

EZ-Luc Dual-Glow Luciferase Assay Kit

说明书

Cat. No.: EZB-DL1

一、产品简介

EZ-Luc Dual-Glow Luciferase Assay Kit是一款双报告基因检测试剂盒，具有灵敏度高、发光信号稳定的特点，可以对萤火虫荧光素酶（Firefly luciferase）和海肾荧光素酶（Renilla luciferase）在哺乳动物细胞中的表达进行高通量检测。萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶可分别催化荧光素（luciferin）或腔肠素（coelenterazine）氧化形成oxyluciferin或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的活性，然后终止萤火虫荧光素酶的催化反应，并同时以腔肠素为底物检测海肾荧光素酶的活性，实现双荧光素酶报告基因检测。

EZ-Luc Dual-Glow Luciferase Assay Kit可高效地检测受特定基因的调控元件调控的luciferase的表达。通常可根据需要将转录调控元件（Promoter等）构建克隆于luciferase基因编码区的上游，或将3'-UTR调控区克隆于luciferase基因编码区的下游，与待测的上下游调控基因的质粒及Renilla luciferase质粒共转染细胞，或转染后加入相应的药物进行处理，裂解细胞并检测荧光素酶活性。通过检测荧光素酶的活性，评价调控元件受特定蛋白或药物的调控作用的强弱。其中Renilla luciferase的作用为校正转染效率的内参，以消除不同孔间细胞数和转染效率的差异。萤火虫荧光素酶催化luciferin的发光波长为560 nm，海肾荧光素酶催化coelenterazine的最强发光波长为465 nm。

二、产品组分

组分	货号（规格）	EZB-DL1-01 (100 Rxns)	EZB-DL1-02 (1000 Rxns)
Firefly Luciferase Assay Reagent		10 ml	100 ml
Stop & Reaction Buffer		10 ml	100 ml
Renilla Luciferase Substrate (100×)		100 µl	1 ml

注：对于 EZB-DL1-01：足以在 96 孔板中进行 100 次 assays；或 384 孔板中进行 400 次 assays；对于 EZB-DL1-02：足以在 96 孔板中进行 1000 次 assays；或 384 孔板中进行 4000 次 assays。

三、保存条件

本产品需用干冰运输，未拆封的试剂盒于-20℃可保存 2 个月，-80℃可保存 1 年。过期日期详见产品标签中有效期信息。配制好 Renilla Luciferase Substrate 工作液后，建议将其按使用需求分装并避光保存于-80℃，可稳定进行 10 次冻融，活性损失小于 10%。

四、自备材料

具有发光检测（Luminescence）模块的多功能酶标仪或荧光检测仪（luminometer）、适合于发光检测的标准不透明壁多孔板（贴壁处理的无菌板，建议优先使用白色酶标板）、多孔板振板装置、单通道或者多通道移液器、水浴锅、PBS。

五、操作步骤

1. 试剂准备

1.1 Renilla Luciferase Substrate 溶解于无水乙醇中，首次使用时请短暂离心，小心量取管内溶液体积，如发现液体体积有明显减少，请加入无水乙醇补足体积后保存。

1.2 配制 Renilla Luciferase Substrate 工作液：使用时将 Renilla Luciferase Substrate 置于冰上暂存，计算实际使用量，以 100:1 的比例将适量的 Stop & Reaction Buffer 和 Renilla Luciferase Substrate 上下颠倒 20 次充分混匀，室温（15 ~ 25°C）避光备用。

1.3 酶促反应对温度较为敏感，因此加样检测前需将 Firefly Luciferase Assay Reagent 和 Renilla Luciferase Substrate 工作液均平衡至室温后使用。

2. 细胞裂解及 Firefly luciferase 反应检测

建议 96 孔板培养的细胞中的培养基为 75 μ l，然后每个孔加入 75 μ l 平衡至室温的 Firefly Luciferase Assay Reagent，室温摇床混匀 5 ~ 10 min，然后在多功能酶标仪或荧光检测仪（luminometer）中检测 Firefly luciferase 报告基因活性（使用 384 孔培养板时，建议每个孔的培养基用 20 μ l，检测前加入 20 μ l Firefly Luciferase Assay Reagent）。

3. Renilla Luciferase 反应检测

上述检测结束后，取出 96 孔板，直接在每个反应孔中加入 75 μ l 新鲜配制的 Renilla Luciferase Substrate 工作液，置于水平摇床混匀 1 ~ 2 min，立即在多功能酶标仪或荧光检测仪中检测 Renilla luciferase 报告基因活性（使用 384 孔培养板时，建议每个孔加入 20 μ l 新鲜配制的 Renilla Luciferase Substrate 工作液）。

六、注意事项

1. 不同的细胞株的最适裂解时间可能不同，建议裂解 5 ~ 10 min 以得到更充分的裂解效果。裂解完成后吹打细胞不宜过久，以防产生大量泡沫影响酶活性。
2. 如果体系中荧光素酶表达量较低，可适当减少 Firefly Luciferase Assay Reagent 用量以提高蛋白浓度。同时应增加检测复孔的数量，以减少低浓度表达造成的孔间差异，确保结果的可靠性。
3. 通常加入 Renilla Luciferase Substrate 工作液后对上一步 Firefly luciferase 的抑制可达到 99% 以上，但可能残留微量活性，因此在转染时需将 Renilla luciferase 的表达量控制在其 RLU 读值与 Firefly luciferase 相当或略高的水平。
4. 检测仪器选择：能够检测化学发光的仪器都适用于本试剂盒的检测，但针对同样样品，不同检测仪器的本底信号值和测量值均可能不同，因此需在预实验中检测仅加入荧光底物的本底信号，且对于同一样本的检测，不同仪器的数值不可横向比较。若使用全波长酶标仪进行检测，为防止孔间干扰，推荐使用不透明的白色酶标板，且检测孔间有一定间隔。
5. 裂解产物与底物接触后约 10 min 内荧光强度较为稳定，为取得最佳检测结果，在使用单管的化学发光仪检测时，不同样品和底物混合后至上机检测的时间间隔应尽量一致；使用全波长酶标仪时，应先用 PBS 清洗细胞 1 ~ 2 次，弃去 PBS，然后统一加入检测试剂，裂解混匀后尽快上机检测。测定时间根据荧光值的强弱可设定在 1 ~ 10 sec 区间内，增加检测时长会同时增加样本和本底的荧光读值。
6. 关于荧光素酶反应干扰的解决方案：通常这种情况并不常见，但是如果添加的试剂当中存在严重干扰荧光素酶反应的试剂（结果明显异常时），在检测前，可先去除培养基，重新加入 75 μ l 恢复到室温的 DMEM，然后每个孔加入 75 μ l 平衡至室温的 Firefly Luciferase Assay Reagent，室温摇床裂解 5 ~ 10 min 后，进行检测。