



## 荧光素酶互补瞬转试剂盒 使用说明书

产品编号: MH001

储存条件: 见产品内容。

产品内容:

产品内容	类型	50 T	储存条件
5 × 农杆菌侵染液	溶液	80 mL	4°C
乙酰丁香酮 (100 mM)	溶液	400 µL	-20°C, 避光
D-荧光素钾盐	粉末	64 mg	-20°C, 避光, 1 年
p1300-nLuc	空载质粒	10 µg	-20°C
p1300-cLuc	空载质粒	10 µg	-20°C
p1300-nLuc-T	阳性对照质粒	10 µg	-20°C
p1300-cLuc-p53	阳性对照质粒	10 µg	-20°C
说明书		1 份	

产品介绍:

荧光素酶互补实验 (LCI, luciferase complementation imaging) 可以用于蛋白质-蛋白质相互作用的研究。萤火虫荧光素酶 (LUC, luciferase) 可以分为 N 端和 C 端两部分, 单独的两部分不能自发地重组和发挥功能。只有分别融合了 N 端和 C 端的两个蛋白发生相互作用时, LUC 的两部分在空间上相互靠近, 产生有功能的重组 LUC, 催化荧光素酶底物发光。在植物中, 通过农杆菌瞬时转化, 可以快速在烟草、拟南芥等双子叶植物叶片快速进行蛋白之间的互作检测。该方法简便、高通量、灵敏度高。

本试剂盒提供了一套简单高效, 适用于多种植物的荧光素酶互补实验的瞬转方法。采用本公司独家研制的侵染缓冲液, 广泛适用的表达载体和高灵敏反应底物, 明星互作对照组, 可以快速获得高质量的互作检测结果。

产品特点:

1. 本产品适用于在叶片等植物组织中利用 LCI 方法进行蛋白质相互作用检测。
2. 本产品将荧光素酶互补实验用到的载体及试剂组合起来并提供了试验全流程方案。帮助研究人员方便、快捷地完成实验。

注意事项:

1. 本产品提供了荧光素酶互补实验的方案, 具体操作时可根据自己试验的实际情况对相关内容进行调整。
2. 本产品不提供的感受态及其它试剂可以在本司单独购买, 详情可见说明书最后的相关产品介绍。



3. 虽然本产品操作步骤以烟草为例，但实际可尝试应用于更多荧光素酶互补瞬转受体植物。
4. 质粒建议重新转化大肠杆菌扩繁，提取质粒后使用。

## 操作步骤：（在开始操作前请先阅读注意事项）

### （一）载体构建

将所研究的两个目标蛋白（蛋白 1、蛋白 2）的 CDS 序列分别构建到 p1300-nLuc 载体（11015 bp、卡那抗性）的 nLuc 区域的上游 MCS 处和 p1300-cLuc 载体（11753 bp，卡那抗性）的 cLuc 区域的下游 MCS 处（可供使用的酶切位点如图 1 所示）。构建完成后，形成两个实验组质粒：p1300-nLuc-蛋白 1、p1300-cLuc-蛋白 2。

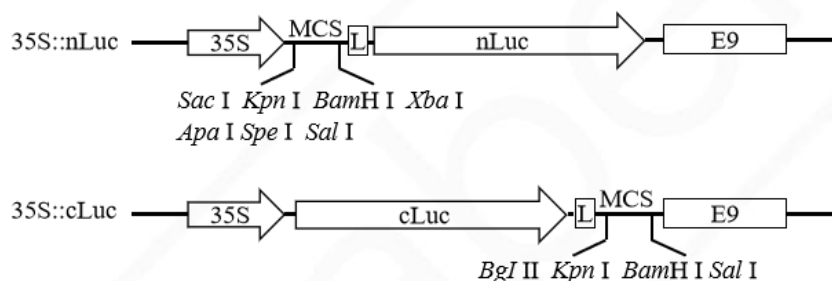


图 1 实验组载体构建示意图

**注 1：**载体构建时要保证插入片段与 nLuc 或 cLuc 处于同一阅读框下，使插入片段与 nLuc 或 cLuc 能够融合表达。插入 nLuc 上游的 CDS 序列要去掉终止密码子，插入 cLuc 下游的 CDS 序列要保留终止密码子。

