

## Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

### 双萤光素酶报告基因检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL555A	双萤光素酶报告基因检测试剂盒	100T
BL555B	双萤光素酶报告基因检测试剂盒	1000T

#### 产品简介:

双萤光素酶报告基因检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit), 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), 并且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。

萤火虫萤光素酶是一种分子量约为 61kD 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, 会发出生物萤光(bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量约为 36kD 的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化 coelenterazine 氧化成 coelenteramide, 在 coelenterazine 氧化的过程中也会发出生物萤光。生物萤光可以通过化学发光仪(luminometer)或液闪测定仪进行测定。

萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的最强发光波长为 560nm。海肾萤光素酶催化 coelenterazine 发光的最强发光波长为 465nm。

通常将目的基因的 5'UTR 或者启动子克隆至 Firefly Luciferase 的上游, 或者 3'UTR 克隆至 Firefly Luciferase 的下游, 通过检测萤火虫萤光素酶的量来检测启动子或者调控元件的转录调控作用。Renilla Luciferase 作为内参, 来消除细胞数量或者转染效率的差异。

#### 产品组成:

产品编号	产品名称	BL555A	BL555B
1	细胞裂解液	10mL	100mL
2	萤火虫萤光素酶检测缓冲液	10mL	100mL
3	萤火虫萤光素酶检测底物	2mg	20mg
4	Renilla 萤光素酶检测缓冲液	10mL	100mL
5	Renilla 萤光素酶检测底物	400μg	4mg

注: 细胞裂解液、萤火虫萤光素酶检测缓冲液、Renilla 萤光素酶检测缓冲液在 4°C 可以保存一个月, -20°C 可以保存一年, -80°C 可以长期保存。萤火虫萤光素酶检测底物、Renilla 萤光素酶检测底物, -20°C 可以保存半年, -80°C 可以保存一年。

#### 使用方法:

##### 1. 细胞裂解

根据不同的细胞培养板加入适量的细胞裂解液:

细胞培养板	6 孔板	12 孔板	24 孔板	48 孔板	96 孔板
细胞裂解液	500μL	250μL	100μL	65μL	20μL

- (a) 对于贴壁细胞: 吸尽细胞培养液后用 1×PBS 润洗 2 遍后, 去除洗涤液, 然后加入细胞裂解液, 使裂解液完全覆盖细胞; 对于悬浮细胞: 离心去上清后用 1×PBS 润洗 2 遍后离心去上清, 加入细胞裂解液。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



(b) 于振荡器上室温裂解 20min 以裂解充分, 然后 10000-15000g 离心 3-5min, 取上清用于测定。

注: (1) 裂解产物可室温保存 6h, -70°C 可长期存放(裂解产物不能反复冻融);

(2) 如果荧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 $\mu$ L;

(3) 细胞裂解后可以立即测定荧光素酶, 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。

## 2. 工作液准备

将所有组分平衡至室温。

### 2.1 萤火虫荧光素酶工作液制备

(a) 配置 10mg/mL 萤火虫荧光素酶储存液。2mg 组份 3 溶解在 200 $\mu$ L 超纯水中。储存液 -20°C 可以储存 6 个月反复冻融 5 次。

(b) 工作液配置: 用组分 2 按照 1:50 稀释以上储存液, 配制成 0.2mg/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超过 5 次, 若单次实验用量较少, 建议按单次使用量分装成小规格。

### 2.2 Renilla 荧光素酶工作液制备

(a) 配置 2mg/mL Renilla 荧光素酶储存液。400 $\mu$ g 组份 5 溶解在 200 $\mu$ L 无水乙醇中。储存液 -20°C 可以储存 3 个月反复冻融 5 次。

(b) 工作液配置: 用组分 4 按照 1:50 稀释以上储存液, 配制成 0.04mg/mL 的 Renilla 荧光素酶工作液。

## 3. 检测

(a) 取样品 20-100 $\mu$ L (如果样品量足够, 请加入 100 $\mu$ 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)。细胞裂解液为空白对照。

(b) 加入 100 $\mu$ L 萤火虫荧光素酶检测液, 用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit) 值。

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。

(c) 加入 100 $\mu$ L Renilla 荧光素酶工作液, 用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit) 值。

## 4. 计算

在以 Renilla 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 Renilla 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。

## 注意事项:

1. 荧光染料操作中注意避光进行。
2. 为保证荧光素酶检测试剂的稳定性, 可以采取适当分装后避光保存的方法, 以避免反复冻融和长时间暴露于室温。
3. 萤火虫荧光素酶检测试剂、Renilla 荧光素酶检测试剂最好现用现配。
4. 细胞裂解液及裂解时间可根据细胞量适当增加、延长。
5. 关于检测仪器的选择: 能够检测化学发光或者生物发光的仪器都可适用于此试剂盒。如果使用多功能酶标仪, 为防止各孔之间的干扰, 我们推荐使用黑色酶标板, 并且不同实验组之间最好有间隔。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 保存条件:

-20°C 保存, 有效期 1 年。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。

