

双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (增强型)

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
Omt-06	5 × 细胞裂解液 (5 × Cell Lysis Buffer)	20 ml	-20 °C 2 年
	萤火虫荧光素酶检测试剂 (Firefly Luciferase Detection Reagent)	10 ml	-80 °C 2 年
	海肾荧光素酶检测底物 (50 ×) (Substrate for Renilla Luciferase Detection)	0.2 ml	-80 °C 2 年
	海肾荧光素酶底物稀释液 (SFAR Buffer)	15 ml	-20 °C 2 年
	说明书	1 份	

一、运输与存储条件。

本产品必须干冰运输，依据各组份保存条件分开保存，有效期 2 年。

二、注意事项（请使用试剂盒前阅读此注意事项）。

1. 由于酶促反应受温度影响，所以待测样品（细胞裂解产物）和分装的萤火虫荧光素酶检测试剂必须平衡到室温后再进行活性测定，否则同一样品在不同温度下检测到的活性值差异较大。
2. 萤火虫荧光素酶检测试剂不可反复冻融，可分装成100 μl/管，置于-80 °C长期保存。
3. 用ddH₂O将5 × 细胞裂解液稀释成1 × 细胞裂解液，再裂解细胞。1 × 细胞裂解液可在4 °C存放1周，长期保存在-20 °C。
4. 为取得最佳测定效果，用单管的化学发光仪测定样品活性时，样品加入底物时的间隔时间和混合次数尽量一致，减少操作误差；使用多功能化学发光酶标仪时，宜先把样品全部加好，再统一加入萤火虫荧光素酶检测试剂。
5. 海肾荧光素酶的底物腔肠素溶液是乙醇溶液，易挥发。收到产品时若发现其体积小于0.2 ml，可自行添加适当的无水乙醇补齐体积为0.2 ml。
6. 配制好的海肾荧光素酶检测试剂，请立即使用，或者-80 °C保存。-20 °C保存导致效果减弱。

7. SFAR Buffer若有沉淀，可以在室温平衡一段时间，待沉淀溶解后再使用。
8. SFAR Buffer配制的海肾荧光素酶活性检测试剂加入可以检测体系后，可以灭活萤火虫荧光素酶的活性，启动海肾荧光素酶的活性测定。
9. SFAR Buffer只用于双荧光素酶报告基因检测体系，若单独检测海肾荧光素酶活性，请购买本公司的“海肾荧光素酶报告基因检测试剂盒（增强型）（Omt-08）”，利用其中的腔肠素稀释液配制的检测试剂可以直接检测海肾荧光素酶的活性，且检测到的活性值较高。

10. 为了您的健康，实验过程中请穿好实验服、佩戴手套和安全眼镜。

三、产品简介。

本产品由萤火虫荧光素酶检测试剂和海肾荧光素酶检测试剂组成，在同一体系中依次测定两种荧光素酶的活性，从而实现双荧光素酶报告基因的检测。

本产品是增强型的双荧光素酶报告基因检测试剂盒，灵敏度是普通型双荧光素酶报告基因检测试剂盒的 3-10 倍，更适合检测报告基因活性变化微弱的样品。

四、特点与优势。

1. 本试剂灵敏度高于市售同类试剂，灵敏度达到 10^{-19} 摩尔萤光素酶，线性范围至少达到 7 个数量级酶浓度范围，可以有效的检测报告基因转录水平变化。
2. 本试剂盒操作简单，能够快速完成双荧光素酶报告基因检测。

五、使用说明。

1. 以 6 孔细胞培养板培养的贴壁细胞为处理对象，实验步骤如下：
2. 细胞转染。细胞转染实验请参考本公司转染试剂（**Omifection, Cat: Omc-01**）说明书中的实验步骤，将编码萤火虫荧光素酶基因的质粒与编码海肾荧光素酶基因的质粒按 10:1（或 5:1）的比例混合，转入 6 孔板的细胞中，2 μg /孔。
3. 裂解液配制。用 ddH₂O 稀释 5 \times 细胞裂解液，配成 1 \times 细胞裂解液，4 $^{\circ}\text{C}$ 可存放 1 周。
4. 细胞裂解。细胞转染后 48 h, 弃培养液，预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次，加入 0.5 ml 细胞裂解液(1 \times)，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上，轻轻旋转 15-30 min，裂解细胞。
5. 将裂解液转入 1.5 ml EP 管中，12,000 \times g，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，弃沉淀，上清转移至新的 EP 管中，即为待测样品（细胞裂解产物）。
6. 海肾荧光素酶检测试剂配制。每个样品需要 100 μl 海肾荧光素酶检测试剂。根据样品数量，按照海肾荧光素酶底物:SFAR Buffer=1:50 的比例配制海肾荧光素酶检测试剂。

