



Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

双萤光素酶报告基因检测试剂盒

目录号：CW9312

保存条件：冰袋运输。

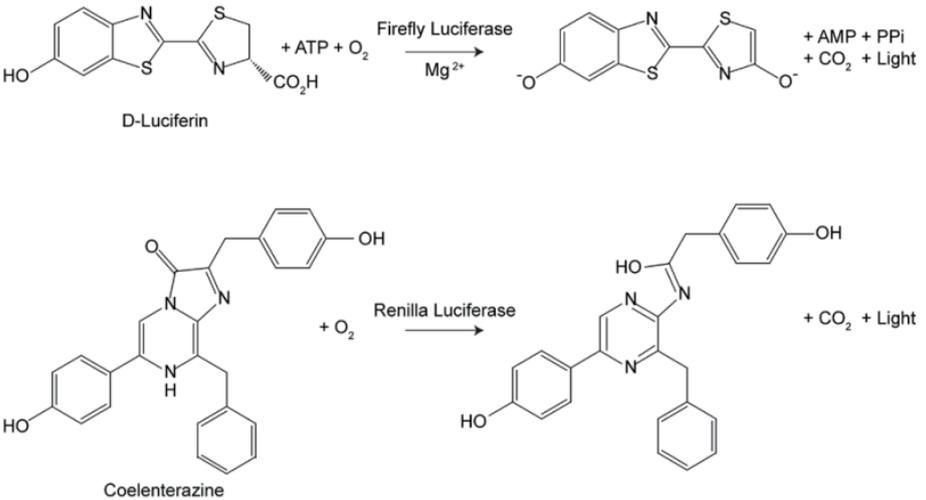
本试剂盒-20±5°C避光储存；配制后的萤火虫萤光素酶检测试剂(CW9312M-B和CW9312M-C的混合液)建议分装保存，避免反复冻融，-20±5°C避光储存，有效期6个月。海肾萤光素酶检测试剂(CW9312M-D和CW9312M-E的混合液)，

产品内容

Cat. No.	Component	CW9312T	CW9312M
CW9312M-A	1× Passive Luciferase Lysis Buffer	2 mL	10 mL
CW9312M-B	Firefly Luciferase Assay Buffer	2 mL	10 mL
CW9312M-C	D-Luciferin	0.4 mg	2 mg
CW9312M-D	Renilla Luciferase Assay Buffer	2 mL	10 mL
CW9312M-E	Coelenterazine	80 µg	400 µg

产品简介

本产品是一款以萤光素(luciferin)为底物用于检测哺乳动物细胞内萤火虫萤光素酶(firefly luciferase)和海肾萤光素酶(Renilla luciferase)活性的试剂盒。萤火虫萤光素酶是一种分子量约为61 kD的蛋白酶,在ATP、镁离子和氧气的共同作用下催化luciferin氧化成oxyluciferin,从而产生波长为560 nm的生物荧光(bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量为36 kDa的蛋白酶,在氧气存在的条件下,可以催化腔肠素(Coelenterazine)氧化成Coelenteramide,在Coelenterazine氧化的过程中也会产生波长为465 nm的生物荧光。这种荧光可以通过化学发光仪、酶标仪或液闪测定仪进行测定。本试剂盒的检测原理参考下图。



在双萤光素酶报告基因检测中,萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的活性可在单个样品中依次检测。先以萤光素为底物来检测萤火虫萤光素酶的活性,然后加入抑制萤火虫萤光素酶催化的物质,同时加入腔肠素检测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。

通常把目的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,以排除不同组之间细胞生长状况、细胞数目以及转染效率带来的干扰。

产品优势

本产品具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广、无细胞内源活性干扰等优势。

使用方法

1. 检测试剂的准备:

