

Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit

For parallel bioluminescence assays of *Gaussia* luciferase (GLuc) and secreted Alkaline Phosphatase (SEAP)

Cat. No. LF031 (Old Cat.No.SPDA-D010, 100 reactions)

Cat. No. LF032 (Old Cat.No.SPDA-D030, 300 reactions)

Cat. No. LF033 (Old Cat.No.SPDA-D100, 1000 reactions)

Secrete-Pair™ *Gaussia* Luciferase Assay Kit

For stable and sensitive assay of *Gaussia* luciferase activity

Cat. No. SPGA-G010 (100 reactions)

Cat. No. SPGA-G100 (1000 reactions)

使用说明书

GeneCopoeia, Inc.

9620 Medical Center Drive, #101

Rockville, MD 20850

USA

301-762-0888

866-360-9531

inquiry@genecopoeia.com

www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司

地址：广州科学城揽月路3号F区F801（510663）

电话：4006-020-200、020-28069288、020-28069233

网站：www.igenebio.com

使用说明书

Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit

Secrete-Pair™ *Gaussia* Luciferase Assay Kit

- I. 产品介绍及原理
- II. 产品信息及储存条件
- III. 操作流程
- IV. 准备工作
- V. GLuc 检测流程
- VI. SEAP检测流程
- VII. 信号标准化
- VIII. 注意事项
- IX. 参考文献
- X. 有限使用许可协议及质量保证

I. 产品介绍及原理

Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit

本试剂盒用于检测双报告系统中*Gaussia Luciferase* (GLuc) 和*Secreted Alkaline Phosphatase* (SEAP) 的活性。GLuc和SEAP都是分泌型蛋白，无需裂解细胞就能从培养基中获得实验样本。

本试剂盒与GeneCopoeia GLuc-ON™启动子报告克隆配套使用。GLuc-ON™启动子报告克隆在GLuc报告基因上游插入一段1~1.5kb的序列，这段插入序列与基因转录起始位点(TSS)上游大约1.5kb到下游200bp之间的5'侧翼序列一致。在克隆的启动子区域有一个顺式调控元件，从而可以通过观察荧光素酶的活性来研究启动子对基因的调节作用。

第二个报告基因SEAP使转染标准化。SEAP即可与GLuc共用一个载体，也可装到一个单独的载体上。

Secrete-Pair™ *Gaussia* Luciferase Assay Kit

Secrete Pair *Gaussia* Luciferase Assay Kit只能用于检测*Gaussia luciferase* (GLuc) 的活性。获得分泌性GLuc，无需裂解细胞，直接从培养基中就可获得实验样本。

Gaussia luciferase (GLuc) 作为 报告基因具有强大的优势

Gaussia luciferase (185aa, 19.9kDa) 是最小的荧光素酶¹。在氧气存在的条件下，它可以催化肠腔素 (coelenterazine) 氧化成 coelenteramide，在肠腔素氧化的过程中发出生物荧光，其发光波长是480nm²。

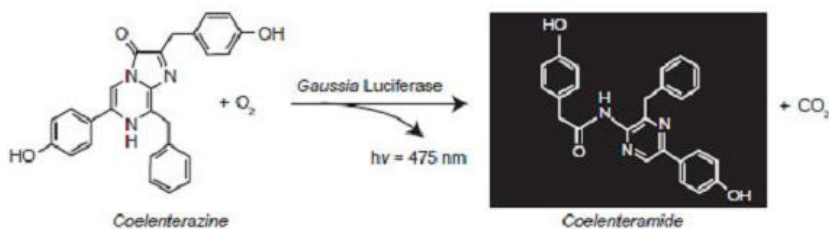


图 1. *Gaussia Luciferase* 的检测原理图。

Haddock, S.H.D., McDougall, C.M. and Case, J.F. The Bioluminescence Web Page, <http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/> (created 1997; updated 2005).

