

萤光素酶检测系统



Precision Design... for Life
www.promega.com

原英文技术手册号码: TB281

本说明书用于产品 E1483,E1500,E1501,E4030,E4530, 和 E4550。

所有的技术文献均可从公司网站 www.promega.com 得到

请访问公司网站以证实您所使用的技术手册为最新版本

I. 介绍.....	2
II. 产品组成	3
III. 萤光素酶检测前的准备.....	4
A. 确定光检测的线性范围.....	4
B. 萤光素酶检测试剂的配制.....	5
C. 裂解缓冲液.....	5
D. 制备细胞裂解液的方法.....	6
E. 用于植物及细菌细胞裂解液和组织匀浆液的方法.....	
IV. 萤光素酶检测方法.....	6
A. 手动萤光光度计的方法.....	6
B. 具进样器的单管萤光光度计的方法.....	6
C. 萤光读板机的方法.....	7
V. 一般注意事项.....	7
A. 光强度的优化.....	7
B. 仪器使用.....	8
C. 萤火虫萤光素酶报告载体.....	8
溶液及缓冲液的组成.....	10
相关产品.....	11
参考文献.....	13
有经验使用者的方法.....	14

注意: 本中文操作手册仅供实验参考, 在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB281。如遇到问题请与

Promega 公司北京办事处联系, 免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB281

I. 介绍

报告基因已被细胞生物学广泛使用以研究基因表达及其它与基因表达相关的细胞学事件，例如：受体活性，细胞内信号传导，mRNA 加工，蛋白质折叠及蛋白-蛋白相互作用 (1,2)。萤火虫萤光素酶作为报告者被广泛使用有以下原因：

- 因为该蛋白不需要翻译后加工，所以一旦翻译立即产生报告活性 (3,4)。
- 在所有的化学发光反应中，它的光产物具有最高的量子效率，因而非常灵敏。另外，在宿主细胞及检测试剂中均检测不到背景发光。
- 本检测快速，每个样品只需几秒钟。

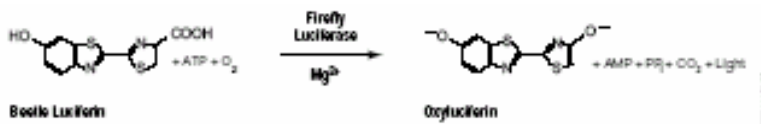


图 1. 由萤火虫萤光素酶催化的生物发光。

与传统检测方法相比，Promega 公司的萤光素酶检测系统在灵敏性及简单性方面都有实质性的提高 (2, 6-8)。在形成氧化萤光素过程中，通过电子转移将化学能转化为光能，因而发光。萤火虫萤光素酶是一个 61kDa 单体蛋白，以 ATP•Mg²⁺ 为共同底物催化萤光素的氧化反应 (图 1)。在传统萤光素酶检测方法中，酶与底物结合后产生闪光并快速衰退。为提高其动力学性能，Promega 公司的萤光素酶检测系统掺入了辅酶 A (CoA) (9)，提高了酶的转化能力，因此增强光强度，而且光强度在至少 60 秒内保持不变 (图 2)。经过至少 8 倍放大后，萤光素酶检测系统依然能够给出线性结果。在合适的条件下，曾经检测到少于 10⁻²⁰ 摩尔的萤光素酶 (2)。一般而言，本系统的灵敏度能够达到氯霉素转乙酰酶 (CAT) 检测的 100 倍 (1)。

Promega 公司的萤光素酶检测系统为哺乳动物细胞中的报告基因定量而开发。与细胞培养裂解试剂一同提供的萤光素酶检测系统 (Cat.#E1500)，也可以用于植物及细菌细胞的报告基因定量 (参见章节 III.E)；但是，与报告基因裂解缓冲液一同提供的萤光素酶检测系统 (Cat.#E4030) 不适合这些应用。

