

双萤光素酶报告基因检测试剂盒

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

产品编号	产品组成	规格	保存条件
FRT-02	5 × 细胞裂解液 (5 × Cell Lysis Buffer)	20 ml	-20 °C 3 年
	萤火虫萤光素酶检测试剂 (Firefly Luciferase Detection Reagent)	10 ml	-80 °C 3 年
	海肾萤光素酶检测底物 (50×) (Substrate for Renilla Luciferase Detection)	0.2 ml	-80 °C 3 年
	海肾萤光素酶底物稀释液 (Dilution Buffer for Renilla Luciferase Substrate)	15 ml	-20 °C 3 年
	说明书	1 份	

一、运输与存储。

本产品必须干冰运输，依据各组份保存条件分开保存，有效期3年。

二、注意事项（实验前阅读）。

1. 由于温度对酶促反应有影响，所以待测样品（细胞裂解产物）和分装的萤光素酶检测试剂必须平衡到室温后再进行活性测定，否则同一样品测得的活性值之间差异较大。
2. 萤火虫萤光素酶检测试剂不可反复冻融，可分装成100 μl/管，置于-80 °C长期保存。
3. 用ddH₂O将5×细胞裂解液稀释成1×细胞裂解液，再裂解细胞。1×细胞裂解液可在4 °C存放1个月，长期保存在-20 °C。
4. 为取得最佳测定效果，用单管的化学发光仪测定样品活性时，样品加入底物时的间隔时间和混合次数尽量一致，减少操作误差；使用多功能化学发光酶标仪时，宜先把样品全部加好，再统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。
5. 海肾萤光素酶的底物腔肠素溶液是乙醇溶液，易挥发。收到产品时若发现其体积小于0.2 ml，可自行添加适当的无水乙醇补齐体积为0.2 ml。
6. 配制好的海肾萤光素酶检测试剂，请立即使用，或者-80 °C保存。 -20 °C保存导致活性值降低。
7. 为了您的健康，实验过程中请穿好实验服、佩戴手套和安全眼镜。

三、产品简介。

本产品由萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测试剂组成，在同一体系中依次测定两种萤光素酶的活性，从而实现双萤光素酶报告基因的检测。

检测目的基因转录水平变化时可以将目的基因的转录调控元件或 5'端的启动子区域的 DNA 序列克隆到萤火虫萤光素酶基因的上游（5'端），也可以把目的基因的 3'-UTR 区域的 DNA 序列添加到萤火虫萤光素酶基因的下游，构建报告基因质粒，与表达海肾萤光素酶的质粒共同转染细胞，表达萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶。萤火虫萤光素酶的表达水平通常反应目的基因在特定条件下的转录调控变化，而海肾萤光素酶的表达水平一般用作体系内参，来消除细胞转染效率和细胞数量等因素的影响。

四、特点与优势。

1. 本试剂灵敏度高，达到 10^{-19} 摩尔萤光素酶，线性范围至少达到 7 个数量级酶浓度范围，可以有效的检测报告基因转录水平变化。
2. 本试剂盒操作简单，能够快速完成双萤光素酶报告基因检测。

五、使用说明。

1. 以 6 孔细胞培养板培养的贴壁细胞为处理对象，实验步骤如下：
2. 细胞转染。细胞转染实验请参考本公司转染试剂（**Chemifect, Cat: FR-01**）说明书中的实验步骤，将编码萤火虫萤光素酶基因的质粒与编码海肾萤光素酶基因的质粒按 10:1（或 5:1）的比例混合，转入 6 孔板的细胞中，2 μ g/孔。
3. 裂解液配制。用 ddH₂O 稀释 5 $\times$ 细胞裂解液，配成 1 $\times$ 细胞裂解液，4 $^{\circ}$ C 可存放 1 月。
4. 细胞裂解。细胞转染后 48 h，弃培养液，预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次，加入 0.5 ml 细胞裂解液（1 $\times$ ），置于 4 $^{\circ}$ C 摇床上，轻轻旋转 5-30 min，裂解细胞。
5. 将裂解液转入 1.5 ml EP 管中，12,000 $\times$ g，4 $^{\circ}$ C 离心 5 min，弃沉淀，上清转移至新的 EP 管中，即为待测样品（细胞裂解产物）。
6. 取出萤火虫萤光素酶检测试剂，融化。若使用单管测定仪器，则将萤火虫萤光素酶分装到 1.5 ml 的 EP 管中，100 μ l/管。若使用 96 孔板测定，则根据实际情况进行分装。将不用的萤火虫萤光素酶检测试剂转入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱，需要使用的检测试剂，避光平衡到室温。
7. 海肾萤光素酶检测试剂配制。每个样品需要 100 μ l 海肾萤光素酶检测试剂。根据样品数量，按照海肾萤光素酶底物:海肾萤光素酶底物稀释液=1:50 的比例配制海肾萤光素酶检测试剂。
8. 仪器设置。打开仪器，设置参数，延迟时间（整合时间）一般为 2 sec，测定时间为 10-20 sec。

