

高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
RG021S	高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒	100次
RG021M	高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒	1000次

产品简介:

- 碧云天生产的高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒(Gaussia Luciferase Reporter Gene Assay Kit), 也称高斯萤光素酶检测试剂盒(Gaussia Luciferase Assay Kit), 是一种高灵敏度、高信号稳定性的以肠胞素(Coelenterazine)为底物来检测分泌型、非ATP依赖的高斯萤光素酶(Gaussia luciferase, 简称Gluc)活性的试剂盒。本试剂盒可以检测不同类型的含有高斯萤光素酶的样品, 既可以用于细胞培养上清样品的检测, 也可以用于细胞裂解样品或纯化的酶的检测, 特别适用于高通量筛选(High-throughput screening)和酶活性的实时研究。
- 本产品的性能达到甚至优于国外主要同类产品。本产品的性能和用途与Thermo Scientific公司的Pierce™ Gaussia Luciferase Glow Assay Kit基本相同。本产品的检测灵敏度显著优于国外同类产品(Competitor T) (图1A、B), 化学发光的信号稳定性与国外同类产品(Competitor T)基本一致(图1C)。本产品的检测效果及与国外同类产品Competitor T的检测效果比较参见图1。

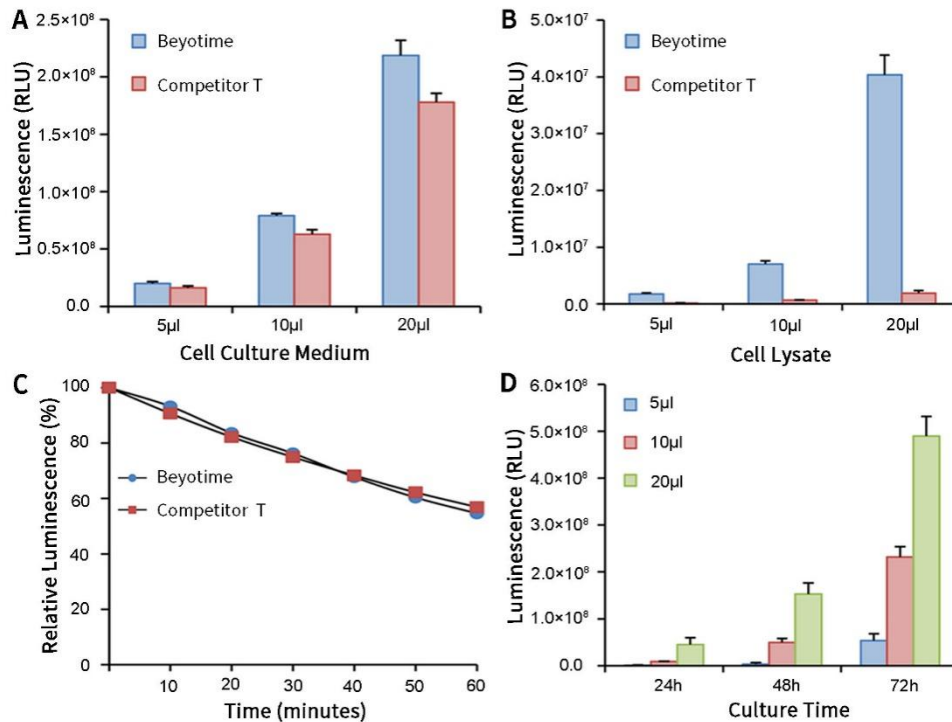


图1. 碧云天高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒(RG021)和国外同类产品(Competitor T)对转染阳性高斯萤光素酶报告基因质粒 pGLuc-Dura-SV40-C (D2770)的293T细胞的检测效果。图A和B分别为本产品(Beyotime)和国外同类产品(Competitor T)对使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染阳性高斯萤光素酶报告基因质粒48小时的293T细胞培养上清与细胞裂解液样品(分别使用各自的裂解液进行裂解), 进行的化学发光强度的检测效果对比图; 图C为本产品(Beyotime)和国外同类产品(Competitor T)对转染阳性高斯萤光素酶报告基因质粒48小时的293T细胞培养上清样品, 进行的化学发光稳定性的检测效果对比图; 图D为本产品对转染阳性高斯萤光素酶报告基因质粒24、48、72小时的293T细胞培养上清样品(转染时的细胞密度约为50-70%), 进行的化学发光强度的检测效果图。实际读数会因细胞种类、高斯萤光素酶表达体系、转染效率、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- ▶ **本产品发光强度高。**对于相同的细胞上清样品, 本产品的发光效果比国外同类产品(Competitor T)强约20% (图1A); 对于相同的细胞裂解液样品, 本产品的发光效果是国外同类产品(Competitor T)的10-50倍(图1B)。实测效果可能会因细胞种类、检测环境等的不同有所差异。
- ▶ **本产品发光信号非常稳定。**发光信号在10分钟内波动不超过15%, 反应30分钟内信号波动不超过30%, 信号半衰期大于60分钟, 在发光稳定性方面和国外同类产品(Competitor T)基本一致(图1C), 特别适用于96或384孔板中高斯萤光素酶活性的大批量测