为了迎合大量检测特别是 96 孔板使用者的需要，我们设计了萤光素酶报告基因 1000 检测系统 (Cat.#E4550)。该系统包含足够 1000 次萤光素酶检测的试剂 (每次检测 100μl)。对于操作转化细胞的使用者，在萤光素酶测定前 (参见章节 III)，准备样品时需要使用细胞裂解缓冲液。该裂解液可单独购买。

萤光素酶检测系统一般与裂解缓冲液及萤光素酶检测试剂一同使用。萤光素酶检测试剂及其准备在章节III.B中进行了说明。三种裂解缓冲液的说明见章节III.C。表1推荐了适合于特殊细胞种类使用的裂解缓冲液。

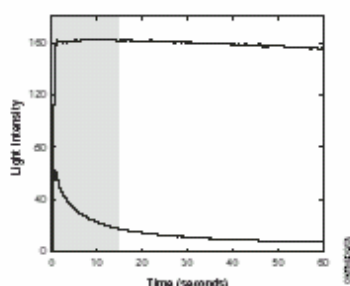


图2. Promega公司的萤光素酶检测系统与传统的萤光素酶检测方法的比较。表达来自于Rous sarcoma 病毒的萤光素酶基因的NIH3T3细胞在转染48小时后用1X细胞培养裂解试剂裂解。阴影区域表示测量过程中典型的光损失。光测量（例如：闪烁记数）前细胞裂解液与底物混合。在传统检测中，这部分为1-分钟内测定的总发光的50%。

II. 产品组成

产品	包装	目录号
萤光素酶检测系统	100 次检测	E1500

每个系统包含足够 100 次标准检测的试剂。包括：

- 1 瓶 萤光素酶检测底物（冻干）
- 10ml 萤光素酶检测缓冲液
- 30ml 萤光素酶细胞培养裂解试剂，5X
- 1 操作手册

产品	包装	目录号
萤光素酶检测系统 10-包	1,000 次检测	E1501

每个系统包含足够 1,000 次标准检测的试剂。包括：

- 10 瓶 萤光素酶检测底物（冻干）
- 10x10ml 萤光素酶检测缓冲液
- 1 操作手册

产品	包装	目录号
带有报告裂解缓冲液的萤光素酶检测系统	100 次检测	E4030

每个系统包含足够 100 次标准检测的试剂。包括：

- 1 瓶 萤光素酶检测底物（冻干）
- 10ml 萤光素酶检测缓冲液
- 30ml 5X 报告裂解缓冲液
- 1 操作手册

注意：本中文操作手册仅供实验参考，在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB281。如遇到问题请与 Promega 公司北京办事处联系，免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn 技术手册号码: CTB281

产品	包装	目录号
冷冻包装萤光素酶检测系统	1,000 次检测	E4530

每个系统包含足够 1,000 次标准检测的试剂。包括:

- 10 瓶 萤光素酶检测底物 (冻干)
- 10x10ml 萤光素酶检测缓冲液
- 10 瓶 5X 报告裂解缓冲液(30ml/瓶)
- 10 操作手册

产品	包装	目录号
萤光素酶报告 1000 检测系统	1,000 次检测	E4550

每个系统包含足够 1,000 次标准检测的试剂。包括:

- 1 瓶 萤光素酶检测底物 (冻干)
- 105ml 萤光素酶检测缓冲液
- 1 操作手册

产品	包装	目录号
萤光素酶检测试剂	1,000 次检测	E1483

包含足够 1,000 次标准检测的试剂。包括:

- 100ml 萤光素酶检测试剂
- 1 操作手册

注意: 不要用于冰存放萤光素酶检测试剂。

注意: 不要在 25 °C 以上室温下融化萤光素酶检测试剂。

储存及稳定性: 萤光素酶检测试剂可在使用前购买 (Cat.#E1483) 或将萤光素酶检测底物与萤光素酶检测缓冲液混合而配制。混合或第一次使用后, 萤光素酶检测试剂应分装保存, 在-20 °C 可稳定一个月, 在-70 °C 可稳定一年。配制并冻存后的萤光素酶检测试剂在使用前应当充分混合。未混合的系统组分可于-20 °C 保存一年。萤光素酶检测底物应避免光保存。报告基因裂解缓冲液可于室温保存并避免阳光直射。细胞培养裂解试剂应存放于-20 °C。