1) GLuc是自然分泌型荧光素酶，可直接取上清检测，无需裂解细胞 (GLuc分泌量 > 95%)。转染后的细胞是活细胞，可以继续进行研究，例如：时间进程、不同的条件或其它下游分析。因为样本分析和酶活性检测只需要几分钟，GLuc系统适用于高通量筛选和酶活性的实时研究。

2) GLuc是可获得的最亮的荧光素酶，其产生的荧光信号是萤火虫和海肾荧光素酶的荧光信号的1000多倍，所以GLuc是一个高灵敏性的报告基因²。

3) GLuc稳定性高，对温度、PH耐受性强，可适用于多种培养基^{2,4}。

4) 在活体内，可以在血液和尿液中检测到GLuc，所以GLuc可作为一个灵敏性工具实时监测体内的生物活动⁴。

Secrete-Pair assay kit 的优势

1) 无需裂解细胞

- 分泌型GLuc和SEAP

2) 双报告检测

- 检测GLuc和SEAP
- 实现转染标准化，可用于样本间的比较

3) 高灵敏度和低背景

- GLuc是最亮的荧光素酶，其产生的荧光信号是萤火虫和海肾荧光素酶的荧光信号的1000多倍
- 通过更换培养基去除积累的GLuc

4) 实时研究

- 快速获得实验数据，与实时活性研究类似

5) 实验条件更灵活

- 根据不同情况提供两种用于Gluc活性分析的缓冲液
- 使用稳定活性缓冲液可以在实验开始10分钟内保证90%以上的信号，并能延长发射光的半衰期30分钟以上
- 灵敏度高的缓冲液可以检测低表达量的GLuc

