

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01058

产品介绍

真核基因表达调控研究常用的方法是进行报告基因的检测，生物发光法又是报告基因检测最常用的有效手段。萤光素酶能催化底物萤光素的转化，并发射出光子。该产品为萤火虫萤光素酶报告基因在哺乳动物细胞中的表达提供快速、灵敏、稳定的检测方法。能够检测最低 10-20 mol 的萤光素酶，在 10-14 至 10-20 mol 的酶浓度范围内呈很好的线性关系。

萤火虫萤光素酶分子量约 61 kDa 的蛋白，在 ATP、Mg²⁺ 和 O₂ 存在条件下，催化其底物甲虫萤光素氧化成氧化萤光素并发出波长是 560 nm 左右的萤光。海肾萤光素酶 (Renilla Luciferase) 是分子量约 36 kDa 的蛋白，在 O₂ 存在下，催化其底物腔肠素 (Coelenterazine) 氧化成 Coelenteramide 并放出波长 480 nm 左右的萤光。两种萤光均属于化学发光，可以用酶标仪的化学发光检测模块进行测定。检测原理见图 1。

DualFluo 萤火虫/海肾萤光素酶双检测试剂盒利用双报告基因检测的方式，其中一种报告基因（如海肾萤光素酶报告基因）可作为内对照，可有效排除因外部因素导致的误差，如细胞数量，细胞状态，移液体积，细胞裂解效率等，以实现实验数据的准确性和可靠性。本试剂盒主要可以应用于启动子、增强子、转录因子活性研究，miRNA 靶向研究，信号通路研究，蛋白质相互作用等。

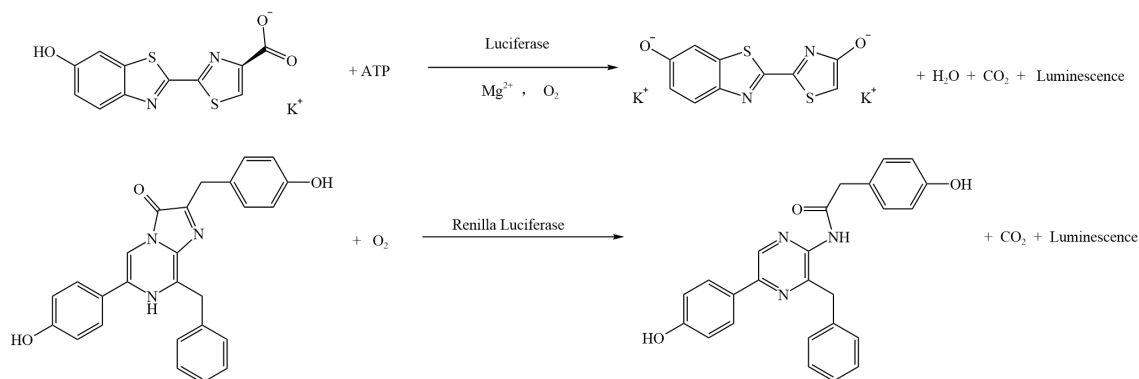


图 1 检测原理图

应用范围

启动子、增强子、转录因子活性研究、miRNA 靶向研究、信号通路研究、蛋白质相互作用

储运条件

-20℃避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

快速省时：细胞裂解在 10~15 min 内完成；

操作简便：试剂易于配制，样品检测步骤简单；

灵度高：能够检测最低 10-20 mol 的萤光素酶；

线性范围广：酶的浓度线性范围可达 8 个数量级。

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.萤火虫萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 560 nm，海肾萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 480 nm。请用化学发光 (Luminescence) 模块进行检测。
- 3.实验需要自备 PBS 试剂，若是植物样本还需自备磁珠，研钵，研磨棒，液氮。
- 4.本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品和药品，不得存放于普通住宅内。
- 5.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材
离心管
- 2.试剂
(1) $1 \times$ PBS (2) LB 培养基 (3) $1/2$ MS 培养基
- 3.仪器
(1) 微型振荡器 (2) 摇床 (3) 多功能酶标仪

