

中文说明书

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

适用产品目录号：E1910 和 E1960



Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. 产品描述	2
1.A. Dual-Luciferase [®] Reporter Assay 化学反应过程	3
1.B. Dual-Luciferase [®] Reporter Assay 检测模式	6
1.C. Passive Lysis Buffer	7
2. 产品组分和储存条件	8
3. pGL4 萤光素酶报告基因载体	9
3.A. pGL4 载体介绍	9
3.B. 共转染实验的重要注意事项	9
4. 仪器注意事项	10
4.A. 单样品发光检测仪	10
4.B. 多样品读板发光检测仪	10
4.C. 闪烁计数器	10
5. 使用 Passive Lysis Buffer 制备细胞裂解物	11
5.A. 制备 Passive Lysis Buffer	11
5.B. 培养于多孔板中细胞的被动裂解	12
5.C. 通过刮取主动裂解细胞	13
6. Dual-Luciferase [®] Reporter Assay 操作步骤	14
6.A. 制备 Luciferase Assay Reagent II	14
6.B. 制备 Stop & Glo [®] 试剂	14
6.C. 标准检测步骤	15
6.D. 清洗试剂进样器的重要注意事项	17
6.E. 检测本底的测定	18
7. 参考文献	20
8. 附录	21
8.A. 缓冲液和溶液的组成	21
8.B. 相关产品	21
9. 内容变更总结	24

1. 产品描述

遗传报告基因系统目前广泛用于真核基因表达和细胞生理学的研究。其应用领域包括受体活性、转录因子、细胞内信号传导、mRNA 加工和蛋白质折叠等相关研究。双报告基因常被用来提高实验准确性。“双报告基因”这一术语指在一个系统中同时表达和测量两种单独的报告基因酶。一般来说，“实验”报告基因与特定实验条件产生的效应相关，而共转染的“对照”报告基因的活性则提供了可作为基线响应的内对照。将实验报告基因的活性相对于内对照的活性进行归一化处理，可最大程度降低细胞活性或转染效率差异造成的实验变异性。同时也可有效消除其他造成变异性的因素（例如移液体积、细胞裂解效率和检测效率等）。因此，一般来说，双报告基因检测法可通过减少外部因素影响，实现对实验数据更为可靠的解读。

Dual-Luciferase[®] Reporter (DLR[™]) 检测系统^(a-c) 是进行双报告基因检测的有效方法。DLR[™] 检测系统可依次测量单个样品中萤火虫 (*Photinus pyralis*) 和海肾 (*Renilla reniformis*, 也称 sea pansy) 萤光素酶的活性。首先通过添加 Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 产生稳定的发光信号，来测量萤火虫萤光素酶报告基因。在完成对萤火虫发光的定量后，通过向同一管中添加 Stop & Glo[®] 试剂淬灭该反应并同时启动海肾萤光素酶反应。Stop & Glo[®] 试剂也可产生源自海肾萤光素酶的稳定信号，此信号在测量过程中会缓慢衰减。在 DLR[™] 检测系统中，两种报告基因均可产生线性的检测且其灵敏度可达亚阿托摩尔级 (subattomole)。而且两种报告基因在实验用宿主细胞中均无内源活性。此外，DLR[™] 检测系统的整合模式可实现两种报告基因在转染细胞或无细胞转录 / 翻译反应体系中的快速定量。

Promega 公司可提供专门为配合 DLR[™] 检测系统使用而设计的 pGL4 系列萤火虫和海肾萤光素酶载体。这些载体可与实验和对照报告基因结合使用，共转染哺乳动物细胞。

1.A. Dual-Luciferase[®] Reporter Assay 化学反应过程

由于萤火虫和海肾萤光素酶的进化起源不同，因此这两种酶的结构和对底物的要求各不相同。利用这些差异，可选择性地区分其相应的生物发光反应。因此，使用 DLR[™] 检测系统，可淬灭萤火虫萤光素酶反应的发光信号并同时激活海肾萤光素酶的发光反应。

萤火虫萤光素酶是一种分子量大小为 61kDa 的单体蛋白，无需翻译后加工即具有酶活性（1，2）。因此，该酶在翻译后可立即作为遗传报告基因发挥功能。通过在需要 ATP、Mg²⁺ 和 O₂ 的反应中氧化甲虫萤光素可实现光子发射（图 1）。在常规反应条件下，氧化过程通过转换速度极为缓慢的萤光素化 -AMP（luciferyl-AMP）中间体实现。因此，此检测方法的化学反应过程中可产生“闪光”型的光信号，其在底物和酶混合后会迅速衰减。

我们用于定量萤火虫萤光素酶的多种萤光素酶检测试剂均含辅酶 A（CoA），以便得到更佳的整体反应动力学（3）。在 CoA 存在的条件下，萤光素酶检测可产生稳定的发光信号且其强度（图 2）显著高于常规检测方法的化学反应过程中所产生的信号。萤火虫萤光素酶检测方法灵敏度极高，且酶浓度可涵盖至少七个数量级的线性范围（图 3）。

海肾萤光素酶是一种分子量为 36kDa 的单体蛋白，从其天然来源海肾（*Renilla reniformis*）纯化得到的酶由 3% 的碳水化合物组成（4）。如萤火虫萤光素酶一样，该酶无需翻译后修饰即具有活性，且在翻译后可立即作为遗传报告基因发挥功能。海肾萤光素酶催化的发光反应需要氧气和腔肠动物萤光素（腔肠素）的参与（图 1）

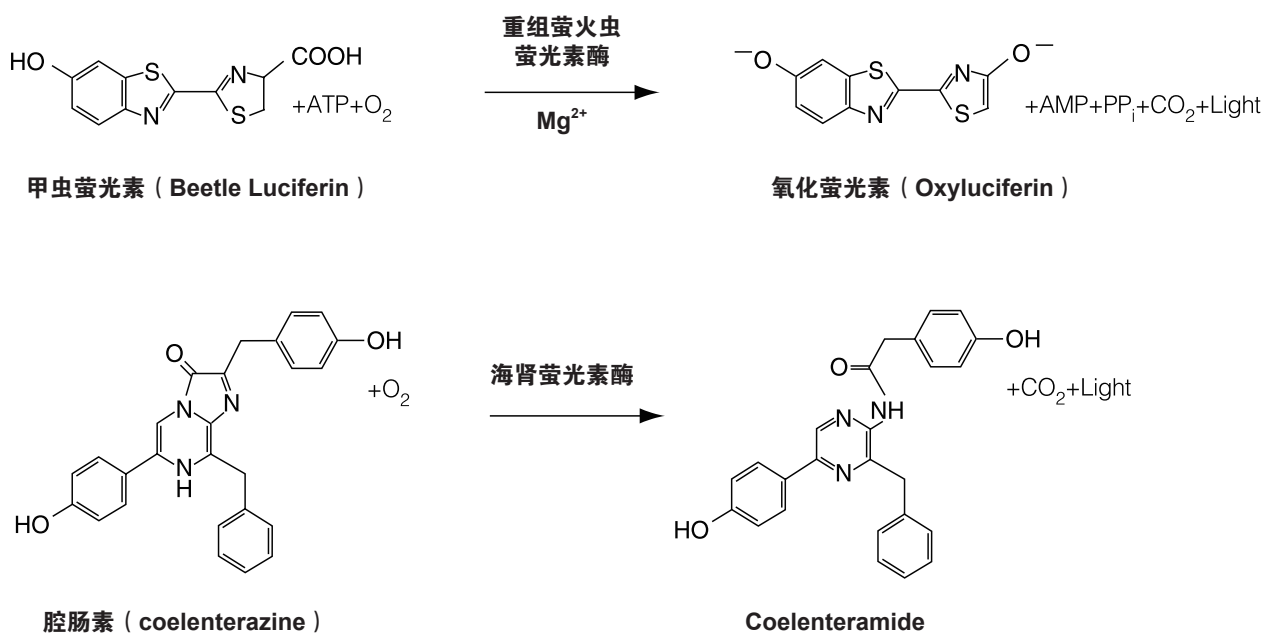


图 1. 萤火虫和海肾萤光素酶催化的生物发光反应。

1.A. Dual-Luciferase® Reporter Assay 化学反应过程 (续)

