

Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit

—稳定型双荧光素酶检测试剂盒

Cat. No. LF013 (10ml, 75 μ l \times 120 reactions for 96-well plate; 20 μ l \times 480 reactions for 384-well plate)

Cat. No. LF014 (30ml, 75 μ l \times 360 reactions for 96-well plate; 20 μ l \times 1440 reactions for 384-well plate)

Cat. No. LF015 (100ml, 75 μ l \times 1200 reactions for 96-well plate; 20 μ l \times 4800 reactions for 384-well plate)

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

使用说明书

Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit

- I. 产品概述
- II. 产品信息及储存条件
- III. 准备细胞样品
- IV. FLuc 和 RLuc 工作液的配制
- V. 荧光素酶检测流程
- VI. 有限使用许可及质保声明

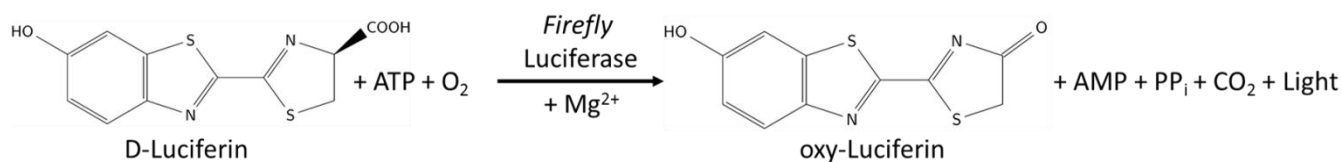
I. 产品概述

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：

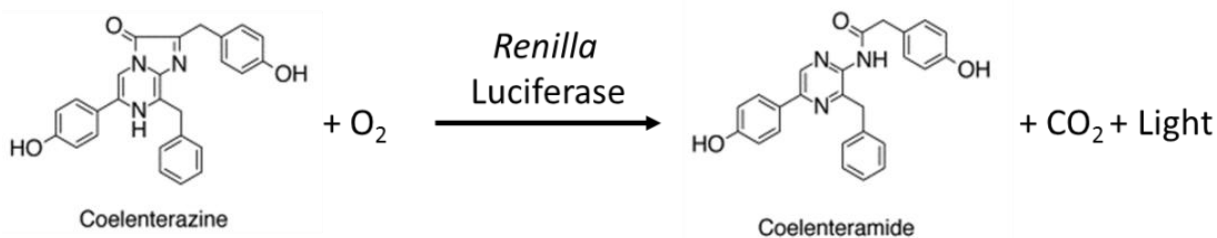
- 1) 在广泛动态范围内具有高灵敏度
- 2) 在哺乳动物细胞内无荧光素酶、背景极低
- 3) 实验重复性好
- 4) 成本低
- 5) 操作简单

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：



GeneCopoeia 充分利用了萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶结构和底物的不同，优化并开发了简便/快速的检测体系可以方便连续地从一个样品中定量测定两种荧光素酶的活性。The Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit 提供的试剂可直接用于培养基中的细胞，无需预处理或预裂解细胞，两种酶活性的检测可以依次在同一样品里检测出。细胞裂解与萤火虫荧光素酶的检测可以在第一种试剂加入后同时进行，而后加入的第二种试剂可同时淬灭萤火虫荧光素酶的荧光同时激发海肾荧光素酶的荧光。本试剂盒经实验优化可用于包含 0~10% 血清的多种培养基：DMEM, RPMI1640, EMEM, IMDM, McCoy's-5A, F-12K, MEM, ACL-4, L15, Cho-S-SFMII, NCTC109 等。

GeneCopoeia 的研发团队在 Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit 中添加了几种特殊试剂，使该产品的检测性能大大提高并有效简化实验步骤，其优点如下所示：

- **稳定性高** — 本产品对萤火虫和海肾荧光素酶产生的光信号很稳定，半衰期可达2小时（见图1），很适合用于高通量分析。
- **简便快速** — 本产品已经优化用于多种培养基（见图2），无需预先进行细胞裂解，即可进行荧光素酶活性检测。
- **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）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（见图3）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；
- **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。

