

# 海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒

## Renilla Luciferase Reporter Gene Assay Kit

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
FRT-04	5 × 细胞裂解液 (5×Cell Lysis Buffer)	20 ml	-20°C 2年
	海肾萤光素酶检测底物 (50×) (Substrate for Renilla Luciferase Detection)	0.2 ml	-80 °C 18个月
	海肾萤光素酶底物稀释液 (Dilution Buffer for Renilla Luciferase Substrate)	15 ml	-20 °C 2年
	说明书	1份	

### 一、运输与存储条件。

本产品**必须干冰**运输，各组份依据保存条件分开保存，有效期 18 个月。

### 二、注意事项（实验前阅读）。

- 海肾萤光素酶检测底物是乙醇溶液，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。
- 用ddH<sub>2</sub>O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月，长期保存在-20 °C。
- 配制好的海肾萤光素酶检测试剂，若不立即使用，请-80 °C保存，切勿存放于-20 °C，导致试剂活性降低或失效。
- 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。
- 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。

海肾萤光素酶 (Renilla Luciferase) 是一种分子量为 36 kD 的蛋白, 最初从腔肠动物海肾(Renilla Reniformis)中分离鉴定出来., 在氧气存在的情况下可以将腔肠素 (Coelenterazine) 氧化成腔肠酰胺 (Coelenteramide), 并发出生物荧光。检测荧光的强度, 即可确定海肾萤光素酶的表达水平。可以将目的基因的转录调控元件或启动子区域 DNA 序列克隆到海肾萤光素酶基因的上游, 或将目的基因的 3'-UTR 区域 DNA 序列整合到海肾萤光素酶表达基因的下游, 通过测定海肾萤光素酶活性的变化来鉴定目的基因在转录水平的表达变化。此外, 海肾萤光素酶通常与萤火虫萤光素酶共同表达在一个细胞内, 充作萤火虫萤光素酶活性检测的内参。

### 四、特点与优势。

1. 本试剂灵敏度高, 可以有效的检测海肾萤光素酶活性。
2. 本试剂盒操作简单, 能够快速完成海肾萤光素酶活性检测。

### 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, 将编码海肾萤光素酶基因的质粒转入 6 孔板的细胞中, 2  $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。
3. 裂解液配制。用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 5 $\times$ 细胞裂解液, 配成 1 $\times$ 细胞裂解液, 可在 4  $^{\circ}\text{C}$  存放一月。
4. 细胞裂解。细胞转染 48 h, 弃培养液, 预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 0.5 ml 的 1 $\times$ 细胞裂解液, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中的摇床上, 摇晃 5-30 min, 裂解细胞。裂解液转入 1.5 ml EP 管中, 12,000 $\times\text{g}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min, 上清转移至新的 EP 管中, 作为待测样品。
5. 海肾萤光素酶检测试剂配制。每个样品需要 100  $\mu\text{l}$  检测试剂。根据样品数量, 计算所需海肾萤光素酶检测试剂体积, 按照底物: 稀释液=1: 50 的比例稀释底物, 制备海肾萤光素酶检测试剂。
6. 打开检测仪器, 设置测定参数, 一般延迟时间 (整合时间) 为 2 sec, 测定时间为 10-20 sec。
7. 活性测定。吸取 100  $\mu\text{l}$  海肾萤光素酶检测试剂, 加入 EP 管 (或 96 孔板) 中, 再加入 5-20  $\mu\text{l}$  待测样品 (细胞裂解液), 立即混匀, 仪器检测。

表1. 细胞裂解液体积表

96孔板	24孔板	12孔板	6孔板
100 $\mu\text{l}/\text{孔}$	200 $\mu\text{l}/\text{孔}$	250 $\mu\text{l}/\text{孔}$	500 $\mu\text{l}/\text{孔}$

## 六、效果鉴定。

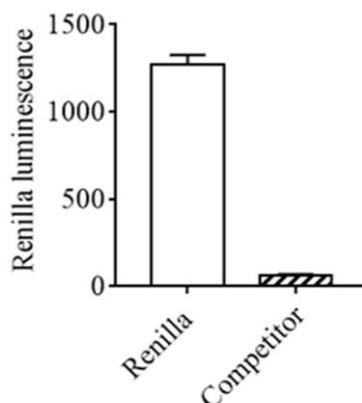


图 1. 海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒效果鉴定。

## 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，Renilla 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细胞株，如 293T 细胞。
	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。
重复测量的海肾萤光素酶活性值偏差大	萤光素酶活性检测试剂反复冻融。	请尽量使用新鲜配制的海肾萤光素酶活性检测试剂，避免反复冻融。
	样品和检测试剂未平衡到室温。	提前取出样品，并配制海肾萤光素酶检测试剂，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。
萤光素酶活性值偏高	检测底物不是同一批次配制的底物	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，且没有反复冻融的海肾萤光素酶活性检测试剂。
	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。