III. 萤光素酶检测前的准备

第一次开始萤光素酶检测前, 需要准备萤光素酶检测试剂 (章节 III.B) 及裂解缓冲液(章节 III.C-D)。重要的光检测注意事项请参阅章节 III.A。另外, 章节 V 提供了优化光强度及光检测仪器选择的信息。

A. 确定光检测的线性范围

开始实验前, 确定你所使用的萤光光度计的光检测线形范围非常重要, 因为当光强高时, 萤光光度计会出现信号饱和情况。为了得到光单位与酶相对浓度相对应的标准曲线, 需要使用加入 1mg/ml BSA 的 1X 裂解缓冲液对萤光素酶 (纯化的萤光素酶或细胞裂解液) 进行系列稀释。必须加入 BSA 以避免萤光素酶因吸附而损失。Promega 公司提供重组萤火虫萤光素酶 (QuantiLum[®]重组萤光素酶, Cat.#E1701)。

B. 萤光素酶检测试剂的配制

将萤光素酶检测缓冲液（对于 Cat.#E4550 为 105ml;对于其它系统为 10ml）加入装有冻干萤光素酶检测底物的瓶中以配制萤光素酶检测试剂。为了避免萤光素酶检测试剂的反复冻融，有必要将重新组合的试剂分装成工作液。将暂时不用的萤光素酶检测试剂存放于-70℃。每次使用前，将萤光素酶检测试剂置于室温平衡。每个反应需要 100μl 萤光素酶检测试剂以启动酶活性。

C. 裂解缓冲液

Promega 公司有三种含有萤光素酶可用于制备细胞裂解液的裂解缓冲液（见表 1）。萤光素酶细胞培养裂解试剂（CCLR）可以在数分钟内有效裂解细胞。报告裂解缓冲液（RLB）是一种温和裂解试剂，需要一次冻融循环方可裂解细胞。被动裂解缓冲液（PLB; Cat.#E1941）可以被动裂解细胞而无需冻融循环。但是，它的裂解效率依赖于不同的细胞类型，而且对于那些抗被动裂解的细胞还需要验证。PLB 含有抗泡沫试剂，当使用自动液体分配器加入试剂时，它可以阻止样品中过多泡沫的形成。无泡沫形成使得光输出检测更加一致并且可以避免仪器污染。

表 1. 对于不同样品类型所推荐的裂解缓冲液

样品/细胞类型	裂解缓冲液
哺乳动物贴壁细胞	CCLR, RLB, PLB
哺乳动物非贴壁细胞	CCLR, RLB, PLB
细菌细胞 ^{a,b}	CCLR
植物细胞 ^b	CCLR
组织匀浆液	CCLR, RLB

^a 有关推荐的用于细菌细胞裂解的 CCLR 的组成信息，请参阅章节 VI。

^b RLB 未进行用于植物或细菌细胞的有效性验证。

D. 制备细胞裂解液的方法

1. 将 4 体积水加入 1 体积 5X 裂解缓冲液。使用前在室温平衡 1X 缓冲液。
2. 仔细地将生长培养基从待检细胞吸出。用 PBS (见章节 VI) 漂洗细胞。此过程必须仔细，不要接触贴壁细胞。尽可能多地将漂洗用 PBS 吸出。
3. 加入足够的 1X 裂解缓冲液(CCLR, RLB 或 PLB)以覆盖细胞（例如：400μl/60mm 培养皿，900μl/100mm 培养皿或 96 孔板每孔 20μl）。如果使用 RLB，要做一次冻融循环以保证完全裂解。对于 96 孔板，按照章节 IV 的方法继续操作。对于培养皿，继续步骤 4。
4. 晃动培养皿数次以保证裂解缓冲液完全覆盖细胞。将细胞从培养皿刮下。将细胞及所有的液体转移至一个离心管中。将离心管置于冰上。
5. 旋涡震荡离心管 5-10 秒钟，然后以 12,000 x g 离心 15 秒钟（室温）或长至 2 分钟（4℃）。将上清液转移至一个新的试管中。



