ZETA Life Biotechnology Co., Ltd
3443 S GALENA ST STE 300 DENVER CO 80231 US
Tel: (+1) 85524513675、email: info@zeta-life.com、www.zeta-life.com

ZETA life®

双萤光素酶报告基因检测试剂盒

包装规格

产品货号：ZT10007

规格：100T

储存条件

-20°C 避光保存，一年有效

产品介绍

双萤光素酶报告基因检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit)，是先以萤光素(luciferin)为底物来检测萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase)，后以肠腔素(coelenterazine)为底物来检测海肾萤光素酶(Renilla luciferase)，并且在后续加入海肾萤光素酶底物时，同时加入抑制萤火虫荧光素酶催化 luciferin 发光的物质，使后续检测仅仅检测到海肾萤光素酶的活性，实现双萤光素酶报告基因检测。

萤火虫萤光素酶是一种分子量约为 61kD 的蛋白，在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下，可以催化 luciferin 氧化成 oxyluciferin，在 luciferin 氧化的过程中，会发出生物萤光(bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量约为 36kD 的蛋白，在氧气存在的条件下，可以催化 coelenterazine 氧化成 coelenteramide，在 coelenterazine 氧化的过程中也会发出生物萤光。生物萤光可以通过化学发光仪(luminometer)或液闪测定仪进行测定。本试剂盒的检测原理参考图 1.

双萤光素酶报告基因检测试剂盒为检测基因的表达量提供有效的手段，在 DLR 检测中，萤火虫萤光素酶（Firefly luciferase）和海肾萤光素酶（Renilla luciferase）的活性可在单个样品中依次检测。先以萤光素（Luciferin）为底物来检测萤火虫萤光素酶的活性，然后加入抑制萤火虫萤光素酶催化的物质，同时加入腔肠素（Coelenterazine）检测海肾萤光素酶的活性，实现双萤光素酶报告基因检测。通过萤光素酶和其底物这一生物发光体系，可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。通常把感兴趣基因的转录调控元件或 5' 启动子区克隆在 Luciferase 的上游，或把 3'-UTR 区克隆在 Luciferase 的下游，构建成报告基因（Reporter gene）质粒，然后转染细胞，用适当药物等处理细胞后裂解细胞，通过检测萤光素酶活性的高低来判断药物处理等对目的基因的转录调控作用。海肾萤光素酶更多地被用作检测转染效率的内参，以消除细胞数量和转染效率的差异。

萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的最强发光波长为 560nm。海肾萤光素酶催化 coelenterazine 发光的最强发光波长为 465nm。

本试剂盒的光信号可以通过化学发光仪、酶标仪或液闪测定仪进行测定。该试剂盒具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广，无细胞内源活性干扰等特点。

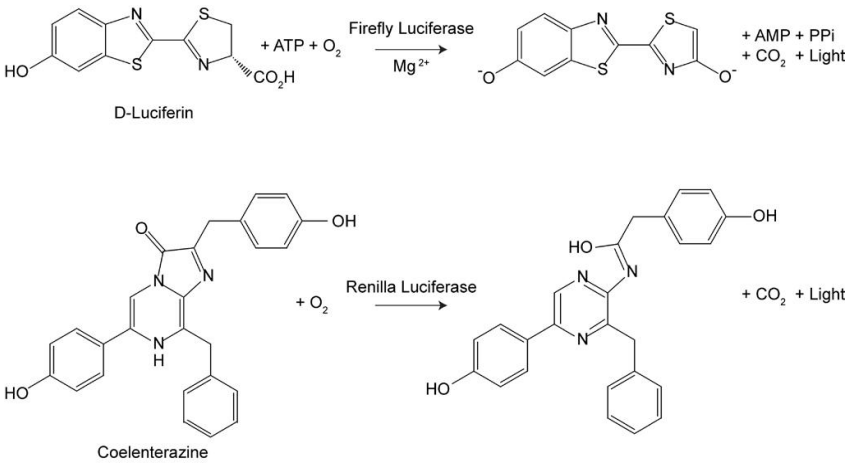

Figure 1. Bioluminescent reactions catalyzed by firefly luciferase and *Renilla* luciferase.

