

双荧光素酶及其注意事项

李鹏飞

2010年2月22日

主要内容

1、载体选择

2、载体比例

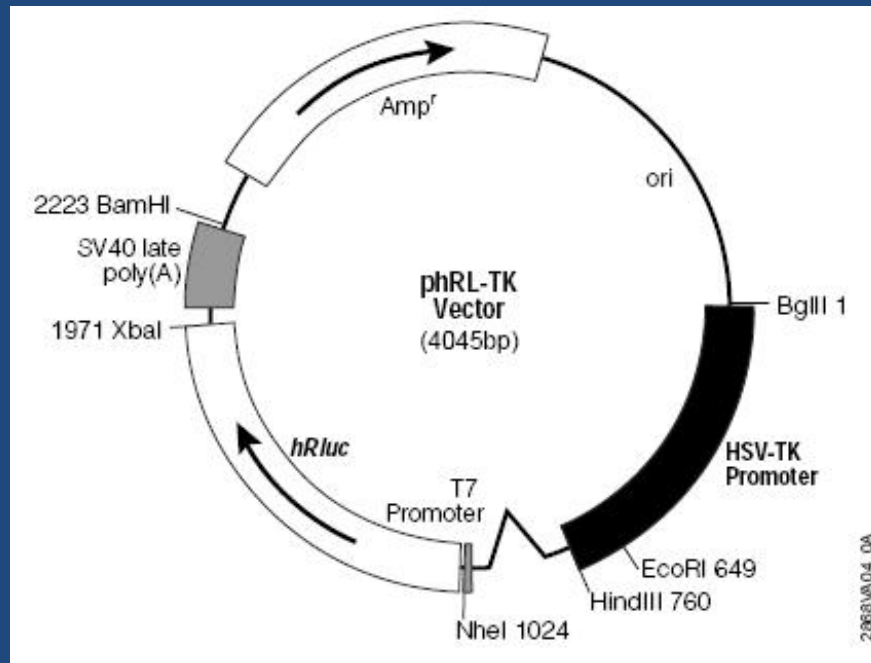
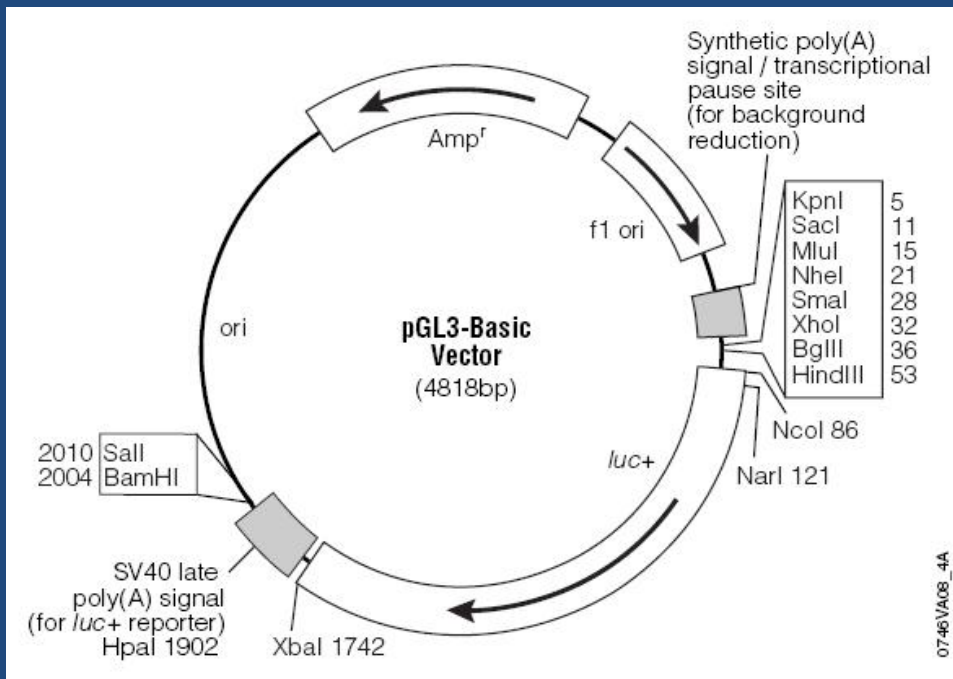
3、细胞与培养

