也可以进行类似计算。

## 注意事项:

1) 为取得最佳测定效果,在用单管的化学发光仪测定时,样品和测定试剂混合后到测定前的时间应尽量控制一致;使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时,宜先把样品全部加好,然后统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。

2) 由于温度对酶反应有影响,所以测定时,样品和试剂均需达到室温后再进行测定。