6) 高通量兼容

- 快速简便的分析模式
- 可检测大量样品

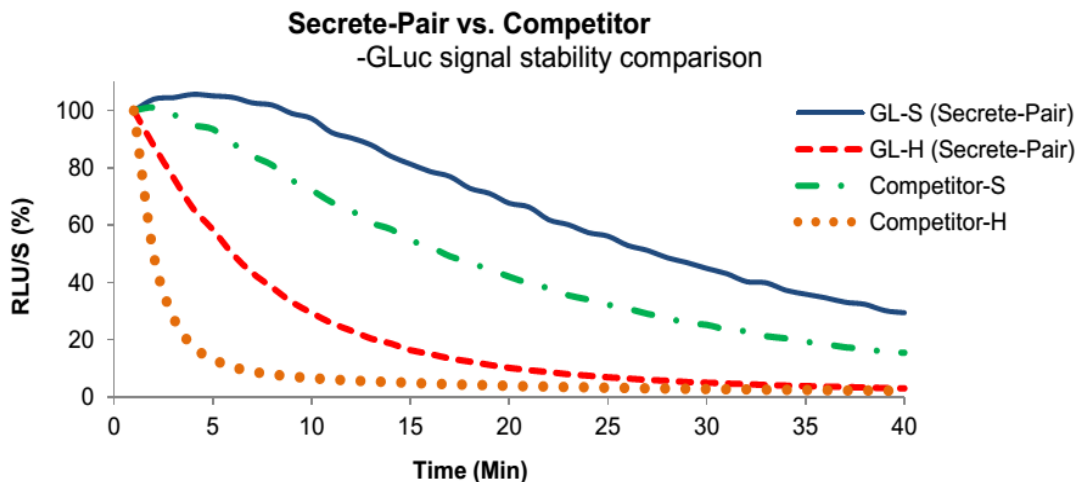


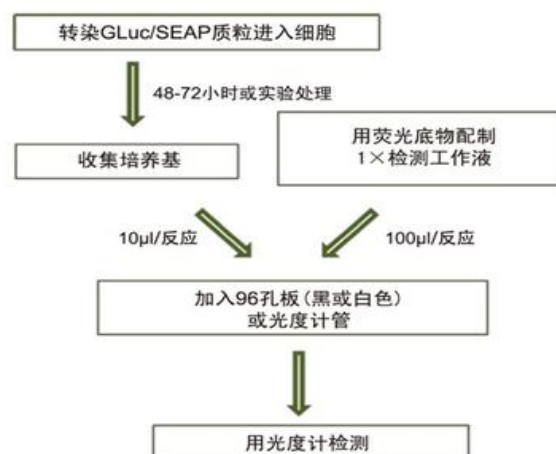
图2. 不同缓冲体系中GLuc的信号稳定性比较。细胞转染人类GLuc报告基因克隆后收集细胞培养物，每个反应10μl。根据试剂盒的实验步骤进行操作，对每个试剂盒中两种缓冲体系进行测试，获得的信号百分比（Y轴）作为信号稳定性的指标。实验结果如图所示，在两种试剂盒中（Secrete-Pair和竞争者Gaussia luciferase assay kit），含有稳定剂（-S）的缓冲体系中GLuc的活性比不含稳定剂（-H）的缓冲体系中稳定。不仅如此，Secrete-Pair试剂盒缓冲体系中GLuc信号比竞争者试剂盒中稳定性更高（实验开始10分钟内近90%的信号可被捕获）。

II. 产品信息及储存条件

产品内容	包装规格	寄送条件	储存条件	Secrete-Pair™ 试剂盒
Buffer GL-S (10x) GLuc buffer (For stable activity)	1 mL 1 mLx3 1.8 mLx6	干冰或冰袋	-20°C 至少保存 6 个月	Dual luminescence assay kits <i>Gaussia</i> luciferase assay kits
Buffer GL-H (10x) GLuc buffer (For high sensitivity)	1 mLx1 1 mLx3 1.8 mLx6	干冰或冰袋	-20°C 至少保存 6 个月	Dual luminescence assay kits <i>Gaussia</i> luciferase assay kits
Substrate GL (100x) GLuc substrate	100 µLx1 100 µLx3 0.5 mL x2	干冰或冰袋	-20°C 至少保存 6 个月	Dual luminescence assay kits <i>Gaussia</i> luciferase assay kits
Buffer AP (10x)* SEAP buffer	1 mLx1 1 mLx3 1.8 mLx6	干冰或冰袋	-20°C 至少保存 6 个月	Dual luminescence assay kits
Substrate AP (100x)* SEAP substrate	100 µLx1 100 µLx3 0.5 mL x2	干冰或冰袋	-20°C 至少保存 6 个月	Dual luminescence assay kits
EF1A-PG04 Media*	50 µLx1 50 µLx2 50 µLx2	干冰或冰袋	-20°C 至少保存 6 个月	Dual luminescence assay kits

*The Buffer AP, Substrate AP and EF1A-PG04 media are only provided in the Dual Luminescence Assay Kits.

III. 操作流程



IV. 准备工作

备注

1. 10x缓冲液在室温下彻底溶解后涡旋3-5秒，然后用灭菌水配制成1x的工作液。缓冲液溶解后可能呈浑浊状态，但这并不影响荧光素酶的检测。1x的工作液（不包含底物）在4℃可保存一星期。
2. 荧光素酶催化发光和SEAP对温度变化非常敏感，所以检测GLuc和SEAP的活性的最佳温度是室温（20-25℃）。因此在测试之前使1x的工作液恢复到室温是非常重要的。
3. 试剂盒提供两种用于GLuc分析的缓冲液。Buffer GL-S含有稳定剂，弥补了GLuc信号快速衰退的缺点，可用于稳定活性分析。Buffer GL-H适用于检测低表达量的GLuc活性，可以提供更高的灵敏度。GL-H缓冲液中GLuc的活性比GL-S缓冲液中高4-6倍（图3）。但是GL-S缓冲液中的GLuc的活性更稳定。实验开始10分钟内近90%的信号可被捕获，但在同一时间内，GL-H缓冲液中GLuc的活性降至不到40%（图3& 图4）。因此，我们建议先使用GL-S缓冲液检测GLuc的活性，特别是高通量筛选。如果GLuc的活性太低，你可以考虑使用GL-H缓冲液。
4. 如果检测SEAP，需使用AP缓冲液。

