

双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Lucy Assay Kit)

货号: AC10987

规格: 100T

保存: 干冰运输。-20℃保存 12 个月。长期保存推荐 -80℃。

产品内容:

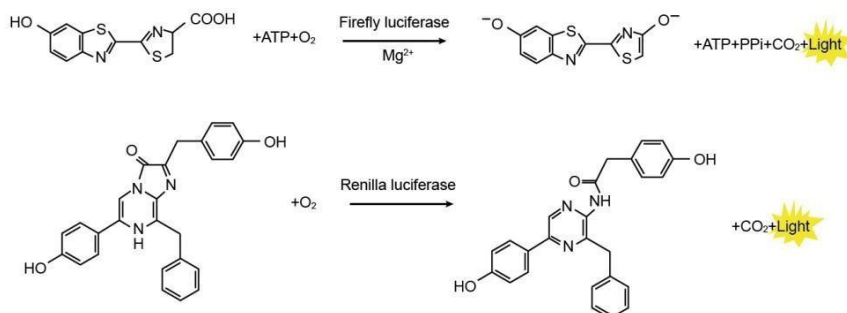
组分编号	名称	100 次	1000 次
A	细胞裂解液	60 mL	60 mL×10
B	萤火虫荧光素酶缓冲液	10 mL	10 mL×10
C	萤火虫荧光素酶底物 (50 X)	200 μL	200 μL×10
D	海肾荧光素酶缓冲液	10 mL	10 mL×10
E	海肾荧光素酶底物 (50 X)	200 μL	200 μL×10

注意: 萤火虫荧光素酶反应工作液和海肾荧光素酶反应工作液现配现用。

产品说明:

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 大小为61 KDa, 单亚基蛋白, 能够催化荧光素 (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, 能够催化腔肠素 (coelenterazine) 氧化形成coelenteramide。二者在翻译后均无需修饰即可发挥作用。

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit 双荧光素酶报告基因检测试剂盒首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, 之后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。其检测机理机理如图所示:



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。

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克隆至Firefly Luciferase的下游, 通过检测萤火虫荧光素酶的量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, 来消除细胞数量或者转染效率的差异。

实验步骤

1: 裂解细胞

1) 将细胞裂解液充分混匀, 按如下方式加入细胞裂解液, 充分裂解细胞。

a: 对于贴壁细胞, 吸尽细胞培养液, 按照下表比例加入细胞裂解液, 轻轻旋转培养皿或者培养板使裂解液完全覆盖细胞;

b: 对于悬浮细胞, 离心弃去上清, 按照下表比例加入裂解液,

细胞培养板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
裂解液加入量	100 μL	150 μL	200 μL	300 μL	500 μL

2) 冰上孵育 5 min, 充分裂解细胞。

3) (选作) 10000-16000rpm 离心 1 min, 取上清。

2: 荧光检测

1) 取 20 μL 细胞裂解液, 加至黑色酶标板中。按照实验需要, 可设置 3 孔-5 孔重复。

2) 配制萤火虫荧光素酶反应工作液和海肾荧光素酶反应液, 即萤火虫荧光素酶底物 (50 X) 和海肾荧光素酶底物 (50 X) 分别用对应的缓冲液稀释至 1 X 工作液。并孵育至室温。

3) 加入 100 μL 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。

4) 加入 100 μL 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。

5) 分析数据。



注意事项

1) 检测过程中需自备耗材和设备包括如下: PBS; 100 μL 移液器或者排枪; 黑色酶标板; Luminometer 发光计或者多功能酶标仪或者其他能够检测生物发光的仪器。

2) 关于检测仪器的选择: 能够检测化学发光或者生物发光的仪器都可适用于此试剂盒。如果使用多功能酶标仪, 为防止各孔之间的干扰, 我们推荐使用黑色酶标板, 并且不同实验组之间最好有间隔。

相关文献:

[1] Kongxi Zhu, Yunxia Wang, Lan Liu, et al. Long non-coding RNA MBNL1-AS1 regulates proliferation, migration, and invasion of cancer stem cells in colon cancer by interacting with MYL9 via sponging microRNA - 412-3p. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology. June 2019. (IF 2.807)