产品说明书

Rhinogen® Bio-Turbo™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒

Rhinogen® Bio-Turbo™ One-Step Firefly Luciferase Assay Kit

适用于 ADCC、ADCP 活性的常规检测及批签发检测指标、小分子化合物、重组蛋白药物活性的常规检测

产品仅用于科学研究，不得用于临床诊断和治疗。

RA-STP-QC-06024 00

RHINO BIO
瑞安生物科技

目　录

目　录 **1**
试剂包装与保藏条件 **2**
试剂包装 2
保藏条件 2
产品综述 **3**
背景 3
概述 3
特性 4
操作方法 **5**
操作简介 5
底物试剂准备 5
加入荧光素酶底物试剂检测光信号 6
数据分析 6
操作说明 6
常见问题 **7**
检测没有信号或者信号强度低 7
产品文档及支持 **7**
产品文档 7
联系我们 7
参考文献 **8**
相关产品 **8**

试剂包装与保藏条件

试剂包装

该规格试剂盒含有足够进行 660 次测定（96 孔板：75μl /孔）的试剂：

名称	货号	规格
Bio-Turbo™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒	RA-GL03	50ml
试剂盒组分：		
• Bio-Turbo™ One-Step 荧光素酶反应缓冲液		50ml
• Bio-Turbo™ One-Step 荧光素酶反应底物（冻干粉）		1vial

保藏条件

采用干冰运输。收到试剂盒后，请立即将其置于-70℃冻存。反应底物溶解于反应缓冲液后混合均匀，务必按照单次单块板的使用量（8ml）分装，冻存于-70℃，保存时间可长达 6 个月。严禁融化后再次冻存使用。

产品综述

背景

报告基因检测是基因表达调节研究的重要手段，目前已被广泛应用于分子生物学及细胞生物学研究领域。报告基因检测法是一种将转录调控和报告基因（如荧光素酶）偶联表达，通过报告基因表达产物（如荧光素酶）活性的测定判断细胞刺激物（如小分子化合物、重组蛋白）生物学活性的方法。《中国药典》2015 年版已将报告基因检测方法列为干扰素活性测定法第二法（通则 3523）。目前在生物制品 PD1/PD-L1、IL6/IL6R 等相关单抗药物的生物学活性检测和 Fc 效应功能研究中，报告基因检测法已经起到了至关重要的作用。以往只能采用体内动物学活性研究的细胞因子如 EPO、GH、FSH、TSH 等，也在逐步采取体外报告基因检测法替代原有的动物体内法作为产品批放行的关键指标。

概述

萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）是一种分子量为 61kDa 的蛋白，因其在宿主细胞中无背景萤光，同时无需翻译后修饰，是报告基因的理想选择。Bio-Turbo™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒为针对萤火虫荧光素酶开发的一款快速、稳定的一步法检测试剂盒，是 Bio-Turbo™ 的升级产品，具有超高的检测灵敏度，主要开发用于 ADCC 或 ADCP 活性检测体系以及对灵敏度有特殊要求的其他检测项目。本试剂盒以 D-荧光素（D-luciferin）为底物，在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下，可以被萤火虫荧光素酶催化进行氧化脱羧反应，产生激活态的氧化荧光素（Oxyluciferin），并产生生物萤光（Bioluminescence）（图 1）。生物萤光与与荧光素酶的启动子活性成比例，间接反映了细胞刺激物的生物学活性。

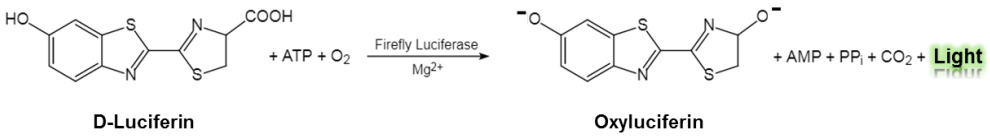

图 1. 萤火虫荧光素酶底物的发光原理

本试剂盒具有超高的检测灵敏度及超强的光输出，ADCC活性检测效果及与某知名大公司产品的检测效果对比如图2所示，可以检测最低10^{-20}mol的荧光素酶，在10^{-20}至10^{-14}mol的酶浓度范围内呈很好的线性关系。信号半衰期通常都超过10min。

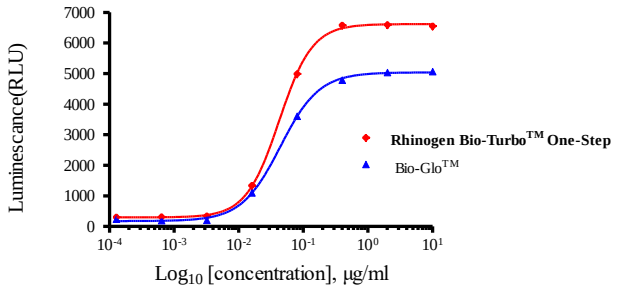

图 2. Bio-Turbo™ One-Step和某公司竞争产品对相同样品的检测效果。

注意：实际读数会因细胞数量、转染效果、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

特性

Bio-Turbo™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒具有操作简便、灵敏度超高等特点。

- ✓ **快速：**荧光素酶检测 10-15min 内完成；
- ✓ **方便：**将冻干粉底物与缓冲液简单混合即可使用，样品检测步骤简单；
- ✓ **高灵敏度：**能够检测最低 10^{-20}mol 的荧光素酶；
- ✓ **超高发光强度：**更强的光输出，产生比其它荧光素酶检测试剂高至 10 倍的光强度。