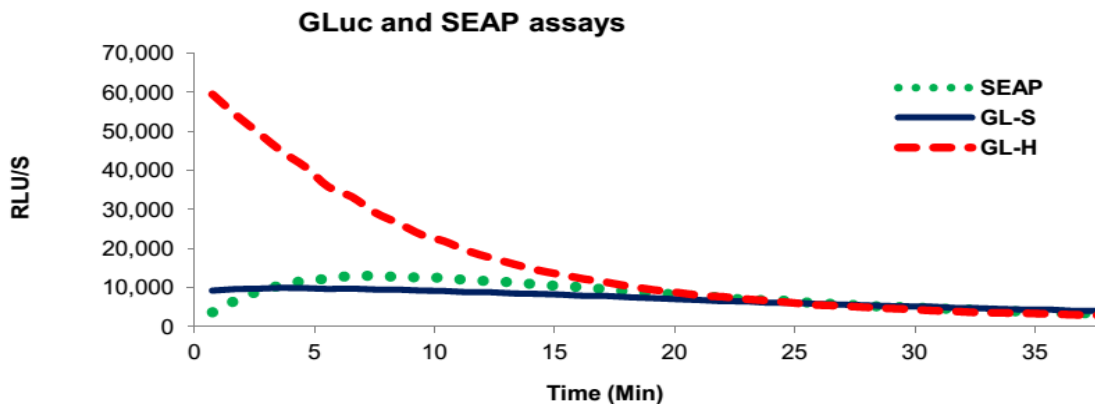


图3. GLuc和SEAP分析。细胞转染GLuc-SEAP双报告基因克隆后收集细胞培养物，每个反应10μl。反应初期，GL-H缓冲液中wtGLuc活性比GL-S缓冲液中高3-5倍。但GL-S缓冲液中GLuc活性更稳定。

制备样品

1. 将带有单报告基因或双报告基因的质粒通过Endofectin™（GeneCopoeia, Cat# EFP100）或其它转染试剂转染细胞。建议设置重复。
备注: 我们建议转染时使用6-孔板或12-孔板，也可使用其它类型的细胞培养板。如果是共转染，使用者自己决定最佳的转染条件。一般建议含有报告基因的质粒（例如：含GLuc报告基因的克隆）和对照质粒（例如：SEAP质粒）的比率是1-5:1。
2. 转染6-24小时后更换培养基。如果需要在特殊条件下测试，那么更换培养基后，你可以开始进行相关的实验。
3. 一段时间后（转染48-72小时后），轻轻收集细胞培养基用于检测GLuc和SEAP的活性。如果不立即使用，将收集好的细胞培养基存放于-20℃。在-20℃至少可保存一个月。
4. （可选项）在使用Secrete-Pair dual luminescence assay kit时，可用EF1A-PG04 media（10μl）作为阳性对照检测光度计。

V. GLuc 检测流程

试剂盒提供两种GLuc 缓冲液以满足您的特殊研究需求。

GLuc 缓冲液选择指导

GLuc 缓冲液	目的	wtGLuc*	mGLuc**	应用
GL-S 缓冲液	更高的稳定性	需要	被推介	常规、高温超导、手动检测
GL-H 缓冲液	更高的灵敏度	不推介 除非酶的活性非常低	当检测更高的灵敏度时需要	常规、高温超导、手动检测 (如果处理得当)

