



Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0

- 双荧光素酶检测试剂盒 2.0

Cat. No. LF001 (100 reactions)

Cat. No. LF002 (300 reactions)

Cat. No. LF003 (1000 reactions)

使用说明书

GeneCopoeia, Inc.

9620 Medical Center Drive, #101

Rockville, MD 20850

USA

301-762-0888

inquiry@genecopoeia.com

www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司

地址：广州科学城揽月路 3 号 F 区 F 801 (510663)

电话：4006-020-200、020-28069288、020-28069233

网站：www.igenebio.com

© 2020 GeneCopoeia, Inc.

使用说明书

Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0

- I. 产品概述
- II. 产品信息及储存条件
- III. 细胞裂解
- IV. FLuc 和 RLuc 工作液的配制
- V. 荧光素酶检测流程
- VI. 有限使用许可协议及质量保证

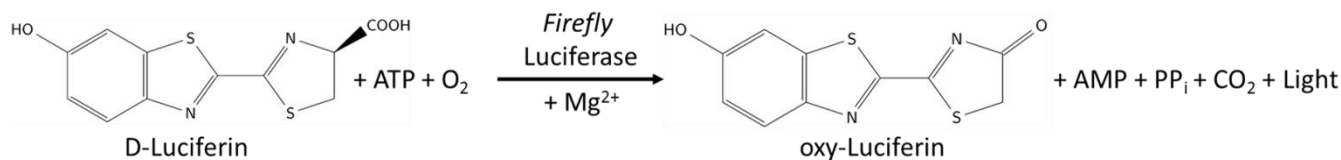
I. 产品概述

对报告基因表达的转录调控的研究常被应用于生物学研究和药物发现。荧光素酶在基因表达研究中应用最为广泛，其主要包含以下几个优点：

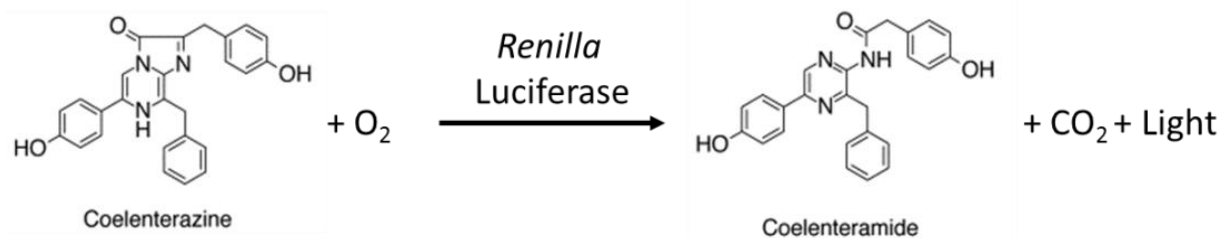
- 1) 在广泛动态范围内具有高灵敏度
- 2) 在哺乳动物细胞内无荧光素酶、背景极低
- 3) 实验重复性好
- 4) 成本低
- 5) 操作简单
- 6) 适用于高通量筛选

萤火虫和海肾荧光素酶都具有快捷、简便、灵敏度高的检测特点，被公认为是理想的报告基因，因为它们具有完全不同的进化起源、酶学结构和底物要求。荧光素酶报告基因的测定需要用光度计或多功能微孔板检测仪，且发光强度与荧光素酶的数量成正比。

萤火虫荧光素酶 (*Photinus pyralis*) 已被证实是检测启动子活性和监测基因转录后调控状态的理想的报告基因。它是在细胞质中作用的酶，分子量为 61 kDa 并催化下列反应：



海肾 (*Renilla reniformis*) 荧光素酶是一个 36 kDa 单亚基蛋白质，酶活性不需要翻译后修饰，因此它可以作为一个实时转录报告基因，催化下面的生物发光反应：