方案一：一次性使用配制方法

融解冻存的CW9312M-B和CW9312M-D，达到室温。用CW9312M-C缓冲液充分溶解CW9312M-B底物，轻柔颠倒混匀至完全溶解，配制成0.2 mg/mL的萤火虫萤光素酶检测试剂。用CW9312M-E缓冲液充分溶解CW9312M-D底物，轻柔颠倒混匀至完全溶解，配制成0.04 mg/mL的海肾萤光素酶检测试剂。

注意：1) CW9311M-C、CW9311M-E为冻干粉，可能会有少量粘附在瓶盖和瓶口，旋开瓶盖前可以拿起瓶子用瓶底并轻轻敲击桌面，使粉末尽量掉落至瓶底，然后轻轻旋开瓶盖，并注意不要损失冻干粉。

2) 一次性使用配制方法适用于大量实验需要并计划一次性用完的情况。否则，建议先配制成母液，然后根据需要分装使用。

方案二：分次使用的母液配制方法

1) 萤火虫萤光素酶检测试剂配制

A. 配制10 mg/mL D-luciferin储存液：2 mg组份CW9312M-C溶解在200 μ L超纯水中。储存液-20°C可以储存6个月，反复冻融5次。

B. 配制检测试剂：以1: 50的比例将D-luciferin储存液与CW9312M-B混合，轻柔颠倒混匀至完全溶解，配制成0.2 mg/mL的萤火虫萤光素酶检测试剂。

注意：萤火虫萤光素酶检测试剂不能反复冻融超过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) 海肾萤光素酶检测试剂配制

A. 配制2 mg/mL Coelenterazine储存液。400 μ g组份CW9312M-E溶解在200 μ L乙醇中。储存液-80°C可以储存6个月，反复冻融5次。

B. 配制检测试剂：以1: 50的比例将Coelenterazine储存液与CW9312M-D混合，轻柔颠倒混匀至完全溶解，配制成0.04 mg/mL的海肾萤光素酶检测试剂。

注意：海肾萤光素酶检测试剂现配现用，配置后在3小时内使用，注意避光。

2. 样品处理

细胞:

1) 使用适合进行化学发光检测的96孔板, 每孔接种100 μL 细胞(如使用384孔板, 每孔接种25 μL 细胞, 具体用量视不同类型的384孔板而定), 同时设置不含细胞的培养液孔作为阴性对照, 按照细胞培养和细胞转染的常规方法培养和转染细胞。如有需要, 可加入药物处理细胞。

注意: 细胞裂解后可立即测定萤光素酶, 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。

2) 将1 \times Passive Luciferase Lysis Buffer充分混匀后, 按如下剂量加入到细胞培养板中, 充分裂解细胞。对于贴壁细胞: 吸尽细胞培养液后, 参考下表加入适量CW9312M-A; 对于悬浮细胞: 离心去上清后, 参考下表加入适量CW9312M-A。

Cat No	96-well plates	48-well plates	24-well plates	12-well plates	6-well plates
Lysis Buffer (CW9312M-A) $\mu\text{L}/\text{well}$	20 μL	65 μL	100 μL	250 μL	500 μL

注意: 1) 裂解产物可室温保存6 h, -80°C 可长期存放(裂解产物不能反复冻融);

2) 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 。

3) 冰上孵育5分钟, 充分裂解后, 10,000-15,000 $\times g$ 离心3-5分钟, 取上清作为测定所用样品。

注意: 细胞裂解后可立即测定萤光素酶, 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。

叶片组织 (以烟草叶片为例, 仅供参考)

1) 挑取含有重组质粒的农杆菌单菌落, 接种到2mL含有相应抗生素的LB液体培养基中, 在 28°C 、220 rpm条件下培养过夜。

2) 农杆菌培养至 OD_{600} 为1.0后, 1,700 $\times g$ 离心5分钟, 收集菌体, 并用1/2MS液体培养基清洗菌体两次; 用含有150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乙酰丁香酮的1/2 MS液体培养基将农杆菌的 OD_{600} 调至1.0。