*wtGLuc: 人类野生型 *Gaussia* 荧光素酶。

**mGLuc: 修改后的 *Gaussia* 荧光素酶。它比wtGLuc产生更稳定的荧光信号(图4)。GeneCopoeia公司的GLuc-ON™启动子报告克隆和miTarget™ miRNA 3'UTR 克隆都使用mGLuc。

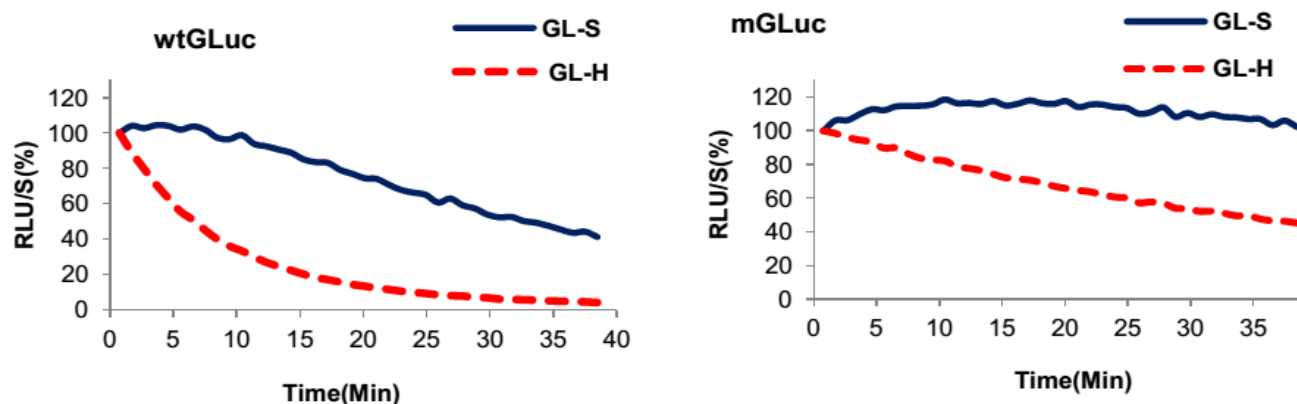


图 4. wtGLuc和mGLuc信号稳定性的检测。缓冲液为GL-S和GL-H，细胞转染wtGLuc或mGLuc报告基因克隆后收集细胞培养物，每个反应10 μ l。

A. 稳定性的GL-S缓冲液使用说明

备注: wtGLuc和mGLuc的GLuc的活性在GL-S缓冲液中非常稳定(图4)。由于在很长一段时间内GLuc的活性都非常稳定，所以适用于高通量筛选及手动监测分析。

1. 收集0.1-0.2ml细胞培养物装到1.5ml离心管里，然后置于室温。
2. 在室温下解冻GL-S (10x) 缓冲液，上下颠倒管3-5次，然后涡旋振荡3-5秒。配制1xGL-S缓冲液，每个反应需要100 μ l 1xGL-S缓冲液。建议每个样品做3次重复。

举例说明: 如果你有5个样品做重复反应，需准备1mL的1xGL-S缓冲液。0.1mL的10xGL-S缓冲液加0.9mL灭菌水。多配制1-2个反应的Buffer避免因吸取时的误差造成的短缺。

3. 准备GLuc工作液(例如: 10个样品): 加10 μ l的Substrate GL (100 x) 到1mL的1xGL-S缓冲液中。上下颠倒管子数次，混匀溶液。
4. 加样品前，配好的试剂先在室温孵育25分钟(避光保存)。
5. 根据仪器说明书设置测试条件，设置检测时间为1-3秒。
6. 用移液器吸取10 μ l培养基样品(一式两份或一式三份)加到96-孔白板(不透光)或黑色的微孔板，或是光度计管。

7. 加入100µL 孵育好的GLuc工作液到样品中。温和的吹打混匀，不要涡旋振荡。

备注：如果您有许多样品，并用96-孔板测试，我们建议您用多道移液器加样以缩短样品之间的误差。如果使用单个光度计管测试，不要在同一时间内把工作液加到所有的光度计管里。但是得确保所有样品的发光检测前的处理时间是相同的。