注意：Promega 公司同时提供混合好的萤光素酶检测试剂 (Cat.#E1483)。

注意：当萤火虫萤光素酶与第二个报告基因共表达时，我们推荐用 RLB 或 PLB 制备细胞裂解液。

注意：有经验者的操作手册附于本技术手册的末尾。

注意：进行荧光素酶检测前，应将荧光素酶检测试剂和样品置于室温（参见章节 V.A）。

注意：当需要减少检测时间时，请验证应观个光度计所用时间以确保读数为信号曲线中的直线部分。

6. 将上清液/细胞裂解液存放于-70°C 或按照章节 IV 的方法继续操作。

E. 用于植物及细菌细胞裂解液和组织匀浆液的方法

1. 对于植物组织，将其用液氮快速冷冻，将冷冻组织研磨成粉末，于室温用 1X CCLR 重新悬浮并匀浆。细胞裂解后，短暂离心，除去细胞碎片。使用标准检测条件检测上清液（章节 IV）。
2. 对于细菌，将 40µl 未转化细胞（载体细胞）与 50µl 转化的培养物混合。加入 10µl 1M K₂HPO₄ (PH 7.8), 20mM EDTA。用干冰快速冷冻混合物，然后将细胞转移至室温并置于室温水浴中。加入 300µl 新鲜配制的裂解混合物（章节 VI）。混合并于室温孵育 10 分钟。按照章节 IV 的方法检测裂解液。
3. 适于荧光素酶检测系统的组织匀浆液制备方法参见参考文献 10。

IV. 荧光素酶检测方法

由用户准备的材料

- 透明多孔板或荧光光度计试管

下述方法（章节 IV.A-C）适合于培养的哺乳动物细胞，也可以用于按照章节 III.E 制备的细菌及植物细胞裂解液或组织匀浆液。荧光素酶检测系统适用于手动荧光光度计（无试剂进样器）或有进样器的荧光光度计（单管或 96 孔板方式）。

A. 用于手动荧光光度计的方法

1. 将 100µl 荧光素酶检测试剂加入荧光光度计试管中，每管一个样品。
2. 将荧光光度计的程序设置为：2 秒延迟及 10 秒荧光素酶活性测量读数。如果有足够的光产生，读数时间可缩短。
3. 将 20µl 细胞裂解液加入装有荧光素酶检测试剂的荧光光度计试管中。吹打或轻微旋涡震荡以混合。
4. 将荧光光度计试管置于荧光光度计中并开始读数。
5. 如果荧光光度计未与打印机或计算机相连，记录读数。

B. 用于具进样器的单管荧光光度计的方法

1. 用荧光素酶检测清洗引导荧光光度计进样器至少 3 次或按照用户手册推荐的方法进行。
2. 将 20µl 细胞裂解液或待检加入荧光光度计试管中。
3. 将荧光光度计的程序设置为：2 秒延迟及 10 秒荧光素酶活性测量读数。如果有足够的光产生，读数时间可缩短。

4. 将荧光光度计试管置于荧光光度计中并将 100 μ l 萤光素酶检测试剂通过进样器注入荧光光度计试管中，开始读数。
5. 如果荧光光度计未与打印机或计算机相连，记录读数。

C. 用于荧光读板机的方法

1. 为荧光光度计设置合适的时间延迟及测量时间。
2. 将每孔装有 20 μ l 细胞裂解液的 96 孔板放入带进样器的荧光光度计。进样器向每孔加入 100 μ l 萤光素酶检测试剂，然后立即读数。96 孔板前进到下一个孔后，荧光光度计重复进样-读数步骤。
3. 光测量时间为 10 秒。本反应的光强度可以在将近 1 分钟时间内保持稳定，随后缓慢衰退，半寿期大约为 10 分钟。典型的延迟时间为 2 秒，典型的读数时间为 10 秒。如果产生的光强度足够，就可显著缩短检测时间，从而减少总的读数时间。例如，96 孔板中所有样品的总读数时间可以少于 5 分钟。

