



One-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit

一步法双萤光素酶报告基因检测试剂盒

版本号: V260701

货号: C202
 保存: -80℃避光
 运输: 干冰

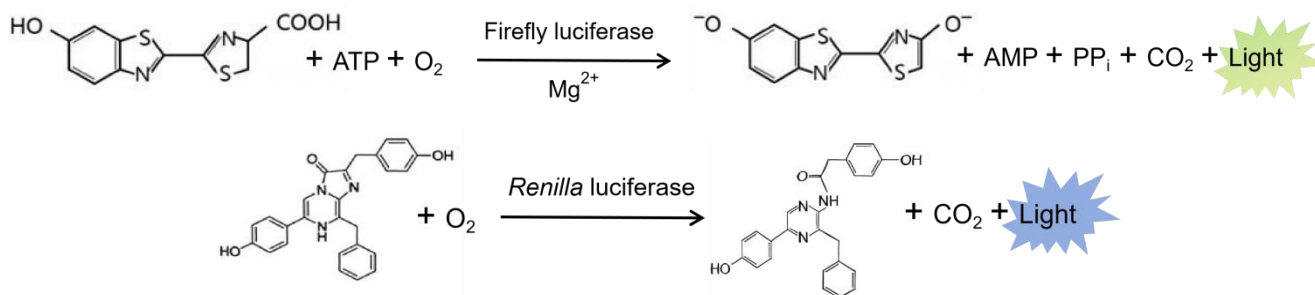
货号	规格
C202-01	100 T
C202-10	1000 T

【产品概述】

本试剂盒采用一步式化学发光检测体系，无需细胞收集、洗涤操作，可在同一细胞样本中先后完成两种萤光素酶定量检测：以萤光素（Luciferin）为底物检测萤火虫萤光素酶（Firefly luciferase）；加入海肾萤光素酶工作液后，同步淬灭萤火虫萤光信号，以腔肠素（Coelenterazine）为底物检测海肾萤光素酶（Renilla luciferase）。

本试剂盒可灵敏高效地检测受基因调控元件调控的萤光素酶表达水平。实验中常将启动子、转录调控元件克隆至萤火虫萤光素酶编码基因上游，或将靶基因 3'-UTR 序列克隆至萤火虫萤光素酶编码基因下游，构建萤光素酶报告质粒。将报告基因质粒（Firefly）和内参质粒（Renilla）共转染细胞，经给药刺激等操作完毕后，裂解细胞并测定萤光素酶活性。通过萤光素酶活性的高低来判断药物处理对目的基因的转录调控作用。海肾萤光素酶作为校正转染效率的内参可以消除细胞数量和转染效率的差异。萤火虫萤光素酶催化 Luciferin 发光的最强发光波长为 560nm。海肾萤光素酶催化 Coelenterazine 发光的最强发光波长为 465nm，具体波段选用需依据实验需求和所用仪器进行设定，通常采用全波段接收发射信号即可，不必单独设置。

反应原理如下：



【产品特点】

1. 操作简便：无需单独裂解液，全程检测流程约 20 min 即可上机读数。
2. 检测线性范围宽、灵敏度优异：96 孔单孔 ≤ 200,000 个细胞区间内发光信号线性良好。
3. 发光信号稳定：发光半衰期 ≥ 1 h，读数重复性佳。
4. 兼容性广：可直接检测培养板活细胞，也可检测提前裂解收集的细胞上清，常规细胞培养基不干扰发光信号。

【产品组分】

组分货号	组分名称	C202-01	C202-10
ZC202-101	One-Step Firefly Luciferase Assay Mix	10 ml	100 ml
ZC202-102	Renilla Luciferase Assay Buffer	10 ml	100 ml
ZC202-103	Renilla Luciferase Substrate (100×)	100 μl	1 ml

【保存条件】

-80℃避光保存，保质期 12 个月，-20℃ 避光保存，推荐 3-6 个月内使用。



【操作步骤】

一、细胞样本直接检测：

1. 细胞铺板与转染处理：

选用白色/黑色不透光化学发光专用 96/384 孔板铺板：

96 孔板：每孔接种 100 μ l 细胞悬液；

384 孔板：每孔接种 25 μ l 细胞悬液（可根据板型微调体积）。

常规设置对照组：空白培养液阴性对照、空质粒转染对照、药物溶剂对照；完成细胞转染后按需加药处理。

2. 检测工作液配置：

1) 试剂预处理：将 One-Step Firefly Luciferase Assay Mix、Renilla Luciferase Assay Buffer 室温融化平衡；Renilla Luciferase Substrate (100 $\times$) 置于冰浴或冰盒上备用。