操作步骤

1.前处理

(1) 细胞裂解

1) 将转入报告基因的细胞中的培养基移除，加入 PBS 轻轻洗涤（贴壁细胞可直接进行此操作，悬浮细胞要离心收集细胞）。充分裂解按如下方案加入 $1 \times$ 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 15 min，充分裂解细胞得到裂解产物。

细胞培养板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
裂解液体积	30 μ L	60 μ L	120 μ L	250 μ L	500 μ L

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

2) 将充分裂解后的裂解产物，10000~15000 rpm 离心 3~5 min，收上清。

(2) 叶片组织（以烟草叶片为例，仅供参考）

- 1) 构建相应的载体。
- 2) 挑取转化有重组质粒的农杆菌单菌落，接种到 2 mL LB 液体培养基（添加相应抗生素）中， 28°C ，220 rpm 培养过夜。
- 3) 农杆菌培养至 OD600 为 1.0， $1700 \times g$ 离心 5 min 收集菌体后，用 $1/2$ MS 液体培养基清洗菌体 2 次；用含有 150 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的 $1/2$ MS 液体培养基将农杆菌的 OD600 调至 1.0。
- 4) 将待检测的农杆菌菌液进行混合，使每种菌液的 OD600 为 0.5。
- 5) 选取生长期为 1 个月左右完全伸展的烟草叶片，将混合好的菌液用 1 mL 注射器（去掉针头）从烟草叶背面进行注射。为保证实验结果的一致性，需要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上，以保证相同的生长背景。
- 6) 正常温室生长条件下，24~48 h 即可取样观察。
- 7) 取 3~4 片直径为 6~8 mm 的叶盘，放入 2 mL 的 EP 管（提前放入 3~4 个小钢珠）中，液氮中冷冻，使用破碎仪进行研磨破碎（45 Hz，30 s）。破碎完全后在 EP 管中加入 100 μL $1 \times$ Lysis Buffer（用无菌水按 4:1 稀释 A 组分）。
- 8) 冰上孵育 5 min 左右，充分裂解叶片。
- 9) 10000~16000 rpm 离心 1 min，取上清。

2.工作液配制

- (1) 将所有组分恢复至室温。
- (2) 用 B 组分稀释 C 组分成 0.2 mg/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保存于 -20°C 。

- (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 μL E 组分加入到 49 μL 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 10 s，测定间隔为 2 s。
- (2) 每个样品测定时，取样品 20~100 μL （如果样品量足够，请加入 100 μL ；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 μL 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）。
- (4) 加入 100 μL 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）。

注：步骤 3~4 的化学发光为瞬时发光，请先打开酶标仪并设置好参数后，建议用排枪加入萤光素酶工作液，并立即进行检测。

- (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。

4.化学发光值检测

(1) 实验设计

根据实验目的，在每个培养板中都应设置对照组、实验组和空白对照组。为了保证实验准确性，理论上每个实验组（包括对照组）都应当减去空白对照组的萤火虫和海肾萤光素酶的发光测量值。

(2) 空白对照组

- 1) 背景 F：未转染细胞 + 萤火虫萤光素酶检测试剂。
- 2) 背景 R：未转染细胞 + 萤火虫萤光素酶检测试剂 + 海肾萤光素酶检测试剂。

注：空白对照组的样品量必须与实验样品量相同，包含与实验样品相同的培养基/血清组合，并加上完全相同的检测试剂。

- (3) 实验组：转染细胞经实验化合物处理（用于验证化合物对于某基因表达的影响）或者实验启动子或者转录因子（用于启动子活性或者转录因子活性的研究）等处理组，即实验组 F 和实验组 R。

- (4) 对照组：转染细胞不经任何化合物处理或者正常启动子或者转录因子，用以标准化结果，即对照组 F 和对照组 R。

(5) 计算结果：

- 1) 实验组比值 = (实验组 F-背景 F) / (实验组 R-背景 R) 。
- 2) 对照组比值 = (对照组 F-背景 F) / (对照组 R-背景 R) 。
- 3) 表达倍数 = 实验组比值 / 对照组比值。