

Dualucif® Firefly & Renilla Assay Kit (双萤光素酶报告基因检测试剂盒)

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 (Firefly Luciferase) 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 (Beetle Luciferin) 氧化成氧化萤光素 (Oxyluciferin) 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。

本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。

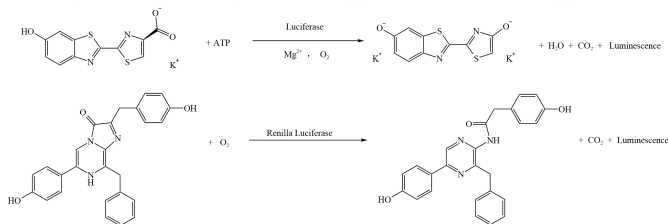


图 1 检测原理图

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。

产品货号

F6075S/F6075M/F6075L

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；

灵敏度：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。

产品组分

组分	F6075S (20 T)	F6075M (100 T)	F6075L (10 × 100 T)
A. 5 × Passive Luciferase Lysis Buffer	2×1 mL	10 mL	10×10 mL
B. Firefly Luciferase Assay Buffer	2 mL	10 mL	10×10 mL

组分	F6075S (20 T)	F6075M (100 T)	F6075L (10 × 100 T)
C. D-Luciferin	0.4 mg	2 mg	10×2 mg
D. Renilla Luciferase Assay Buffer	2×1 mL	10 mL	10×10 mL
E. 50 × Coelenterazine	40 μL	200 μL	10×200 μL

注：(1)E 组分易挥发，开封使用后请注意拧紧盖子和封好封口膜保存。

(2)C 组分用 B 组分配置成工作液后，避免反复冻融；若单次用量较少，建议分装保存于 -20℃。

(3)D 组分含有 ATP 组分，建议分装保存。D 组分稀释 E 组分配制成的工作液建议现配现用。

注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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×PBS (2)LB 培养基 (3)1/2MS 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×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 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 μmol/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，需要对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×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成小规格保存于-20℃。

(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)。

(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。

FAQ

1. 问：C 组分的颜色到底是无色还是黄绿色？

答：本底物是我们公司自主合成的,不同批次间存在批间差,这是正常现象。

2. 问：为什么试剂盒使用到最后,发现 E 组分不够？

答：E 组分易挥发,请每次使用完毕后尽快保存至-20℃密封保存,减少 E 组分的挥发。

3. 问：酶标仪的检测设置？

答：Luminescence, 350~700 nm, 建议检测时间设为 2~10 s。请注意不是吸光度 (Absorption) 板块。

4. 问：检测使用的板子应该怎么选择？

答：为防止孔间干扰,建议使用白色不透光孔板。黑色不透光孔板也可使用,但相较于白色不透光板测得的萤光值会低。

5. 问：双报告基因表达载体应该怎么选择？

答：(1)萤火虫报告基因质粒原则上含有 luc 基因就可以,但是不同实验所需的载体有一定差异,如果您要自己构建载体,要注意有些载体没有启动子,需要自行插入启动子,如 pGL3 Basic。

(2)海肾报告基因质粒尽量选择中等强度的启动子,如 TK 启动子等,不要选择强启动子 CMV、SV40 等。海肾基因的表达活性应显著高于背景组,同时不干扰萤火虫萤光素酶报告基因的表达。

(3)报告基因表达载体可选择分别带有萤火虫萤光素酶报告基因和海肾萤光素酶报告基因的两个表达载体共转染,若海肾萤光素酶作为内对照,构建对照载体,那么萤火虫萤光素酶作为实验组,构建实验载体,共转染时,实验载体:对照载体组合之比可以在 10: 1~100: 1 (或更大)是可行的。或者也可选择一个表达质粒(可同时表达萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶,但二者的表达分别由不同的启动子控制表达),选择表达量相对弱的作为内对照。

6. 问：怎么保证数据重复性和复孔误差？

答：(1)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,然后用排枪统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。

(2)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。

7. 问：荧光值过高是什么原因造成的? 该怎么解决?

答：(1)荧光值过高可能会超出仪器检测范围,从而检测不到值。

(2)减少质粒转染量。

(3)细胞样品裂解后,离心取上清后检测或对裂解产物进行稀释后检测。

(4)不建议通过减少底物量来降低荧光值,需要保证底物的饱和来反映萤光素酶真实的表达水平,否则会造成检测结果出现大的偏差。

8. 问：荧光值过低或无荧光值是什么原因造成的? 该怎么解决?

答：(1)萤光素酶的表达水平与启动子活性相关,正常表达水平下检测到的荧光值应在 10⁵ 数量级左右,若检测到的荧光值比较低或无荧光值,可从启动子活性、转染效率、检测过程这几方面进行考虑。

(2)转染效率低。

1)优化转染实验条件,用较易转染的质粒做阳性对照(如转染过表达萤光蛋白质粒);

2)确保转染 DNA 的质量,可通过酶切或琼脂糖凝胶电泳的方法对 DNA 质量进行鉴定;

3)选择活性较高,处于指数分裂期的细胞进行转染。

(3)启动子活性低或诱导失败。

1)转染后的细胞培养使用特异性诱导启动子的条件;

2)优化细胞的培养条件,提高萤光素酶的表达量;

3)更换强启动子(如 SV40、CMV)。

4)海肾荧光素酶基因作为内对照，其表达应不受时期、部位、环境影响，因此常用组成型表达的 TK 启动子。

(4)样品裂解效率低。

1)细胞培养时间不宜过长，12~36 h 内最好，长时间培养后，细胞可能会难裂解。

2)加入的裂解液需足量，保证细胞能够充分裂解。

(5)检测过程操作不规范。

1)选择合适的检测仪器，能够检测化学发光或者生物发光的仪器都适用于该实验；

2)需加入足量底物，保证底物的饱和，否则会造成检测结果出现很大偏差；

3)室温反应。反应时各个组分（细胞裂解产物，底物工作液等）都需要调整到室温；

4)荧光素酶的半衰期一般约 30 min，加完底物后可立即检测，尽量在 30 min 内完成。

(6)底物氧化失效。

1)底物避光密封保存，萤火虫荧光素酶底物-20℃保存；海肾荧光素酶底物推荐-20℃保存；

2)反应工作液建议现用现配。

同系列产品

产品货号	产品名称	选购指南
F6075	Dualuciferase® Firefly & Renilla Assay Kit (双萤光素酶报告基因检测试剂盒)	双报告基因检测，海肾作为内对照，结果更准确，实验重复性高
F6072	One-Step Firefly Luciferase Assay Kit (一步法萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒)	适合用于 ADCC，ADCP 活性检测，抗体筛选，抗体糖基化修饰
F6024	Firefly Luciferase Assay Kit (萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒)	真核基因表达调控研究，萤火虫化学发光检测
R6073	Renilla Luciferase Assay Kit (海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒)	真核基因表达调控研究，海肾化学发光检测

相关产品

产品货号	产品名称
L7003	LipoGene 2000 Plus 转染试剂 (高效款)
L7002	LipoGene 2000 Star 转染试剂 (低毒款)
D1009	D-Luciferin, Potassium Salt (D-萤光素钾盐)
D1010	D-Luciferin, Potassium Salt (D-萤光素钾盐，增强型)
D1007	D-Luciferin, Sodium Salt (D-萤光素钠盐)