此体系可以在目的基因的附近监控顺式作用元件的转录激活。然而，它很难通过基因 3' UTR 调节来测定转录抑制效率，因为酶底物的活性非常低。在测定底物抑制物时，酶底物复合物的稳定性有更大的灵活性。由于生物学变异和其它原因的干扰，使观察到的荧光素酶活性差异变小，所以在标准实验流程中通常会选择一个报告基因作为内对照，使另一个报告基因的检测均一化。标准实验流程也需要调整转染效率和细胞活性之间的差异。

GeneCopoeia 对萤火虫和海肾荧光素酶的酶结构和底物进行优化并研发出一个方便的双荧光素酶报告基因检测方法，即对同一样品中的两个荧光素酶同时测定。将裂解产物与第一种荧光素酶测试试剂混合，测试萤火虫荧光素酶的活性；然后加入第二种试剂，此时萤火虫荧光素酶发光被淬灭，同时激活海肾荧光素酶的发光。本试剂盒适用于 GeneCopoeia、Promega 及许多其它公司的萤火虫和海肾荧光素酶载体的双荧光素酶报告基因检测。

GeneCopoeia 的研发团队在 Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0 中添加了几种特殊试剂，使该产品荧光素酶检测信号的稳定性大大提高并有效简化实验步骤，其优点如下所示：

- **稳定性高**—本产品具有极高稳定性。添加底物 30 分钟后（22-25℃），萤火虫荧光素酶的活性仍保持在 80% 以上，而海肾萤火虫荧光素酶的活性仍保持在 95% 以上（见图1）；
- **适用范围广**—适用于多种不同的真核生物（脊椎动物、低等无脊椎动物）细胞系样品在微孔板（如 96-孔板）或单管中检测；
- **背景值低**—背景更低，数据更准确；
- **操作简便**—海肾荧光素酶反应液包含了萤火虫荧光素酶的淬灭剂。终止萤火虫荧光素酶发光，同时启动海肾荧光素酶反应，只需两步实验（见图2）；
- **重复性好**—检测数据更可靠，且荧光素酶的浓度线性范围超过 9 个数量级（见图3）。