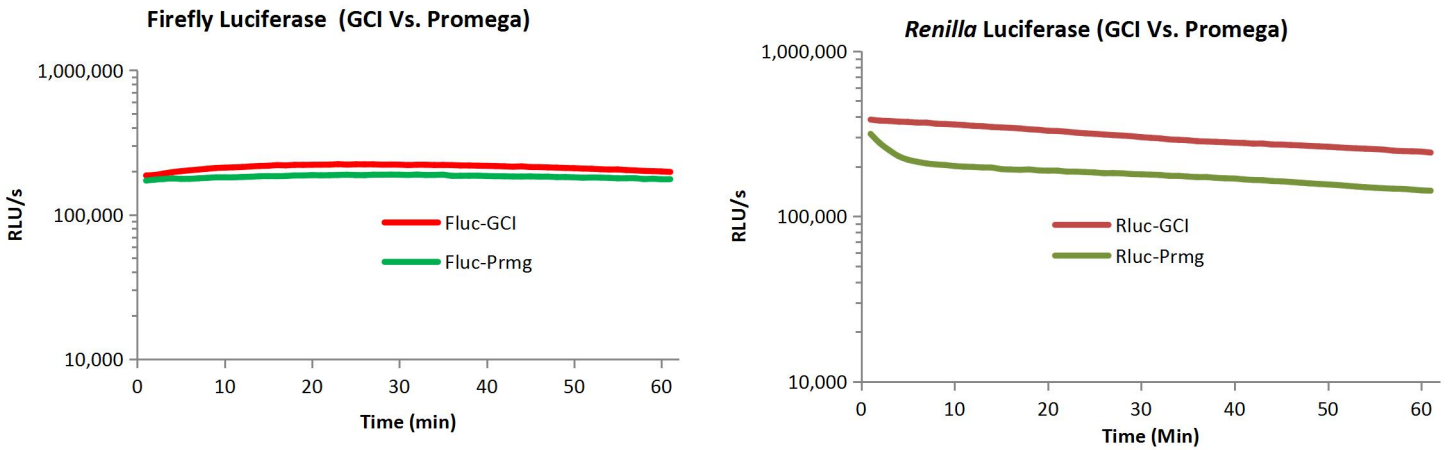


图1. 使用GeneCopoeia的 Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit检测萤火虫和海肾荧光素酶的活性。用Promega的pGL4.13和pGL4.75 报告载体转染HEK293细胞，转染48小时之后分别检测荧光信号，结果如上图显示。Fluc-GCI和Rluc-GCI分别代表GeneCopoeia品牌试剂盒检测Fluc和Rluc的结果，Fluc-Prmg和Rluc-Prmg分别代表Promega品牌试剂盒检测Fluc和Rluc的结果。

