

Dual Luciferase Reporter Assay Kit {双荧光素酶报告基因检测试剂盒}

货号：BRK0044

规格：100 T

◆ 产品简介

双荧光素酶报告基因检测试剂盒用于通过报告质粒转染细胞后检测 Luciferin 底物荧光强度以反映 Luciferase 表达量的方法，检测基因调控作用。先以萤光素（Luciferin）为底物检测萤火虫萤光素酶（Firefly luciferase），后以腔肠素（Coelenterazine）为底物检测海肾萤光素酶（Renilla luciferase），实现双荧光素酶报告基因检测。双荧光素酶报告基因检测试剂盒可灵敏高效地检测受基因元件调控的 Luciferase 表达，通常将转录调控元件克隆于 Luciferase 的上游，或把 3'UTR 调控区克隆于 Luciferase 下游，转染细胞后进行相应的刺激物诱导，裂解细胞并测定萤光素酶活性。通过萤光素酶活性评价调控元件受刺激物诱导的作用强弱。Renilla luciferase 的作用为校正转染效率的内参，以消除孔间细胞数量和转染效率的差异。

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格（100 T）	保存条件
BRK0044-1	5 × Passive Luciferase Lysis Buffer	10 ml	-20℃
BRK0044-2	Firefly Luciferase Assay Buffer	10 ml	-20℃
BRK0044-3	D-Luciferin	2 mg	-20℃，避光
BRK0044-4	Renilla Luciferase Assay Buffer	10 ml	-20℃，避光
BRK0044-5	50 × Coelenterazine	200 µl	-20℃，避光

◆ 保存条件

-25 ~ -15℃避光保存，有效期 18 个月。

◆ 自备材料

1 × PBS，移液器或排枪，白色不透光酶标板，荧光检测仪（luminometer）或全波长酶标仪。植物样本还需自备磁珠，研钵，研磨棒，液氮。

◆ 使用指南

1. 使用前按 1:4 的比例将 5 × Passive Luciferase Lysis Buffer 与无菌水充分混合，置于冰上备用。

2. 使用前将 D-Luciferin 粉末瞬时离心至管底，使用 Firefly Luciferase Assay Buffer 充分溶解 D-Luciferin，配制成 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避免反复冻融，若单次实验用量较少，建议按使用需求分装并避光保存于-80℃）。

3. 使用前用 Renilla Luciferase Assay Buffer 将 50 × Coelenterazine 稀释成 1 × 海肾萤光素酶工作液（注：海肾萤光素酶工作液建议现用现配）。

4. 50 × Coelenterazine 组分易挥发，请每次使用完毕后尽快密封保存（封口膜）至-20℃，以减少组分的挥发损失。

◆ 实验流程

1. 样本处理

1.1 细胞样本

吸弃细胞培养基，用 PBS 轻柔洗涤两次（贴壁细胞可直接进行此操作，悬浮细胞需要离心收集细胞），按下表建议加入适量 1 × Passive Luciferase Lysis Buffer，室温静置或振摇裂解 15 min，吹打并吸取细胞裂解产物至 1.5 ml 离心管中，12,000 g 常温离心 3 min，取上清用于后续检测。

细胞培养板	1 × Passive Luciferase Lysis Buffer
96 孔板	30 μl
48 孔板	60 μl
24 孔板	120 μl
12 孔板	250 μl
6 孔板	500 μl

注：①如果荧光素酶的表达水平过低，可适当减少裂解液的使用量以提高蛋白浓度；②裂解产物可室温保存 6 h，长期存放需置于-80℃（裂解产物应避免多次反复冻融）。

1.2 植物样本（以烟草叶片为例）

a. 构建相应的载体。

b. 挑取转化有重组质粒的农杆菌单菌落，接种到 2 ml 的 LB 液体培养基（添加相应的抗生素）中，28℃、220 rpm 培养过夜。

c. 将农杆菌培养至 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。

- d. 将待检测的农杆菌菌液进行混合，使每种菌液的 OD₆₀₀ 为 0.5。
- e. 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 1ml 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。
- f. 正常温室生长条件下，24-48 h 即可取样观察。
- g. 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 的 1 $\times$ Passive Luciferase Lysis Buffer。
- h. 置于冰上孵育 5 min 左右，充分裂解叶片。
- i. 10000-16000 rpm 离心 1 min，取上清检测。

2. Firefly Luciferase 反应检测

小心吸取 20-100 μ l 裂解上清至检测管或酶标板孔中，将 100 μ l 平衡至室温的萤火虫萤光素酶工作液加入检测管或酶标板中，迅速混匀后立即于荧光检测仪（luminometer）或酶标仪中检测 Firefly luciferase 报告基因活性。

注：对于加入裂解液的体积，如果样品量充足，则可加入 100 μ l；如果样品量不足，则可适当减少用量，但同批检测样品的使用量需保持一致。同时，加入等体积的 1 $\times$ Passive Luciferase Lysis Buffer 作为空白对照。

3. Renilla Luciferase 反应检测

在以上反应液中加入 100 μ l 平衡至室温的 1 $\times$ 海肾萤光素酶工作液，迅速混匀后立即于荧光检测仪（luminometer）或酶标仪中检测 Renilla luciferase 报告基因活性。

◆ 注意事项

1. 由于温度对酶反应的影响较大，因此，测定时样品和试剂均需恢复至室温后再进行检测。
2. **双萤光素酶报告基因载体的选择：**①萤火虫报告基因质粒原则上需含有 luc 基因，但不同实验所需的载体具有一定差异性，如果要构建载体，需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对照组，同时不干扰萤火虫萤光素酶报告基因的表达。
3. **检测操作注意事项：**①预先设置好酶标仪检测程序，再进行加样。程序设置选择“化学发光/luminescence/LUM/全波长，不要选择某一波长检测；②使用排枪进行加样，加样时间最好不要超过 90 s。裂解液可以预先放入酶标板中，设置好程序后使用排枪加入酶反应工作液。
4. **荧光值低：**①转染效率与表达效率：建议做预实验优化转染条件，如增加细胞用量，优化转染试剂的用量、质粒的用量和比例、细胞密度、试剂和质粒的混合孵育时间，建议在质粒上加 GFP 作为转染效率验证；可以适当减少裂解液

用量来提高蛋白浓度，同时设置多个复孔，减少因低浓度造成的孔间差异。②加样速度/即加即检：本产品为闪光型检测试剂盒，加样完成后，需立即检测。建议提前设置好检测程序（化学发光/luminescence/全波长）。

5. **检测板材的选择**：黑色板材吸光，容易导致检测的荧光值偏低；透明板材容易发生光泄露，导致检测的读值不准确。因此，建议使用不透光的白色酶标板进行检测。

6. **luciferase 和 Renilla 质粒转染的比例**：luciferase 和 Renilla 质粒转染的比例一般为 10:1，luciferase 质粒转染量根据转染试剂说明书和相关文献确定，可以根据预实验具体情况合理调整比例，预实验建议萤火虫载体和海肾载体比例分别用 10:1、20:1、50:1、100:1，即萤火虫荧光素酶检测的发光值需大于海肾荧光素酶的发光值。

7. **实验数据处理**：相对荧光素酶活性= $\frac{\text{实验组萤火虫荧光素酶活性 (F)} - \text{空白组萤火虫荧光素酶活性 (F)}}{\text{实验组海肾荧光素酶活性 (R)} - \text{空白组海肾荧光素酶活性 (R)}}$