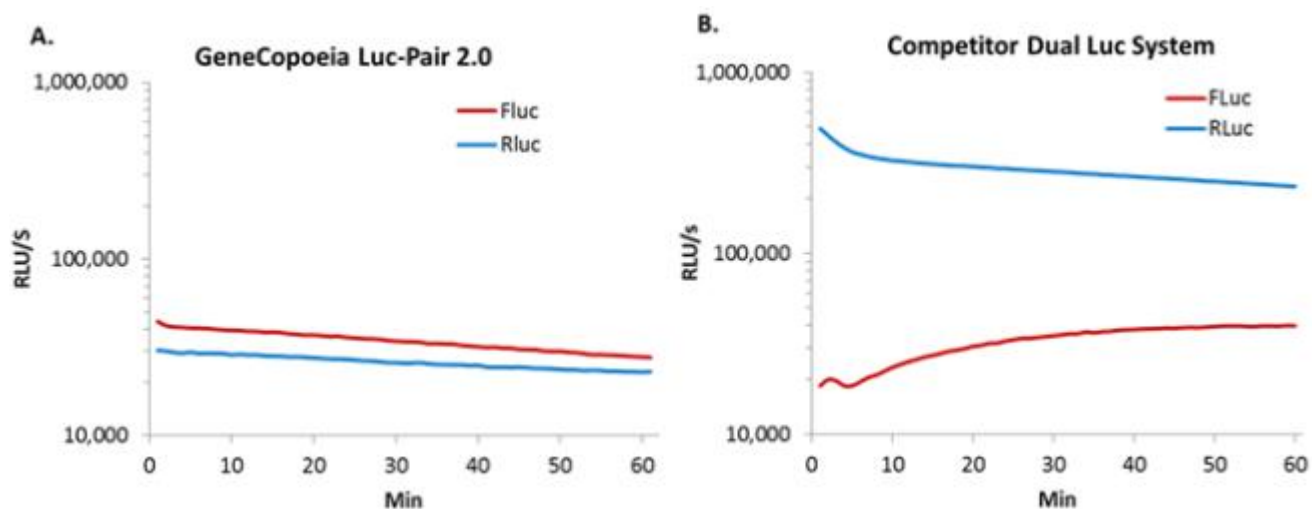


图 1. 荧光信号的稳定性比较。用 GeneCopoeia pEZX-MT06 miRNA 报告载体转染 HEK293 细胞，转染 48 小时后分别检测荧光信号，效果如上图所示。从图中可知，GeneCopoeia 试剂盒（图A）的 Fluc 及 RLuc 均在 60 分钟内保持信号稳定，竞争对手品牌的试剂盒（图B）荧光信号在前 30 分钟已出现较大波动。

Firefly Luciferase activity before and after the addition of RLuc Buffer.

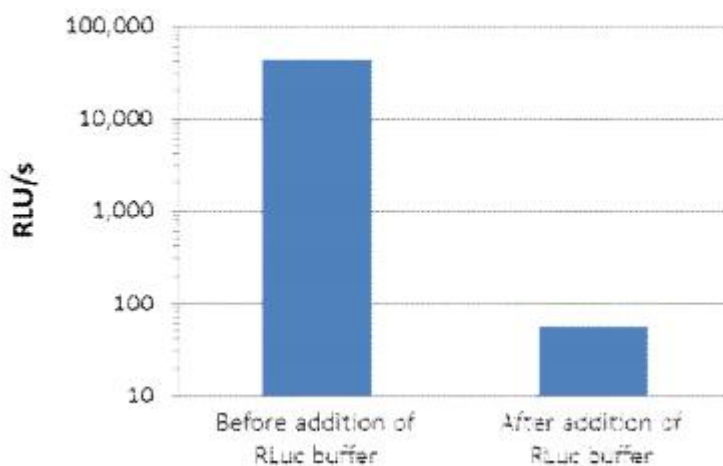


图2. 萤火虫荧光素酶的活性被 Luc Buffer II 淬灭。用 GeneCopoeia pEZX-MT06 miRNA 报告载体转染 HEK293 细胞，转染 48 小时后检测荧光信号。然后把 1 x Luc Buffer II（不包含底物）加入到测试孔，重新检测荧光值。萤火虫荧光素酶的活性如上图所示。