**注 2：**本司提供的 p1300-cLuc 载体中在 MCS 区域含有 FLAG 和 Strep-Tag II 两个标签，可能会影响测序，如果不需要这两个标签，建议构建载体时使用 BamH I 和 Sal I 双酶切载体去除。

**注 3：**有关 p1300-cLuc（Coolaber # VT138）及 p1300-nLuc（Coolaber # VT139）载体信息及序列请查阅我司官网信息。

### （二）瞬时转化（以瞬时转化烟草为例）

**1. 转化农杆菌：**将构建好的 2 个实验组质粒、2 个空载质粒（p1300-nLuc、p1300-cLuc）以及 2 个阳性对照质粒（p1300-nLuc-T、p1300-cLuc-p53）转化农杆菌 GV3101 感受态，涂布在含有 50 μg/mL Kan 的 LB 平板上。28°C 培养约 2 天即可长出单菌落。

**2. 摇菌：**从上一步得到的平板上挑取直径约 1-2 mm 农杆菌单菌落到 5 mL 的 LB 液体培养基中（含有 50 μg/mL Kan 和 25 μg/mL Rif）。过夜培养 14-18 h，使用分光光度计测定菌液的 OD 值，一般情况下，OD 值不超过 1 即可（一般在 0.6-1.0 之间）。**可选步骤：**同时在含有 5 μg/mL Tet 和 25 μg/mL Rif 的 LB 培养基中培养 GV3101（pSoup-p19）菌株。

**注 1：**实际操作时可根据后续试验组合需要，扩大或缩小摇菌体积。

**注 2：**GV3101（pSoup-p19）菌株可以辅助异源蛋白在植物中的瞬时表达。在大部分实验中不使用此菌株也可取到良好的实验效果。



**注 3:** 加入利福平的目的是防止杂菌生长，实际操作中可以不添加。添加利福平会造成农杆菌生长速度减慢，利福平添加量一般为 25 µg/mL。对于不具有利福平抗性的菌株，则需根据各菌株的对应抗性，选择相应抗生素进行培养。

**3. 配制 Activation Buffer:** 在无菌条件下，用无菌双蒸水将农杆菌侵染液稀释为 1 x 工作液，然后取 4 mL 的工作液加入 4 µL (1/1000) 体积的 100 mM 乙酰丁香酮混匀备用。

**注:** Activation Buffer 需要现配现用，根据第 3 步菌液的体积配置合适体积的 Activation Buffer。

**4. 混菌，收集菌体:** 实验一般设置四个组合（如图 2），在 2 mL 无菌离心管中按照 1:1 体积混合两种菌液，保证最终 1 mL 的重悬菌液的 OD600 不超过 1。**4000 g 离心 10 min 收集菌体**，弃去上清。

**注:** 如果需要 P19 蛋白辅助，则在每个处理中加入 GV3101 (pSoup-p19) 菌液，其体积一般占总体积的 20%-50%即可有效促进蛋白表达。也可以直接将质粒转化进 GV3101 (pSoup-p19) 菌株中。

**5. 重悬菌体:** 第 3 步收集到的菌体每管用 1 mL 的 Activation Buffer 重悬，室温静置 2-3 h。

#### 6. 注射法侵染烟草叶片

使用 1 mL 无菌注射器吸取上一步得到的重悬液；避开烟草叶脉，确认要注射的区域（如图 2 所示），先用注射器针头在要注射的区域中间轻微划一下，造成“微创”，注意不要划破叶片；左手抵在叶片的正面，右手将注射器（不带针头）垂直压在烟草的背面，右手拇指慢慢推压注射器，观察转化液在表皮下扩散到一定范围（如图 2 圆圈所示区域，具体范围视烟草叶片大小而定，注射范围不必过大，有一小片区域即可满足试验需求，务必使 4 个处理在一片叶子上的扩散范围互不影响）。