7. 活性测定。打开检测仪器，设置测定参数，一般延迟时间（整合时间）为 2 sec，测定时间为 10-20 sec。吸取 100 μ l 萤火虫荧光素酶检测试剂，加入 EP 管（或 96 孔板）中，再加入 2-10 μ l 待测样品（细胞裂解液），快速混匀，测定萤火虫荧光素酶活性值。同一检测体系中再加入 100 μ l 海肾荧光素酶检测试剂，快速混匀，测定海肾荧光素酶活性值。
8. 整理并分析萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活性值的比例，鉴定目的基因表达变化。

表1. 细胞裂解液体积表

96孔板	24孔板	12孔板	6孔板
100 μ L/孔	200 μ L/孔	250 μ L/孔	500 μ L/孔

六、效果鉴定。

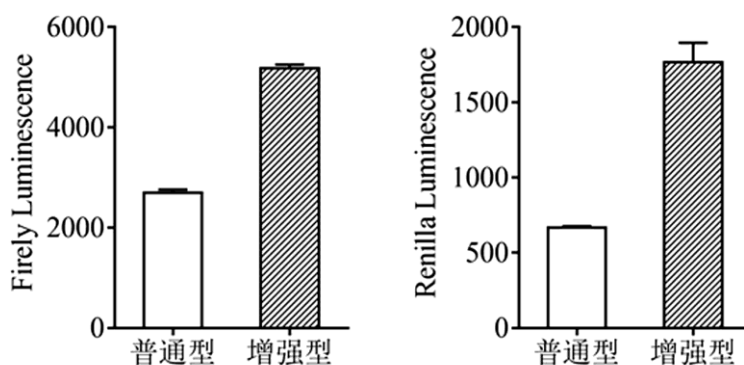


图 1. 双荧光素酶报告基因检测试剂盒（增强型）效果鉴定。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
荧光素酶活性值偏低	细胞转染效率低， luciferase 表达水平偏低。	增强细胞转染效率，或更换成转染效率较高的的细胞株，如 293T 细胞。
	裂解产物使用量偏少	增加检测体系中的细胞裂解产物用量。
	细胞裂解不充分。	请用配制的 1×细胞裂解液裂解细胞 30 min，裂解过程中不断震荡。
	荧光素酶活性检测试剂失效。	请正确保存和使用试剂盒。
	荧光素酶活性检测试剂反复冻融。	萤火虫荧光素酶检测试剂分装成 100 μl/tube，-80 °C 保存。尽量使用新鲜配制的海肾荧光素活性检测试剂，配好暂时不用的置于-80 °C 存放，避免反复冻融。
重复测量的荧光素酶活性值偏差大	样品和检测试剂未平衡到室温。	提前取出样品和分装的萤火虫荧光素酶检测试剂，并配制海肾荧光素酶检测试剂，室温避光放置几分钟，平衡到室温后，再开始检测。
	样品加样量不准。	使用精确度较高的移液器，保证加样量，混合次数及间隔时间一致。
	检测试剂不是同一批次配制的荧光素酶活性检测试剂。	反复冻融降低检测试剂的灵敏度，因此，检测同一样品时，使用同一批次配制，且没有反复冻融的萤火虫和海肾荧光素酶活性检测试剂。
荧光素酶活性值偏高	细胞转染效率高， luciferase 表达量高。	减少细胞裂解产物用量，或用 1×细胞裂解液稀释细胞裂解产物后再测定。
	细胞裂解产物用量偏大。	减少测定体系中的细胞裂解产物用量。