自动注射器：如果您使用自动注射器，请按照仪器说明书进行操作。我们建议用以下参数设置光度计：加入100µL孵育好的GLuc工作液到样品中、60秒的间隔、1-3秒的检测；如果工作液未孵育也可进行测试。

8. 室温孵育1分钟，放入仪器进行检测。

备注：室温孵育后争取在5分钟内读板。如果使用单个光度计管测试，请确保所有样品的发光检测前的处理时间是相同的。

B. 高灵敏度的GL-H缓冲液使用说明

备注：wtGLuc的活性不适合用GL-H缓冲液来检测，因为wtGLuc的活性衰退非常快。如果用GL-H缓冲液进行高通量筛选，我们推荐您使用自动注射器。GL-H缓冲液也可用于测定mGLuc的活性以增强灵敏性，工作液加到样品后应该在1-2分钟内完成检测工作。

1. 收集0.1-0.2ml细胞培养物装到1.5ml离心管里，然后置于室温。

2. 在室温下解冻GL-H（10x）缓冲液，上下颠倒管3-5次，然后涡旋振荡3-5秒。配制1xGL-H缓冲液，每个反应需要100µl 1xGL-H缓冲液。建议每个样品做3次重复。

举例说明：如果你有5个样品做重复反应，需准备1mL的1xGL-H缓冲液。0.1mL的10xGL-H缓冲液加0.9mL灭菌水。多配制1-2个反应的Buffer避免因吸取时的误差造成的短缺。

3. 准备GLuc工作液（例如：10个样品）：加10µL的Substrate GL（100 x）到1mL的1xGL-H缓冲液中。上下颠倒管子数次，混匀溶液。

4. 加样品前，配好的试剂先在室温孵育25分钟（避光保存）。

5. 根据仪器说明书设置测试条件，设置检测时间为1-2秒。

6. 用移液器吸取10µL培养基样品（一式两份或一式三份）加到96-孔白板（不透光）或黑色的微孔板，或是光度计管。

7. 加入100µL 孵育好的GLuc工作液到样品中。温和的吹打混匀，不要涡旋振荡。

备注：如果您有许多样品，并用96-孔板测试，我们建议您用多道移液器加样以缩短样品之间的误差。如果使用单个光度计管测试，不要在同一时间内把工作液加到所有的光度计管里。但是得确保所有样品的发光检测前的处理时间是相同的。

自动注射器：如果您使用自动注射器，请按照仪器说明书进行操作。我们建议用以下参数设置光度计：加入100µL孵育好的GLuc工作液到样品中、40秒的间隔、1-2秒的检测；如果工作液未孵育也可进行测试。

8. 室温孵育30秒，立即放入仪器进行检测。

备注：在GL-H缓冲液中GLuc的活性衰退非常快（图1）。我们建议室温孵育后立即读板。如果使用单个光度计管测试，请确保所有样品的发光检测前的处理时间是相同的。

VI. SEAP 检测流程（仅适用于 Secrete-Pair dual luminescence assay kit）

1. 从GLuc 检测流程中吸取40-50µl 细胞培养物（步骤1）。65°C 加热10-15 分钟，然后置于冰上备用。

2. 在室温下解冻AP（10x）缓冲液，上下颠倒管3-5次，然后涡旋振荡3-5秒。配制1xAP缓冲液，每个反应需要100µl 1xAP缓冲液。建议每个样品做3次重复。

举例说明：如果你有5个样品做重复反应，需准备1mL的1xAP缓冲液。0.1mL的10xAP缓冲液加0.9mL灭菌水。多配制1-2个反应的Buffer 避免因吸取时的误差造成的短缺。

