

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

I. 产品描述

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 是一种分子量约为61 kDa 的蛋白, 在ATP、辅酶A、镁离子和氧气存在的条件下, 能够催化萤光素 (luciferin) 氧化成oxyluciferin, 在 luciferin 氧化的过程中会发出波长为560 nm左右的生物荧光。海肾萤光素酶 (Renilla luciferase) 是一种分子量约为36 kDa的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化腔肠 (coelenterazine) 氧化成 coelenteramide, 在氧化的过程中会发出波长为480 nm左右的生物荧光。两种生物荧光都可通过化学发光仪进行测定。Renilla Luciferase 作为内参, 来消除细胞数量、转染效率等的差异。Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit 首先以萤光素为底物来检测萤火虫萤光素酶报告基因的活性, 之后在淬灭该萤光反应的同时, 以腔肠素为底物检测海肾萤光素酶报告基因的活性。该试剂盒具有灵敏度高的特点。

II. 产品组分

组分	产品规格 (50T)
萤火虫萤光素酶检测试剂 (Reagent A)	5 ml
海肾萤光素酶检测试剂 (Reagent B)	5 ml

III. 运输和保存方式

1. 干冰运输。-20℃保存, 有期限1年。
2. 萤火虫萤光素酶反应工作液和海肾萤光素酶反应工作液不能反复冻融, 建议-20℃或-80℃分装保存。

IV. 实验步骤

1. 细胞样品前处理

1) 细胞转染 (转染步骤参照相关的说明书)

2) 加入细胞裂解液, 充分裂解细胞

①对于贴壁细胞, 吸去细胞培养液, 按照比例加入细胞裂解液, 轻轻旋转培养皿或者培养板使裂解液完全覆盖细胞;

②对于悬浮细胞, 离心弃去上清, 按照比例加入裂解液。

细胞培养板	6 孔板	12 孔板	24 孔板	48 孔板	96 孔板
每孔裂解液加入量	500μL	300μL	200μL	150μL	100μL

3) 孵育5min, 充分裂解细胞, 将裂解液吸入1.5ml 离心管。

4) 13000rpm 离心5min, 取上清备用。

2. 荧光检测

1) 打开荧光检测仪, 测定参数, 测定时间为10sec, 测定间隔2sec。

2) 取20μL 裂解上清液加入不透光白色酶标板中 (96 孔), 接着加入100μL 萤火虫萤光素酶检测试剂 (Reagent A), 充分混匀后测定RLU (Relative light unit)。

3) 取100μL 裂解上清液加入不透光白色酶标板中 (96 孔), 测定海肾萤光素酶活力 (Reagent B) (检测光波长 480 nm)

4) 数据分析: 样品荧光虫荧光值RLU/对应样品海肾萤光素值