在 DLR™ 检测的化学反应过程中，海肾萤光素酶反应的动力学可产生稳定的发光信号，但该信号在测量过程中会缓慢衰减（图 2）。海肾萤光素酶与萤火虫萤光素酶类似，其催化的发光反应的灵敏度也极高且线性范围一般可涵盖六个数量级（图 3）。请注意，发光反应的有效范围可能会因所用发光检测仪的类型不同（例如 96 孔与单个样品）而异。

腔肠素的固有特性是它在水性溶液中可发出较低水平的自发光。最初，当酶浓度较低时此缺点影响了检测的灵敏度。此外，一些常用于制备细胞裂解物的非离子型去污剂（例如 Triton® X-100）可显著增强腔肠素的自发光。DLR™ 检测系统中包含专有的化学物质，可将自发光降低至除了最灵敏度的发光检测仪以外的其他设备均无法检测到的水平。Passive Lysis Buffer 的配方可最大程度降低裂解物组分对腔肠素自发光的的影响。此外，DLR™ 检测系统还包括两种复溶检测试剂（Luciferase Assay Reagent II 和 Stop & Glo® 试剂），两者结合使用可抑制腔肠素自发光信号。

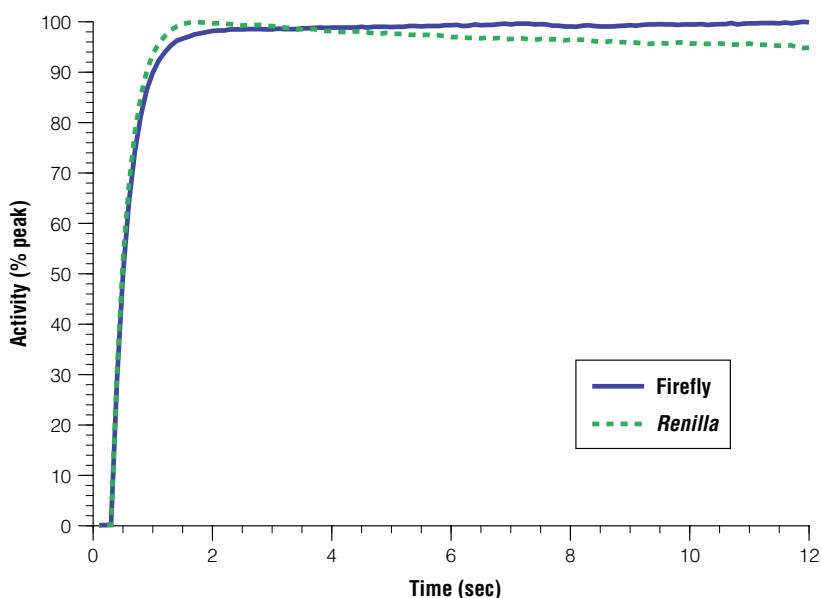


图 2. 萤火虫和海肾萤光素酶在 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 中产生的发光信号。

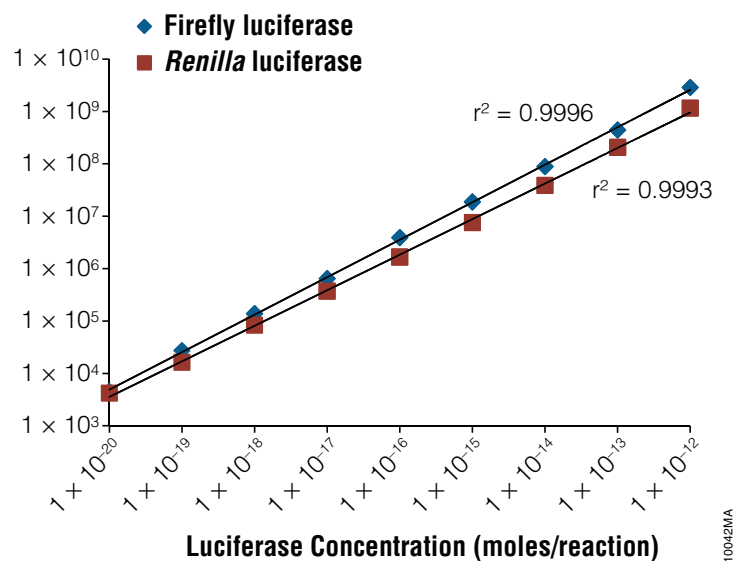


图 3. 萤火虫和海肾荧光素酶的线性范围比较。使用纯化的萤火虫和海肾荧光素酶混合物（用含有 1mg/ml BSA 的 PLB 制备）进行 DLR™ 检测。使用 Promega 公司 GloMax® 20/20 发光检测仪测量发光信号。如图所示，使用 DLR™ 检测系统，萤火虫荧光素酶检测的线性范围为 8 个数量级，且萤火虫荧光素酶报告基因酶的检测灵敏度 ≤ 0.1 毫微微克（约为 10^{-21} 摩尔）。海肾荧光素酶检测的线性范围涵盖 8 个数量级，且可检测到约 0.1 毫微微克（约 10^{-21} 摩尔）的海肾荧光素酶。

1.B. Dual-Luciferase® Reporter Assay 检测模式

制备裂解物后可立即对来自每种萤光素酶报告基因酶的发光信号进行定量，而无需进行分样或其他处理。向 Luciferase Assay Reagent II 中加入一份裂解物后便可启动萤火虫萤光素酶报告基因检测。在萤火虫萤光素酶反应定量结束后，立即将 Stop & Glo® 试剂添加至样品管中，以淬灭萤火虫萤光素酶发光信号并同时激活海肾萤光素酶。加入 Stop & Glo® 试剂后，萤火虫反应产生的发光信号可在 1 秒内降低 10^5 倍（至 $<0.001\%$ 的残余光输出信号）（图 4）。与此同时，海肾萤光素酶也在这 1 秒内被完全激活。当使用手动发光检测仪时，定量两种萤光素酶报告基因活性所需的时间约为 30 秒。该操作流程可概括如下：