V. 一般注意事项

A. 光强度的优化

光强度是萤光素酶催化速度的一种度量，因此它依赖于温度。对萤光素酶活性适宜的温度大约为室温（22 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C）。开始测定前将萤光素酶检测试剂完全平衡到室温非常重要。为确保室温平衡，将融化的分装萤光素酶检测试剂置于一个密封的管中，并置于室温水浴中，平衡时间最少需要 30 分钟。

待检样品也应于室温平衡。一般而言，1X 萤光素酶细胞培养裂解试剂 (Cat.#E1531)，报告裂解缓冲液 (Cat.#E3971)，或被动裂解缓冲液 (Cat.#E1941) 中的萤光素酶活性在室温条件下，数小时内保持稳定。如果因特殊情况使室温无法达到，样品可以在冰上放置长至 12 小时。使用标准检测体积（见章节 IV）测定冷的样品将导致酶活性降低 5-10%。

注意：使用 CCLR（萤光素酶细胞培养裂解试剂）制备的细胞裂解液不适于 CAT, β -半乳糖苷酶或 *Renilla* 萤光素酶的共报告活性的检测。CCLR 中的 Triton[®] X-100 组分会部分抑制 CAT 活性 (11)。尽管 CCLR 中的高浓度去污剂不会直接抑制 β -半乳糖苷酶的活性，但是将 β -半乳糖苷酶检测缓冲液与用该裂解缓冲液制备的细胞裂解液混合时会产生沉淀。CCLR 和 RLB 中的组分会显著抑制 *Renilla* 萤光素酶的活性，而且可以造成高水平的自发荧光 (12)。另外，CCLR 中的高浓度去污剂和二硫苏糖醇 (DTT) 会妨碍使用许多蛋白测定方法来确定使用 CCLR 制备的细胞裂解液中的总蛋白含量。

注意：当萤火虫萤光素酶与第二个报告基因共表达时，我们推荐使用 RLB 或 PLB 制备细胞裂解液。

B. 仪器使用

萤光素酶检测系统可以使用萤光光度计或闪烁计数器进行定量。(通常没有足够的光输出用于可见光检测。)萤光光度计最少可以检测到 10^{-20} 摩尔 (0.001pg) 萤光素酶, 而闪烁计数器有较低灵敏度极限。但是, 灵敏度极限会因使用的仪器的不同而不同。本检测在仪器检测范围内的某些部分应当呈线形。如欲了解仪器操作的一般信息请参考仪器的用户手册。

萤光光度计

使用能够处理多孔板的萤光光度计是进行大量萤光素酶检测的最方便方法。该检测的光强度及有效线性范围在 10^{-20} 到 10^{-13} 摩尔区间内与萤光素酶的浓度成比例。但是, 灵敏度极限会因为所使用的仪器的不同而有所变化。在每次分析样品前, 应当对每一台仪器的灵敏度极限进行验证(参见章节 III.A)。

闪烁计数器

在理想情况下, 应当关闭闪烁计数器的符合电路。通常可以通过程序菜单的选择或关闭仪器内部的开关达到这一目的。如果不能关闭符合电路, 可以通过计算测量到的每分钟记数(cpm)与背景 cpm 的差值的方根(例如: $[\text{样品}-\text{背景}]^{1/2}$) 得到萤光素酶浓度与 cpm 的线性关系。将萤光素酶检测试剂加入没有细胞的裂解缓冲液或非转化细胞裂解液, 测定背景 cpm。

如果样品可以完全覆盖瓶底(可以使用半透明或透明的小瓶), 可以直接将样品加入闪烁瓶。不要加入闪烁液, 因为闪烁液会使萤光素酶失活。或者, 将样品加入离心管中, 然后将离心管放入闪烁瓶。为了确保测定多个样品时的一致性, 将离心管放入闪烁瓶的相对同样的位置。

