

## MonoLume™ 海肾萤光素酶单检测试剂盒

### 1 产品基本信息

产品名称（中文）：MonoLume™ 海肾萤光素酶单检测试剂盒

产品名称（英文）：MonoLume™ Renilla Luciferase Single Assay Kits

产品编号：MX1551

产品规格：50 T,200 T,5×200 T

产品组分

组分	MX1551S(50 T)	MX1551M(200 T)	MX1551L(5 × 200 T)
A. 5 × Renilla Luciferase Lysis Buffer	5 mL	20 mL	5 × 20 mL
B. Renilla Luciferase Assay Buffer	5 mL	20 mL	5 × 20 mL
C. 50×Coelenterazine	100 μL	400 μL	5 × 400 μL

注：(1)B 组分建议根据实验需求进行小批量分装。B 组分稀释 C 组分配制成的工作液建议现配现用，避免反复冻融。

(2)C 组分易挥发，开封使用后请注意拧紧盖子和封好封口膜保存。

### 2 产品介绍

真核基因表达调控研究常用的方法是进行报告基因的检测，生物发光法又是报告基因检测最常用的有效手段。萤光素酶能催化底物萤光素的转化并发射出光子。该产品为萤火虫萤光素酶报告基因在哺乳动物细胞中的表达提供快速、灵敏、稳定的检测方法，海肾萤光素酶(Renilla Luciferase)是分子量约 36 kDa 的蛋白，在 O<sub>2</sub> 存在下，催化其底物腔肠素(Coelenterazine)氧化成 Coelenteramide 并放出波长 480 nm 左右的萤光。萤光属于化学发光，检测结果可以用酶标仪的化学发光检测模块进行测定。检测原理见图 1。



图 1 检测原理图

产品特点：

- 快速省时：细胞裂解在 10~15 min 内完成；
- 操作简便快捷：试剂易于配制，样品检测步骤简单。

适用范围：

真核基因表达调控研究

### 3 储存与运输

储存条件：-20 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

### 4 使用方法（仅供参考）

#### 一、自备材料

1. 耗材

离心管

2. 试剂

(1) 1 × PBS

### 3. 仪器

(1)微型振荡器 (2)摇床 (3)多功能酶标仪

## 二、操作步骤

### 1. 细胞裂解

(1)将转入报告基因的细胞中的培养基移除，加入 PBS 轻轻洗涤（贴壁细胞可直接进行此操作，悬浮细胞要离心收集细胞）。充分裂解按如下方案加入 1×Lysis Buffer（用无菌水按 4: 1 稀释 A 组分），然后将培养板 放在微型震荡器上室温震荡 15 min，充分裂解细胞得到裂解产物。

细胞培养板	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板
裂解液体积	30 $\mu$ L	60 $\mu$ L	120 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L