Bio-Turbo™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒超高的发光强度主要适用于 ADCC、ADCP 活性的常规检测及批签发检测指标。是抗体筛选、抗体糖基化修饰等研究的有效手段。同时，在对检测灵敏度有更高要求时，该试剂盒也可用于小分子化合物、重组蛋白药物活性的常规检测，如用于 IFN、EPO、FSH、TSH、GH、GLP-1、PTH 等药用蛋白的生物学活性检测。

我们也提供一系列 ADCC、ADCP 效应细胞株，详情请咨询 techserv@rhinobio.com，或者登陆公司官网 www.rhinobio.com 查询。

操作方法

操作简介

Bio-Turbo™ One-Step 荧光素酶测定试剂盒适用于 ADCC、ADCP Reporter Bioassay 中表达的萤火虫荧光素酶的检测，试剂盒使用操作流程如图 3 所示。

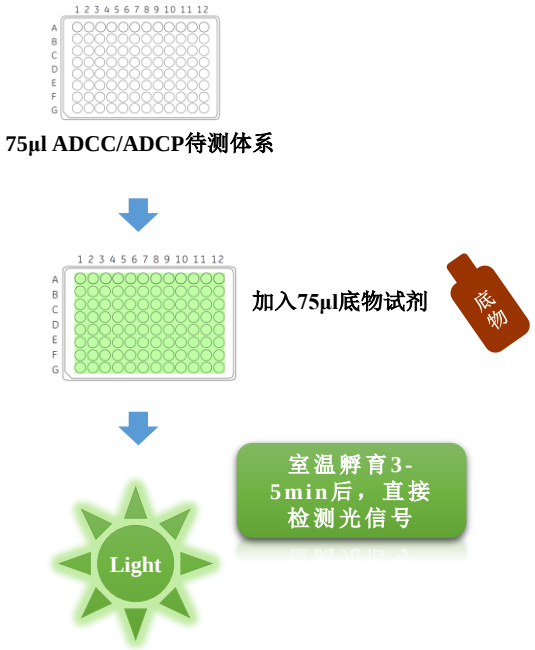

图 3. Bio-Turbo™ One-Step 荧光素酶检测流程图

底物试剂准备

在实验当天提前 4-6h 配制底物试剂，首先将荧光素酶反应缓冲液及荧光素酶反应底物取出解冻并平衡至室温。用移液枪取出少量荧光素酶反应缓冲液至装有荧光素酶反应底物的棕色西林瓶中，反复吹吸几次以溶解底物干粉。将溶解后的底物溶液转回至荧光素酶反应缓冲液的棕色试剂瓶中，重复上述步骤多次，确保底物完全转移至缓冲液中，轻柔颠倒混合，直至完全溶解，室温（22-25℃）避光保存，待用。

注意：1）配制好的底物试剂务必根据每次实验需要量进行分装，避光冻存于-70℃，保存时间可长达 6 个月，**避免再次冻融**；2）分装冻存的底物试剂使用前需在≤25℃条件下避光解冻并平衡至室温，颠倒混匀后使用，**检测剩余的底物试剂务必丢弃**。

加入荧光素酶底物试剂检测光信号

1. **平衡：**将待测细胞孔板从 37℃培养箱中取出，放置于室温（22-25℃），平衡至少 15min，若为多块板叠加，需平衡更长时间；
   注意：需使用与化学发光检测仪配套的孔板，如全白板。
2. **化学发光检测仪设置检测条件：**在孔板平衡期间，根据化学发光检测仪说明书设置合适的检测条件；
3. **加入底物试剂：**用排枪加入与待测体系相同体积的底物试剂至所有检测孔中（含阴性对照及背景孔），以 96 孔板为例，若检测体系为 75μl/孔，则加入 75μl/孔底物试剂，轻柔震荡混匀，避免产生气泡；
   注意：底物试剂必须平衡至室温后加入；
4. **室温孵育：**在环境温度（22-25℃）下孵育 2-5min；
5. **读数：**放入化学发光检测仪器中检测光信号。

数据分析

1. 计算背景值、样品测定数值及阴性对照值的平均值，根据结果分析数据；
2. 诱导倍数计算方法，诱导倍数（Fold of induction, FI）=（诱导孔数值–背景值）/（阴性对照孔数值–背景值）
   注意：计算诱导倍数时，如果样本数值高于背景值 100 倍以上，则不必减去背景值。

