

Dual-Luciferase® 双荧光素酶检测试剂盒

在 Veritas™ 微孔板发光检测仪上的应用



1. 应用说明

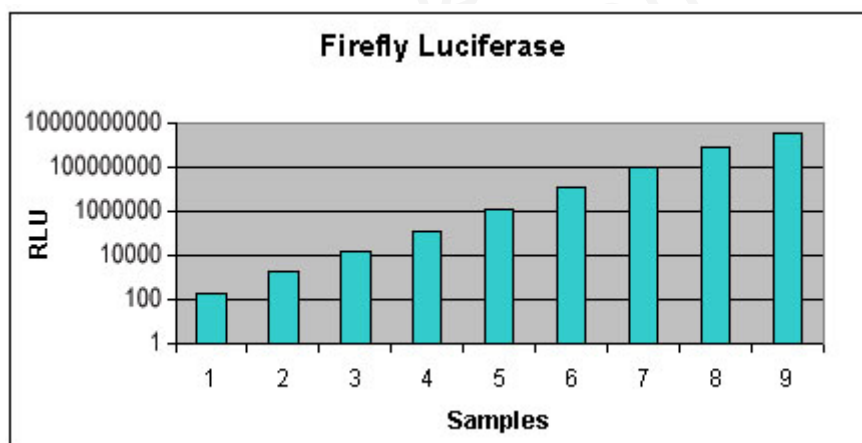
Turner Biosystems公司的Veritas微孔板发光检测仪和Dual-Luciferase双荧光素酶报告基因检测试剂盒联合使用为基因表达的定量研究提供了一种方便、快捷、灵敏的方法。荧光素酶报告基因表达的转录调控常被用来研究培养细胞的生物学特性。荧光素酶是理想的报告基因，因为哺乳动物细胞中不含内源性荧光素酶，一旦转录完成立刻就生成功能性的荧光素酶。

Dual-Luciferase®双荧光素酶报告基因检测系统中含有在同一细胞中同时表达的两种荧光素酶。通常，报告基因实验中往往会受到各种实验条件的影响，共转染的“对照”报告基因会作为内对照，为试验提供一基准线。实验报告基因经过内参照的处理可以减小细胞活性和转染效率对实验的影响，因此双报告系统减少了外部干扰，使得实验数据更可信。实验中报告基因和对照基因的酶没有种源同源性，萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶对应不同的反应底物，反应中没有任何的交叉干扰。

萤火虫荧光素酶底物和海肾荧光素酶底物分别与检测试剂反应可以使灵敏度最大化。由于超强的光信号和超高的信噪比，本系统被广泛用于制药和生物技术产业中。双荧光素酶报告基因检测系统适配于各种培养哺乳细胞的培养基，如1640，MEM，DMEM，F12等。这些试剂与被动裂解液所附带的试剂盒，可以从Promega试剂盒中分开，单独使用。

具有超高灵敏度和超宽线性范围的Veritas™微孔板发光检测仪特别适合DLR 报告基因检测系统，Veritas™软件中预装了DLR 的检测程序使得安装更为方便，内置自动加样器使得应用更为简单。

Veritas™微孔板发光检测仪使用荧光素酶检测试剂II (LAR II)最低可以检测到 1×10^{-19} mol 荧光素酶分子，使用Stop & Glo®试剂可以检测到 1×10^{-18} mol 海肾荧光素酶分子，检测线性范围分别为8 和6 个数量级。所有的检测均采用纯化的重组萤火虫荧光素酶(Promega Catalog# E1701)和纯化的重组海肾荧光素酶(Chemicon Catalog# 4400)。



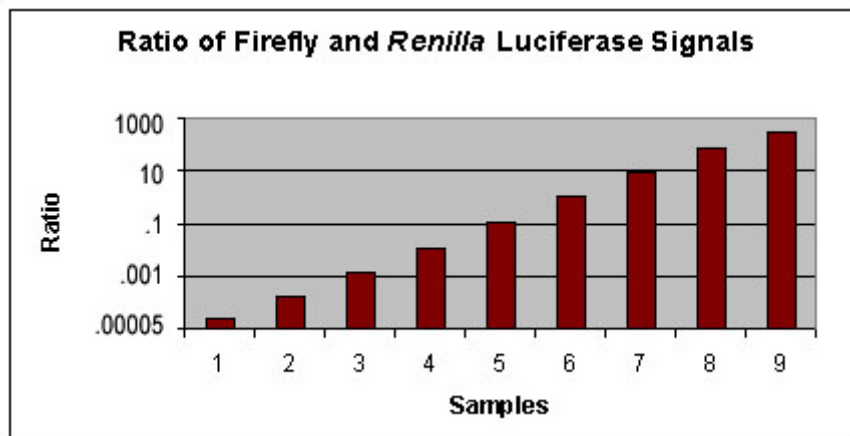
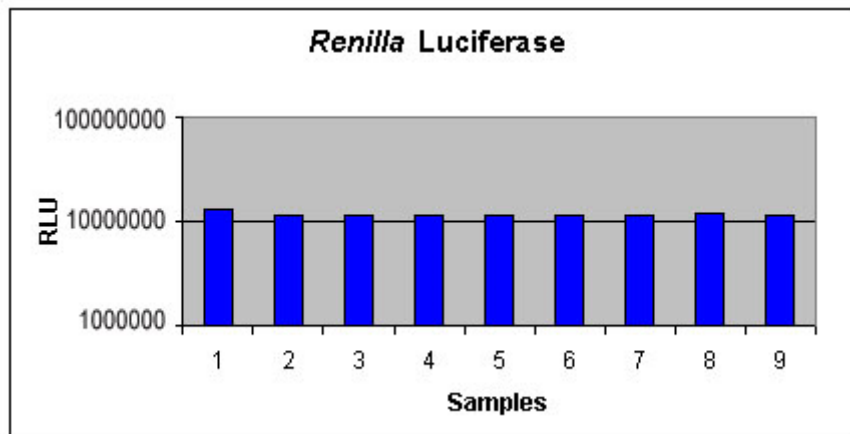