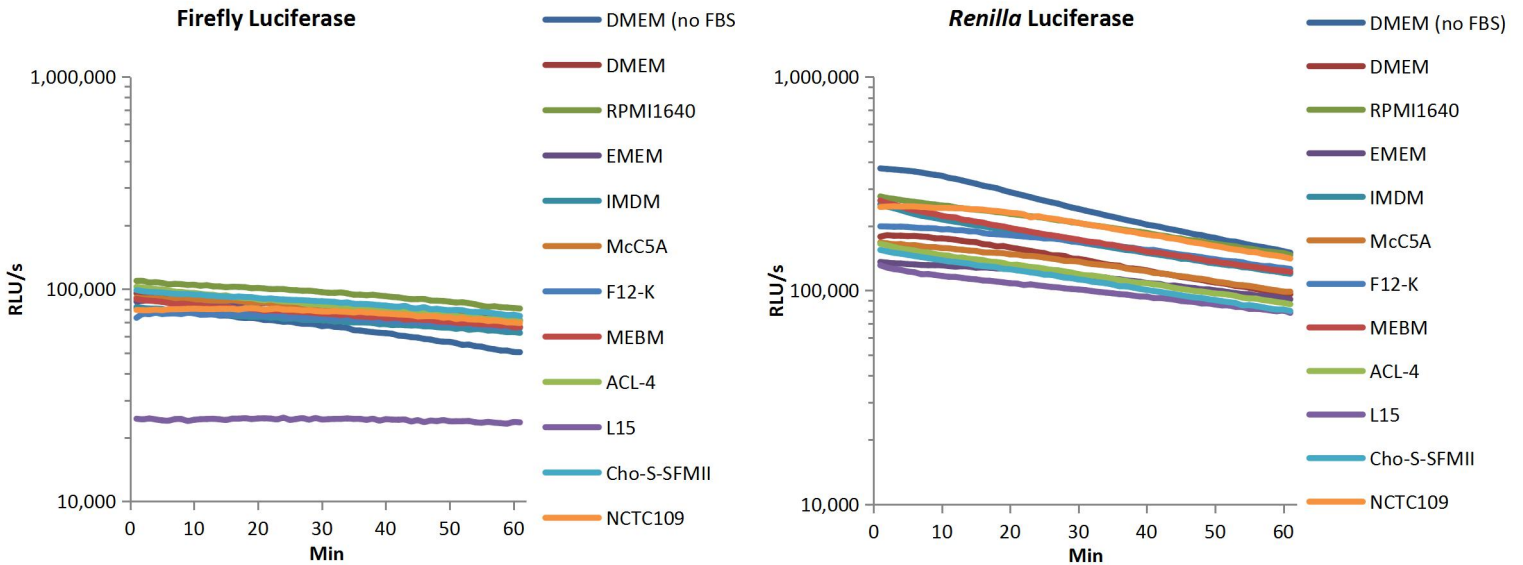


图2. 使用GeneCopoeia的 Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit在不同培养基中检测萤火虫和海肾荧光素酶的活性。用Promega的pGL4.13和pGL4.75 报告载体转染HEK293细胞48小时之后，收集 5×10^4 个细胞悬浮于无血清的DMEM，或者包含10%血清的DMEM，RPMI1640，EMEM，IMDM，McCoy's5A，F-12K，MEMB，ACL-4，L15，Cho-S-SFMII，NCTC109。按照实验操作说明分别检测Fluc和Rluc的荧光信号，结果如上图显示。

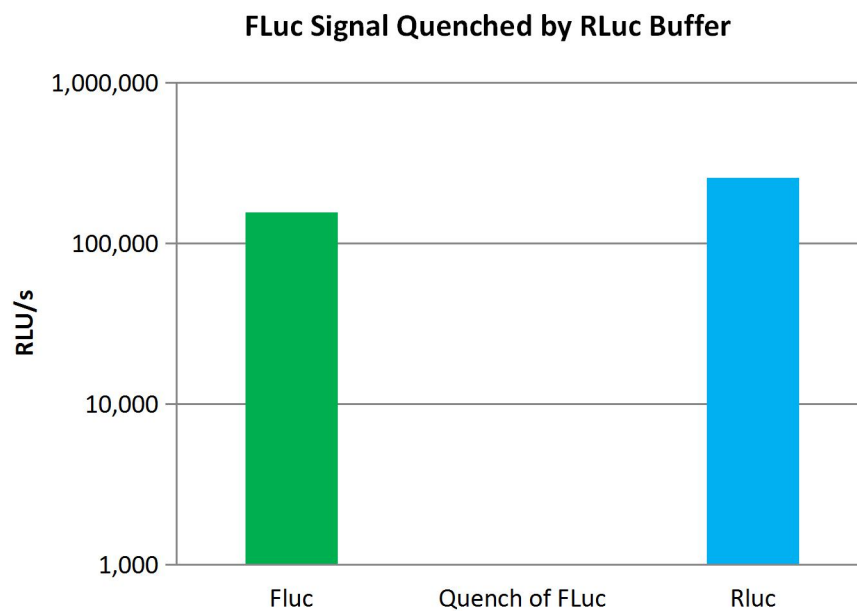


图 3. 萤火虫荧光素酶的活性被 Luc-HT Buffer II 淬灭。用 Promega 的 pGL4.13 和 pGL4.75 报告载体转染 HEK293 细胞 48 小时之后，检测 Fluc 的荧光信号（左柱）。然后把不包含底物（中间柱）或包含底物（右柱）的 1 x Luc Buffer II 加入到测试孔，重新检测 Fluc 的荧光值，大约 99.9%的萤火虫荧光素酶的荧光被淬灭。

II. 产品信息及储存条件

The Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit（货号：LF013, LF014 和 LF015）试剂盒组份如下表所示。

产品编号	产品内容	包装规格	寄送条件	储存条件
LF013-01 LF013-01 LF015-01	Luc-HT Buffer I (5×) Firefly luciferase buffer	10 mL 30 mL 100 mL	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月
LF013-02 LF013-02 LF015-02	Luc-HT 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
LF013-03 LF013-03 LF015-03	Luc-HT 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
LF013-04 LF013-04 LF015-04	Luc-HT 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. 准备细胞样品

