



海肾荧光素酶检测试剂盒

(Ren-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。海肾荧光素酶(Renilla luciferase)催化的发光反应，具有很好的浓度线性范围(7~8个数量级的线性范围)，酶的检测灵敏度达到 10^{-18} mol。本试剂盒采用通用裂解缓冲液，能与其他类型的报告基因检测和蛋白含量检测兼容；可与Fire-Lucy Assay Kit共同使用进行一体化的双荧光素酶检测。

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°C
Rassay Buffer (海酶缓冲液)	10 ml	-20°C
Rassay Substrate (海酶底物)	0.2 ml	-20°C

可作100次荧光素酶检测。低温运输，-20°C或-80°C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°C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分钟；培养皿可直接用细胞刮刀刮下细胞，将细胞悬液移入1.5ml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Rassay Buffer溶化，混匀。按50/1比例用Rassay Buffer稀释Rassay Substrate，配制所需体积的Rassay Reagent（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，Rassay Reagent的注入体积设定为100 μ l。

手动发光测定:

取待测样品20 μl 加入测量管底部，取Rassay Reagent 100 μl 立即加入管底部，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 μl 分别加入连续的各孔底部，用多道加样器于各孔底加入Rassay Reagent 100 μl ，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Ranilla luciferase的发光单位(RLU)。

自动发光测定:

配制好的Rassay Reagent置于测定仪内并连接好对应管道。各待测样品20 μl 分别加入测定管/板孔底部，启动自动测量程序。记录Ranilla luciferase的发光单位(RLU)。

注意事项:

- 1) Rassay Substrate溶液应盖严存放，避免蒸发。
- 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。长期保存应在-80 $^{\circ}\text{C}$ 。测定样品量可用10~30 μl 。
- 3) 用多孔板同时手动测定多个样品时，要尽量缩短样品间试剂加入的时间间隔。
- 4) Rassay Reagent可与Fire-Lucy Assay Kit共同使用进行一体化的双荧光素酶检测。需要注意的是，Rassay Reagent直接测量的RLU要比双荧光素酶顺序检测获得的RLU稍高（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
50 μl	80 μl	150 μl	250 μl	500 μl	500 μl	1000 μl