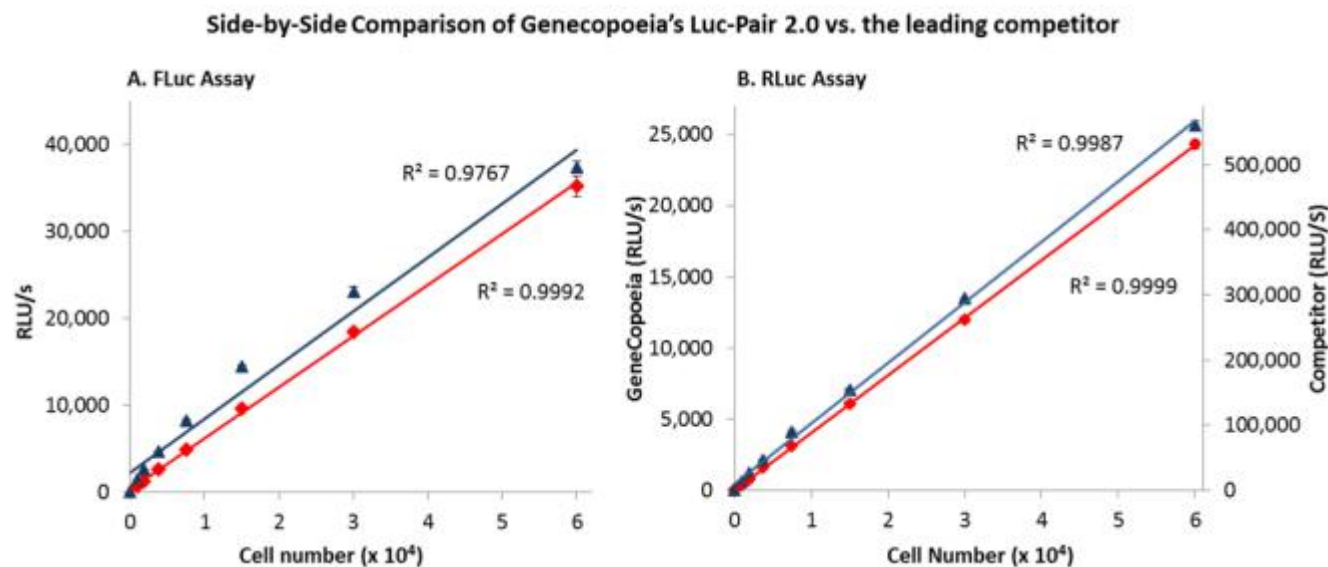


图 3. 转入细胞的载体数量与荧光激发量的线性关系比较。以 GeneCopoeia pEZX-MT06 miRNA 报告载体转染 HEK293 细胞，转染 48 小时后，按梯度取不同细胞数量，溶解细胞后分别检测荧光信号，效果如上图所示。从图中可知，GeneCopoeia 试剂盒（红色）检测所得结果中，Fluc 和 RLuc 的线性关系比较好，竞争对手品牌的试剂盒（蓝色）检测所得结果的线性关系相对较差。

II. 产品信息及储存条件

Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0（货号：LF001, LF002, LF003）试剂盒组份如下：

产品编号	试剂盒组份	包装规格	寄送条件	储存条件
LF001-01 LF001-01 LF003-01	Lysis Buffer (10×) Cell Lysis buffer	100 reactions 300 reactions 1000 reactions 1.0 mL 1.0 mL×3 10 mL	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月
LF001-02 LF001-02 LF003-02	Luc Buffer I (5×) Firefly luciferase buffer	1.0 mL×2 1.0 mL×6 10 mL×2	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月
LF001-03 LF001-03 LF003-03	Luc Sub I (100×) Firefly luciferase substrate	100 µL 100 µL×3 500 µL×2	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月
LF001-04 LF001-04 LF003-04	Luc Buffer II (5×) <i>Renilla</i> luciferase buffer	1.0 mL×2 1.0 mL×6 10 mL×2	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月
LF001-05 LF001-05 LF003-05	Luc Sub II (100×) <i>Renilla</i> luciferase substrate	100 µL 100 µL×3 500 µL×2	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月

III. 细胞裂解

我司提供的 Lysis Buffer 是 10× 的浓缩液，溶解后可能呈浑浊状态，但这并不影响荧光素酶的检测。Lysis Buffer 溶解后涡旋 3-5 秒，然后用灭菌水配制成 1× 的工作液。1× Lysis Buffer 在 -20°C 可保存 1-2 个月，但是建议现配现用。

A. 在培养板中裂解细胞

- 清洗细胞：**确定转染参数（例如：细胞密度和培养时间），确保每个孔在收细胞溶解液时达到 80-95%。在收细胞溶解液前吸走培养基，沿板壁缓慢加入足量的 PBS，上下轻轻晃动培养板几次，然后将 PBS 尽量吸取干净。
- 加入 1× Lysis Buffer 裂解细胞：**加到每个培养孔的 1× Lysis Buffer 的最小体积要求完全覆盖单层细胞，每个孔的 1× Lysis Buffer 的推介用量如下所示：

Culture Plate	1× Lysis Buffer (μL)
6-well	500
12-well	250
24-well	100
48-well	65
96-well	20

备注：试剂盒里提供的 Lysis Buffer (10×) 足够用于 24-、48- 或 96-孔板的使用量，但不足以用于 6-孔或 12-孔板。可以单独购买试剂盒中的组份 Luc-Lysis buffer (10×) (货号：LF003-01)，或者参照说明书中步骤 III B 的方法进行细胞裂解。