定。

- **本产品操作简单，读数稳定，检测速度快，完成检测仅需约10分钟。**高斯萤光素酶为分泌型萤光素酶，报告基因质粒转染哺乳动物细胞后，大部分高斯萤光素酶可以分泌到细胞外，检测时无需裂解细胞，可直接取上清进行检测，操作非常方便，特别适用于不同时间点的报告基因的检测(图1D)。检测时只需把试剂盒提供的高斯萤光素酶检测底物和高斯萤光素酶检测缓冲液按照1:100比例混合配制成高斯萤光素酶检测工作液，再与5-20微升细胞培养上清或细胞裂解样品混合，反应5-10分钟后即可进行化学发光检测，并且产生的化学发光信号比较稳定，信号半衰期大于60分钟。使用可以测定96孔板的化学发光的多功能酶标仪通常在2分钟内就可以完成一块96孔板的检测。
- **本产品稳定性好。**本试剂盒中的高斯萤光素酶检测缓冲液稳定性非常好，反复冻融10次、4°C保存7天或37°C保存1天对检测效果基本无影响。37°C保存3天检测效果下降不超过5%，37°C保存7天检测效果下降不超过20%。高斯萤光素酶检测底物在4°C保存1周、室温保存1天检测效果下降不超过10%，室温保存3天、37°C保存1天，仍可保留80%以上的检测效果。
- **本产品使用灵活便捷。**本产品不仅适合少量样品的检测，也非常适合大量样品的高通量检测(High-throughput screening)；本产品不仅可以用于细胞上清样品的检测，试剂盒同时也提供了高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液，可以用于细胞裂解样品的检测。
- **本产品兼容性强。**本产品兼容各种常见培养液，正常培养液中的酚红、10%以内的胎牛血清或小牛血清、2%以内的DMSO或乙醇、萤光素酶抑制剂等对信号和稳定性基本没有影响，常用的盐类或金属离子在正常浓度下也基本没有影响。
- 高斯萤光素酶(Gussia luciferase)是分离于夏威夷水域的一种大型海洋桡脚类(Copepod)动物(Gussia princeps)的新型萤光素酶。高斯萤光素酶为单条肽链的单体酶，其分子量较小(20kDa)，且具有分泌性信号肽，可通过内质网分泌到细胞外。与萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase)和天然的海肾萤光素酶(Renilla luciferase)相比，高斯萤光素酶具有以下优点：高斯萤光素酶为自然分泌型萤光素酶，可直接取上清检测，无需裂解细胞，样本的分析和酶活检测只需要几分钟，使得操作更加方便，更适用于报告基因不同时间点的检测和高通量筛选；高斯萤光素酶是可获得的较亮的萤光素酶，它的发光强度是萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的萤光信号的1000多倍，具有更高的检测灵敏度；反应无须ATP，不受ATP影响；高斯萤光素酶的稳定性更高，对温度和pH的耐受性强，可适用于多种培养基[1-3]。
- 高斯萤光素酶产生的生物萤光是由于腔肠啉的氧化作用，这种反应不需要三磷酸腺苷(ATP)或其它辅助因子。在氧气存在的条件下，高斯萤光素酶可以催化腔肠素(Coelenterazine)氧化成Coelenteramide。在Coelenterazine氧化的过程中，会发出波长为480nm左右的生物萤光(Bioluminescence)。生物萤光可以通过化学发光仪(Luminometer)或液闪测定仪进行测定，萤光强度与高斯蛋白表达量相关，与高斯蛋白表达的启动子活性成正比。通过萤光素和萤光素酶这一生物发光体系，可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。通常把感兴趣基因的转录调控元件或5'启动子区克隆在luciferase的上游，或把3'-UTR区克隆在luciferase的下游等，构建成报告基因(Reporter gene)质粒，然后转染细胞，用适当药物等处理细胞后，测定萤光素酶活性。通过萤光素酶活性的高低来判断药物处理等对目的基因的转录调控作用。本试剂盒的检测原理参考图2。