	所需时间
步骤 1： 将制备好的裂解物手动加入 Luciferase Assay Reagent II（已预先分装至发光检测管）中；混匀。	约 3 秒
步骤 2： 定量萤火虫萤光素酶活性。	12 秒
步骤 3： 添加 Stop & Glo® 试剂；混匀。	3 秒
步骤 4： 定量海肾萤光素酶活性。	12 秒
整个 DLR™ Assay 所需时间	30 秒

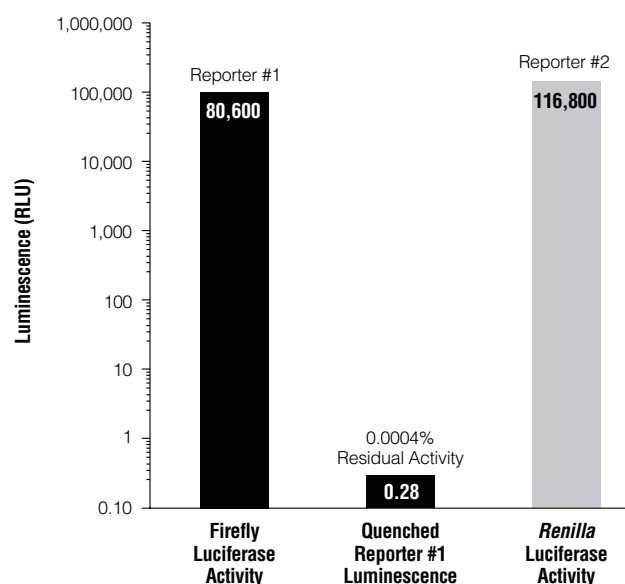


图 4. 添加 Stop & Glo® 试剂前后的萤光素酶活性测量值。DLR™ Assay 可按顺序先测量萤火虫萤光素酶（报告基因 # 1），然后在将 Stop & Glo® 试剂加入反应体系后，再测量海肾萤光素酶活性（报告基因 # 2）。在同一裂解物样品中（从用 pGL3 对照载体（目录号：E1741）和 pRL-SV40 载体（目录号：E2231）共转染的 CHO 细胞制得）对两种报告基因活性进行了定量。为证明 Stop & Glo® 试剂可有效淬灭报告基因 # 1，添加了等体积的 Stop & Glo® Buffer（不含海肾萤光素酶的底物）。萤火虫萤光素酶的发光信号淬灭程度超过 5 个数量级。

1.C. Passive Lysis Buffer

Passive Lysis Buffer (PLB) 的配方经过专门的优化, 可促进培养的哺乳动物细胞的快速裂解, 且不需要刮取贴壁细胞或进行额外的冻融循环步骤(主动裂解)。此外, PLB 还可防止样品起泡, 因此非常适合高通量应用(在这种应用中, 将一系列处理过的细胞在多孔板中培养、加工成裂解物并使用自动化系统进行检测)。虽然 PLB 是专为被动裂解应用而配制的, 但当使用主动裂解方式收获在标准培养皿中培养的贴壁细胞时, 其强大的裂解性能同样具有优势。对于培养的哺乳动物细胞而言, 无论采用何种裂解方法, 萤火虫和海肾萤光素酶报告基因酶向细胞裂解物中的释放都是定量且可靠的(图 5)。

除其裂解特性外, PLB 还旨在保持萤火虫和海肾萤光素酶报告基因酶的最佳性能和稳定性。与其他细胞裂解试剂不同, PLB 的一个重要特征是它仅会引起极低水平的腔肠素自发光信号。因此, 当使用 DLR™ 检测系统处理细胞以定量萤火虫和海肾萤光素酶活性时, PLB 是首选的裂解试剂。其他裂解缓冲液(例如 Glo Lysis Buffer、Cell Culture Lysis Reagent 和 Reporter Lysis Buffer)会显著增加本底发光信号或不适用于进行被动裂解。如有需要, 使用各种常见的化学检测方法便可很容易地定量用 PLB 制备的细胞裂解物中的蛋白含量。进行蛋白含量测定时, 须使用合适的对照进行。建议使用水或不含去污剂或还原剂的缓冲液对裂解物进行稀释, 以降低 Passive Lysis Buffer 对本底吸光度的影响。必须在相同的缓冲液条件下平行生成含有 BSA 的标准曲线。

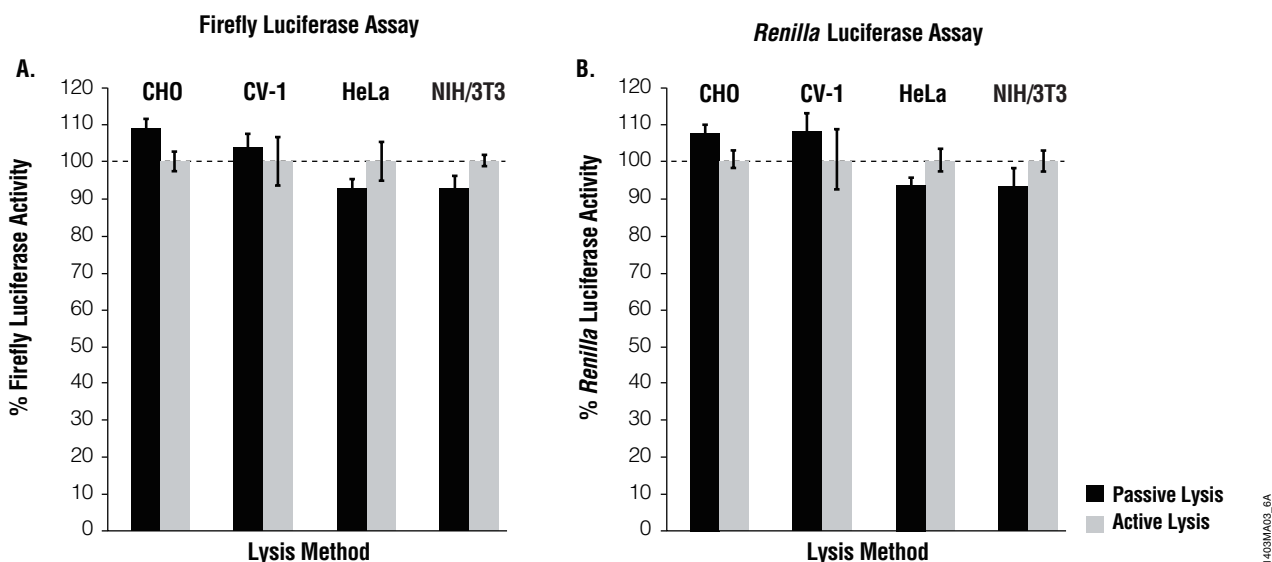


图 5. 使用被动裂解或主动裂解流程, 在用 Passive Lysis Buffer 制备的细胞裂解物中测得的萤火虫和海肾萤光素酶报告基因活性的比较。将四种不同类型的哺乳动物细胞用萤火虫和海肾萤光素酶表达载体共转染。通过将贴壁细胞暴露于 Passive Lysis Buffer 中 15 分钟(被动裂解)或在 Passive Lysis Buffer 存在的条件下刮取贴壁细胞随后冻融一次(主动裂解)以制备裂解物。为了便于比较, 将报告基因活性相对于通过主动裂解方法获得的每种类型细胞的报告基因活性进行了归一化处理。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100 assays	E1910

