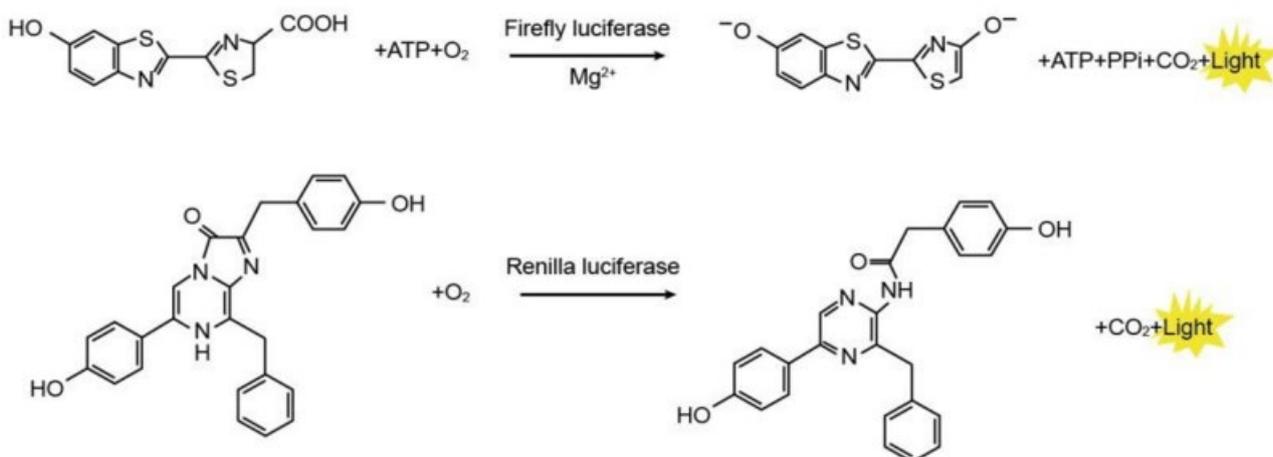




Firefly & Renilla 双萤光素酶报告基因检测试剂盒

产品描述

萤火虫萤光素酶是一种分子量约为 61 kD 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, 并伴随生物发光(Bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量约为 36 kD 的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化 Coelenterazine 氧化成 Coelenteramide, 在 Coelenterazine 氧化的过程中也伴随生物发光。生物发光是化学发光的一种形式, 通过化学反应释放光能, 可以通过化学发光仪(Luminometer)或液闪测定仪进行测定。



在 DLR 检测中, 萤火虫 (Firefly) 萤光素酶和海肾 (Renilla) 萤光素酶的活性可在单个样品中依次检测。先是先以萤光素 (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 的下游等, 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, 测定萤光素酶活性。通过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。Renilla Luciferase 相对更多地被用作转染效率的内参, 以消除细胞数量和转染效率的差异。

李记生物的 Firefly & Renilla 双萤光素酶报告基因检测试剂盒, 具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广, 无细胞内源活性干扰等特点。

订购信息

产品名称	货号	规格
Firefly & Renilla 双萤光素酶报告基因检测试剂盒	AC19L021	100T
Firefly & Renilla 双萤光素酶报告基因检测试剂盒	AC19L022	10*100T



产品组分

组分	AC19L021	AC19L022
A. 5× Passive Luciferase Lysis Buffer	10mL	10*10mL
B. Firefly Luciferase Assay Buffer	10mL	10*10mL
C. D-Luciferin	2mg	10*2mg
D. Renilla Luciferase Assay Buffer	10mL	10*10mL
E. 50× Coelenterazine	200μL	10*200μL

运输与保存

蓝冰运输。-20°C保存, 有效期 12 个月。

注: 组分 C 建议预先使用组分 B 配制为 2 mg/mL 储液, 组分 B、组分 D 及配制为储液的组分 C, 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。

使用方法

1. 样本处理

对于细胞裂解:

(1) 将转入报告基因的细胞中的培养基移除, 加 PBS 轻轻洗涤 2 次 (贴壁细胞可直接进行此操作, 悬浮细胞要离心收集细胞)。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 μL	60 μL	120 μL	250 μL	500 μL

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

- (2) 将充分裂解后的裂解产物, 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。
- (3) 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。

对于叶片组织 (以烟草叶片为例, 仅供参考)

- (1) 构建相应的载体。
- (2) 挑取转化有重组质粒的农杆菌单菌落, 接种到 2mL LB 液体培养基 (添加相应抗生素) 中, 28°C, 220rpm 培养过夜。
- (3) 农杆菌培养至 OD₆₀₀ 为 1.0, 1700 × g 离心 5min 收集菌体后, 用 1/2 MS 液体培养基清洗菌体 2 次;



用含有 150 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的 1/2 MS 液体培养基将农杆菌的 OD₆₀₀ 调至 1.0。

- (4) 将待检测的农杆菌菌液进行混合, 使每种菌液的 OD₆₀₀ 为 0.5。
- (5) 选取生长期为 1 个月左右完全伸展的烟草叶片, 将混合好的菌液用 1 mL 注射器(去掉针头)从烟草叶背面进行注射。为保证实验结果的一致性, 需要将对照载体和待检测目标载体的菌液注射在同一叶片的不同部位上, 以保证相同的生长背景。
- (6) 正常温室生长条件下, 24-48h 即可取样观察。
- (7) 取 3-4 片直径为 6-8mm 的叶盘, 放入 2mL 的 EP 管中 (提前放入 3-4 个小钢珠), 液氮中冷冻, 使用破碎机进行研磨破碎 (45 Hz, 30 s)。破碎完全后在 EP 管中加入 100 μL 1 \times Lysis Buffer(用无菌水按 4:1 稀释 A 组分)。
- (8) 冰上孵育 5min 左右, 充分裂解叶片。
- (9) 10000-16000rpm 离心 1min, 取上清。

2. 工作液配制

- (1) 用 B 组分充分溶解 C 组分, 配制成 0.2mg/mL 的萤火虫萤光素酶检测液。
注: 萤火虫萤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。
- (2) 用 D 组分将 E 组分稀释成海肾萤光素酶工作液, 稀释方法为将 1 μL E 组分加入到 49 μL D 组分中, 此稀释方法可按比例相应扩大。
注: 海肾萤光素酶工作液应该现用现配。

3. 化学发光值检测

- (1) 将上述配制好的萤火虫萤光素检测液和海肾萤光素酶工作液恢复至室温。
- (2) 按仪器操作说明书开启化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪, 将测定间隔设为 2s, 测定时间设为 10s。
- (3) 每个样品测定时, 取样品 20-100 μL (如果样品量足够, 请加入 100 μL ; 如果样品量不足可以适当减少用量, 但同批样品的使用量宜保持一致)。1 \times Lysis Buffer 为空白对照。**注:** 为防止孔间干扰, 建议使用白色不透光孔板。
- (4) 加入 100 μL 萤火虫萤光素酶检测试剂, 用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU(relative light unit)。
注: 由于该发光为瞬时发光, 建议加入萤火虫萤光素酶检测试剂后, 立即进行发光值的检测。
- (5) 在完成上述测定萤火虫萤光素酶步骤后, 加入 100 μL 海肾萤光素酶检测工作液, 用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU(relative light unit)。
- (6) 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. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。
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。
3. 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。

4. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
5. 萤火虫萤光素酶催化的生物发光的最强波长 560nm，海肾萤光素酶催化的生物发光的最强波长 480nm。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品推荐

EZ ECL Pico 化学发光液（超敏型）（货号：AP34L024）

快速细胞冻存液（无血清、无蛋白）（货号：AC05L033）