



版本号：DE250707

## Firefly Luciferase Reporter Gene Assay Kit

### 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒

产品编号：MH1071

#### 产品内容：

产品货号	产品组成	MH1071 (100 T)
MH1071-1	Cell Lysis Buffer	60 mL
MH1071-2	Luciferase Reaction Buffer	10 mL
MH1071-3	Luciferase Substrate (Lyophilized)	1 vial

**运输及储存条件：**蓝冰运输；未使用前整盒可-20℃避光储存一年有效，长期储存建议-80℃。

**Cell Lysis Buffer** 可分装成小份于-20℃条件下可至少储存1年，避免反复冻融。

首次使用时将 **Luciferase Reaction Buffer** 全部倒入装有 **Luciferase Substrate (Lyophilized)** 的棕色瓶，混合后得到**萤火虫荧光素酶检测工作液**。应按每次使用量分装成小份，并于**-80℃避光**条件下储存，避免反复冻融。



## 产品介绍:

本产品为闪光型 (Flash) 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒, 可以高灵敏度的检测萤火虫荧光素酶在动物细胞、烟草叶片或植物原生质体中的表达。

萤火虫荧光素酶报告基因检测系统 (Firefly Luciferase Reporter Gene Assay) 是一种以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶活性的报告系统。萤火虫荧光素酶是一种 61 kDa 的单体蛋白, 不需要翻译后修饰过程, 蛋白翻译后立即发挥报告基因的作用。只有荧光素、氧气、ATP 和  $Mg^{2+}$  同时存在时, 萤火虫荧光素酶可以催化 luciferin 氧化成 oxyluciferin, 在 luciferin 氧化的过程中, 会发出波长为 560 nm 左右的生物荧光 (bioluminescence)。萤火虫荧光素酶报告基因检测非常灵敏, 它的发光效率是所有化学发光反应中最高的, 并且在宿主细胞或分析化学中没有发现背景发光。反应快速, 每个样品只需要几秒钟即可完成<sup>[1-5]</sup>。

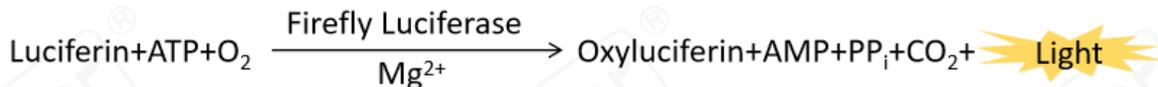


图 1 萤火虫荧光素酶检测原理图

## 产品特点:

1. 发光强度高: 优于国内外同类产品。
2. 稳定性好: 萤火虫荧光素酶检测工作液反复冻融 5 次对检测效果基本无影响。
3. 操作简便, 读数稳定, 检测速度快: 检测过程中, 发光信号值在反应 10 min 后仍能保持 80% 以上的信号强度。

## 注意事项:

1. 需在正确的温度及避光条件下储存各种试剂 (详见第 1 页)。为取得最佳实验效果, 建议将各试剂分装后保存, 避免反复冻融。
2. 如果体系中荧光素酶表达量较低, 可适当减少裂解液用量以提高蛋白浓度, 同时应增加检测复孔的数量, 以减小低浓度表达造成的孔间差异, 确保结果的可靠性。
3. 为保证实验数据准确可靠, 建议测量大量样品时使用排枪添加萤火虫荧光素酶检测工作液, 使用过程中务必留意排枪各孔吸取的液体是否一致。
4. 为取得最佳测定效果, 在用单管的化学发光仪测定时, 不同样品和测定试剂混合后到上机检测的时间应尽量控制在相同的时间内, 例如 30 秒内; 使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时, 宜先把细胞裂解液全部加好, 然后统一加入萤火虫荧光素酶检测工作液。测定时间根据荧光值的强弱可设定在 1 - 10 sec 区间内, 增加检测时长会同时增加样本和本底的荧光读值。



5. 酶促反应对温度比较敏感，检测前细胞裂解样品和检测试剂均需达到室温（20-25℃）后再进行测定。短暂置于室温下，检测试剂活性不会受到影响。
6. 使用 Luminometer 发光计、带有化学发光检测功能的多功能酶标仪或者其他能够检测生物发光的仪器都适用于本试剂盒的检测。推荐使用**白色不透明的 96 孔板**。针对相同的样本，不同仪器的本底信号值和测量值均可能不同，不同仪器测定的发光值不可横向比较。
7. 检测时，为了保证底物过量反应使得发光值与酶活成正比，反应孔中细胞裂解液与萤火虫荧光素酶检测工作液的比例为 1:5 最佳。底物的量可以调整，但要保证底物是足量的。
8. 本产品仅供科研使用！