使用闪烁计数器的手动方式以确保萤光素酶测定的一致性。在测量前立即启动每一个样品反应并且每次读取一个样品的数值。因为酶反应产生的光覆盖了所有的波长范围, 读数时应将所有通道打开(打开窗口)。为了降低背景记数, 记数前有必要等待 10-30 秒。每个样品读数时间为 1-5 分钟。

C. 萤火虫萤光素酶报告载体

pGL3 萤光素酶报告载体包含克隆自北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 编码萤光素酶 (*luc+*) 基因, 并且它的基本骨架是专为增强报告基因的表达而设计的。*luc+* 与野生型萤光素酶 (*luc*) 的区别, 存在于以下四个方面: i) 取代了 C-末端三肽以消除表达的报告酶中的过氧化物酶体的作用位点; ii) 经证明, 使用的密码子有助于其在植物及动物细胞中的表达; iii) 修饰了两个潜在的 N 端糖基化位点; 以及 iv) 改变了数个 DNA 序列, 破

坏了它的回文结构，消除了内部的内切酶位点及有可能被基因调控结合蛋白所识别的保守序列。在转化细胞中表达时，萤光素酶报告活性的变化与所克隆的调控元件的转录活性直接相关。这些改变确保萤光素酶报告基因不会提供假的转录信号。有关这些改变的详细信息请参阅 *pGL3 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual # TM033*。

除了对萤光素酶基因的改造以外，对 pGL3 家族萤光素酶载体的基本骨架也进行了四项主要改造：i) 用 SV40 晚期 poly(A)信号代替了 SV40 早期 poly(A)信号以改善 RNA 加工 (13)；ii) 将一个合成的 poly(A)和转录终止位点定于多克隆位点的上游以终止可以起始于基本骨架内部的假转录 (14)；iii) 取消了小 t 内含子以消除保护性剪切，提高了报告基因的表达 (15)；及 iv) 加入了 Kozak 保守序列以提高萤光素酶翻译的启动效率 (16)。

包含于 pGL3 载体家族的上述改造为基因操作提供了更广泛的灵活性，相对小的基本骨架活性及与 pGL2 载体相比急剧升高的萤光素酶表达水平。当研究弱启动元件或进行细胞内萤光素酶测定时，使用 pGL3 载体，使得测定难以转化细胞类型中的萤光素酶的表达成为可能。光强度单位绝对值及报告载体的相对表达强弱会因细胞类型而变化。我们推荐在应用基因报告系统时始终使用合适的对照载体。

pGL3 载体家族包括四种改善的萤火虫萤光素酶载体，pGL3-基本载体，pGL3-启动子载体，pGL3-增强子载体，pGL3-对照载体。pGL3-基本载体 (Cat.#E1751)没有真核启动子及增强子元件。载体内独特的内切酶位点的安排策略提供了克隆中最强的灵活性及操作待检基因调控序列的能力。转化了 pGL3-基本载体的细胞中萤光素酶的表达活性依赖于 *luc+*上游插入的功能性启动子。另外，需要的增强子元件可以插入到没有启动子序列的区域或定位于 *luc+*的下游。pGL3-启动子载体(Cat.#E1761)在 *luc+*上游含有 SV40 启动子。含有垂体增强子元件的染色体 DNA 片段可以任何方向插入，可以定位于 SV40 启动子/ *luc+*转录单元的上游或下游。pGL3-增强子载体(Cat.#E1771)在 *luc+*报告基因下游含有 SV40 增强子。当检测待检启动子序列时，可以利用它来验证功能性启动子/ *luc+*连接。在许多情况下，增强子的存在可以增强所克隆的启动子的转录活性。pGL3-对照载体 (Cat.#E1741)含有 SV40 启动子及增强子序列，在许多真核细胞类型中都可以高效表达萤光素酶。在监测转化效率时，这种质粒非常有用。