图 1—3 使用 Dual-Luciferase® 双荧光素酶报告基因检测系统, 萤火虫荧光素酶(1×10^{-19} 到 1×10^{-11} mol)和海肾荧光素酶(1×10^{-14} mol)在 Veritas™ 微孔板发光检测仪上测量结果。

2. 所需器材

- [Veritas™ 微孔板发光检测仪](#)
- 96 孔白板 (E&K Scientific EK-25075)
- Dual-Luciferase Reporter® 荧光素酶检测系统 (Promega Catalog #E1980)
- P200 移液器和枪头

3. 实验方案

3.1 试剂制备

- 荧光素酶检测缓冲液II 和荧光素酶检测底物: 使用所提供产品, -20°C 储存, 可以稳定保存6 个月, 荧光素酶检测底物可以 4°C 保存1 个月。将荧光素酶检测缓冲液II 加入荧光素酶检测底物中, 配制DLR 工作液, 颠倒混合, 直到底物彻底溶解。配好试剂最好当天使用, 也可以将配好试剂分装, -20°C 储存1 月, -70°C 储存1 年。
- Stop & Glo® 底物和 Stop & Glo® 底物缓冲液: 使用所提供产品, -20°C 储存。
- Stop & Glo® 底物溶解缓冲液: 使用所提供产品, 低于 25°C 储存。在玻璃管或者硅化聚丙烯酸树脂管中将 $50 \times$ Stop & Glo® 底物稀释成 $1 \times$ Stop & Glo® 工作液。颠倒混合, 工作液最好当天使用, 也可以将工作液分装, -20°C 储存2 周。

- d) 被动裂解缓冲液：用去离子水将5x 被动裂解缓冲液稀释成1x 的，低于25°C 保存。

注意：因为荧光素酶活性受温度影响，在定量发光检测过程中Dual-Luciferase® 荧光素酶缓冲液II 和Stop & Glo®缓冲液应始终保持室温。混合试剂冻存后再次使用，为确保试剂性能，应在低于25°C条件下溶解。溶解后充分混匀，最简单的方法是室温水浴溶解。

3.2 仪器准备

- a) 双击Veritas图标运行软件。
- b) 从"Welcome to Veritas"对话框中点击"Run Promega Protocol"。
- c) 浏览"DLR"文件夹,选择合适的检测程序,例如DLR检测中使用的是单注射器那就选择"DLR with one injection."。
- d) 点击"Options"选择需要检测的孔,默认值是预置了Promega 操作方案的最佳测量值。但也可以根据自己需要在"Other Options"面板中进行检测时间,延迟时间和加样体积的调整。修改结束,点击"Apply Changes"确认修改,或者点击"Save Protocol As"保存修改方案。另外也可以点击"Options"返回"Main Dialog Box"。
- e) 在"Main Dialog Box".中输入个人信息,例如"Experiment", "Operator", "Plate No.", and "Notes"

3.3 样品分析

- a) 准备含有裂解细胞培养物的96 孔板。
- 注意：**为了保证数据良好的重现性。加入试剂前,室温下平衡细胞培养基。
- b) 准备注射器。将注射器1 进样口放入LAR II,将注射器2 进样口放入Stop & Glo®试剂瓶,在"Main Dialog Box"上用"Prime"键对注射器进行初始化。
- 注意：**不能混用注射器。Stop & Glo®试剂对萤火虫荧光素酶活性有猝灭作用。建议一个注射器专门吸入Stop & Glo®, 另一个专门吸入LAR II.
- c) 样品板放入Veritas™微孔板发光检测仪中,点击“Start”开始检测。检测结束后,所有需要检测的样品检测结果会以Excel 表格形式显示,如检测中遇到其他问题,请参考问题导读获取更多信息
- d) 检测结束就可以通过Excel 进行数据分析。
- e) 检测结束取出检测板。选择"Reverse Purge"将管路中剩余试剂回收试剂瓶,而后彻底清洗注射器。

4. 关于 Veritas™微孔板发光检测仪

Veritas™微孔板发光检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款专门用于生物发光与化学发光检测的微孔板型发光检测仪。Veritas™微孔板发光检测仪具有极高的检测灵敏度 (3×10^{-21} moles 荧光素酶) 和极宽的检测范围 (>9 数量级), 可以满足各种发光检测的需求。

5. REFERENCES

1. Ow, D.W. *et al.* (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234, 856—9.
2. De Wet, J.R. *et al.* (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725—37.