

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

说明书修订日期: 2021.09.26

Cat Number: KGAF040

Store at -20°C for 6 months, protected from light

For Research Use Only (科研专用)

一、产品简介

凯基双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit), 是先以萤光素(luciferin)为底物来检测萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase), 后以肠腔素(coelenterazine)为底物来检测海肾萤光素酶(Renilla luciferase), 并且在后续加入海肾萤光素酶底物时, 同时加入抑制萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的物质, 使后续检测仅仅检测到海肾萤光素酶的活性, 实现双荧光素酶报告基因检测。

萤火虫萤光素酶是一种分子量约为 61kD 的蛋白, 在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 可以催化 luciferin 氧化成 oxyluciferin, 在 luciferin 氧化的过程中, 会发出生物萤(bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量约为 36kD 的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化 coelenterazine 氧化成 coelenteramide, 在 coelenterazine 氧化的过程中也会发出生物萤光。生物萤光可以通过化学发光仪(luminometer)或多功能酶标仪(LUM功能)。

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

通常将目的基因的 5'UTR 或者启动子克隆至 Firefly Luciferase 的上游, 或者 3'UTR 克隆至 Firefly Luciferase 的下游, 通过检测萤火虫萤光素酶的量来检测启动子或者调控元件的转录调控作用。Renilla Luciferase 作为内参, 来消除细胞数量或者转染效率的差异。

二、试剂组份

组份	KGAF040 100 assays	储存温度
细胞裂解液	5 ml	-20°C, 1 年
萤火虫萤光素酶检测缓冲液	10 ml	-20°C, 1 年
100× 萤火虫萤光素酶检测底物	100 ul	-20°C, 避光, 6 个月
50× Renilla 萤光素酶检测底物	200 ul	-20°C, 避光, 6 个月
Renilla 萤光素酶检测缓冲液	10 ml	-20°C, 1 年
说明书		1 份
塑料袋		1 个

注意:

1. 细胞裂解液在 96 孔板中裂解, 可以用 200 次以上。

2. 细胞裂解液、萤火虫荧光素酶检测缓冲液、Renilla 荧光素酶检测缓冲液在 4℃可以保存一个月，-20℃可以保存一年，-70℃可以长期保存；萤火虫荧光素酶检测底物和 Renilla 荧光素酶检测底物在 20℃可以保存六个月，在-70℃可以保存一年。

三、操作方法

萤火虫荧光素酶检测缓冲液临用前加入 100× 萤火虫荧光素酶检测底物，标记为萤火虫荧光素酶检测试剂； Renilla 荧光素酶检测缓冲液临用前加入 50× Renilla 荧光素酶检测底物，标记为 Renilla 荧光素酶检测试剂。此检测工作液需现配现用。

1、裂解细胞

根据不同的细胞培养板加入适量的细胞裂解液：

多孔板	裂解液
6 孔板	500 ul
12 孔板	250 ul
24 孔板	100 ul
48 孔板	65 ul
96 孔板	20 ul

1) 对于**贴壁**细胞：吸尽细胞培养液后用 1×PBS 润洗 2 遍后加入细胞裂解液，使裂解液完全覆盖细胞；对于**悬浮**细胞：离心去上清后用 1×PBS 润洗 2 遍后离心去上清，加入细胞裂解液。

2) 于振荡器上室温裂解 20min 以裂解充分。

注：细胞裂解后可以立即测定荧光素酶，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、荧光数值检测（酶标板中操作）

将样本、萤火虫荧光素酶检测试剂、Renilla 荧光素酶检测试剂平衡至室温后再进行以下操作：

- 1) 取 20 ul 细胞裂解样本，加至黑色酶标板中，按照实验要求，可设置 3-5 孔重复。
- 2) 每孔加入 100 ul 萤火虫荧光素酶检测试剂，用移液器轻柔吹打混匀后 OD560 nm 处读数；以不含细胞的细胞裂解液为空白对照，检测尽量在 30min 内完成。
- 3) 每孔加入 100 ul Renilla 荧光素酶检测试剂，使用酶标仪震荡混匀后 OD465 nm 处读数。以不含细胞的细胞裂解液为空白对照，检测尽量在 30min 内完成。

3、计算荧光比值

在以 Renilla 荧光素酶为内参的情况下，用萤火虫荧光素酶测定得到的 RLU（relative light unit）值除以 Renilla 荧光素酶测定得到的 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。

四、注意事项

- 1、无菌操作。
- 2、荧光染料操作中注意避光进行。
- 3、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。
- 4、为保证荧光素酶检测试剂的稳定性，可以采取适当分装后避光保存的方法，以避免反复冻融和长时间暴露于室温。

5、萤火虫荧光素酶检测试剂、**Renilla** 荧光素酶检测试剂最好现用现配。

6、细胞裂解液及裂解时间可根据细胞量适当增加、延长。

7、关于检测仪器的选择：能够检测化学发光或者生物发光的仪器都可适用于此试剂盒。如果使用多功能酶标仪，为防止各孔之间的干扰，我们推荐使用黑色酶标板，并且不同实验组之间最好有间隔。