- 充分裂解细胞：**放置培养板在一个摇摆平台或轻轻摆动的摇床上以确保 1× Lysis Buffer 可以完全覆盖单层细胞，然后室温摇动 10-15 分钟。

备注1：如果出现细胞团，用移液器轻轻吹打细胞成单个状态。也可用离心管收集细胞裂解液（包括细胞团），于冰上冷却后，涡旋振荡 5-10 秒，然后冻融 1-2 次使细胞完全裂解。如细胞数很多，通常需要增加 1× Lysis Buffer 以确保细胞完全裂解。

备注2：包含萤火虫和海肾荧光素酶的裂解液在室温下（22°C）可保存 30 分钟，如果置于冰上可保存 2 小时。如需长期保存则存放于 -70°C 冰箱。细胞裂解液反复冻融超过 3 次，可能会导致荧光素酶的活性逐渐丧失。

- 按照步骤 V 进行荧光素酶检测。**

B. 在管中裂解细胞

- 清洗细胞：**对悬浮培养的细胞，或用细胞刮刀刮取或加胰蛋白酶消化的贴壁培养的细胞，离心收集细胞。细胞计数后分装 $1-2 \times 10^5$ 个细胞到 1.5 ml 管中，加 1 ml PBS Buffer 洗涤细胞，以 500g 离心 5 分钟，小心地尽量去除上清。

2. 裂解细胞: 加 50-100 μ L 的 1 \times Lysis Buffer 至每微升溶液含 2×10^3 个细胞。冰上放置2-5分钟，涡旋振荡 5-10 秒使细胞完全分散，然后冻融 1-2 次使细胞完全裂解。

备注: 包含萤火虫和海肾荧光素酶的裂解液在室温下 (22 $^{\circ}$ C) 可保存 30 分钟，如果置于冰上时间可延长到 2 小时。如需长期保存则存放于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱。细胞裂解液反复冻融超过 3 次，可能会导致荧光素酶的活性逐渐丧失。每微升 1 \times Lysis Buffer 含有 2×10^3 个细胞适用于通常转染的细胞。如果细胞转染效率很低或启动子非常微弱，建议增加细胞数量。本试剂盒提供的 Lysis Buffer 里含有与检测溶液相配套的试剂，如使用其它细胞裂解液，可能会影响后续的荧光素酶活性检测信号强度及稳定性。

3. 按照步骤V进行荧光素酶检测。

IV. FLuc 和 RLuc 工作液的配制

备注1: Luc Buffer I 和 II 在 -20 $^{\circ}$ C 至少可保存 6 个月。试剂反复冻融 5-6 次不影响检测荧光素酶的活性。

备注2: 配制好的工作液 (包含底物的 Buffers) 在室温下存放 1-2 小时是稳定的，建议只配制所需要的量。

备注3: 荧光素酶的催化速率对温度变化非常敏感，而且两个荧光素酶的活性的最佳温度是室温 (20-25 $^{\circ}$ C)，因此在测试之前使试剂恢复到室温是非常重要的。本试剂盒是为双荧光素酶的检测设计。如只检测单一荧光素酶，也必须严格按本使用说明中的双荧光素酶检测流程操作。

1. 在室温下解冻 Luc Buffer I (5 \times) 和 Luc Buffer II (5 \times)，上下颠倒管 3-5 次，然后涡旋振荡 3-5 秒。

备注: Luc Buffer II (5 \times) 解冻后可能出现沉淀，可在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 分钟，使沉淀完全溶解。

2. 配制 1 \times Luc Buffer I 和 1 \times Luc Buffer II 工作液，每个反应需要 Buffer I 和 Buffer II 各100 μ L。建议每个样品做 3 次重复。

举例说明: 如果你有 3 个样品做3次重复反应，需准备 1 mL 的 1 \times Luc Buffer I 和1 \times Luc Buffer II工作液。0.2 mL 的 5 \times Buffer 加 0.8 mL 灭菌水。多配制 1-2 个反应的 Buffer 避免因吸取时的误差造成的短缺。

