Dualucif® Firefly & Renilla Assay Kit

（双萤光素酶报告基因检测试剂盒）

Dualucif® Firefly & Renilla Assay Kit

产品货号： F6075S，F6075M，F6075L

产品规格： 20T，100T，1000T

储存条件： -20℃保存，有效期见外包装

应用范围： 真核基因表达调控研究

产品特点

1. 快速：细胞裂解在 10-15 min 内完成。
2. 方便：试剂易于配制，样品检测步骤简单。
3. 灵敏：能够检测最低 10^{-20} mol 的萤光素酶。
4. 酶的浓度线性范围可达 8 个数量级。

产品组分

规格 / 组分	F6075S（20T）	F6075M（100T）	F6075L（1000T）
A. 5× Passive Luciferase Lysis Buffer	2 × 1 mL	10 mL	100 mL
B. Firefly Luciferase Assay Buffer	2 × 1 mL	10 mL	100 mL
C. D-Luciferin	0.4 mg	2 mg	20 mg
D. Renilla Luciferase Assay Buffer	2 × 1 mL	10 mL	100 mL
E. 50× Coelenterazine	40 μL	200 μL	2 × 1 mL

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。

实验步骤

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× Lysis Buffer(用无菌水按4:1稀释A组分)，然后将培养板放在微型震荡器上室温震荡15 min，充分

本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com

裂解细胞。

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

注：裂解产物可室温保存 6 h，-70℃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℃ 220 rpm 培养过夜。

（3）农杆菌培养至 OD600 为 1.0，1700×g 离心 5 min 收集菌体后，用 1/2MS 液体培养基清洗菌体 2 次；用含有 150 μ mol/L 乙酰丁香酮的 1/2MS 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 μ L 1× 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. 工作液配置

（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

（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× 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）。

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 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）。

（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。

本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com

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 560 nm，海肾萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 480 nm。

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.为了你的健康和安全，操作过程中务必穿戴实验服和一次性手套

本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com