

荧光素酶实验的一些影响因素及注意事项

1. 报告基因检测受多种因素影响（载体状态、细胞状态、转染量、转染效率、裂解效率、加样精度、检测过程等），因此同批次样品检测值也可能出现浮动。所以实验一般需要做3个或3个以上复孔，并且引入另一个报告基因作为内参。
2. 细胞培养时间不宜过长，12-36h内最好；长时间培养后，细胞难裂解
3. 双荧光素酶报告基因的载体选择：
 - a) 萤火虫荧光素酶建议选取 pGL-3 或 pGL-4 的载体或自己构建相应的载体；
 - b) 海肾荧光素酶建议选取 phRL-TK 或 pGL-4 代载体或自己构建相应的载体。建议海肾载体不使用强启动子（如 SV40、CMV），而选用中等强度的启动子（如 TK）
4. 双荧光素酶报告基因的载体比例：根据实验具体情况调整。建议作一个预实验来调整（萤火虫载体与海肾载体比例分别用 1: 10、1: 20、1: 50、1: 100），萤火虫荧光素酶检测发光值大于海肾荧光素酶发光值的比例较好。
5. **最适反应温度：室温（20-22℃）。各个组分（细胞裂解产物，底物工作液等）都需要调整到室温。**
6. 双荧光素酶反应体积：20ul（细胞裂解产物）-100ul（萤火虫荧光素酶底物）-100ul（海肾荧光素酶底物），底物量可根据实际情况调整，但一定要保证底物过量，不然会造成检测结果出现大的偏差
7. 细胞裂解液无需离心去沉淀。
8. 被动裂解液存放：5×的裂解液，-20℃存放；1×裂解液，建议现用现配，4℃不能超过1个月
9. 配好的工作液存放：萤火虫检测工作液，-20℃一个月；-80℃一年；海肾检测工作液，建议现用现配，-20℃不能超过15天，反复冻融6次活性损失≤15%
10. 细胞裂解产物存放：常温6小时；4℃16小时，-20℃一个月；-80℃半年或更长
11. 裂解产物与底物混合（手动加样）：要求混合快速、混合时间一致
12. 检测结果：Modulus 单管仪器的检测范围 0-2 千万，Modulus 微孔板检测仪的检测范围 0-2 亿。但实验结果最好落在在“千-百万”这个范围中，这时受实验背景影响最小，线形最好。
 - a) 空管检测仪器背景约 100 左右，样品检测结果最好能比样品高出一个数量级，即检测值上千。
 - b) 检测值过小（比如 300）：说明样品中荧光素酶表达过低，可能与细胞状态、转染条件、转染量、载体结构、启动子活性等有关，如果条件允许，调整各个影响因素，提高发光值。
 - c) 检测值过高（比如 1 千万）：说明样品中荧光素酶表达过高，可能会接近或超过仪器检测上限，建议通过降低转染量或减少检测体积等降低发光。长期检测强光，对仪器有一定的损害。
13. 半衰期：
 - a) 单报告检测试剂盒（E1500）中，萤火虫荧光素酶发光半衰期约 12min
 - b) 双荧光素酶检测试剂盒（E1910）中，萤火虫荧光素酶发光半衰期约 9min，海肾荧光素酶发光半衰期约 2min