



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

一. 产品介绍

双荧光素酶报告基因检测试剂盒,先以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性,进而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。通常将目的基因的5'UTR或者启动子克隆至 Firefly Luciferase 的上游,或者3'UTR或预期RNAi靶向序列克隆至 Firefly Luciferase 的下游,通过检测萤火虫荧光素酶与底物的反应活性来检测启动子或者调控元件的转录调控作用。Renilla Luciferase 作为内参来消除细胞数量或转染效率等实验组间差异。

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 为 61KDa 的单亚基蛋白,能催化荧光素 (luciferin) 氧化,生成氧化荧光素 oxyluciferin; 海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 为 36 KDa 的单亚基蛋白,能催化腔肠素 (coelenterazine) 氧化形成 coelenteramide。二者在翻译后均无需修饰即可发挥作用。萤火虫荧光素酶催化 luciferin 发光的最强发光波长为 560 nm。海肾荧光素酶催化 coelenterazine 发光的最强发光波长为 465 nm。

其检测机理如图 1 所示:

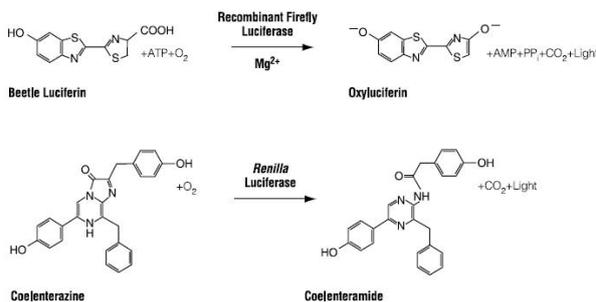


fig1. 荧光素检测机理

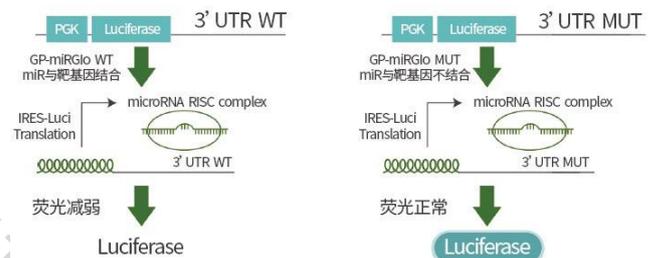


fig2. miRNA 与基因 UTR 荧光素报告作用模式图



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

二. 产品组分及保存条件

组分名称	产品规格 (100 次)
细胞裂解液 (5×)	15mL
萤火虫荧光素酶底物 (200 ×)	50μl
萤火虫荧光素酶缓冲液	10 mL
海肾荧光素酶底物 (200×)	50μl
海肾荧光素酶缓冲液	10 mL
使用说明书	一份

冰袋运输。本产品-20℃保存一年。

三. 操作流程

1. 细胞铺板

转染时细胞密度: 一般来说, 当细胞密度达到 60%~80%时进行转染可以取得较高的转染效率。但不同细胞的最适转染密度有所差异, 建议在初次转染某种细胞时, 可以通过预实验先确认该细胞最佳的转染密度。

2. 转染

根据效率评价, 扩大体系进行相对应的转染

例: 12 孔板, 体系 500 μL

转染试剂 GP-transfect-Mate	质粒	oligo
4 μL	1 μg	5 μL

3. 裂解细胞

待转染至相应的时间后, 弃培养液, PBS 洗一次, 将细胞裂解液完全覆盖细胞充分混匀, 按以下方式加入细胞裂解液, 充分裂解细胞, 约 30 min~1 h

供参考:

培养板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
细胞裂解液用量	100 μL	150 μL	200 μL	500 μL	600 μL

4. 荧光检测

准备工作:

A. 使用前短暂离心萤火虫/海肾荧光素酶底物 (200X);

B. 根据每次实验需要现用现配:

(1) 细胞裂解液 (5X)

5×细胞裂解液使用 ddH₂O 按照 1:5 稀释成工作液 (1X) 后使用。

(2) 萤火虫荧光素酶反应液:

萤火虫荧光素酶底物 (200×) 用萤火虫荧光素酶缓冲液按照 1:200 稀释成反应液后使用。



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

(3) 海肾荧光素酶反应液:

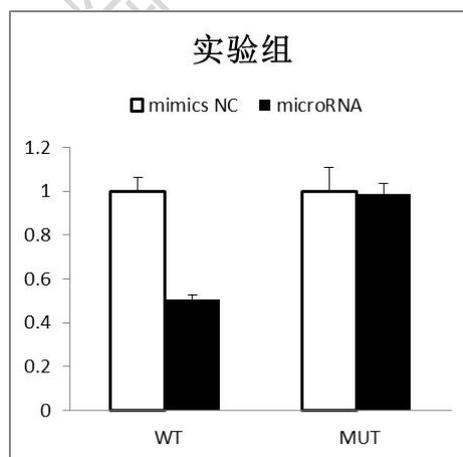
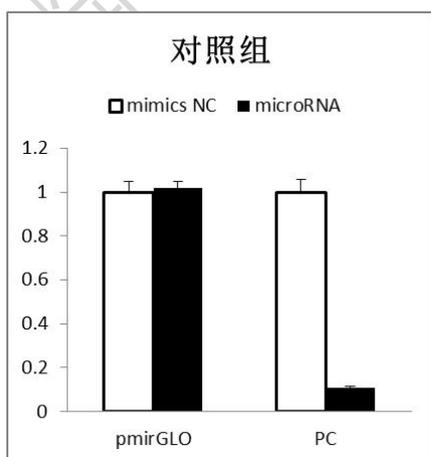
海肾荧光素酶底物 (200×) 用海肾荧光素酶缓冲液按照 1:200 稀释成反应液后使用。

检测步骤

- (1) 取 100 μ L 细胞裂解液, 加至酶标板中。按照实验需要, 可设置 3 孔-5 孔重复;
- (2) 加入 10 μ L 萤火虫荧光素酶反应液, 震板混匀, 检测萤火虫荧光素酶的活力, 检测尽量在 30 min 内完成;
- (3) 加入 10 μ L 海肾荧光素酶反应液, 震板混匀, 检测海肾荧光素酶的活力, 检测尽量在 30 min 内完成;
- (4) 分析数据。

注: 因荧光素酶在不同细胞表达量有所差异, 故底物量依不同细胞有所差异, 优化区间可参考 5-20 μ L。

四. 实验案例



本产品仅限于科研用途, 而不适用于临床诊断、治疗等其他用途

上海电话: 021-51320195

苏州电话: 0512-86668828

E-mail: support@genepharma.com

E-mail: szsupport@genepharma.com



B045-V001-20210331