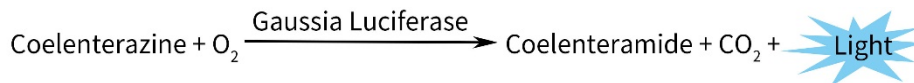


图2. 高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒(RG021)的检测原理图。

- 碧云天同时提供高斯萤光素酶报告基因的空载体质粒和直接使用的报告基因质粒，详见相关产品。
- 萤光素、萤光素酶、萤火虫萤光素酶、海肾萤光素酶和高斯萤光素酶也经常被称作荧光素、荧光素酶、萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶和高斯荧光素酶。
- 对于96孔板，按照检测每个样品需要50μl检测工作液的量，此时本试剂盒S和M包装分别可以进行100次和1000次检测。对于384孔板，按照检测每个样品12.5μl检测工作液的量，此时本试剂盒S和M包装可以进行400次和4000次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
RG021S-1	高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液	10ml
RG021S-2	高斯萤光素酶检测缓冲液	5ml
RG021S-3	高斯萤光素酶检测底物(100X)	50μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
RG021M-1	高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液	100ml
RG021M-2	高斯萤光素酶检测缓冲液	50ml
RG021M-3	高斯萤光素酶检测底物(100X)	50μl×10
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，6个月有效。RG021-1 高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液和RG021-2 高斯萤光素酶检测缓冲液，-20°C保存一年有效；RG021-3 高斯萤光素酶检测底物(100X)，-20°C避光保存6个月有效，-80°C避光保存一年有效。

注意事项：

- 由于萤光素酶的活性对温度比较敏感，所以反应前细胞样品和高斯萤光素酶检测缓冲液均需平衡至室温后再进行测定。可将检测缓冲液在室温或不超过25°C的水浴中融解并混匀后再与检测底物混合成检测工作液使用。
- 本试剂盒中的高斯萤光素酶检测缓冲液在反复冻融过程中，可能会导致检测试剂中出现少量沉淀，此时宜平衡至室温，并尽量溶解。如仍有残留的不溶物，可以离心去除后使用，经测试不会影响后续的检测效果。
- 本试剂盒中的高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液作用于细胞时仅会让细胞中的高斯萤光素酶充分有效地释放，但不会裂解细胞，裂解得到的细胞样品适合用于高斯萤光素酶报告基因的检测，不是很适合用于SDS-PAGE或Western检测。
- 高斯萤光素酶检测底物(100X)配制在含有高浓度乙醇的溶液中。由于乙醇容易挥发，有时会在初次使用时发现体积明显小于包装体积的情况，此时用无水乙醇把体积补足至包装体积，并混匀后即可使用。
- 高斯萤光素酶检测工作液宜配制后立即使用。如不能立即使用，-20°C可以保存一周。随着保存时间的延长检测效果会不断下降，因此不可配制成工作液后长期保存。
- 细胞的培养和转染等可以使用普通的透明96/384孔板，但是使用多功能酶标仪对细胞培养上清或细胞裂解样品进行化学发光的检测时，请使用孔和孔之间不透光的96/384孔白板或黑板。如果使用普通透明的96/384孔板，相邻孔之间会产生相互干扰。推荐使用碧云天的BeyoGold™全黑或全白96/384孔细胞培养板(FCP966/FCP968/FCP983/FCP985)、白色或黑色透明底96/384孔细胞培养板(FCP963/FCP965/FCP986/FCP987)。
- 待测药物的溶剂含量较高时可能会干扰萤光素酶反应，从而影响化学发光信号。可以通过设置含有溶剂的细胞培养液对照孔排除溶剂的干扰。经测试，最终反应体系中DMSO含量在2%以内不会对反应产生影响。
- 对于同一批样品的检测，必须固定所用样品的体积，使不同样品之间的检测数据具有更好的可比性。
- 如需更多的高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液，可以单独选购碧云天生产的高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液(RG135)，该产品与本试剂盒中的高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液的组分完全一致。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。

使用说明：

1. 细胞的准备：

使用适合进行化学发光检测的96孔板，每孔接种100μl细胞(如使用384孔板，每孔接种25μl细胞，具体用量视不同类型的384孔板而定)，同时设置不含细胞的培养液孔作为阴性对照，按照细胞培养和细胞转染的常规方法培养和转染细胞。如有需要，可加入药物处理细胞。继续培养16-72小时。