3. 准备SEAP工作液（例如：10个样品）：加10 μ L的Substrate AP（100 x）到1mL的1xAP缓冲液中。上下颠倒管子数次，混匀溶液。
4. 加样品前，配好的试剂先在室温孵育5-10分钟（避光保存）。
5. 根据仪器说明书设置测试条件，设置检测时间为1-3秒。
6. 用移液器吸取10 μ L培养基样品（一式两份或一式三份）加到 96-孔白板（不透光）或黑色的微孔板，或是光度计管。
7. 加入100 μ L 孵育好的SEAP工作液到样品中。温和的吹打混匀，不要涡旋振荡。

备注：如果您有许多样品，并用 96-孔板测试，我们建议您用多道移液器加样以缩短样品之间的误差。

自动注射器：由于孵育时间长（5-10分钟），不需要使用自动注射器。但是，如果您使用自动注射器，请按照仪器说明书进行操作。我们建议用以下参数设置光度计：加入100 μ L孵育好的GLuc工作液到样品中、5-10分钟的间隔、1-3秒的检测；如果工作液未孵育也可进行测试。

8. 室温孵育5-10分钟，放入仪器进行检测。

备注：室温孵育后争取在5分钟内读板。如果使用单个光度计管测试，请确保所有样品的发光检测前的处理时间是相同的。

VII. 信号标准化（仅适用于Secrete-Pair dual luminescence assay kit）

信号标准化是必要的，当在多个转染细胞样本中比较GLuc的活性。用SEAP作为内参，信号标准化（GLuc和SEAP活性的比率）消除了由于转染效率的变化产生的影响，使样品的GLuc的活性标准化，可以更精确地反映真实的生物学事件。

计算的GLuc /SEAP的发光强度的比率（RLU，相对光单位），使所有样品的GLuc的活性（GLuc/SEAP比率）标准化。

VIII. 注意事项

发光信号受培养基和实验条件的影响。结果仅适用于比较同一时间用相同的培养基/血清的样品。在不同时间收集的样品应保存于-20 $^{\circ}$ C，且保证一个月内荧光素酶的活性没有丢失。如果GLuc/SEAP的比率太高（>100）或太低（<0.01），而且发光信号（RLU）高于 1×10^6 ，需要稀释样品保证GLuc /SEAP的活性的稳定性。用新鲜的培养基进行稀释。本试剂盒内置10 μ l EF1A-PG04 media（阳性对照），在检测中，通常可产生40,000-80,000 RLU的GLuc和5,000-10,000 RLU的SEAP，使用不同的光度计测的RLU的数值可能有所不同。

IX. 参考文献

1. Szent-Gyorgyi, C., et al, Proc.SPIE 1999, 3600: 4-11.
2. Tannous, BA, et al, Mol Ther 2005, 11:435-443.
3. Badr, CE, et al, PLoS ONE 2007, 2:e571.
4. Tannous BA. Nat Protoc 2009; 4:582-591.

X. 有限使用许可协议及质量保证

有限使用许可协议

以下条款适用于 GeneCopoeia 所有的产品。如果不接受以下条款，所有的产品必须 5 个工作日内返回 GeneCopoeia。GeneCopoeia 的产品仅限购买方内部研究使用，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。GeneCopoeia 的产品不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经 GeneCopoeia 的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。此产品必须按照国家卫生研究院的 DNA 重组和基因研究的指导方针使用。

有限质量保证

GeneCopoeia 保证您收到的产品符合产品目录上的规格。如果 GeneCopoeia 的产品未能满足这些规格，GeneCopoeia 将替换该产品。如果不能提供替换产品，GeneCopoeia 将退款给购买方。这个有限质量保证不得延伸至产品的原始购买者以外的人。如果产品与订购信息不符，所有的产品必须在 30 天内返回 GeneCopoeia。GeneCopoeia 的责任仅限于替换产品，且退款只限于实际的购买价格。GeneCopoeia 不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。GeneCopoeia 不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。

GeneCopoeia 致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果你对我们的产品有任何问题和担忧，请和我们联系，电话：301-762-0888。

© 2016 GeneCopoeia, Inc.