



Dual-Luciferase Reporter Assay Kit

CP101

产品概述

Product Overview

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 和海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 可分别催化荧光素 (Luciferin) 和腔肠素 (Coelenterazine) 氧化形成 Oxyluciferin 和 Coelenteramide, 并在此过程中产生生物荧光。本试剂盒先以荧光素为底物检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性, 之后在淬灭该荧光反应的同时, 以腔肠素为底物检测海肾荧光素酶报告基因的活性, 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。

产品组成

Product Composition

组 分	CP101 100 rxns
5 × Passive Luciferase Lysis Buffer	10 mL
Firefly Luciferase Assay Buffer* ¹	10 mL
D-Luciferin* ¹	2 mg
Renilla Luciferase Assay Buffer	10 mL
50 x Coelenterazine* ²	200 μL

*1. 当使用 Firefly Luciferase Assay Buffer 将 D-Luciferin 配制成工作液后, 要避免对其进行反复冻融。倘若单次使用量较少, 建议将其分装后, 存放于 -20°C 的冰箱中保存。

*2. 该组分具有较强的挥发性, 开封使用后, 务必及时拧紧盖子, 并使用封口膜严密封, 以防挥发, 确保保存效果。

注意事项

Precautions

1. 萤火虫荧光素酶所催化生物发光的最强波长处于 560 nm, 海肾荧光素酶催化生物发光的最强波长则是 480 nm, 检测时, 请采用化学发光 (Luminescence) 模块进行操作。
2. 在开展实验前, 请先对产品进行瞬时离心操作, 使内容物沉降于管底, 再进行后续步骤。
3. 海肾荧光素酶检测工作液配制完成后, 建议即刻使用, 以确保最佳检测效果。若因特殊情况无法马上使用, 可将其存储于 -20°C 的环境中, 但其保存期限仅为一周。随着保存时长增加, 检测灵敏度和准确性会逐步降低, 所以, 为避免对实验结果产生不利影响, 请勿将其配制成工作液后长期存放。
4. 酶促反应受温度影响较大, 在加样检测前, 务必将所有试剂放置室温环境 (20 ~ 25°C), 待其温度平衡后再使用。为有效避免孔间干扰, 推荐使用白色不透光孔板。黑色不透光孔板也能够用于实验, 但与白色不透光板相比, 使用黑色板测得的荧光值会偏低。
5. 本实验需自行准备 PBS 试剂, 若是处理植物样本, 还需提前准备好研钵、研磨棒、磁珠以及液氮。

操作流程

Operation Process

◆ 前处理

1. 细胞裂解

- ① 将细胞中的培养基移除。对于贴壁细胞, 可直接加入 PBS 轻柔地洗涤; 而悬浮细胞, 则需要通过离心的方式收集后, 再加入 PBS 轻柔地洗涤细胞。
- ② 按照如下配比准备裂解液: 将 5 × Passive Luciferase Lysis Buffer 与无菌水以 1: 4 的比例进行稀释, 从而得到 1 × Lysis Buffer。随后, 向细胞中加入配好的裂解液, 把培养板放置在微型震荡器上, 在室温环境下持续震荡 15 min。通过这样的操作, 使细胞得到充分裂解, 获取细胞裂解产物。

细胞培养板	裂解液体积
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：裂解产物可室温保存 6h，-70℃可长期存放（裂解产物不能多次反复冻融）；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。

③ 将充分裂解后的裂解产物，10000 ~ 15000 rpm 离心 3 ~ 5 min，取上清作为待测样品。

2. 叶片组织 (以烟草叶片为例，仅供参考)

① 构建相应的载体。

② 在无菌条件下，用接种环挑取已转化重组质粒的农杆菌单菌落，接入含对应抗生素的 2 mL LB 液体培养基里，将培养基置于摇床，28℃、220 rpm 培养过夜。

③ 农杆菌培养至 OD600 值为 1.0，1700 g 离心 5 min 收集菌体，用 1/2 MS 液体培养基清洗菌体 2 次，弃上清，用含 150 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的 1/2 MS 液体培养基重悬菌体，调节 OD600 值到 1.0。

④ 将待检测的农杆菌菌液进行等比例混合，使每种菌液的 OD600 值均为 0.5。

⑤ 挑选生长约 1 个月、已完全舒展的烟草叶片，取去掉针头的 1 mL 注射器，吸取混合均匀的菌液，从烟草叶片背面缓缓注射。为确保实验结果精准可靠，将对照载体菌液与待检测目标载体菌液，分别注射在同一片烟草叶的不同部位，使两者处于完全相同的生长环境，减少外界因素干扰。

⑥ 正常温室生长条件下，24 ~ 48 h 即可取样观察。

⑦ 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，液氮中冷冻，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 μL 1 $\times$ Lysis Buffer (将无菌水与 5 $\times$ Passive Luciferase Lysis Buffer 按 4:1 体积比稀释，得到 1 $\times$ Lysis Buffer)。

⑧ 冰上孵育 5 min 左右，充分裂解叶片。

⑨ 10000 ~ 16000 rpm 离心 1 min，取上清。

◆ 工作液配制

1. 将所有组分恢复至室温。

2. 用 Firefly Luciferase Assay Buffer 溶解 D-Luciferin 成 0.2 mg/mL 的萤火虫荧光素酶工作液。

注：萤火虫荧光素酶工作液不能反复冻融，若单次实验用量较少，建议按单次使用量分装成小规格保存于 -20℃。

3. 用 Renilla Luciferase Assay Buffer 按比例将 50 $\times$ Coelenterazine 稀释成海肾荧光素酶工作液，稀释方法为将 1 μL 50 $\times$ Coelenterazine 加入到 49 μL Renilla Luciferase Assay Buffer 中。

注：海肾荧光素酶工作液现用现配。

◆ 化学发光值检测

1. 按照仪器操作说明书开启具有检测化学发光功能的仪器，如多功能酶标仪，设定参数，测定时间为 10 s，测定间隔为 2 s，提前预热 20 min 以上。

2. 每个样品测定时，取样品 20 ~ 100 μL (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 $\times$ Lysis Buffer 为空白对照。

3. 加入 100 μL 萤火虫荧光素酶工作液，测定 RLU (Relative Light Unit) 值 (建议酶标仪设置 Shaking 混匀功能)。

4. 加入 100 μL 海肾荧光素酶工作液，测定 RLU (Relative Light Unit) 值 (建议酶标仪设置 Shaking 混匀功能)。

注：步骤 3 ~ 4 的化学发光为瞬时发光，请先打开酶标仪并设置好参数后，建议用排枪加入荧光素酶工作液，并立即进行检测。

5. 在以海肾荧光素酶为内参的情况下，用萤火虫荧光素酶测定得到的 RLU 值除以海肾荧光素酶测定得到的 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 (如果以萤火虫荧光素酶为内参，也可以进行类似计算)。

保存条件

-30 ~ -15℃保存，避光保存，干冰运输。保质期 18 个月