每个系统所包含的试剂足够进行 100 次标准的 Dual-Luciferase® Reporter 检测。包括：

- 10ml Luciferase Assay Buffer II
- 1 vial Luciferase Assay Substrate (Lyophilized Product)
- 10ml Stop & Glo® Buffer
- 200µl Stop & Glo® Substrate, 50X
- 30ml Passive Lysis Buffer, 5X

产品	规格	目录号
Dual-Luciferase® Reporter Assay System, 10-Pack	100 assays	E1960

每个系统所包含的试剂足够在 96 孔发光板上进行 1000 次标准的 Dual-Luciferase® Reporter 检测。包括：

- 10 x 10ml Luciferase Assay Buffer II
- 10 x 1 vial Luciferase Assay Substrate (Lyophilized Product)
- 10 x 10ml Stop & Glo® Buffer
- 10 x 200µl Stop & Glo® Substrate, 50X
- 30ml Passive Lysis Buffer, 5X

目录号为 E1960 产品的相关说明：对于需要使用更多裂解试剂（例如，>100µl/孔）的应用场景，可能需要单独购买额外的 Passive Lysis Buffer（目录号：E1941）。

储存条件：接收后，应将 Dual-Luciferase® System 置于 -20℃ 存储。配制好萤光素酶检测底物后，应将其分装成单次使用的小份，并于 -20℃（最长可储存 1 个月）或 -70℃（最长可储存 1 年）条件下储存。理想情况下，应在每次使用前新鲜配制 Stop & Glo® 试剂（底物 + 缓冲液）。如有必要，该试剂可在 -20℃ 储存 15 天（活性不会降低）。如果将该试剂在 22℃ 储存 48 小时，其活性会降低 8%。如置于 4℃ 储存 15 天，则试剂活性会降低 13%。最多可于室温条件下解冻 Stop & Glo® 试剂 6 次，其活性降低程度 ≤15%。

3. pGL4 萤光素酶报告基因载体

3.A. pGL4 载体介绍

pGL4 萤光素酶报告基因载体是为在哺乳动物细胞中表达而优化的新一代报告基因载体。pGL4 载体的配置多种多样，包括那些带有合成的萤火虫 *luc2* (*Photinus pyralis*) 和海肾 *hRluc* (*Renilla reniformis*; 5) 萤光素酶基因的载体，这些载体的密码子已经过优化，可在哺乳动物细胞中更有效地表达。此外，报告基因和载体骨架，包括氨苄青霉素 (Amp^r) 基因以及针对潮霉素 (Hyg^r)、新霉素 (Neo^r) 和嘌呤霉素 (Puro^r) 的哺乳动物选择性标记基因均已经过基因工程改造，以减少共有转录因子结合位点的数量，降低背景和转录异常的风险。

pGL4 载体骨架上带有 *luc2* 或 *hRluc* 基因，并且某些载体带有一个 Rapid Response™ 报告基因或同时含有两个 Rapid Response™ 报告基因。相较于更为稳定的萤光素酶基因，Rapid Response™ 萤光素酶基因所维持的蛋白水平对转录活性变化的响应更迅速且幅度也更大。

如需获取 pGL4 系列载体优点和相关改良的更多信息，请访问：www.promega.com/pgl4/ 或参见 pGL4 萤光素酶报告基因技术手册 # TM259。

3.B. 共转染实验的重要注意事项

萤火虫和海肾萤光素酶载体可一起用于共转染哺乳动物细胞。萤火虫或海肾萤光素酶均可用作对照或实验报告基因，选择哪种报告基因取决于具体的实验和可用的基因表达载体。然而，值得注意的是，启动子之间在共转染质粒上的反式作用可能会影响报告基因的表达 (6)。首先，当对照或实验报告基因载体或两者含有非常强的启动子 / 增强子元件时，上述情况非常值得关注。此类影响的发生和程度具体取决于共转染载体上的基因调控元件的组合形式和活性、导入细胞中的实验载体与对照载体之间的相对比例以及转染细胞类型。

为确保实验报告基因和对照报告基因之间的独立基因表达，我们建议用户进行共转染预实验，以对载体 DNA 用量和添加至转染混合物中的共报告基因载体的比例进行优化。萤火虫和海肾萤光素酶检测法的灵敏度均极高，且发光检测仪的线性范围跨度也非常大（一般为 5-6 个数量级），因而即使当实验组和对照组发光信号值差异巨大时也可实现精准测量。因此，可添加相对较少量的对照报告基因载体，以实现对照组萤光素酶活性的低水平组成型表达。实验载体：内对照报告基因载体组合之比在 10: 1 至 50: 1（或更大）之间是可行的，而且还可显著抑制启动子间反式作用的发生。

4. 仪器注意事项

4.A. 单样品发光检测仪

海肾和萤火虫萤光素酶均呈现出稳定的反应动力学；因此，针对低通量应用而设计的单样品发光检测仪不需要试剂进样器即可进行 DLR™ 检测。与测量“闪光”强度或“峰值”高度不同，应将发光检测仪设置为测量特定时间段内的光发射信号。对于标准的 DLR™ 检测而言，我们建议将发光检测仪的程序设置为 2 秒的读取前延迟以及后续 10 秒的测量时间。但是，某些用户可能更愿意根据所用仪器的类型和所处理样品的数量，缩短测量前延迟时间和 / 或发光信号测量时间。为方便起见，最好为发光检测仪配备一台计算机或在线打印机以便直接捕获数据，从而避免因手动记录测量值而暂停报告基因检测这一操作。某些配备一个或两个试剂进样器的单管发光检测仪可能很难或无法重新设置程序以满足 DLR™ Assay 的“读数 - 进样 - 读数”模式。在这种情况下，我们建议禁用进样器系统并手动添加试剂。

配备单或双自动进样器系统（目录号：E5321 或 E5331）的 GloMax® 20/20 发光检测仪非常适用于 DLR™ 检测的中至低通量处理。GloMax® 20/20 发光检测仪经过预编程，使之可在一个“开始”指令后即可进行加样并依次读取萤火虫和海肾萤光素酶报告基因活性。此外，仪器的程序已经过设置，可提供单个的和归一化后的萤光素酶值，而且还可对重组内测得的值进行统计分析。

4.B. 多样品读板发光检测仪

进行大量 DLR™ 检测的最便捷方法是使用能够处理多个样品管的发光检测仪或者通过在 96 孔阵列中配置检测并使用读板发光检测仪，例如 GloMax® 96 发光检测仪（目录号：E6511, E6521）。对于高通量应用而言，我们建议首先将所需体积的每种样品分配至单独的检测管或微孔板各孔中，或直接在每个孔中制备裂解物。然后按下述操作步骤进行双报告基因检测：i) 注入 Luciferase Assay Reagent II；ii) 测量萤火虫萤光素酶活性；iii) 注入 Stop & Glo® 试剂并；iv) 测量海肾萤光素酶活性；因此，我们建议多样品和读板发光检测仪应配备两个试剂进样器以便进行 DLR™ 检测。使用高通量仪器的用户进行 DLR™ 检测所需的预测量和测量时间均可明显短于标准检测方案中所规定的时间。