## 实验方案：（在开始操作前请先阅读注意事项）

### 一、试剂准备

1. **Cell Lysis Buffer**: 即用型溶液，建议首次使用时将其分装成小份于-20℃保存。每次使用前将 Cell Lysis Buffer 完全融化，混匀后使用，使用时可置于冰上暂存。
2. **萤火虫荧光素酶检测工作液**: 首次使用前，请将 Luciferase Reaction Buffer 全部倒入含有冻干底物的 Luciferase Substrate (Lyophilized)棕色避光瓶中，盖上瓶盖后适当颠倒混匀。分装成单次使用的小份后于-20℃避光保存，避免反复冻融。每次使用前将萤火虫荧光素酶检测工作液室温完全融化后置于冰上暂存，检测前需将试剂置于室温下，使其温度达到室温（20-25℃），操作过程中适当**避光**操作。

### 二、样品前处理

#### 1. 动物细胞

- (1) 细胞裂解：将 Cell Lysis Buffer 充分混匀，按如下方式加入细胞裂解液充分裂解细胞。
- a. 对于贴壁细胞：弃除细胞培养基，用 1×PBS 小心洗涤两次，尽量弃干净 PBS。参考下表比例加入 Cell Lysis Buffer，轻轻旋转培养皿或者培养板使裂解液完全覆盖细胞。
  - b. 对于悬浮细胞：离心去上清后，参考下表比例加入 Cell Lysis Buffer。

细胞培养板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
Cell Lysis Buffer (μL/孔)	20	65	100	250	500

(2) 室温充分裂解 5 min。4℃，12,000×g，离心 2 min。

#### 2. 植物叶片（以烟草叶片为例）

- (1) 取待检测的烟草叶片，用打孔器在选定区域取 3-4 片直径为 6-8 mm 的烟草叶盘，放入 2 mL 的 EP 管中（提前加入 2-3 个研磨用小钢珠），立即投入液氮中速冻。取出后使用破碎



仪进行研磨破碎；或者将取好的烟草叶盘放入 2 mL 的 EP 管中，液氮速冻后，用液氮预冷过的一次性塑料研磨杵在离心管内快速研磨成粉末；也可以将取好的烟草叶盘放入研钵中，用研磨杵研磨成粉末后转移至 2 mL 的 EP 管中。

(2) 向破碎后的样品中加入 100  $\mu\text{L}$  的 Cell Lysis Buffer (每 3-4 片叶片加入 100  $\mu\text{L}$  裂解液)。涡旋或吹打混匀后，室温充分裂解 5 min。

(3) 4°C, 12,000 $\times$ g, 离心 10 min, 取上清待检测。

### 3. 植物原生质体

(1) 将细胞培养板中过夜培养 (12-16 h) 的原生质体转移至 2 mL 离心管中，按照相应原生质体的离心力及时间进行离心，吸弃上清。

(2) 加入 20-100  $\mu\text{L}$  的 Cell Lysis Buffer, 吹打混匀, 室温充分裂解 5 min。

(3) 4°C, 12,000 $\times$ g, 离心 10 min, 取上清待检测。

### 三、发光检测

(1) 按仪器操作说明书提前开启化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪，根据仪器设备的要求并根据实验需要设置适当的间隔时间和测定时间。可以将测定间隔设为 2 s, 测定时间设为 1-10 s。不需要选择某一波长检测，全波长下接收光信号。

(2) 取 20  $\mu\text{L}$  细胞裂解后上清至检测管或酶标板孔中，可按照实验需求设置 3-5 孔重复。

注：细胞裂解后的上清可以立即测定荧光素酶活性，也可以于 -80°C 保存半年，-20°C 保存一个月。冻存样品需完全融解，并达到室温后再进行测定，避免反复冻融。

(3) 加入 100  $\mu\text{L}$  平衡至室温的萤火虫荧光素酶检测工作液，用枪吹打混匀或其它方式迅速混匀后，立即置于 luminometer 或酶标仪中检测萤火虫荧光素酶活性，测得的荧光值即为 FLUC 值。

### 参考文献

- [1] Wood K V, Wet J R D, Dewji N, et al. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1984, 124(2): 592-596. DOI:10.1016/0006-291X (84)91595-X.
- [2] De Wet J R, Wood K V, Helinski D R, et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli. [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 82(23): 7870-7873. DOI:10.1073/pnas.82.23.7865.
- [3] Dewet J R, Wood K V, Deluca M, et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. [J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(2): 725-737. DOI:10.1128/MCB.7.2.725.
- [4] Ow D W, Wet J R D, Helinski D R, et al. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants[J]. Science, 1986, 234(4778): 856-859. DOI:10.1126/science.234.4778.856.
- [5] Dewet J R, Wood K V, Deluca M, et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. [J]. Mol.cell.biol, 1987, 7(2):725-737.DOI:10.1128/MCB.7.2.725.