

产品说明书

Dualucif[®] Firefly & Renilla Assay Kit (双荧光素酶报告基因检测试剂盒)

产品货号: BN16075

产品规格: 20T, 100T, 1000T

组分 \ 规格	20T	100T	1000T
A. 5× Passive Luciferase Lysis Buffer	2 × 1 mL	10 mL	100 mL
B. Firefly Luciferase Assay Buffer	2 × 1 mL	10 mL	100 mL
C. D-Luciferin	0.4 mg	2 mg	20 mg
D. Renilla Luciferase Assay Buffer	2 × 1 mL	10 mL	100 mL
E. 50× Coelenterazine	40 μL	200 μL	2 × 1 mL

储存条件

-20°C保存, 有效期见外包装。C组分建议预先使用B组分配制为2 mg/mL储液, B组分、D组分及配制为储液的C组分, 根据实验需求进行小批量分装。所有检测工作液建议现配现用, 避免反复冻融。

产品介绍

Dualucif[®] Firefly & Renilla Assay Kit (双荧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, 萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 和海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 的活性可在单个样品中依次检测。先以荧光素 (Luciferin) 为底物来检测萤火虫荧光素酶的活性, 然后加入抑制萤火虫荧光素酶催化的物质, 同时加入腔肠素 (Coelenterazine) 检测海肾荧光素酶的活性, 实现双荧光素酶报告基因检测。通过荧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, 通过检测荧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。海肾荧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。

萤火虫荧光素酶是一种分子量约为 61 kDa 的蛋白, 在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 可以催化荧光素生成氧化荧光素 (Oxyluciferin), 在荧光素被氧化的过程中, 会产生光信号。海肾荧光素酶是一种分子量约为 36 kDa 的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化腔肠素氧化成肠酰胺 (Coelenteramide), 在腔肠素氧化的过程中也会产生光信号。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。

使用方法

1. 细胞裂解

1 / 2

本产品仅用于科研

TEL: 010-62960866 www.biorigin.Ltd

(1) 将培养基移除, 加 PBS 轻轻洗涤两次 (贴壁细胞可直接进行此操作, 悬浮细胞需离心收集细胞)。按如下方案加入 1× Lysis Buffer (用无菌水按 4:1 稀释 A 组分), 然后将培养板放在微型震荡器上室温震荡 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
细胞裂解液	30 μ L	60 μ L	120 μ L	250 μ L	500 μ L

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

(2) 将裂解产物 10000-15000 rpm 离心 3-5 min, 离心后将上清液移入新的 EP 管中进行后续检测。

注: 细胞裂解后可立即检测, 也可以冻存, 需要时再检测。冻存样品需融解至室温再进行检测。

2. 工作液配制

(1) 将所有组分恢复至室温。

(2) 用 B 组分稀释 C 组分成为 0.2 mg/mL 的萤火虫荧光素酶工作液。

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

(3) 用 D 组分将 E 组分稀释成海肾荧光素酶工作液, 稀释方法为 1 μ L E 组分加入到 49 μ L D 组分中。

注: 海肾荧光素酶工作液需用现配。

3. 化学发光值检测

(1) 按照仪器操作说明书开启具有检测化学发光功能的仪器, 如多功能酶标仪, 设定参数, 测定时间为 10 s, 测定间隔为 2 s。

(2) 每个样品测定时, 取样品 20-100 μ L (如果样品量足够, 请加入 100 μ L; 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)。1× Lysis Buffer 为空白对照。

(3) 加入 100 μ L 萤火虫荧光素酶工作液, 测定 RLU (relative light unit) 值 (建议酶标仪设置 Shaking 混匀功能)。

注: 由于该发光为瞬时发光, 建议加入萤火虫荧光素酶工作液后, 立即进行检测。

(4) 加入 100 μ L 海肾荧光素酶工作液, 测定 RLU (relative light unit) 值 (建议酶标仪设置 Shaking 混匀功能)。

(5) 在以海肾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 值除以海肾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。如果以萤火虫荧光素酶为内参, 也可以进行类似计算。

注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 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荧光素酶检测试剂。
- 萤火虫荧光素酶催化的生物发光的最强波长为 560 nm, 海肾荧光素酶催化的生物发光的最强波长为 480 nm。
- 为防止孔间干扰, 建议使用白色不透光孔板。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。