注意：当特定样品的发光信号超过光电倍增管的线性范围时，请确认发光检测仪是否会给出诊断警告。萤光素酶介导的反应产生的发光信号强度超过发光检测仪线性范围的现象较为常见。如果发光检测仪不提供警告，那么在进行萤光素酶报告基因检测前确定发光检测仪的线性检测范围则至关重要。可使用纯化的萤光素酶（例如 Quanti-Lum® 重组萤光素酶，目录号：E1701）或细胞裂解物中表达的萤光素酶确定特定发光检测仪的工作范围。使用含 1mg/ml 明胶的 1X PLB（请参见第 5.A 节）对萤光素酶样品进行系列稀释。为了确保萤光素酶在极低浓度下的稳定性，必须添加外源蛋白质。

4.C. 闪烁计数器

通常，我们不建议使用闪烁计数器利用整合模式下的 DLR™ Assay 化学方法来定量萤火虫和海肾萤光素酶活性。闪烁计数器未配备自动进样装置；因此，使用 Dual-Luciferase® 模式进行样品检测时，必须通过手动方式对其进行处理。由于两种萤光素酶产生的发光信号在反应期间会缓慢衰减（图 2），因此有必要在手动模式下操作闪烁计数器，并在开始每个反应后立即进行测量。这对于海肾萤光素酶反应（信号衰减速度比萤火虫萤光素酶反应快）而言尤为重要。由于存在信号衰减的现象，因此控制开始反应和进行测量之间所间隔的时间也很重要。

如果使用闪烁计数器测量萤火虫和海肾萤光素酶的活性，请对仪器进行配置，打开所有通路和关闭符合电路。一般通过程序菜单选项或仪器内开关便可实现。如果无法关闭电路，可通过计算测得的每分钟计数（cpm）减去本底 cpm 的平方根（即 [样品 - 本底]^{1/2}）得到萤光素酶浓度和 cpm 之间的线性关系。有关确定检测本底测量值的相关讨论，请参见第 6.E 节。

5. 使用 Passive Lysis Buffer 制备细胞裂解物

下文介绍了使用 PLB 制备细胞裂解物的两种方法。第一种方法建议用于多孔板中细胞的被动裂解。第二种方法适用于需收获培养于培养皿的细胞且选择通过刮取贴壁细胞加快裂解物制备速度的用户。在这两种方法中，用 PLB 制备的细胞裂解物中所含的萤火虫和海肾萤光素酶在室温（22℃）条件下均可保持稳定至少 6 小时，在冰上保存时可保持稳定达 16 小时。制得的裂解物可于 -20℃ 条件下短期储存（可达 1 个月）；但是，长期储存时我们建议将其置于 -70℃ 条件下。细胞裂解物经受超过 2-3 个冻融循环后，其萤光素酶报告基因酶活性可能会逐渐丧失。

用户需提供的材料

（溶液组成见第 8.A. 节）

- 磷酸盐缓冲液（PBS）

5.A. 制备 Passive Lysis Buffer

PLB 是以 5X 浓缩液形式提供的。通过将 1 体积 5X Passive Lysis Buffer 添加至 4 体积的蒸馏水中并充分混匀，制备足够量的 1X 浓度工作溶液。稀释后的（1X）PLB 可于 4℃ 储存长达 1 个月；但是，我们建议应在临用前新鲜配制所需量的 PLB。5X PLB 应在 -20℃ 条件下储存。

使用 DLR™ 系统时，仅可使用 Passive Lysis Buffer 制备细胞裂解物。PLB 的配方经过专门设计以最大程度地减少本底自发光信号。

5.B. 培养于多孔板中细胞的被动裂解

1. 确定转染参数（即接种的细胞密度和后续孵育时间），以确保细胞在裂解物制备期间融合度不会超过 95%。从培养的细胞中去除生长培养基，并轻轻地加入足量磷酸盐缓冲液（PBS）清洗培养皿表面。短暂旋转培养皿，以除去脱落的细胞和残留的生长培养基。在添加 PLB 试剂之前，请彻底除去清洗液。
2. 将所需最小体积的 1X PLB 分配至每个培养孔内，使之完全覆盖单层细胞。建议每孔添加的 PLB 体积如下：

多孔板	1X PLB
6 孔培养板	500µl
12 孔培养板	250µl
24 孔培养板	100µl
48 孔培养板	65µl
96 孔培养板	20µl

3. 将培养板置于摇床或定轨振荡器上轻轻摇动 / 振动，以确保 1X PLB 完全均匀覆盖细胞单层。于室温条件下摇动培养板 15 分钟。
4. 将裂解物转移至管子或小瓶中，以备进一步处理和储存。或者，可以直接在培养板的孔中进行报告基因检测。通常，进行 DLR™ 检测之前无需除去裂解物中残留的细胞碎片。但是，如果后续需要进行蛋白测定，我们建议使用冷冻微量离心机并以最高转速离心裂解物样品 30 秒除去细胞碎片。在进行报告基因酶分析之前，将澄清的裂解液转移至新管中。

注意：

1. 过度生长的培养物经常更难实现完全裂解，通常需要增加 PLB 的体积和 / 或延长处理时间以确保实现完全的被动裂解。萤火虫和海肾萤光素酶在用 PLB 制备的细胞裂解物中稳定性很好（7）；因此，延长被动裂解处理的时间不会引起报告基因活性的损失。
2. 对经被动裂解处理的不同类型细胞进行显微镜检查可能会发现看似不同的裂解结果。多种类型的培养细胞经 PLB 处理后，其结构会在 15 分钟内完全溶解。但是，某些类型的细胞经 PLB 处理可能会导致培养孔表面出现明显的细胞轮廓或大量漂浮碎片堆积。即使出现此类细胞残留物，我们通常发现在 15 分钟的处理时间内两种萤光素酶报告基因酶均完全溶解（图 5）。然而，有些类型的培养细胞可能会表现出更大的固有的裂解抗性，因此可能需要优化处理条件。

5.C. 通过刮取主动裂解细胞

1. 从培养的细胞中去除生长培养基，并轻轻地加入足量 PBS 清洗培养皿底部。短暂旋转培养皿，以除去脱落的细胞和残留的生长培养基。在添加 1X PLB 之前，请确保已完全除去清洗液。
2. 在 1X PLB 存在的条件，可通过手动刮取培养皿中的细胞以快速制备均质的裂解物。建议添加至每个培养皿中的 PLB 体积如下。

细胞培养板	1X PLB
100 x 20mm 培养皿	1.00ml
60 x 15mm 培养皿	400μl
35 x 12mm 培养皿	200μl
6 孔培养板	250μl
12 孔培养板	100μl

3. 添加 PLB 后，可立即使用一次性塑料细胞铲或细胞橡胶刮板将细胞刮下来以收获细胞。将孔板倾斜并将裂解物刮至下沿。将聚集的裂解物吹打数次以得到均质的悬浮液。如果需要将同一刮板用于制备多个样品，则应在每次使用后彻底清洗刮板。
4. 将裂解物转移至管子或小瓶中，以备进一步处理和储存。将细胞裂解物冻融 1 或 2 次，使细胞完全裂解。一般来说，进行 DLR™ 检测之前无需除去裂解物中残留的细胞碎片。但是，如果后续需要进行蛋白测定，我们建议使用冷冻微量离心机离心裂解物样品 30 秒除去细胞碎片。在进行报告基因酶分析前，将澄清的裂解物转移至新管中。