请注意使用与荧光检测仪匹配的细胞培养板，对于贴壁细胞和悬浮细胞，培养至合适的密度用于下游分析。

对于不同规格的细胞培养板，选用合适体积的细胞生长培养液，比如96孔板，每孔75 μL培养液；384孔板，每孔20 μL培养液。

IV. FLuc 和 RLuc 工作液的配制

备注1: 5x Luc-HT Buffers I 和 II 在-20°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: 光强度用于测量荧光素酶的催化速率，因此对温度变化非常敏感。两个荧光素酶的活性的最佳温度是室温（20-25°C），因此在测试之前需要将试剂恢复到室温。

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

备注1: Luc-HT Buffer I (5×) 解冻后可能出现浑浊现象，涡旋混匀即可，对实验分析不会产生影响。

备注2: Luc-HT Buffer II (5×) 解冻后可能出现沉淀，可在 37°C 孵育 5-10 分钟，使沉淀完全溶解。

2. **配制1×Luc-HT Buffer I (或 1×Luc-HT Buffer II) :** 将Luc-HT Buffer I (5×) 和 Luc-HT Buffer II (5×) 用dH₂O分别稀释成1×缓冲液，根据不同体积的细胞培养液准备等体积的1×缓冲液，比如96孔板，每孔75μL细胞培养液需要75μL的1×缓冲液；比如384孔板，每孔20μL细胞培养液需要20μL的1×缓冲液。建议每个细胞样品做 2-3 次重复。

举例说明：比如96孔板中检测30个细胞样品并做2次重复实验，共60个测试孔，需要配制 5ml 1×缓冲液，配制稍多量的1x缓冲液可避免因移液时的误差造成的短缺。

3. **准备 FLuc 和 RLuc 的工作液：**将Luc-HT Sub I（或 Luc-HT Sub II）（100×）稀释到合适体积的 1×Luc-HT Buffer I（或 1×Luc-HT Buffer II）中。上下颠倒管子数次，混匀溶液。

举例说明：比如准备5 mL 的FLuc 和 RLuc 的工作液，加入50 μL的Luc-HT Sub I（100×）至5mL的1×Luc-HT Buffer I 中，加入50 μL的Luc-HT Sub II（100×）至5mL的1×Luc-HT 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：配制好的工作液（含底物的 1×缓冲液）在室温下存放 1-2 小时是稳定的，建议每次只配制所需要的量。RLuc 工作液是在FLuc 测试完毕后再使用。

V. 荧光素酶检测流程

5. 开启多孔板荧光检测仪，根据仪器说明书设置测试条件，设置每孔检测时间为 1-2 秒。
6. 从培养箱中取出细胞培养多孔板，确保多孔板与荧光检测仪匹配。
7. 加入合适体积的 Fluc 工作液到样品中。温和的吹打混匀，不要涡旋振荡。比如96孔板，每孔加入75μL的Fluc 工作液至75μL细胞培养液中；比如384孔板，每孔需要加入20μL的Fluc 工作液至20μL细胞培养液中。

备注：使用 96孔板或384孔板测试，建议使用多道移液器加样以节约时间并减少重复测试孔之间的误差。

自动注射器：本试剂盒不适合使用。。

8. 将培养板放置于振荡仪上轻柔混匀10分钟。
9. 放入仪器检测。如果发光仪或光度计不能自动保存数据，请手工记录数据。
10. 测试完毕后，取出多孔板。
11. 加入合适体积的 Rluc 工作液到第 10 步骤后的多孔板中，温和的吹打混匀，或轻敲板侧3-5 次混匀样品，不要涡旋振荡。与步骤7相同，96孔板中加入75μL的Rluc 工作液，384孔板中加入20μL的Rluc 工作液。
12. 静置2-5分钟，
13. 放入仪器继续检测。如果发光仪或光度计不能自动保存数据，请手工记录数据。
14. 测试完毕后，取出多孔板。
15. 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本的萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的比值标准化。本试剂盒不适用单荧光素酶的检测。如只检测单一荧光素酶，也必须按本使用说明书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Luc-Pair™ Duo-Luciferase HT Assay Kit 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。

© 2017 GeneCopoeia, Inc.