Genomeditech (Shanghai) Co., Ltd.
Order: +86 021-50432825/50432826
Email: service@genomeditech.com

V 1.0.0

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

产品简介：

报告基因检测是现代分子生物学研究领域中分析结构基因旁侧区域潜在的顺式元件(如启动子、增强子和沉默子等)和反式作用因子相互作用关系的一种重要工具。吉满生物生产的双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Aassy Kit)，是一种结合萤火虫和海肾荧光素酶检测的先进辅助报告基因技术。

虽然萤火虫和海肾荧光素酶都具有生物发光报告基因的检测特点，但它们却具有完全不同的进化起源，因而它们的酶结构和底物要求完全不同。我们利用这一特点，将它们配合起来使用，即可形成十分有效的双荧光素酶报告基因系统，其中 Renilla Luciferase 通常作为内对照。

它的实验原理是先以萤火虫荧光素(firefly luciferin，以下简称荧光素)为底物来检测细胞中的萤火虫荧光素酶（firefly luciferase，以下简称荧光素酶）。荧光素酶在 ATP,Mg^{2+}和 O_2 参与下催化荧光素，生成氧化荧光素（oxyluciferin），荧光素在被氧化过程中，产生生物发光(Bioluminescence)。然后在后续实验中抑制该反应，来终止萤火虫荧光素的生物发光，同时加入海肾荧光素酶(Renilla Luciferase)的底物腔肠素（coelenterazine）。在 O_2 参与下，腔肠素被海肾荧光素酶催化氧化成氧化荧光素（coelenteramide）产生生物发光。然后通过化学发光仪或液闪测定仪测定生物发光。

产品特点：

- 简便，快捷。
- 灵敏度高，可检测 10^{-20} mol 的萤火虫荧光素酶和 3×10^{-19} mol 的海肾荧光素酶。
- 安全，非放射性。
- 酶的浓度线性范围可达 7 个数量级。
- 准确性高：使用海肾荧光素酶作为对照可以大大降低细胞数量，生长状态和转染效率等对实验结果的影响。

运输保存条件：

-20℃冰袋运输。未拆封试剂盒-20℃避光保存，有效期为 6 个月；-80℃避光保存，有效期为一年。

产品信息：

产品编号	名称	规格
GM-040502A-1	Cell Lysis buffer 细胞裂解液	60 mL
GM-040502A-2	Firefly Luciferase Assay Reagent 萤火虫荧光素酶检测试剂	10 mL
GM-040502A-3	Renilla Luciferase Assay buffer 海肾荧光素酶检测 buffer	10 mL
GM-040502A-4	Renilla Luciferase Assay Reagent（100×） 海肾荧光素酶检测底物（100×）	0.1 mL

注：Firefly Luciferase Assay Reagent 和 Renilla Luciferase Assay Reagent 避光保存，避免反复冻融。本试剂盒可用 100 次。

实验步骤：

1. 细胞裂解：

1） 将转入报告基因的细胞中的培养基移除，加 PBS 轻轻洗涤。按如下方案加入 Cell Lysis Buffer，将培养板放在微型振荡器上室温振荡 15 min，充分裂解细胞。

细胞培养板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
Cell Lysis Buffer（微升/孔）	30 μL	60 μL	120 μL	250 μL	500 μL

注：裂解产物可室温保存 6 小时，4℃保存 16 小时，-70℃可长期存放。（裂解产物不能多次反复冻融）

2） 将充分裂解后的裂解产物，10,000-15,000 rpm 离心 3-5 min。离心后将上清液移入新的 EP 管进行后续检测。

2. Renilla Luciferase Assay 工作液的配置：

按照样品要求的量，将 Renilla Luciferase Assay Reagent(100×)按照稀释比例加入 Renilla Luciferase Assay buffer，混匀后室温放置。（海参荧光素酶底物（GM-040502A-4）试剂体积较小，收到后请先离心后使用。应置于冰浴。开盖使用后及时关闭瓶盖，防止挥发，放置回-80℃。温度会对酶的活性产生影响，因此除 Renilla Luciferase Assay Reagent（100×）以外的其它试剂应放置室温后再使用。）

3. 荧光素酶检测：

1) 按照仪器说明书要求将荧光检测打开，设定参数，测定时间为 10 s，测定间隔为 2 s。

2) 将样品按照 20～100 μL 的体积加入测量管中（保持每次样品的加样量一致），另外加入 100 μL Firefly Luciferase Assay Reagent 混匀 2-3 次（不能漩涡混匀），充分混匀后测定 RLU（Relative light unit），同时设置 Cell Lysis buffer 为空白对照孔。

3) 将检测后的样品，加入 100 μL 配制的 Renilla Luciferase Assay 工作液混匀 2-3 次，充分混匀后测定 RLU，同时设置 Renilla Luciferase Assay 工作液为空白对照孔。

4) 将 2）检测的 RLU 值与 3）检测出的 RLU 值进行比较，通过得出的比值来确定报告基因的激活程度。

注意事项：

1. Renilla Luciferase Assay 工作液需现配先用，不能反复冻融。
2. 萤火虫荧光素酶催化的生物发光的最强发光波长为 560 nm，海肾荧光素酶催化的生物发光的最强发光波长为 465 nm。

Genomeditech