每次试验建议将 4 种处理组合注射到同一片叶子上（图 2）。同一株烟草至少选取 3 个叶片进行注射。同一批试验建议至少注射 3 株烟草。

**注:** 最好选择生长到 4-5 片叶子时期的烟草，单个组合 1 mL 菌液即可满足 9 块区域的注射要求，如注射范围较大，需额外多配制菌液。

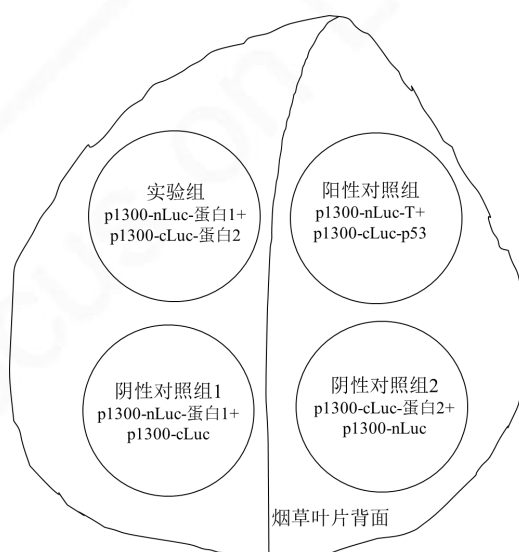


图 2 注射法侵染烟草示意图



### (三) 结果观察

**1. 配制 1 mM 荧光素底物工作液:** 为了避免试剂损失, 建议直接将 2 mL 无菌去离子水加入 D-荧光素钾盐的小瓶中, 溶解后即为 0.1 M 的荧光素钾盐母液。将母液用无菌去离子水稀释 100 倍后即为 1 mM 荧光素底物工作液。

**注 1:** 配置好的荧光素钾盐母液可在-80°C避光保存 1 年, 工作液可在-20°C避光保存 1 个月, 建议分装后保存, 避免反复冻融。

**注 2:** 在本系统中, 建议使用 D-荧光素钾盐作为底物, 如使用 D-荧光素钠盐可能会使实验失败。

**2. 注射荧光素底物:** 选取注射菌液 36-48 h 后的烟草叶片, 用 1 mL 无菌注射器吸取 1 mM 荧光素底物工作液注射烟草叶片背面已经注射过菌液的所有区域。

**注:** 一般情况下, 4 mL 荧光素底物工作液即可满足一次实验注射要求。

**3. 观察拍照:** 剪取注射完底物的烟草叶片, 将其背面朝上放入化学发光成像系统中检测发光情况并拍照。

**注 1:** 加入底物后可立即检测, 也可注射底物后黑暗处理 5 min 后检测 (可适度增强信号), 加入底物后务必半小时内检测。

**注 2:** 使用植物活体成像系统观察活体荧光效果最好。也可尝试使用一般的具有化学发光观察功能的成像系统, 可能对于一些不灵敏的互作反应取不到良好的观察效果。

**相关产品:** 以下产品均可单独在本公司订购, 更多产品请关注公司官网查询。

产品名称	货号
农杆菌侵染液 (烟草专用)	SL0911
100 mM 乙酰丁香酮	SL9513
乙酰丁香酮 (粉末)	CA1061
D-荧光素钾盐	CL6930
DH5 $\alpha$ 感受态细胞	CC501
GV3101 感受态细胞	CC405
EHA105 感受态细胞	CC403
GV3101 (pSoup-p19) 菌株	AT407
p1300-cLuc	VT138
p1300-nLuc	VT139
卡那霉素储存液 (100 mg/mL)	SL3820
利福平储存液 (25 mg/mL DMSO 溶)	SL3880
盐酸四环素储存液 (5 mg/mL)	SL3850

20231207 版