试剂盒组份：

Cat No	Product Name		Size
ZT10007	双萤光素酶报告基因检测试剂盒		100T
Cat No	**Components**	**Quantity**	**Storage**
ZT10007-A	1X Passive Luciferase Lysis Buffer	10ml	-20°C Protect from light 1 year
ZT10007-B	Firefly Luciferase Assay Buffer	10ml	-20°C Protect from light 1 year
ZT10007-C	D-Luciferin	2mg	-20°C Protect from light 1 year
ZT10007-D	Renilla Luciferase Assay Buffer	10mL	-20°C Protect from light 1 year
ZT10007-E	Coelenterazine	400ug	-20°C Protect from light 1 year

保存条件：

最好在-20℃保存。将 C 组分溶解到 B 组分后，该混合液不可反复冻融，建议进行小批量分装，并于-20℃(最长可储存 6 个月)条件下储存。Renilla Luciferase Assay solution（D+E）应新鲜配制，当天使用。

使用方法：

1.裂解细胞：

将报告基因细胞裂解液充分混匀后，按如下方式加入报告基因细胞裂解液，充分裂解细胞。

1.1) 对于贴壁细胞：吸尽细胞培养液后，参考下表加入适量的报告基因细胞裂解液；对于悬浮细胞：离心去上清后，参考下表加入适量报告基因细胞裂解液。

Cell Culture Plate	96-well plates	48-well plates	24-well plates	12-well plates	6-well plates
Lysis Buffer (A) uL/per well	20uL	65uL	100uL	250uL	500uL

注：裂解产物可室温保存 6 h，-70℃可长期存放(裂解产物不能反复冻融);

注：如果萤光素酶的表达水平比较低，可以尝试使用更少的裂解液，例如 6 孔板的每孔用量可以最小为 100 微升。

1.2) 充分裂解后，10,000-15,000g 离心 3-5 分钟，取上清用于测定。

注：细胞裂解后可以立即测定萤光素酶，也可以先冻存，待以后再测定。冻存样品需融解，并达到室温后再进行测定。

1. Preparation of Firefly Working Solution

2.1) 将所有组分恢复至室温。

2.2) 配置 10 mg/mL D-luciferin 储存液。2mg 组份 C 溶解在 200uL 超纯水中。储存液-20℃可以储存 6 个月反复冻融 5 次。

2.3) 工作液配置 ：用组分 B 按照 1:50 稀释以上 D-luciferin 储存液，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不能反复冻融超过 5 次，若单次实验用量较少，建议按单次使用量分装成小规格。

2. Preparation of Renilla Working Solution

3.1) 将所有组分恢复至室温。

3.2) 配置 2 mg/mL Coelenterazine 储存液。400ug 组份 E 溶解在 200uL **乙醇**中。储存液-80℃可以储存 6 个月反复冻融 5 次。

3.3)工作液配置 :用组分 D 按照 1:50 稀释以上 coelenterazine 储存液 ,配制成 0.04 mg/mL 的 1x coelenterazine 工作液。

注：1×Coelenterazine 工作液现配现用，配置后在 3 小时内使用。

3. 化学发光值检测

4.1) 按仪器操作说明书开启具有检测化学发光功能的仪器如酶标仪。

4.2) 每个样品测定时，取样品 20-100uL(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。

4.3) 加入 100uL 萤火虫萤光素酶检测液，用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit) 值。

注：由于该发光为瞬时发光，建议加入萤火虫萤光素酶工作液后，立即进行检测。

4.4) 加入 100uL 1× Coelenterazine 工作液，用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit) 值。

4.5)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。

注意事项:

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。

3 本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。

4) 本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！

仅供科学研究使用，禁止用于它用