4、工作液配制

5、细胞裂解与检测

6、结果分析

1、载体选择



萤火虫荧光素酶载体：

- pGL3-Control
- **pGL3-Basic**
- pGL3-Promoter
- pGL3-Enhancer
- pGL4-系列载体

海肾荧光素酶载体：

- pRL-SV40
- **pRL-TK** 减少“cross talk”
- PRL-CMV
- pRL-null
- pGL4-系列载体

2、载体比例

- 一般海肾荧光素酶作为对照的报告基因
- 对照的报告基因表达不宜过高
- 建议通过预实验确定载体比例：
 - 将Fluc载体与Rluc载体稀释
 - 按1:1、10:1、20:1、50:1、100:1分别混合
 - 转染细胞，检测表达结果
- 载体比例以Fluc检测值稍大于Rluc为佳

3、细胞与培养

- 同一荧光素酶载体在不同细胞中表达效果差异很大
- 常见的表达较高的细胞有293细胞、HeLa细胞
- 建议做3复孔或更多复孔
- 建议做空细胞对照和阳性对照（使用pGL3-Control等）
- 根据实际情况选择细胞裂解时间
- 细胞培养时间不宜过长，长时间培养后细胞不易裂解

4、工作液配制

- 被动裂解液（PLB）
 - 建议现用现配，1×PLB在4℃存储不超过一月
- 萤火虫荧光素酶检测试剂（LAR II）
 - 底物与缓冲液一次混合、分装，避免反复冻融
 - LAR II 在-20℃稳定一月，-70℃稳定一年
 - 冰冻的LAR II溶解时，不要使用高温处理
- Stop&Glo试剂
 - 建议现用现配
 - 1× Stop&Glo 在-20℃存储不要超过15天
 - 冰冻的试剂溶解时，不要高温处理

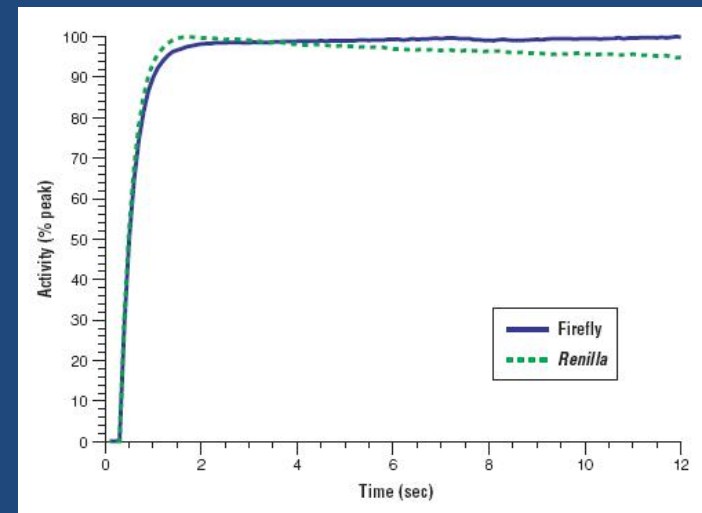
5、细胞裂解与检测

- 细胞裂解

- 去除培养基，PBS清洗细胞，加入PLB裂解细胞
- 常温下裂解15min
- 特殊情况可使用细胞刮刀或枪头反复吹吸
- 裂解产物无需离心即可检测
- 裂解产物室温可稳定6小时，-20 °C稳定一月，-70 °C更长

- 检测

- 反应温度要求**室温**（22 °C左右）
- 标准的检测体系：20ul-100ul-100ul
- 调整体系要适当，一定要保证底物过量
- 样品试剂的混合时间要尽量一致



6、结果分析

- 检测值本身

- 检测值反应样品中荧光素酶的含量
- 检测值过低（例如200），需要增加转染量、调整细胞状态或者更换转染试剂更换细胞系等
- 检测值过高（例如1千万），需要减少转染量

- 检测值比值

- 检测值的比值反应变化情况
- 理想的比值应大于1

双报告检测数据

Firefly luciferase

	1	2	3	4	5	6	空白	阳性	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
E	3811979	2050523	2229496	187092	501837	152382	59	4880126	E
F	2642453	1896948	1885237	119922	725949	133180	78	4704044	F
G	3323590	1973744	2050467	184386	752348	160662	65	3736053	G

Renilla luciferase

	1	2	3	4	5	6	7	8	
E	25436	14035	10250	19035	34074	16511	76	21865	E
F	18503	13750	9417	15106	36038	15289	69	20089	F
G	24711	13313	10311	23456	48935	18027	65	17237	G

ratio

	1	2	3	4	5	6	7	8	
E	149.87	146.10	217.51	9.83	14.73	9.23	0.78	223.19	E
F	142.81	137.96	200.20	7.94	20.14	8.71	1.13	234.16	F
G	134.50	148.26	198.86	7.86	15.37	8.91	1.00	216.75	G