6. Dual-Luciferase[®] Reporter Assay 操作步骤

用户需提供的材料

- 发光检测仪
- 硅化聚丙烯管或小玻璃瓶

6.A. 制备 Luciferase Assay Reagent II

用 10ml 试剂盒提供的 Luciferase Assay Buffer II 重悬冻干的 Luciferase Assay Substrate (试剂盒提供), 制备成 Luciferase Assay Reagent II (LAR II)。将底物和缓冲液混合后, 在现有的小瓶标签上标注 “LAR II”, 以便识别。LAR II 在 -20°C 可稳定 1 个月, 或在 -70°C 可储存 1 年。

请勿用 Luciferase Assay System (目录号: E1500、E1501、E4030、E4530 和 E4550) 中包含的 Luciferase Assay Reagent (目录号: E1483) 替代 LAR II。这些系统所包含的 Luciferase Assay Reagent 并非为配合 DLR[™] Assay System 使用而设计。

注意:

1. 反复冻融该试剂可能导致检测性能降低。我们建议将 LAR II 分装成小份以便于每次实验使用 (例如, 1ml 的小份试剂可供 10 次检测用)。
2. LAR II 的组分不耐热。该试剂分装后的小份冷冻样品应于室温水浴条件下解冻。
3. LAR II 在解冻过程中会产生密度和成分梯度。使用前, 可将小瓶上下颠倒数次或轻轻涡旋, 以使融化后的试剂混合均匀。

6.B. 制备 Stop & Glo[®] 试剂

为进行所需次数的 DLR[™] 检测配制足量体积的试剂 (每次检测需 100μl 试剂)。Stop & Glo[®] 底物是以 50X 浓度提供的。将 1 体积 50X Stop & Glo[®] 底物添加至装有 50 体积 Stop & Glo[®] 缓冲液的玻璃或硅化聚丙烯管中。

Stop & Glo[®] 试剂 (底物 + 缓冲液) 最好在临用前新鲜配制。如果将该试剂置于 22°C 储存 48 小时, 其活性会降低 8%。如有必要, Stop & Glo[®] 试剂可在 -20°C 储存 15 天 (活性不会降低)。该试剂最多可于室温条件下解冻 6 次, 其活性降低程度 ≤15%。

注意: 已配制好并冷冻储存的试剂应于室温水浴条件下解冻。因解冻过程会产生密度和成分梯度, 因此使用前务必将试剂混合均匀, 。

示例 1 (10 次检测) :

将 20μl 50X Stop & Glo[®] 底物添加至装有 1ml Stop & Glo[®] 缓冲液的玻璃小瓶或硅化聚丙烯管中。上述操作制备的 Stop & Glo[®] 试剂可供 10 次检测用。

示例 2 (100 次检测) :

将 10ml Stop & Glo[®] 缓冲液转移至玻璃小瓶或硅化聚丙烯管中。将 200μl 50X Stop & Glo[®] 底物添加至 10ml Stop & Glo[®] 缓冲液中。上述操作制备的 Stop & Glo[®] 试剂可供 100 次 DLR[™] Assay 用。

6.C. 标准检测步骤

! **注意：**在进行 Dual-Luciferase® Assay 之前，应先将 LAR II、Stop & Glo® 试剂和样品置于环境温度条件下。开始此检测流程之前，应先确认 LAR II 和 Stop & Glo® 试剂是否已平衡至室温。

使用一个反应管依次检测萤火虫萤光素酶活性和海肾萤光素酶活性。下述检测方案适用于手动发光检测仪或配备一个试剂进样器的发光检测仪（图 6）。

注意：在某些情况下，可能仅需测量 pGL4 载体转染的细胞裂解物中的海肾萤光素酶报告基因活性。对于此应用场景而言，我们建议使用 Renilla Luciferase Assay System（目录号：E2810、E2820）。如果需要使用 DLR™ Assay System 测量海肾萤光素酶活性，则仍应将 100μl LAR II 和 Stop & Glo® 试剂与 20μl 细胞裂解物混合，以实现最佳的海肾萤光素酶检测条件。1. 将 100μl LAR II 预先分配至合适数目的发光检测管中，用于进行所需次数的 DLR™ 检测。

2. 设置发光检测仪的程序，将每一次报告基因检测设置为 2 秒的测量前延迟以及后续 10 秒的测量时间。
3. 将 20μl 细胞裂解物小心转移至装有 LAR II 的发光检测管中；吹打 2 或 3 次使之混合均匀。**不要涡旋振荡。**将管子置于发光检测仪中并开始读取数据。

注意：我们不建议在步骤 3 中对溶液进行涡旋振荡。涡旋振荡可能会使管子侧面覆盖一层发光溶液微膜，这可能使后续添加的 Stop & Glo® 试剂无法与之混匀。如通过自动进样器将 Stop & Glo® 试剂输送至管中，那么则应更加注意此问题。

4. 如果发光检测仪未与打印机或计算机相连，则应记录萤火虫萤光素酶活性的测量值。
5. 如有可能，可使用试剂进样器分配 100μl Stop & Glo® 试剂。如果使用手动发光检测仪，则应取出发光检测仪中的样品管，然后添加 100μl Stop & Glo® 试剂并短暂涡旋使之混匀。将管子重新置于发光检测仪中并开始读取数据。

注意：可以在几乎没有 DLR™ 检测试剂损失的情况下灌注自动进样器系统。我们建议在使用 LAR II 或 Stop & Glo® 检测试剂灌注进样器之前，首先应排干进样器系统中所有的储存液（即去离子水或乙醇清洗液；请参见第 6.D 节）。将检测试剂灌注进空的进样器系统可防止灌注试剂的稀释和污染。因此，可回收灌注试剂并将其回收至散装试剂加样槽中。

6. 如果发光检测仪未与打印机或计算机相连，则应记录海肾萤光素酶活性的测量值。
7. 弃掉反应管，然后进行下一个 DLR™ 检测。

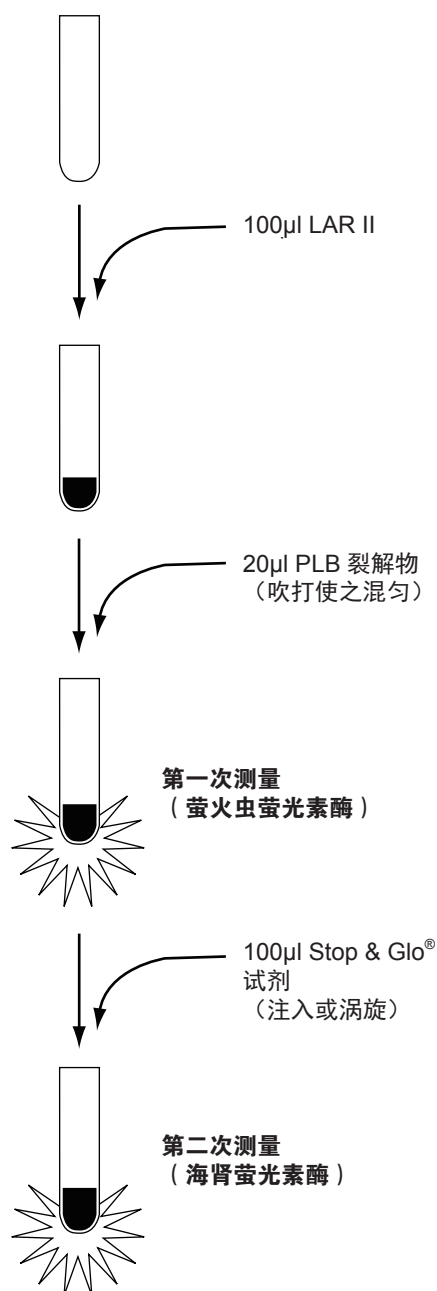


图 6. 使用手动发光检测仪或配备一个试剂进样器的发光检测仪的 DLR™ 检测模式。如果仪器配备两个进样器，最好先将裂解物预分配至发光检测管中，然后依次自动注入 LAR II 和 Stop & Glo® 试剂。