3) 将待检测的农杆菌菌液进行混合, 使每种菌液的 OD_{600} 达到0.5。

4) 选取生长期为1个月左右, 完全伸展的烟草叶片, 使用1 mL注射器(去掉针头)从烟草叶背面进行注射混合的菌液。为保证实验结果的一致性, 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, 以确保相同的生长背景。

5) 在正常温室生长条件下, 24-48小时后即可取样观察。

6) 取3-4片直径为6-8mm的烟草叶片, 放入2mL的EP管(提前放入3-4个小钢珠)中, 液氮中冷冻后使用破碎仪进行研磨破碎(45Hz, 30s)。破碎完全后, 在EP管中加入100 μL 1 \times Passive Luciferase Lysis Buffer。

7) 冰上孵育5分钟, 充分裂解后, 10,000-15,000 $\times g$ 离心3-5分钟, 取上清作为测定所用样品。

原生质体 (仅供参考)

- 1) 制备原生质体 (参考文献: DOI: 10.1038/nprot.2007.199)。
- 2) 在2 mL EP管中加入相应的载体 (具体加入量需通过预实验确定), 加入100 μL 原生质体悬浮液。轻摇混匀后, 加入110 μL PEG-CaCl₂溶液, 轻轻弹击EP管以确保均匀混合。在室温放置10-15分钟以促进转化过程。
- 3) 向EP管中加入440 μL W5溶液, 上下颠倒以停止转化。
- 4) 200 \times g室温离心5分钟, 弃去上清, 向EP管中加入800 μL WI溶液, 重悬原生质体。
- 5) 将EP管置于室温下避光培养16至24小时。
- 6) 将原生质体转移到2 mL离心管中, 离心收集原生质体, 向离心管中加入100 μL 1 \times Passive Luciferase Lysis Buffer。
- 7) 冰上孵育5分钟, 充分裂解原生质体。
- 8) (选做) 10,000-15,000 \times g 离心3-5分钟, 取上清作为测定所用样品。

3. 化学发光值检测

- 3.1 将上述配制好的萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测试剂平衡至室温。
- 3.2 使用化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。可以将测定间隔设为2秒, 测定时间设为10秒, 或者根据仪器设备的要求并根据实验需要设置适当的间隔时间和测定时间。
- 3.3 在进行每个样品测定时, 取样品量20-100 μL (具体加入量可根据实验需求进行调整, 但所有检测孔样品量需保持一致, 建议设置3-5个复孔来进行实验)。CW9312M-A为空白对照。
- 3.4 加入100 μL 萤火虫萤光素酶检测液, 用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定RLU (relative light unit) 值。
注意: 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。
- 3.5 在完成上述测定萤火虫萤光素酶步骤后, 再加入100 μL 海肾萤光素酶工作液, 用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定RLU值。
- 3.6 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. 为避免细胞培养板孔间干扰, 推荐使用白色或黑色的细胞培养板进行实验。
2. 萤火虫萤光素酶检测试剂建议现用现配, 或配制后分装避光保存。避免反复冻融和长时间处于室温环境中。
3. 萤光素酶活性对温度比较敏感, 所以反应前细胞和检测试剂均需达到室温后再进行测定。
4. 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。
5. 本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅。
6. 本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩、手套、实验服并遵守生物实验室安全操作规程。

常见问题

1. 化学发光仪和荧光分光光度计有何不同?
荧光分光光度计检测的样品本身不能发光, 样品需要由特定波长的激发光激发, 然后才能产生荧光并被荧光分光光度计检测。化学发光仪检测的样品本身可以发光, 不需要激发光进行激发。也就是说化学发光仪是检测化学发光(萤光)的仪器。有些型号的荧光分光光度计也具有化学发光仪的功能, 即也可以检测化学发光。您所使用的荧光分光光度计能否用于化学发光的测定请仔细阅读该仪器的说明书。
2. 可以进行萤光素酶报告基因检测的仪器是否就可以用于本试剂盒的检测?
是。萤光素酶报告基因的检测原理和本试剂盒的原理相同, 可以用相同的仪器测定。