

萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒

Firefly Luciferase Reporter Gene Assay Kit

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
FRT-03	5 × 细胞裂解液 (5 × Cell Lysis Buffer)	20 ml	-20 °C 3 年
	萤火虫萤光素酶检测试剂 (Firefly Luciferase Detection Reagent)	10 ml	-80 °C 3 年
	说明书	1 份	

一、运输与存储。

本产品必须干冰运输，并依据各组份保存条件分开保存，有效期 3 年。

二、注意事项（实验前阅读）。

1. 由于温度对酶促反应有影响，所以待测样品（细胞裂解产物）和分装的荧光素酶活性检测试剂平衡到室温后再进行活性测定。
2. 萤火虫萤光素酶检测试剂不可反复冻融，可分装成100 µl/管，置于-80 °C长期保存。
3. 用ddH₂O将5×细胞裂解液稀释成1×细胞裂解液，再裂解细胞。1×细胞裂解液可在4 °C存放1月，长期保存在-20 °C。
4. 为取得最佳测定效果，用单管的化学发光仪测定样品活性时，样品加入底物时的间隔时间和混合次数尽量一致，减少操作误差；使用多功能化学发光酶标仪时，宜先把样品全部加好，再统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。
5. 为了您的完全，请穿实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜。

三、产品简介。

本产品的检测试剂中含有 Luciferin，在萤火虫萤光素酶（Luciferase）的作用下被氧化成 Oxyluciferin，并发出生物萤光。可以通过检测生物萤光的强度，分析萤火虫萤光素酶的活性。为了检测目的基因的转录水平变化，可以将目的基因的转录调控元件或 5'端的启动子区域的 DNA 序列

克隆到萤火虫萤光素酶基因的上游（5'端），也可以把目的基因的 3'-UTR 区域的 DNA 序列添加到萤光素酶基因的下游，构建报告基因质粒，转染细胞，检测萤光素酶的活性，确定目的基因的表达变化，完成报告基因检测分析。

四、特点与优势。

1. 本产品灵敏度高，可以有效的检测基因转录水平变化。
2. 本试剂盒操作简单，能够快速完成萤火虫萤光素酶活性检测。

五、使用说明。

1. 以 6 孔细胞培养板培养的贴壁细胞为处理对象，实验步骤如下：
2. 细胞转染。细胞转染实验请参考本公司转染试剂（**Chemifect, Cat: FR-01**）说明书中的实验步骤，将编码萤火虫萤光素酶报告基因的质粒与转染试剂按规定比例混合，转入 6 孔板的细胞中，2 µg/孔。
3. 裂解液配制。用 ddH₂O 稀释 5×细胞裂解液，配成 1×细胞裂解液，4 °C 可存放 1 月。
4. 细胞裂解。细胞转染后 48 h，弃培养液，预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次，加入 0.5 ml 细胞裂解液(1×)，置于 4 °C 摇床上，轻轻旋转 5-30 min，裂解细胞。
5. 将裂解液转入 1.5 ml EP 管中，12,000×g，4 °C 离心 5 min，弃沉淀，上清转移至新的 EP 管中，即为待测样品（细胞裂解产物）。
6. 取出萤火虫萤光素酶检测试剂，融化。若使用单管测定仪器，则将萤火虫萤光素酶分装到 1.5 ml 的 EP 管中，100 µl/管。若使用 96 孔板测定，则根据实际情况进行分装。将不用的萤火虫萤光素酶检测试剂转入 -80 °C 冰箱，需要使用的检测试剂，避光平衡到室温。
7. 仪器设置。打开仪器，设置参数，延迟时间（整合时间）一般为 2 sec，测定时间为 10-20 sec。
8. 活性测定。吸取 5-20 µl 待测样品，加到 100 µl 萤火虫萤光素酶检测试剂中，立即混匀，置于仪器中，检测萤火虫萤光素酶活性值。
9. 整理并分析萤火虫萤光素酶活性值与海肾萤光素酶活性值的比例，鉴定目的基因表达变化。

表1. 细胞裂解液体积表

96孔板	24孔板	12孔板	6孔板
100 µl/孔	200 µl/孔	250 µl/孔	500 µl/孔

六、效果鉴定。

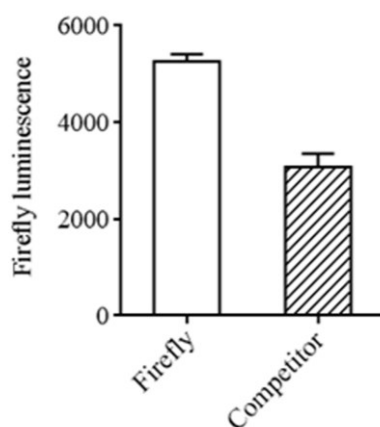


图 1. 萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒效果鉴定。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
萤光素酶活性值偏低	细胞转染效率低，luciferase 表达水平偏低。	增强细胞转染效率，或更换成转染效率较高的的细胞株，如 293T 细胞。
	裂解产物使用量偏少	增加检测体系中的细胞裂解产物用量。
	细胞裂解不充分。	请用配制的 1×细胞裂解液裂解细胞 30 min。
	萤光素酶活性检测试剂失效。	请使用保质期内的试剂。
重复测量的萤光素酶活性值偏差大	萤光素酶活性检测试剂反复冻融。	萤火虫萤光素酶检测试剂分装，-80 °C 保存。避免反复冻融。
	样品和检测试剂未平衡到室温。	提前取出待测样品和分装的萤火虫萤光素酶检测试剂，并配制海肾萤光素酶检测试剂，室温避光放置几分钟，平衡到室温后，再开始检测。
	样品加样量不准。	使用精确度较高的移液器，保证加样量，混合次数及间隔时间一致。
萤光素酶活性值偏高	检测试剂不是同一批次配制的萤光素酶活性检测试剂。	反复冻融降低检测试剂的灵敏度，因此，检测同一样品时，使用同一批次配制，且没有反复冻融（或冻融次数一致）的萤火虫和海肾萤光素酶活性检测试剂。
	细胞转染效率高，luciferase 表达量高。	减少细胞裂解产物用量，或用 1×细胞裂解液稀释细胞裂解产物后再测定。
	细胞裂解产物用量偏大。	减少测定体系中的细胞裂解产物用量。