9. 活性测定。吸取 5-20 μl 待测样品，加到 100 μl 萤火虫萤光素酶检测试剂中，立即混匀，置于仪器中，检测萤火虫萤光素酶活性值。
10. 同一检测体系中再加入 100 μl 海肾萤光素酶检测试剂，立即混匀，转入仪器，测定海肾萤光素酶活性值。
11. 整理并分析萤火虫萤光素酶活性值与海肾萤光素酶活性值的比例，鉴定目的基因表达变化。

表1. 细胞裂解液体积表

96孔板	24孔板	12孔板	6孔板
100 μl /孔	200 μl /孔	250 μl /孔	500 μl /孔

六、效果鉴定。

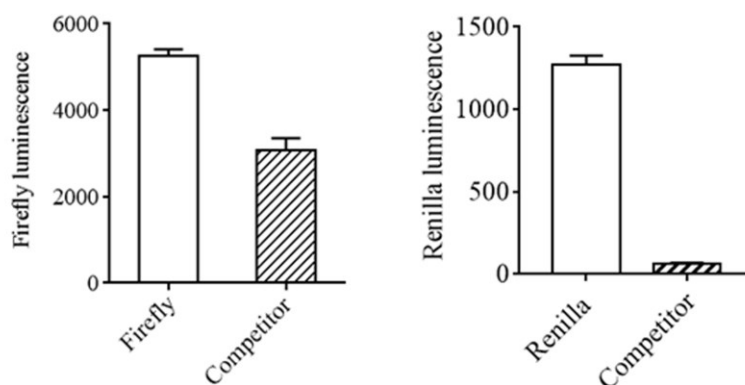


图 1. 双萤光素酶报告基因检测试剂盒效果鉴定。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
萤光素酶活性值偏低	细胞转染效率低，luciferase 表达水平偏低。	增强细胞转染效率，或更换成转染效率较高的的细胞株，如 293T 细胞。
	裂解产物使用量偏少	增加检测体系中的细胞裂解产物用量。
	细胞裂解不充分。	请用配制的 1×细胞裂解液裂解细胞 30 min。
	萤光素酶活性检测试剂失效。	请使用保质期内的试剂。
	萤光素酶活性检测试剂反复冻融。	萤火虫萤光素酶检测试剂分装，-80 °C 保存。避免反复冻融。
重复测量的萤光素酶活性值偏差大	样品和检测试剂未平衡到室温。	提前取出待测样品和分装的萤火虫萤光素酶检测试剂，并配制海肾萤光素酶检测试剂，室温避光放置几分钟，平衡到室温后，再开始检测。
	样品加样量不准。	使用精确度较高的移液器，保证加样量，混合次数及间隔时间一致。
	检测试剂不是同一批次配制的萤光素酶活性检测试剂。	反复冻融降低检测试剂的灵敏度，因此，检测同一样品时，使用同一批次配制，且没有反复冻融（或冻融次数一致）的萤火虫和海肾萤光素酶活性检测试剂。
萤光素酶活性值偏高	细胞转染效率高，luciferase 表达量高。	减少细胞裂解产物用量，或用 1×细胞裂解液稀释细胞裂解产物后再测定。
	细胞裂解产物用量偏大。	减少测定体系中的细胞裂解产物用量。