VI. 溶液及缓冲液的组成

PBS 缓冲液（无 Mg^{2+} 及 Ca^{2+} ）

173mM NaCl
2.7mM KCl
4.3mM Na_2HPO_4
1.4mM KH_2PO_4

最终 PH 为 7.3。

溶菌酶（5mg/ml）

将 1 体积 1M K_2HPO_4 (PH 7.8),
20mM EDTA 加入 9 体积水中。加入
溶菌酶使其终浓度为 5mg/ml。旋
涡震荡使溶菌酶完全溶解。每次使
用前新鲜配制。

荧光素酶细胞培养裂解试剂, 1X

25mM Tris-磷酸(PH 7.8)
2mM DTT
2mM 1,2-diaminocyclohexane-N,
N,N',N'-tetraacetic acid
10% 甘油
1% Triton[®] X-100

裂解混合物

1X CCLR
1.25mg/ml 溶菌酶
2.5mg/ml BSA

加入所需体积的水。使用前新鲜配制。

VII. 相关产品

萤光素酶检测系统及试剂

产品	包装	目录号
报告基因裂解缓冲液, 5X	30ml	E3971
萤光素酶细胞培养裂解试剂, 5X	30ml	E1531
被动裂解缓冲液, 5X	30ml	E1941
甲壳萤光素, 钾盐	5mg	E1601
	50mg	E1602
	250mg	E1603
QuantiLum [®] 重组萤光素酶	1mg	E1701
	5mg	E1702

产品	包装	目录号
Steady-Glo [™] 萤光素酶检测系统	10ml	E2501
	100ml	E2520
	10 x 100ml	E2550
Bright-Glo [™] 萤光素酶检测系统	10ml	E2610
	100ml	E2620
	10 x 100m	E2650

Dual-Luciferase[®] 报告检测系统

产品	包装	目录号
Dual-Luciferase [®] 报告检测系统 10-包	100次检测	E1910
Dual-Luciferase [®] 报告检测系统	1,000次检测	E1960
Dual-Luciferase [®] 报告1000检测系统	1,000 次检测	E1980

萤光素酶报告载体

产品	包装	目录号
pGL3-对照载体	20µg	E1741
pGL3-增强子载体	20µg	E1771
pGL3-启动子载体	20µg	E1761
pGL3-基本载体	20µg	E1751

载体以菌株 JM109 加甘油的方式提供。



Promega

Precision Design... for Life

www.promega.com

注意: 本中文操作手册仅供实验参考, 在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB281。如遇到问题请与

Promega 公司北京办事处联系, 免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB281

海肾萤光素酶对照报告载体

产品	包装	目录号
pRL-SV40 载体	20µg	E2231
pRL-TK 载体	20µg	E2241
pRL-CMV 载体	20µg	E2261
pRL-null 载体	20µg	E2271

载体以菌株 JM109 加甘油的方式提供。请致电 Promega 公司技术支持或访问我们的网站 www.promega.com 查询大量包装及个别 pRL0 载体的价格信息。

萤光光度计（单样品）

产品	目录号
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic Reporter Instrumentation Package for Stabilized Assays	E2041
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic Reporter Instrumentation Package for Stabilized Assays with Printer	E2051
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic Reporter System with Single Auto Injector	E2351
Turner Designs Luminometer TD-20/20 Genetic Reporter System with Dual Auto Injector	E2361
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic Reporter Instrumentation Package with Printer, Auto Injector System	E2061

