

Robust - Lumi™ Dual Luciferase Assay Kit

(Cat #: D100, D100M)

产品简介:

GeneCodex 公司双荧光素酶检测试剂盒提供了一种简单可靠的，用于同时测定单个样品中萤火虫和海肾荧光素酶活性的荧光素酶检测试剂，适用于在 96 或 384 孔酶标板中直接高通量分析含有萤火虫和海肾荧光素酶两种报告基因的哺乳动物细胞基因转录调控情况 (图 1)。该荧光素酶检测试剂可直接加入到含有培养细胞的培养基中，无需清洗和预处理。其中萤火虫检测试剂可诱导细胞裂解并含萤火虫荧光素酶底物，半衰期在 1 小时左右。加入海肾检测试剂可有效淬灭萤火虫发光信号并激活海肾荧光素酶的反应，信号至少可持续 2 小时。GeneCodex 公司双荧光素酶检测试剂盒作为高通量分析的首选试剂，具有以下特征:

简单: 可在培养基中直接裂解细胞并测定荧光素酶活性，无需清洗。

信号稳定: 发光信号稳定，半衰期在 1 小时左右。

适应性强: 试剂盒适用于多种真核细胞 (包括贴壁或悬浮细胞)。

高通量: "add-and-read"模式适用于高通量检测。

图 1. 萤火虫和海肾荧光素酶催化的双生物发光反应。

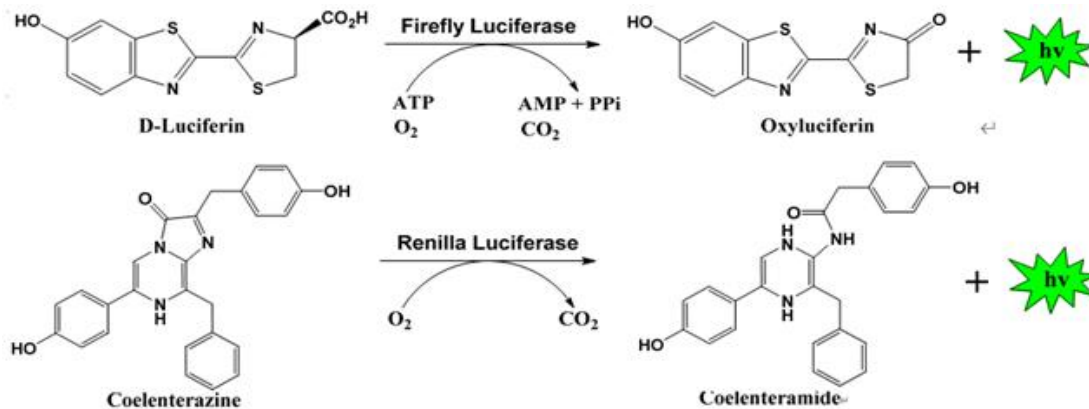


Table 1. 试剂盒组分和储存条件

组分	体积	浓度	储存条件
双荧光素酶检测试剂盒 (货号 D100, 100 assays)			
细胞裂解液(组分 A)	1.0 mL	10X	-20℃, 避光; 按照推荐的储存条件保存, 有效期为 6 个月, 请注意避免反复冻融。
萤火虫荧光素酶底物(组分 B)	100 μL	100X	
萤火虫荧光素酶缓冲液(组分 C)	10 mL	1X	
海肾荧光素酶底物(组分 D)	100 μL	100X	
海肾荧光素酶缓冲液 (组分 E)	10 mL	1X	
双荧光素酶检测试剂盒 (货号 D100M, 500 assays)			
细胞裂解液(组分 A)	5.0 mL	10X	-20℃, 避光; 按照推荐的储存条件保存, 有效期为 6 个月, 请注意避免反复冻融。
萤火虫荧光素酶底物(组分 B)	500 μL	100X	
萤火虫荧光素酶缓冲液(组分 C)	50 mL	1X	
海肾荧光素酶底物(组分 D)	500 μL	100X	
海肾荧光素酶缓冲液 (组分 E)	50 mL	1X	

注意事项:

① 用于细胞培养的多孔板 (96-或 384-孔板) 必须与用于检测化学发光的仪器兼容。检测条件会影响发光信号, 所以样品只有在同一时间内, 相同条件下获得的检测结果才能作比较;