3. 准备 FLuc 和 RLuc 的工作液 (例如: 10 个反应): 加 10 μ L 的 Luc Sub I (或 Luc Sub II) (100 \times) 到 1 mL 的 1 \times Luc Buffer I (或 1 \times Luc Buffer II) 中。上下颠倒管子数次，混匀溶液。

4. 加样品前，配好的试剂先在室温孵育 5 分钟。

备注: FLuc 测试完毕后，再使用 RLuc 工作液。如果存放合适，RLuc 工作液在室温下避光可保存 1 小时。

V. 荧光素酶检测流程

1. 根据仪器说明书设置测试条件，设置检测时间为 1-2 秒。
2. 用移液器吸取 20 μL 细胞裂解液加到 96-孔白板（不透光）或黑色的微孔板，或是光度计管。
3. 加入 100 μL 孵育好的 Fluc 工作液到样品中。温和的吹打混匀，不要涡旋振荡。

备注：如果您有许多样品，并用 96-孔板测试，我们建议您用多道移液器加样以缩短样品之间的误差。

自动注射器：不建议使用此仪器。

4. 置室温孵育 3-5 分钟，然后放入仪器进行检测。

备注：孵育后 5 分钟内读板。如果使用单个光度计管测试，请确保所有样品的发光检测前的处理时间是相同的。

5. 如果光度计不能自动保存数据，请手工记录数据。

6. 测试完毕后，取出微孔板或光度计管。

7. 加入 100 μL 孵育好的 Rluc 工作液到第 6 步骤中的微孔板或光度计管中，温和的吹打混匀，或轻敲板侧（或管壁）3-5 次混匀样品，不要涡旋振荡。

备注：如果您有许多样品，并用 96-孔板检测，我们建议您用多道移液器加样以缩短样品之间的误差。

自动注射器：不建议使用此仪器。

8. 置室温孵育 3-5 分钟，放入仪器继续检测。

备注：孵育后 5 分钟内读板。如果使用的是单一光度计管，请确保所有样品发光检测前的处理时间是相同的。

9. 如果光度计不能自动保存数据，请手工记录数据。

10. 测试完毕后，取出微孔板或光度计管。

11. 计算萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的发光比值。

重要提示：因为发光信号受试验条件的影响，原始结果的比较应该是同一时间测定的样品，并使用相同的培养基、血清等试剂。每个板上的对照使每个样品的萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的比值标准化。同一样品在 1 小时内测量的这些标准比率基本保持不变（ $\pm 10\%$ ）。本试剂盒是为双荧光素酶的检测设计。如只检测单一荧光素酶，也必须按本使用说明中的双荧光素酶检测流程操作，也可以购买本公司的单荧光素酶检测试剂盒。

VII. 有限使用许可协议及质量保证

有限使用许可协议

以下条款适用于GeneCopoeia的Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0产品。如果不接受以下条款，所有的产品必须在5个工作日内返回GeneCopoeia。GeneCopoeia的产品仅限购买方内部研究使用，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。GeneCopoeia的产品不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经GeneCopoeia的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。此产品必须按照国家卫生研究院的DNA重组和基因研究的指导方针使用。

有限质量保证

GeneCopoeia保证您收到的产品符合产品目录上的规格。如果GeneCopoeia的产品未能满足这些规格，GeneCopoeia将替换该产品。如果不能提供替换产品，GeneCopoeia将退款给购买方。这个有限质量保证不得延伸至产品的原始购买者以外的人。如果产品与订购信息不符，所有的产品必须在30天内返回GeneCopoeia。GeneCopoeia的责任仅限于替换产品，且退款只限于实际的购买价格。GeneCopoeia不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。GeneCopoeia不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。

GeneCopoeia致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果你对我们的产品有任何问题和担忧，请和我们联系，电话：301-762-0888。

© 2020 GeneCopoeia, Inc.