



双荧光素酶报告基因检测试剂盒

(Dual-Lucy Assay Kit)

产品说明:

报告基因检测，是真核基因表达调控研究的常用方法。由于检测光量子的方法非常敏感，采用生物发光(bioluminescent)法，是报告基因检测最常用的有效手段。荧光素酶(luciferase)催化底物荧光素的转化，发射出光子。萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)和海肾荧光素酶(Ranilla luciferase)催化的发光反应，具有相似的光学特征和很好的浓度线性范围(7~8个数量级的线性范围)，酶的检测灵敏度达 10^{-18} mol到 10^{-20} mol，但两者催化的化学反应底物和最适反应条件完全不同。这两种荧光素酶配合形成了十分有效的双荧光素酶报告基因系统，其中Ranilla luciferase通常作为内参照。

本试剂盒提供了一体化形式的双荧光素酶检测系统。采用通用裂解缓冲液，适合于两种荧光素酶活性的保持，且与其他类型的报告基因检测和蛋白含量检测兼容；优化的两种酶反应体系，使每种发光反应持续数十分钟，以便于手工操作多个样品；并保证Firefly luciferase发光及时淬灭，不影响后续Ranilla luciferase的测定；优化的反应体系还使两种荧光素酶活性比值趋于合理的敏感范围，更有利于后续数据的比较。

产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
5x Universal Lysis Buffer (通用裂解液)	25 ml	-20℃
Fassay Buffer I (虫酶缓冲液)	10 ml	-20℃
Fassay Substrate I (虫酶底物)	0.5 ml	-20℃
Rassay Buffer II (海酶缓冲液)	10 ml	-20℃
Rassay Substrate II (海酶底物)	0.2 ml	-20℃

可作100次双荧光素酶检测。低温运输，-20℃或-80℃避光保存。有效期6个月。

所需其它试剂:

使用者需准备PBS、双蒸水等。

操作方法:

裂解细胞:

- 1) 新鲜配制裂解液：临用前，取适量5xUniversal Lysis Buffer (ULB)，用双蒸水稀释至1xULB，混匀。1xULB可在4℃存放数周。
- 2) 细胞清洗：倾去培养板/皿中的培养液，加入足量PBS，轻轻洗涤细胞。完全倾去洗涤液。
- 3) 细胞裂解：推荐按照表中的体积，在孔/皿中加入1xULB，混匀。培养板可在微型振荡器上震荡5~10 min；培养皿可直接用细胞刮刀刮下细胞，将细胞悬液移入1.5 ml

离心管，在涡旋振荡器上充分混悬震荡30秒。裂解细胞悬液可直接用于发光测定，也可离心30秒，取上清做发光测定。

配制发光反应液:

测定前，在室温待Fassay Buffer I、Fassay Substrate I和Rassay Buffer II溶化，混匀（注意避光）。按20/1比例用Fassay Buffer I稀释Fassay Substrate I，按50/1比例用Rassay Buffer II稀释Rassay Substrate II，分别配制所需体积的Fassay Reagent I和Rassay Reagent II（注意避光）。

测定仪器的设置:

按仪器操作说明开启发光测定仪。手动操作型仪器，将测读时间设为10~20秒。自动操作型仪器，一般将测定延迟设为2秒，将测读时间设为10~20秒，Fassay Reagent I和Rassay Reagent II的注入体积设定为100 μ l。

手动发光测定:

取待测样品20 μ l加入测量管底部，取Fassay Reagent I 100 μ l加入管底部，轻轻敲击管壁3~5次混匀，放入仪器中立即测定，记录发光值为Firefly luciferase的发光单位(RLU)；取Rassay Reagent II 100 μ l加入管底部，轻轻敲击管壁3~5次混匀，放入仪器中立即测定，记录发光值为Ranilla luciferase的发光单位(RLU)。如用多孔板同时手动测定多个样品，则将各待测样品20 μ l分别加入连续的各孔底部，用多道加样器于各孔底加入Fassay Reagent I 100 μ l，轻轻敲击板侧3~5次混匀，放入仪器中立即测定，记录发光值为Firefly luciferase的发光单位(RLU)；取Rassay Reagent II 100 μ l立即加入管底部，轻轻敲击板壁3~5次混匀，放入仪器中立即测定，记录发光值为Ranilla luciferase的发光单位(RLU)。

自动发光测定:

配制好的Fassay Reagent I和Rassay Reagent II置于测定仪内并连接好对应管道，Fassay Reagent I接第一注射管道，Rassay Reagent II接第二注射管道。各待测样品20 μ l分别加入测定管/板孔底部，启动自动测量程序。记录Firefly luciferase和Ranilla luciferase的发光单位(RLU)。

注意事项:

- 1) Fassay Buffer I和Fassay Substrate I应避免反复冻融，可分装成合适体积分次使用。Rassay Substrate II溶液应盖严存放，避免蒸发。配制好未用完的Fassay Reagent I和Rassay Reagent II可在-20 $^{\circ}$ C保存1月左右。
- 2) 细胞裂解液一般在当天测定。如需隔日测定，应将样品于-20 $^{\circ}$ C保存。长期保存应在-80 $^{\circ}$ C。测定样品量可为10~30 μ l。
- 3) 用多孔板同时手动测定多个样品时，要尽量保证每个样品的两种试剂加入时间间隔一致。
- 4) Rassay Reagent II可用于直接测定样品的Ranilla luciferase。需要注意的是，Rassay Reagent II直接测量的RLU要比双荧光素酶顺序检测获得的RLU高一些（反应体积等因素的影响）。

表：不同容器细胞所需1xULB的体积。

96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	35 mm平皿	60 mm平皿
30 μ l	60 μ l	120 μ l	250 μ l	500 μ l	500 μ l	1000 μ l