2. 检测试剂的准备：

- a. 试剂准备：融解高斯萤光素酶检测缓冲液，并平衡至室温。高斯萤光素酶检测底物(100X)放置于冰浴或冰盒上备用。
- b. 高斯萤光素酶检测工作液的配制：按照检测每个样品需要50μl检测工作液的量，计算所需的高斯萤光素酶检测工作液的量。按照1:100的比例混合适量高斯萤光素酶检测底物(100X)和高斯萤光素酶检测缓冲液，配制成高斯萤光素酶检测工作液。例如，1ml高斯萤光素酶检测缓冲液中加入10μl高斯萤光素酶检测底物(100X)充分混匀后即可配制成约1ml高斯萤光素酶检测工作液。

3. 细胞样品的准备：

- a. 细胞培养上清样品的准备：根据具体实验情况，酌情收集5-200μl细胞培养上清至1.5ml离心管中或收集5-20μl细胞培养上清至检测化学发光用的96孔白板或黑板中，平衡至室温。如有需要，可以在不同的时间点收集培养基，以监测萤光素酶表达的变化。如果不能立即检测，可以将收集好的细胞培养基存放于-20°C。样品在-20°C至少可保存一个月。
- b. 细胞裂解样品的准备：去除细胞培养液，用PBS洗涤1次，每孔加入高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液100μl，适当吹打后在摇床上以中等速度摇动裂解15分钟，得到的细胞裂解样品就可以直接用于高斯萤光素酶报告基因的检测。如果不能立即检测，可以将裂解液样品存放于-20°C，至少可保存一个月。如果细胞最初培养在48孔、24孔、12孔或6孔板中，每孔酌情加入约100-500μl裂解液。

4. 萤光素酶检测：

- a. 取5-20μl细胞培养上清或细胞裂解样品加入96孔白板或黑板。
注1：优先推荐使用5μl样品，样品体积较小时化学发光更加稳定。
注2：对于同一批样品的检测，必须固定所用样品的体积，使不同样品之间的检测数据具有更好的可比性，因为样品体积的大小对于最终的化学发光值会产生一定的影响。
- b. 每孔加入高斯萤光素酶检测工作液50μl，混匀。
- c. 室温(约25°C)孵育5-10分钟，使发光信号趋于稳定。
- d. 使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。请根据仪器要求设置相应的参数，每个孔的检测时间一般为0.25-1秒或更长时间，具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。

常见问题：

1. Luminometer和荧光分光光度计有何不同？

荧光分光光度计检测的样品本身不能发光，样品需要由特定波长的激发光激发，然后才能产生荧光并被荧光分光光度计检测。Luminometer检测的样品本身可以发光，不需要激发光进行激发。也就是说luminometer是检测化学发光(萤光)的仪器。有些型号的荧光分光光度计也具有luminometer的功能，即也可以检测化学发光。您所使用的荧光分光光度计能否用于化学发光的测定请仔细阅读该仪器的说明书。

2. 可以进行萤光素酶报告基因检测的仪器是否就可以用于本试剂盒的检测?

是。萤光素酶报告基因的检测原理和本试剂盒的原理相同, 可以用相同的仪器测定。

参考文献:

1. Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Mol Ther. 2005. 11(3):435-43.
2. Szent-Gyorgyi C, et al. Proc SPIE. 1999. 3600(1):4-11.
3. Tannous BA. Nat Protoc. 2009. 4:582-591.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
RG021	高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒	100/1000次
RG072	Gaussia-Lumi™高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒	100/1000次
RG135	高斯萤光素酶报告基因细胞裂解液	10/100ml
D2098	pGLuc (报告基因质粒)	1/100µg
D2100	pGLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2103	pGLuc-TA (报告基因质粒)	1/100µg
D2104	pGLuc-Dura-TA (报告基因质粒)	1/100µg
D2107	pGLuc-Dura-miR (报告基因质粒)	1/100µg
D2114	pARE-GLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2181	pISRE-TA-GLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2209	pNFκB-TA-GLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2225	pp53-TA-GLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2261	pSTAT3-TA-GLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2204	pNFκB-GLuc-Dura (报告基因质粒)	1/100µg
D2764	pGLuc-Dura-SV40-N (报告基因质粒)	1/100µg
D2770	pGLuc-Dura-SV40-C (报告基因质粒)	1/100µg
FCP966	BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	80个/盒, 320个/箱
FCP968	BeyoGold™全白96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	80个/盒, 320个/箱
FCP963	BeyoGold™白色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱
FCP965	BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱
FCP981	BeyoGold™ 384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱
FCP983	BeyoGold™全白384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱
FCP985	BeyoGold™全黑384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱
FCP986	BeyoGold™白色透明底384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱
FCP987	BeyoGold™黑色透明底384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒, 48个/箱

Version 2023.09.26