注：裂解产物可室温保存 6 h，-70 °C 可长期存放（裂解产物不能多次反复冻融）。

(2)将充分裂解后的裂解产物，10000~15000 rpm 离心 3~5 min，收上清。

### 2. 工作液配制

(1)将所有组分恢复至室温。

(2)用 B 组分充分稀释 C 组分成海肾萤光素酶工作液，稀释方法为将 1  $\mu$ L C 组分加入到 49  $\mu$ L B 组分中。

注：B 组分建议根据实验需求进行小批量分装。海肾检测工作液建议现配现用，避免反复冻融。

### 3. 化学发光值检测

(1)按仪器说明书开启具有检测化学发光功能的仪器，如多功能酶标仪。设定参数，测定时间为 10 s，测定间隔为 2 s。

(2)将细胞裂解产物按照 20~100  $\mu$ L 的体积加入测量管中（保持每次样品量一致）。1 × Lysis Buffer 为空白对照。

(3)加入 100  $\mu$ L 海肾萤光素酶检测液，测定 RLU (Relative light unit)（建议酶标仪设置 Shaking 混匀功能）。

注：步骤 3 的化学发光为瞬时发光，请先打开酶标仪并设置好参数后，建议用排枪加入萤光素酶工作液，并立即进行检测。

## 5 常见问题

**Q1 : C 组分的颜色到底是无色还是黄绿色？**

答：本底物是我们公司自主合成的，不同批次间存在批间差，这是正常现象。

**Q2 : 为什么试剂盒使用到最后发现 E 组分不够？**

答：E 组分易挥发，请每次使用完毕后尽快保存至-20 °C 密封保存，减少 E 组分的挥发。

**Q3 : 酶标仪的检测设置？**

答：Luminescence，350~700 nm，建议检测时间设为 2~10 s。请注意不是吸光度(Absorption)板块。

**Q4 : 检测使用的板子应该怎么选择？**

答：为防止孔间干扰，建议使用白色不透光孔板。黑色不透光孔板也可使用，但相较于白色不透光板测得的萤光值会低。

**Q5 : 双报告基因表达载体应该怎么选择？**

答：(1)萤火虫报告基因质粒原则上含有 luc 基因就可以，但是不同实验 所需的载体有一定差异，如果您要自己构建载体，要注意有些载体没有启动子，需要自行插入启动子，如 pGL3 Basic。

(2)海肾报告基因质粒尽量选择中等强度的启动子，如 TK 启动子等，不要选择强启动子 CMV、SV40 等。海肾基因的表达活性应显著高于背景组，同时不干扰萤火虫萤光素酶报告基因的表达。

(3)报告基因表达载体可选择分别带有萤火虫萤光素酶报告基因和海肾萤光素酶报告基因的两个表

达载体共转染，若海肾萤光素酶作为内对照，构建对照载体，那么萤火虫萤光素酶作为实验组，构建实验载体，共转染时，实验载体：对照载体组合之比可以在 10 : 1~100 : 1 (或更大) 是可行的。或者也可选择一个表达质粒 (可同时表达萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶，但二者的表达分别由不同的启动子控制表达)，选择表达量相对弱的作为内对照。

#### Q6 : 怎么保证数据重复性和复孔误差?

答: (1)为取得最佳测定效果，在用单管的化学发光仪测定时，样品和测定试剂混合后到测定前的时间应尽量控制一致；使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时，宜先把样品全部加好，然后用排枪统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。

(2)由于温度对酶反应有影响，所以测定时，样品和试剂均需达到室温后再进行测定。

#### Q7 : 荧光值过高是什么原因造成的？该怎么解决？

答: (1)荧光值过高可能会超出仪器检测范围，从而检测不到值。

(2)减少质粒转染量。

(3)细胞样品裂解后，离心取上清后检测或对裂解产物进行稀释后检测。

(4)不建议通过减少底物量来降低荧光值，需要保证底物的饱和来反映荧光素酶真实的表达水平，否则会造成检测结果出现大的偏差。

#### Q8 : 荧光值过低或无荧光值是什么原因造成的？该怎么解决？

答: (1)荧光素酶的表达水平与启动子活性相关，正常表达水平下检测到的荧光值应在  $10^5$  数量级左右，若检测到的荧光值比较低或无荧光值，可从启动子活性、转染效率、检测过程这几方面进行考虑。

(2)转染效率低。

1)优化转染实验条件，用较易转染的质粒做阳性对照 (如转染过表达荧光蛋白质粒)；

2)确保转染 DNA 的质量，可通过酶切或琼脂糖凝胶电泳的方法对 DNA 质量进行鉴定；

3)选择活性较高，处于指数分裂期的细胞进行转染。

(3)启动子活性低或诱导失败。

1)转染后的细胞培养使用特异性诱导启动子的条件；

2)优化细胞的培养条件，提高荧光素酶的表达量；

3)更换强启动子 (如 SV40、CMV)。

4)海肾荧光素酶基因作为内对照，其表达应不受时期、部位、环境影响，因此常用组成型表达的 TK 启动子。

(4)样品裂解效率低。

1)细胞培养时间不宜过长，12~36 h 内最好，长时间培养后，细胞可能会难裂解。

2)加入的裂解液需足量，保证细胞能够充分裂解。

(5)检测过程操作不规范。

1)选择合适的检测仪器，能够检测化学发光或者生物发光的仪器都适用于该实验；

2)需加入足量底物，保证底物的饱和，否则会造成检测结果出现很大偏差；

3)室温反应。反应时各个组分 (细胞裂解产物，底物工作液等) 都需要调整到室温；

4)荧光素酶的半衰期一般约 30 min，加完底物后可立即检测，尽量在 30 min 内完成。

(6)底物氧化失效。

1)底物避光密封保存，萤火虫萤光素酶底物-20 °C保存；海肾萤光素酶底物推荐-20°C保存；

2)反应工作液建议现用现配。

## 6 注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 海肾萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 480 nm。请用化学发光（Luminescence）模块进行检测。
- 如果单管萤光测定仪测定，每个样品与测定试剂混合后到测定前的时间应保持一致。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。