6.D. 清洗试剂进样器的重要注意事项

如果后续要使用进样器系统自动注入 LAR II 以进行萤火虫萤光素酶检测，那么正确清洗暴露于 Stop & Glo[®] 试剂后的进样器系统则至关重要。Stop & Glo[®] 试剂中的一种萤光素酶淬灭组分对塑料材料具有中等亲和力。此化合物与常用于构建自动进样器系统的塑料管路和泵体内表面会发生可逆的缔合。如果在与 Stop & Glo[®] 试剂接触后未正确清洗进样器管路，那么会有痕量的淬灭剂浸出到后续通过进样器系统的溶液中。在这种情况下，即使极少量污染的淬灭剂也会对萤火虫萤光素酶报告基因活性造成显著抑制，尤其在使用进样器分配不只一种类型试剂的情况下。建议将特定的进样器专用于其中一种试剂，并在运行结束后按下述清洗流程操作以确保管路洁净度。即使将进样器专用于分配某一种试剂时，也应对其进行正确的清洗。

通用进样器清洗方案

1. 使用相当于 3 个泵空隙体积的去离子水反复对进样器管路进行灌注 / 清洗，以清除管路中的 Stop & Glo[®] 试剂。
2. 制备 70% 乙醇用作清洗剂。用至少 5ml 70% 乙醇对系统进行灌注，使之完全填充空隙体积并冲洗进样器管路。使用去离子水进行冲洗之前，最好先将进样器置于此清洗溶液中浸泡 30 分钟。

注意：进样器系统的设计和所用的构造材料差异很大，某些泵可能需要置于清洗剂中浸泡 30 分钟以上才可彻底清洁其表面。配有 Teflon[®] 管路的发光检测仪不存在此问题，但是其他管路（例如 Tygon[®]）将需延长浸泡时间至 12-16 小时（过夜），才可确保从进样器系统中完全去除 Stop & Glo[®] 试剂。

3. 用相当于至少 3 个泵空隙体积的去离子水进行冲洗，以彻底除去所有痕量水平的乙醇。

GloMax[®] 20/20 发光检测仪进样器的清洗方案

可按照下述步骤从 GloMax[®] 20/20 发光检测仪进样器系统中去除痕量的 Stop & Glo[®] 试剂污染：

1. 用去离子水进行 1 个灌注周期，以清除进样器中的 Stop & Glo[®] 试剂。
2. 用 70% 乙醇进行一个冲洗循环，并将管道在此清洗液中浸泡 30 分钟。
3. 用去离子水进行冲洗，以除去所有痕量的乙醇。

6.E. 检测本底的测定

当产生的发光信号高于本底水平时，可对萤光素酶报告基因的表达进行定量。在大多数情况下，由于本底水平极低，因此萤光素酶活性与总发光信号成正比。但是，当测量极微量的萤光素酶时，则需要从测得的总发光信号中减去本底信号。以下各节介绍的是如何分别确定萤火虫和海肾萤光素酶的本底信号。

萤火虫萤光素酶

除极少数特例外，萤火虫萤光素酶测量值中的所有本底发光信号均来自仪器或样品管。样品管的本底信号可能是由静电或磷光造成的。特别是聚苯乙烯管能够积累大量静电，从而可能会导致持续的、升高的背景发光水平。应小心处理和存放管子以最大程度减少静电积累，而且在进行发光信号测量之前，应将样品远离阳光或非常明亮的光线。

特定发光检测仪的电子电路设计可显著影响其可测得的背景信号水平；在没有发光样品存在的条件下，很多发光检测仪不会读取“0”。测定仪器和样品管造成的本底信号时：

1. 使用 Passive Lysis Buffer 制备未转染对照（NTC）细胞裂解物。
2. 添加 100 μ l LAR II 至 20 μ l NTC 裂解物中。
3. 测量表观发光活性。

哺乳动物细胞裂解物不表达内源性发光活性；NTC 裂解物的低水平表观发光信号是由仪器以及可能由进行萤光素酶反应的孔板或管子所造成。请注意，本底信号中的相对噪声水平通常很高。因此，**应进行 5-10 次读数**，并通过计算读数均值得到具有统计学意义的仪器和孔板或管子的本底信号值。当测量多孔板中的发光信号时，相邻孔的信号溢出也可能造成高发光活性。这种影响可通过使用高质量不透明板（可防止孔间信号干扰）来消除。此外，在开始实验之前，应先检查发光检测仪的机械性能及其读取每个孔所发出的发光信号的能力。每种仪器的注入方式和发光检测方法均存在差异，这些差异会影响孔间信号干扰的程度。

6.E. 检测本底的测定 (续)

海肾萤光素酶

海肾萤光素酶活性测量过程中的本底发光信号有三种可能的来源:

1. 仪器和样品管或孔板的本底发光信号, 这与上述萤火虫萤光素酶的背景发光信号相似。
2. 腔肠素的自发光信号是由溶液中腔肠素的非酶促氧化所造成。虽然自发光信号水平取决于溶液组成, 但是使用 PLB 制备的裂解物通常产生低水平且恒定的发光信号。Stop & Glo[®] 试剂通过专有的配方而开发得到, 可进一步降低自发光信号。当使用 PLB 和优化配方的 Stop & Glo[®] 试剂后, 许多发光检测仪无法检测到残余的自发光信号。
3. 来自萤火虫萤光素酶反应的残余发光信号可能来源于 Dual-Luciferase[®] 检测中萤火虫萤光素酶检测过程的少量残余发光信号。但是, 由于萤火虫萤光素酶反应的淬灭程度可达 100000 倍以上, 因此只有当海肾萤光素酶发光反应强度比第一个萤火虫萤光素酶发光反应强度低 1000 倍时, 此残余发光信号才会产生显著影响。

上述第 1 和第 2 点所造成的本底发光信号是恒定的, 可以从海肾萤光素酶的所有测量值中将其减去。由于第 3 点所造成的本底信号是可变的, 且取决于萤火虫萤光素酶的表达, 因此应确认萤火虫萤光素酶的活性水平不会产生可影响海肾萤光素酶精准测量的明显的残余发光信号。当 Stop & Glo[®] 试剂与样品-LAR II 混合物未完全混合时, 可能会出现此种情况。此外, 如果第一次注入的 LAR II 将管壁覆盖, 但是第二次注入的 Stop & Glo[®] 试剂未覆盖相同的暴露表面积, 则可能会导致淬灭不充分。

