

萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒

V02

货号：D0020

规格：50T/200T/1000T

保存：-20℃，有效期1年。

产品介绍：

真核基因表达调控研究常用的方法是进行报告基因的检测，生物发光法又是报告基因检测最常用的有效手段。荧光素酶能催化底物荧光素的转化并发射出光子。该产品为萤火虫萤光素酶报告基因在哺乳动物细胞中的表达提供快速、灵敏、稳定的检测方法，萤火虫萤光素酶(Firefly Luciferase)分子量约61 kDa的蛋白，在 ATP、Mg²⁺和 O₂ 存在条件下，催化其底物甲虫萤光素(Beetle Luciferin)氧化成氧化萤光素(Oxyluciferin)并发出波长是560 nm 左右的萤光，能够检测最低10⁻²⁰mol 的荧光素酶，在10⁻¹⁴至10⁻²⁰mol 的酶浓度范围内呈很好的线性关系。

产品组成：

组分	50T	200T	1000T
A. 5×Firefly Luciferase Lysis Buffer	5mL	20mL	5×20mL
B. Firefly Luciferase Assay Buffer	5mL	20mL	5×20mL
C. D-Luciferin	1mg	4mg	5×4mg

产品特点：

1. 快速省时：细胞裂解在 10~15 min 内完成；
2. 操作简便快捷：试剂易于配制，样品检测步骤简单；
3. 灵敏度高：能够检测最低 10⁻²⁰ mol 的萤光素酶；
4. 线性范围广：酶的浓度线性范围可达 8 个数量级。

自备材料：

离心管、1×PBS、微型振荡器、摇床、多功能酶标仪。

实验步骤：

1.细胞裂解

(1)将转入报告基因的细胞中的培养基移除，加入PBS轻轻洗涤(贴壁细胞可直接进行此操作，悬浮细胞要离心收集细胞)。充分裂解按如下方案加入 1x Lysis Bufer(用无菌水按 4:1 稀释A组分)，然后将培养板放在微型震荡器上室温震荡 15 min，充分裂解细胞。

细胞培养板	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板
裂解液体积	30 μL	60 μL	120 μL	250 μL	500 μL

注：裂解产物可室温保存6 h，-70℃可长期存放(裂解产物不能多次反复冻融)。

(2)将充分裂解后的裂解产物，10000-15000 rpm离心 3-5 min，收上清。

2.工作液配置

(1)将所有组分恢复至室温。

(2)用B组分充分稀释C组分(储液)，配制成 0.2 mg/mL 的萤火虫萤光素酶工作液，涡旋





震荡，确保充分混匀。

注：萤火虫萤光素酶工作液不能反复冻融，若单次实验用量较少，建议按单次使用量分装成小规格。

3.化学发光值检测

(1)按仪器说明书开启具有检测化学发光功能的仪器，如多功能酶标仪。设定参数，测定时间为10 s，测定间隔为2 s。

(2)将细胞裂解产物按照20~100 μL 的体积加入测量管中(保持每次样品量一致)。1x Lysis Buffer 为空白对照。

(3)加入100 μL 萤火虫萤光素酶检测液，测定 RLU(Relative light unit)(建议酶标仪设置 Shaking混匀功能)。

注：步骤 3 的化学发光为瞬时发光，请先打开酶标仪并设置好参数后，建议用排枪加入萤光素酶工作液，并立即进行检测。

注意事项：

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 萤火虫萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 560 nm。请用化学发光 (Luminescence) 模块进行检测。
3. 如果单管萤光测定仪测定，每个样品与测定试剂混合后到测定前的时间应保持一致。
4. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。
5. 产品信息仅供参考，如有疑问请致电400-968-6088咨询。
6. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。

FAQ：

1. 问：怎么保证数据重复性和复孔误差？

答：(1)为取得最佳测定效果，在用单管的化学发光仪测定时，样品和测定试剂混合后到测定前的时间应尽量控制一致；使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时，宜先把样品全部加好，然后用排枪统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。(2)由于温度对酶反应有影响，所以测定时，样品和试剂均需达到室温后再进行测定。

2. 问：荧光值过高是什么原因造成的？该怎么解决？

答：(1)荧光值过高可能会超出仪器检测范围，从而检测不到值。(2)减少质粒转染量。(3)细胞样品裂解后，离心取上清后检测或对裂解产物进行稀释后检测。(4)不建议通过减少底物量来降低荧光值，需要保证底物的饱和来反映萤光素酶真实的表达水平，否则会造成检测结果出现大的偏差。

3. 问：荧光值过低或无荧光值是什么原因造成的？该怎么解决？

答：(1)萤光素酶的表达水平与启动子活性相关，正常表达水平下检测到的荧光值应在 10^5 数量级左右，若检测到的荧光值比较低或无荧光值，可从启动子活性、转染效率、检测过程这几方面进行考虑。

(2) 转染效率低。

- 1) 优化转染实验条件，用较易转染的质粒做阳性对照（如转染过表达荧光蛋白质粒）；
 - 2) 确保转染 DNA 的质量，可通过酶切或琼脂糖凝胶电泳的方法对 DNA质量进行鉴定；
 - 3) 选择活性较高，处于指数分裂期的细胞进行转染。
- (3) 启动子活性低或诱导失败。
- 1) 转染后的细胞培养使用特异性诱导启动子的条件；
 - 2) 优化细胞的培养条件，提高萤光素酶的表达量；



- 3) 更换强启动子（如 SV40、CMV）。
- (4) 样品裂解效率低。
 - 1) 细胞培养时间不宜过长，12~36 h 内最好，长时间培养后，细胞可能会难裂解。
 - 2) 加入的裂解液需足量，保证细胞能够充分裂解。
- (5) 检测过程操作不规范。
 - 1) 选择合适的检测仪器，能够检测化学发光或者生物发光的仪器都适用于该实验；
 - 2) 需加入足量底物，保证底物的饱和，否则会造成检测结果出现很大偏差；
 - 3) 室温反应。反应时各个组分（细胞裂解产物，底物工作液等）都需要调整到室温；
 - 4) 荧光素酶的半衰期一般约 30 min，加完底物后可立即检测，尽量在 30min 内完成。
- (6) 底物氧化失效。
 - 1) 底物避光密封保存，萤火虫荧光素酶底物-20℃保存；
 - 2) 反应工作液建议现用现配。