2) 海肾萤光素酶工作液配制（现配现用）

实操简化方案：按 1:100 比例稀释可满足常规实验。

如：50 μ l Renilla Luciferase Substrate (100 $\times$) + 5 ml Renilla Luciferase Assay Buffer，充分颠倒混匀，配制成 5 ml 工作液。

标准稀释比例：1 份 Renilla Luciferase Substrate (100 $\times$) + 99 份 Renilla Luciferase Assay Buffer（终浓度 1 $\times$ ）。

3. 双萤光信号上机检测：

a. 萤火虫萤光素酶的检测：

1) 细胞培养板室温平衡 10 min（通常不宜超过 30 min）；

2) 96 孔板每孔加入 100 μ l One-Step Firefly Luciferase Assay Mix（384 孔板每孔 25 μ l）；

3) 25 $^{\circ}$ C 室温避光孵育 5-10 min 稳定发光信号；

4) 多功能化学发光酶标仪上机检测，单孔采集时长 0.25 - 1 s；低表达样本可延长采集时间提升信噪比。

b. 海肾萤光素酶的检测：

1) 同孔加入海肾工作液：96 孔 100 μ l/孔，384 孔 25 μ l/孔，轻柔震荡混匀。

2) 25 $^{\circ}$ C 室温避光孵育 5-10 min 稳定信号；

3) 同一酶标仪采集发光数值。

c. 数据的计算

以海肾萤光素酶为内参校正：相对萤光值 = 萤火虫 RLU / 海肾 RLU。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。如果以萤火虫萤光素酶为内参，也可以进行类似计算。

二、裂解并收集细胞后检测：（适用于细胞量比较大，例如细胞培养在培养皿或 6 孔板中可以考虑采用）

1. 细胞裂解收集：

贴壁细胞：弃尽培养液，加入自备细胞裂解液充分裂解；

悬浮细胞：离心去除上清，加入自备裂解液重悬裂解；

注：如果萤光素酶的表达水平比较低，可以尝试使用较少的裂解液。

2. 裂解后 10,000-15,000 g 离心 3-5 min，取上清测定。上清可现测或分装冻存，冻存样品需完全融化至室温再检测。

注：裂解上清建议储存在 -80 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。

3. 取 20 μ l 细胞裂解液，加入 100 μ l 平衡至室温的 One-Step Firefly Luciferase Assay Mix，适当混匀；

4. 25 $^{\circ}$ C 避光孵育 5-10 min 稳定发光；

5. 酶标仪读取萤火虫 RLU 值。

6. 同孔加入 100 μ l 预配好的海肾萤光素酶工作液，混匀。

7. 孵育 5 - 10 min 后检测海肾 RLU 值，按比值计算结果。



【补充说明】

1. 本产品在-20℃保存，推荐在 3-6 个月内使用。 -20℃保存检测效果会逐渐下降，保存半年后其发光效果会降低约 50%，此时仍可满足常规检测。
2. 由于萤光素酶的活性对温度比较敏感，反应前细胞和检测试剂均需达到室温后再进行测定。可将检测试剂在室温或不超过 25℃的水浴中融解并混匀后使用。
3. 本产品解冻后可以采取适当分装后避光保存的方法，以避免反复冻融和长时间暴露于室温。反复冻融过程中，可能会导致检测试剂中出现少量沉淀，此时宜平衡至室温，并尽量溶解。如仍有残留的不溶物，可以离心去除后使用，经测试不会影响后续的检测效果。
4. 请使用适合于细胞培养的白色或黑色的 96 孔板或 384 孔板。如果使用普通透明的 96 孔板或 384 孔板，相邻孔之间会产生相互干扰。
5. Renilla Luciferase Substrate (100×)配制在含有高浓度乙醇的溶液中。由于乙醇容易挥发，有时会在初次使用时发现体积明显小于所标示的包装体积 100 μl 或 1 ml 的情况，此时用无水乙醇把体积补足至 100 μl 或 1 ml，并混匀后即可使用。
6. 海肾萤光素酶工作液配制宜配制后立即使用。如不能立即使用，-20℃可以保存一周。随着保存时间的延长检测效果会不断下降，因此不可配制成工作液后长期保存。
7. 96 孔板中，通常本产品在 20 万个细胞范围内呈现良好的线性关系，但实际检测中因细胞种类、转染效率、表达水平等导致检测的细胞上限有所差异。
8. 待测药物的溶剂含量较高时可能会干扰萤光素酶反应，从而影响化学发光信号。可以通过设置含有溶剂的细胞培养液对照孔排除溶剂的干扰。经测试，最终反应体系中 DMSO 含量在 2%以内不会对反应产生影响。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。