VIII. 参考文献

1. Alam, J. and Cook, J.L. (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188, 245.
2. Wood, K. V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, Stanley, P., and Kricka, L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, NY, 543.
3. Ow, D. W. et al. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234, 856.
4. de Wet, J. R. et al. (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 725.
5. Wood, K. V. (1990) Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. *Promega Notes* 28, 1.
6. Seliger, H. H. and McElroy, W. D. (1960) Spectral emission and quantum yield of firefly Bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys. Res. Comm.* 88, 136.
7. Wood, K. V. (1984) Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem. Biophys. Comm.* 124, 592.
8. 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.
9. Wood, K. V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, Stanley, P., and Kricka, L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, NY, 11.
10. Manthorpe, M. et al. (1993) Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum. Gene Ther.* 4, 419.
11. Lu, J. and Jiang, C. (1992) Detergents inhibit chloramphenicol acetyl transferase. *Bio Techniques* 12, 643.
12. Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Technical Manual #TM040, Promega Corporation.
13. Carswell, S. et al. (1989) Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences. *Mol. Cell Biol.* 9, 4248.
14. Levitt, N. et al. (1989) Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes Dev.* 3, 1019.
15. Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1989) Introns in the 3'-untranslated region can inhibit chimeric CAT and beta-galactosidase gene expression. *Gene* 84, 135.
16. Kozak, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108, 229.

荧光素酶检测系统：有经验者的操作手册

本快速方法是为有经验者提供的一种提示。初次使用荧光素酶检测系统时，请按照完全方法进行操作（章节 III-IV）。

荧光素酶检测试剂的配制 (章节 III.B)	1. 将荧光素酶检测缓冲液加入装有冻干荧光素酶检测底物的瓶中。冷冻前将其分装以避免荧光素酶检测试剂的反复冻融。
制备哺乳动物细胞裂解液 (章节 III.D)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将生长培养基从待检细胞吸出。 2. 用 1X PBS 漂洗细胞。不要接触贴壁细胞。尽可能多地将漂洗用 PBS 吸出。 3. 向细胞培养容器中加入最少量的 1X 裂解缓冲液(CCLR, RLB 或 PLB)。对于培养皿，将细胞从培养皿刮下，旋涡震荡并 12,000 x g 离心。收集上清液。 4. 使用标准条件继续荧光素酶检测。
植物组织的准备 (章节 III.E)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将植物组织用液氮快速冷冻，将冷冻组织研磨成粉末，于室温用 1X CCLR 重新悬浮并匀浆。 2. 离心。沉淀细胞碎片。 3. 使用标准条件继续荧光素酶检测。
细菌细胞裂解液的制备 (章节 III.E)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将 40μl 未转化细胞（载体细胞）与 50μl 转化的培养物混合。 2. 加入 10μl 1M K₂HPO₄ (PH 7.8), 20mM EDTA。 3. 用干冰快速冷冻混合物，然后将细胞置于室温水浴中平衡至室温。 4. 加入 300μl 新鲜配制的裂解混合物（章节 VI）。混合并于室温孵育 10 分钟。 5. 使用标准条件继续荧光素酶检测。
用于手动荧光光度计的方法 (章节 IV.A)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将 100μl 荧光素酶检测试剂加入荧光光度计试管中。 2. 为荧光光度计设置合适的时间延迟及测量时间。典型的延迟时间为 2 秒，典型的读数时间为 10 秒。 3. 将 20μl 细胞裂解液加入到荧光光度计试管中并吹打混合。 4. 开始读数。如果产生的光强度足够，可以缩短检测时间。记录结果。
用于具进样器的单管荧光光度计的方法 (章节 IV.B)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 用荧光素酶检测试剂清洗荧光光度计进样器。 2. 将 20μl 细胞裂解液加入到荧光光度计试管中。 3. 为荧光光度计设置合适的时间延迟及测量时间。典型的延迟时间为 2 秒，典型的读数时间为 10 秒。 4. 将荧光光度计试管置于荧光光度计中并将 100μl 荧光素酶检测试剂通过进样器注入荧光光度计试管中，开始读数。记录结果。
用于荧光读板机的方法 (章节 IV.C)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 为荧光光度计设置合适的时间延迟及测量时间。典型的延迟时间为 2 秒，典型的读数时间为 10 秒。 2. 向每孔加入 20μl 细胞裂。将板放入荧光光度计。 3. 通过进样器向每孔加入 100μl 荧光素酶检测试剂。 4. 测量并记录产生的光强度。对每个孔重复步骤 3 和 4。