

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

产品货号: G1114

产品规格: 100T

产品介绍:

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。先以萤光素 (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, 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。海肾萤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。

萤火虫萤光素酶是一种分子量约为61kDa的蛋白, 在ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 可以催化萤光素生成氧化萤光素 (Oxyluciferin), 在萤光素被氧化的过程中, 会产生光信号。海肾萤光素酶是一种分子量约为36kDa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, 无细胞内源活性干扰等特点。

产品组成:

名称	规格
A: 5× Passive Luciferase Lysis Buffer	10mL
B: Firefly Luciferase Assay Buffer	10mL
C: D-Luciferin	2mg
D: Renilla Luciferase Assay Buffer	10mL
E: 50×Coelenterazine	200μL

注意: C组分建议预先使用B组分配制为2mg/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。

实验步骤:

1. 裂解细胞:

- (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振荡器上室温震荡15min, 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
裂解液加入量	30μL	60μL	120μL	250μL	500μL

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

- (2) 将裂解产物10000-15000rpm离心3-5min, 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:



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- (1) 将所有组分恢复至室温。
- (2) 用B组分稀释C组分成为0.2mg/mL的萤火虫萤光素酶工作液。
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。
- (3) 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1 μ L E组分加入到49 μ L D组分中。
注：海肾萤光素酶工作液需现用现配。
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10s，测定间隔为2s。
 - (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 $\times$ Lysis Buffer为空白对照。
 - (3) 加入100 μ L萤火虫萤光素酶工作液，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，建议加入萤火虫萤光素酶工作液后，立即进行检测。
 - (4) 加入100 μ L海肾萤光素酶工作液，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. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 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萤光素酶检测试剂。
3. 萤火虫萤光素酶催化的生物发光的最强波长为560nm，海肾萤光素酶催化的生物发光的最强波长为480nm。
4. 为防止孔间干扰，建议使用白色不透光孔板。
5. 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。
6. 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℃，有效期12个月。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>