Instructions

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

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

适用于各种萤火虫荧光素酶报告基因系统

货号：RA-GL05

产品仅用于科学研究，不得用于临床诊断和治疗。
RA-STP-QC-06057 01

damas life × Rhinogen®

目　录

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 3

操作方法 4

操作简介 4

底物试剂准备 4

加入荧光素酶底物试剂检测光信号 4

数据分析 5

操作说明 5

常见问题 6

相关产品 7

联系我们 8

参考文献 8

试剂包装与保藏条件

试剂包装

本试剂盒包装规格如下表：

名称	货号	规格
Bio-One™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒	RA-GL05	50ml
试剂盒组分：		
• Bio-One™ One-Step 荧光素酶反应缓冲液		50ml
• Bio-One™ 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，可在-30 ~ -15℃长期保存，混合后的试剂反复冻融 11 个循环仍可保持稳定。

混合前：

- Bio-One™ One-Step 荧光素酶反应缓冲液可在室温保存 90 天(> 90%活性)或在 2 ~ 8℃长期保存；

混合后：

- Bio-One™ One-Step 荧光素酶分析试剂可在室温保存 1 天(> 80%活性)或在 2 ~ 8℃保存 5 天(> 85%活性)。为保证试剂出色的使用性能，未使用完的试剂建议-70℃保存。

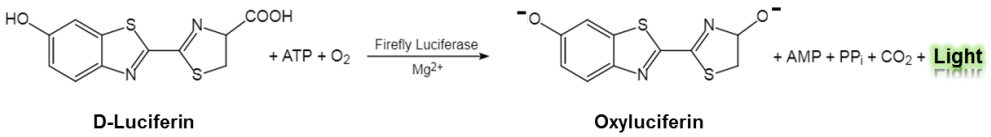
产品综述

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。转录调节与报告基因的表达相结合通常用于广泛的生理学研究，例如通过量化特定受体反应元件对基因表达的作用来分析受体功能，或者用来进行信号转导、转录因子、蛋白质与蛋白质相互作用和病毒感染和传播的研究，转录下游的事件，如 mRNA 加工和蛋白质折叠，也可以被分析。因此，荧光素酶被广泛应用于生物技术和制药行业。

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，检测快速、可靠和方便，是应用萤火虫荧光素酶报告基因系统检测的理想选择。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。



D-Luciferin　　Oxyluciferin

图 1. 萤火虫荧光素酶底物的发光原理

特性

Bio-One™ One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒具有操作简便、试剂稳定、一致性良好、灵敏度高等特点。

- ✓ **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；
- ✓ **快速：**荧光素酶检测 5-30min 内完成；
- ✓ **更亮更持久的光信号：**针对批处理和持续测量进行了优化，延长的强光输出时间有助于增加灵敏度，尤其是延长孵化时间的实验；
- ✓ **高灵敏度：**能够检测最低 10^{-20}mol 的荧光素酶；

操作方法

操作简介

试剂盒使用操作流程如图 2 所示。

图 2. Bio-One™ 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。将荧光素酶反应缓冲液倒入装有荧光素酶反应底物的棕色西林瓶中，确保缓冲液全部转移，轻柔颠倒混合，直至完全溶解，室温（22-25℃）避光保存，待用。

注意：使用剩余的试剂，再次使用前需在≤25℃条件下避光解冻并平衡至室温，颠倒混匀后使用。

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℃）下孵育至少 5min，建议在加入试剂 30min 内完成读数；
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、及 DMEM 高糖培养基兼容；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；
- **实验操作：**室温下（22℃）本产品的信号半衰期为 50 分钟；也可以使用其他培养基/血清组合，但建议在这些情况下对测定性能进行实验验证。发光信号也会受到温度变化或有机溶剂的影响。

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-One™ 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，未使用完的试剂建议于-70℃保存。 2） 使用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。
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 5min 后，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。

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-Glory™ 萤火虫荧光素酶分析试剂盒, 50ml	RA-GL04
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

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：+86 (0)21-60878333-8093
- 技术支持：bio@titansci.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.
9. Wood., K.V.（1991）In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status, Stanley, P., and Kricka,L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, NY 543.
10. Ow, D.W. et al. （1986） Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenicplants. Science 234, 856–9.
11. Bakhtiarova, A. et al. （2006） Resveratrol inhibits firefly luciferase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 351,481–4.