② 为了在低信号时获得较好的线性关系，应该从所有读数中减去背景信号。

操作步骤:

1. 将冰冻 10 × 细胞裂解液 (组分 A), 萤火虫荧光素酶底物 (组分 B), 1 × 萤火虫荧光素酶缓冲液 (组分 C), 海肾荧光素酶底物 (组分 D) 和 1 × 海肾荧光素酶缓冲液 (组分 E) 于水浴锅中室温解冻, 待融化后混匀。
2. 将混匀的 10 × 细胞裂解液以灭菌 ddH₂O 配制成 1 × 工作液 (例如: 取 1 mL 10 × 细胞裂解液, 以 9 mL 灭菌 ddH₂O 稀释混匀, 即为 1 × 工作液)。1 × 细胞裂解工作液可于 -20°C 稳定储存 1 ~ 2 个月, 但建议根据实验需要, 现配现用。1 × 细胞裂解工作液参考用量如下:

细胞培养板	细胞裂解工作液用量(μL)
96-well	20
24-well	100
12-well	250
6-well	500

将已加入细胞裂解工作液, 含有培养细胞的培养板置于摇床上, 室温轻轻摇动 10 ~ 15 分钟, 确保细胞裂解工作液可以完全覆盖单层细胞。

备注: 若出现细胞聚团现象, 可使用移液器轻轻吹打细胞至单个状态。亦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。若细胞数较多, 通常需要增加细胞工作液用量, 以确保细胞完全裂解。

3. 配制萤火虫荧光素酶检测试剂: 将组分 B 和组分 C 按照 1:100 比例进行混合, 上下颠倒数次以混匀。例如: 若实验需要 100 次检测, 则加 100 μL 组分 B 至 10 mL 组分 C 中。

4. 配制海肾荧光素酶检测试剂: 将组分 D 和组分 E 按照 1:100 比例进行混合, 上下颠倒数次以混匀。例如: 若实验需要 100 次检测, 则加 100 μL 组分 D 至 10 mL 组分 E 中。

备注: 配制好的荧光素酶检测试剂 (包含底物的荧光素酶缓冲液) 在室温下避光可稳定储存 1 ~ 2 小时, 建议根据实验需要, 现配现用。荧光素酶的催化速率对温度变化非常敏感, 且两种荧光素酶的活性最适温度为室温 (20 ~ 25°C), 因此在检测之前务必使试剂恢复至室温。

5. 加样前, 将步骤 3 和 4 中配制好的两种荧光素酶检测试剂在室温孵育 5 分钟 (先检测萤火虫荧光素酶, 再检测海肾荧光素酶)。

6. 使用移液器吸取 20 μL 步骤 2 中已充分裂解的细胞裂解液样品, 加至 96-孔白色 (不透光) 或黑色微孔板, 光度计管亦可。再加入 100 μL 孵育好的萤火虫荧光素酶检测试剂 (步骤 5 制备), 温和吹打混匀, 切勿涡旋振荡。于室温孵育 3 ~ 5 分钟, 然后放入仪器中检测萤火虫荧光素酶信号, 记录样品荧光信号的读值。

7. 测试完毕后, 取出微孔板或光度计管。

8. 再向步骤 7 中取出的微孔板或光度计管中加入 100 μL 孵育好的海肾荧光素酶检测试剂 (步骤 5 制备), 温和吹打数次混匀, 切勿涡旋振荡。于室温孵育 3 ~ 5 分钟, 然后放入仪器中继续检测海肾荧光素酶信号, 记录样品荧光信号的读值。

备注: 若使用单个光度计管进行信号测定, 请务必确保所有样品发光信号检测前的处理时间一致, 且需手工记录荧光信号数值; 样品数量较多时, 建议使用 96-孔板完成测试, 并采用多道移液器加样以缩短样品之间的误差; 务必在加入荧光素酶检测试剂后, 室温孵育 5 分钟内完成信号测定, 读板。

9. 测试完毕后, 取出测试用微孔板或光度计管。

10. 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: 由于荧光信号受试验条件影响, 原始结果的比较应在同一时间测定的样品间进行, 并使用相同培养基、血清等试剂。每块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 (±10%)。