操作说明

- **适用细胞类型：**本试剂盒同时适用于悬浮细胞以及贴壁细胞的荧光素酶检测，检测中无需去除培养基；
- **适用培养基类型：**本试剂盒与 RPMI1640、DMEM/F12、MEMα 及 DMEM 高糖培养基（可含 0-10%血清）兼容；若使用其它培养基或血清浓度，建议进行实验验证；
- **实验设置：**对于多块孔板的检测，建议在每块孔板都带上相同的对照样品，以得到最准确的对比结果。同时每块板都建议设置背景孔（即以相同体积的培养基替代待检体系加入底物试剂进行检测），用于背景值的测定；
- **实验试剂：**同一批样品检测若需要多支同批或不同批分装冻存的底物试剂，建议先将试剂混匀后再行检测；
- **实验影响因素：**酚红、有机溶剂及检测温度等均可影响检测结果，酚红的存在会降低发光强度，建议细胞培养采用本公司提供的无酚红培养基，订购信息请见第 7 页相关产品部分内容；本试剂盒与 DMSO、异丙醇和乙醇兼容，其它有机溶剂对测定是否有影响应在使用前进行验证；所有的试剂及细胞均需要先平衡至室温后进行检测；
- **实验操作：**本试剂盒信号半衰期为 10min，因此务必在加入底物试剂室温孵育 2-5min 后进行荧光信号检测；

常见问题

检测没有信号或者信号强度低

出现这个问题的原因可能有以下几种：荧光素酶测定试剂的低活性或失效、荧光素酶低表达及荧光素酶发生了降解等，对应的解决办法或注意事项如下：

Bio-Turbo™ One-Step 荧光素酶测定试剂的低活性或失效：

1） 配制新的底物试剂，预留检测需要量后，其余务必按照单次单块板的使用量（8ml）分装，冻存于-70℃。

2） 使用分装冻存的底物试剂进行检测时，需在 25℃条件下避光解冻并平衡至室温，颠倒混匀后使用，检测剩余的底物试剂务必丢弃。

荧光素酶低表达：

1）用不同的启动子、效应细胞或者培养条件提高表达；

2）扩大每孔中样品和试剂的体积/浓度；

荧光素酶降解：

加入底物试剂室温孵育 2-5min 左右后，立即进行荧光读数；

化学发光检测仪器不灵敏：

选择对荧光素酶检测灵敏的检测仪器。

产品文档及支持

产品文档

我们的网站 http://www.rhinobio.com/kfjk.html 可为您提供最新的服务及支持，包括：

- 常见问题查询
- 购买指南
- 说明书下载
- 质检报告（COA）下载
- 化学品安全技术说明书（MSDS）下载

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电　　话：0512-87663137
- 技术支持：techserv@rhinobio.com
- 客户服务：sales@rhinobio.com

参考文献

1. De Wet, J.R. et al. (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 7, 725–37.
2. Tatsumi, H., *et al.* (1989). Luciferase cDNA from Japanese firefly, *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *Escherichia coli*. *J Biolumin Chemilumin* 3(2)**:**75-8.
3. Collin Goddard (1994). Cell based screening approaches: advantages of highly automated robotics technology in HTS. *Handbook for the 1994 International Forum on Advances in Screening Technologies and Data Management*, p.19.
4. Wood, K.V. (1990) Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. Promega Notes 28, 1–3.
5. Alam, J. and Cook, J.L. (1990) Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. Anal. Biochem. 188, 245–54.
6. Fraga, H. (2008). Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments. Photochemical & Photobiological Science, 7(2), 146-158.
7. Parekh, B.S. et al. (2012) Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicityreporter gene assay. mAbs 4, 310–8.
8. Cheng, Z.J. et al. (2012) Development of a bioluminescent cell-based bioassay to measure Fc receptor functionality in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting, poster # 2840.

相关产品

产品名称	货 号
Rhinogen® ADCC Reporter Bioassay, Core Kit	RA-CK01
Rhinogen® ADCC Reporter Bioassay, Complete (Raji)	RA-CK02
Rhinogen® ADCC Reporter Bioassay, Complete (WIL2-S)	RA-CK03
Rhinogen® ADCC Reporter Bioassay, Complete (BT474)	RA-CK04
Rhinogen® ADCC Reporter Bioassay, Complete (A431)	RA-CK05
Rhinogen® ADCP Reporter Bioassay	RA-CK09
Bio-Turbo™ 萤火虫荧光素酶分析试剂盒, 50ml	RA-GL02
Rhinogen® DMEM 高糖培养基, 无酚红, 500ml	RA-BM13
Rhinogen® DMEM/F12 培养基, 无酚红, 500ml	RA-BM12
Rhinogen® RPMI 1640 培养基, 无酚红, 500ml	RA-BM11
Rhinogen® ADCC Bioassay 细胞稳定剂, 1ml	RA-AD01
潮霉素 B (Hygromycin B) 50mg/ml, 1ml	RA-AD03
博来霉素 (Zeocin) 100mg/ml, 1ml	RA-AD05

苏州瑞安生物科技有限公司
苏州工业园区星湖街 218 号丨电话：0512-87663137丨传真：0512-62956239
寻求技术支持，请访问官方网站 www.rhinobio.com，或电邮 techserv@rhinobio.com.