进行下述步骤, 测定仪器、样品管和腔肠素自发光所造成的本底信号:

1. 用 Passive Lysis Buffer 制备未转染对照 (NTC) 细胞裂解物。
2. 将 20 μ l NTC 细胞裂解物添加至装有 100 μ l LAR II 的发光检测管中。
3. 添加 100 μ l Stop & Glo[®] 试剂至样品管中。
4. 测量本底信号。

进行下述步骤, 测定残余萤火虫萤光素酶发光所造成的本底信号:

1. 用 Passive Lysis Buffer 制备表达高水平萤火虫萤光素酶的细胞裂解物。
2. 将 20 μ l 细胞裂解物添加至装有 100 μ l LAR II 的发光检测管中。
3. 测量萤火虫萤光素酶发光信号。
4. 添加 100 μ l Stop & Glo[®] 试剂。
5. 测量表现发光信号。
6. 减去来自腔肠素自发光的本底信号和仪器所造成的本底信号 (由上述步骤测定)。

对于非常强的萤火虫萤光素酶反应, 在步骤 6 中测得的扣除本底的淬灭后发光值应比步骤 3 中测得的萤火虫萤光素酶发光值低 100000 倍。在大多数情况下, 萤火虫发光值不会比本底值高 100000 倍。因此, 检测到明显的残余萤火虫发光信号 (超过步骤 5 中所测得的本底信号) 的可能性很低。

7. 参考文献

1. Wood, K.V. *et al.* (1984) Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **124**, 592–6.
2. de Wet, J.R. *et al.* (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7870–3.
3. Wood, K.V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, eds. P. Stanley and L. Kricka, John Wiley and Sons, Chichester, 11.
4. Matthews, J.C. *et al.* (1977) Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry* **16**, 85–91.
5. Lorenz, W.W. *et al.* (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4438–42.
6. Farr, A. and Roman, A. (1992) A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Res.* **20**, 920.
7. Sherf, B.A. *et al.* (1996) Dual-Luciferase? reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays. *Promega Notes* **57**, 2–9.

8. 附录

8.A. 缓冲液和溶液的组成

PBS 缓冲液, 10X (每升)

11.5g Na_2HPO_4

2g KH_2PO_4

80g NaCl

2g KCl

溶于 1 升无菌去离子水中。

1X PBS 的 pH 值应为 7.4。

8.B. 相关产品

发光检测仪 (Luminometers)

产品	规格	目录号
GloMax [®] Discover Microplate Reader	1 each	GM3000
GloMax [®] Explorer System (Fully Loaded)	1 each	GM3500
GloMax [®] Explorer System (Luminescence and Fluorescence)	1 each	GM3510
GloMax [®] Navigator System	1 each	GM2000
GloMax [®] Navigator System with Dual Injectors	1 each	GM2010

荧光素酶检测系统和试剂

产品	规格	目录号
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2610
	100ml	E2620
	10 × 100ml	E2650
Steady-Glo® Luciferase Assay System	10ml	E2510
	100ml	E2520
	10 × 100ml	E2550
Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System	1,000 assays	E1980
Luciferase Assay System	100 assays	E1500
	1,000 assays	E1501
Renilla Luciferase Assay System	100 assays	E2810
	1,000 assays	E2820
Dual-Glo® Luciferase Assay System	10ml	E2920
	100ml	E2940
	10 × 100ml	E2980
EnduRen™ Live Cell Substrate	0.34mg	E6481
	3.4mg	E6482
	34mg	E6485
ViviRen™ Live Cell Substrate	0.37mg	E6491
	3.7mg	E6492
	37mg	E6495
QuantiLum® Recombinant Luciferase	1mg	E1701
	5mg	E1702
Passive Lysis 5X Buffer	30ml	E1941

质粒 DNA 纯化系统

产品	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 preps	A2492
	100 preps	A2495
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10 preps	A2392
	25 preps	A2393
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	50 preps	A1330
	250 preps	A1460

8.B. 相关产品 (续)

pGL4 萤光素酶报告基因载体

载体	多克隆位点	报告基因	蛋白降解序列	报告基因启动子	哺乳动物选择性标记	目录号
pGL4.10[luc2]	Yes	luc2 ^A	No	No	No	E6651
pGL4.11[luc2P]	Yes	“	hPEST	No	No	E6661
pGL4.12[luc2CP]	Yes	“	hCL1-hPEST	No	No	E6671
pGL4.13[luc2/SV40]	No	“	No	SV40	No	E6681
pGL4.14[luc2/Hygro]	Yes	“	No	No	Hygro	E6691
pGL4.15[luc2P/Hygro]	Yes	“	hPEST	No	Hygro	E6701
pGL4.16[luc2CP/Hygro]	Yes	“	hCL1-hPEST	No	Hygro	E6711
pGL4.17[luc2/Neo]	Yes	“	No	No	Neo	E6721
pGL4.18[luc2P/Neo]	Yes	“	hPEST	No	Neo	E6731
pGL4.19[luc2CP/Neo]	Yes	“	hCL1-hPEST	No	Neo	E6741
pGL4.20[luc2/Puro]	Yes	“	No	No	Puro	E6751
pGL4.21[luc2P/Puro]	Yes	“	hPEST	No	Puro	E6761
pGL4.22[luc2CP/Puro]	Yes	“	hCL1-hPEST	No	Puro	E6771
pGL4.70[hRluc]	Yes	hRluc ^B	No	No	No	E6881
pGL4.73[hRluc/SV40]	No	“	No	SV40	No	E6911
pGL4.74[hRluc/TK]	No	“	No	HSV-TK	No	E6921
pGL4.75[hRluc/CMV]	No	“	No	CMV	No	E6931
pGL4.82[hRluc/Puro]	Yes	“	No	No	Puro	E7501
pGL4.83[hRlucP/Puro]	Yes	“	hPEST	No	Puro	E7511
pGL4.84[hRlucCP/Puro]	Yes	“	hCL1-hPEST	No	Puro	E7521

^A luc2 = 合成的萤火虫萤光素酶基因。^BhRluc = 合成的海肾萤光素酶基因。

9. 内容变更总结

此中文说明书是以 6/15 版英文说明书为基础翻译的，而 6/15 版英文说明书与旧版相比对以下内容进行了变更：

1. 专利信息已更新，已删除其中过期声明。
2. 于 2021 年 7 月 19 日删除已停产产品。

^(a)U.S. Pat. No. 5,744,320 and European Pat. No. 0 833 939.

^(b)U.S. Pat. Nos. 7,078,181, 7,108,996 and 7,118,878, European Pat. No. 1297337 and other patents pending.

^(c)Certain applications of this product may require licenses from others.

© 1996–2015 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Dual-Glo, Dual-Luciferase, GloMax, QuantiLum, Steady-Glo, Stop & Glo and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation. Bright-Glo, DLR, EnduRen, PureYield, Rapid Response and ViviRen are trademarks of Promega Corporation.

Teflon is a registered trademark of E.I. duPont de Nemours and Company. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals & Plastics Technology Corporation. Tygon is a registered trademark of Norton Performance Plastics Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.