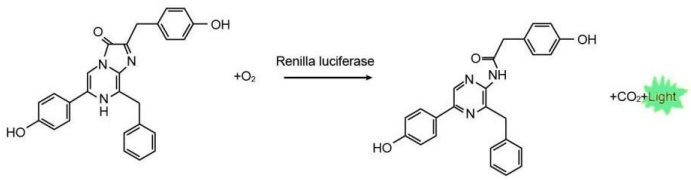
海肾荧光素酶检测试剂盒

货号: KTA8012　　规格：100 T/1000 T　　批号：见产品标签

	适用样本：细胞、原生质体、植物叶片
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

在氧气存在的条件下，海肾荧光素酶（Renilla luciferase）可以催化腔肠素（Coelenterazine）氧化成肠酰胺（Coelenteramide），在腔肠素氧化的过程中也会产生光信号。通过荧光素酶和其底物这一生物发光体系，可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。



通常把目的基因的转录调控元件或 5'-启动子区克隆在 Luciferase 的上游，或把 3'-UTR 区克隆在 Luciferase 的下游，构建成报告基因（Reporter gene）质粒，然后转染细胞，用适当药物等处理细胞后裂解细胞，通过检测荧光素酶活性的高低来判断药物处理等对目的基因的转录调控作用。该试剂盒具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广，无细胞内源活性干扰等特点。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	100 T	1000 T	
Lysis Buffer (5×)	10 mL	100 mL	-20℃
Renilla Luciferase Assay Buffer	10 mL	100 mL	4℃
Renilla Luciferase Substrate (100×)	100 μL	1 mL	-20℃，避光密封保存

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	发光检测仪或多功能酶标仪	/
耗材	细胞培养板、96 孔全黑酶标板	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）、去离子水	清洗、配液
其他	低温离心机、调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。
- 由于温度对酶反应有影响，所以测定时，样品和试剂均需达到室温后再进行检测。较高的温度会导致信号强度增加，但信号稳定性较低，因此建议操作环境温度不超过 25℃。
- 为取得最佳测定效果，在用单管的化学发光仪测定时，每个样品和测定试剂混合后到测定前的时间应尽量控制一致；使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时，宜先把样品全部加好，然后统一加入 Renilla Luciferase Solution。
- 检测时需使用全黑色的 96 孔板，防止相邻孔的干扰。
- 海肾荧光素酶催化的生物发光的最强波长为 480 nm。（检测时仪器不需要设置固定波长，直接选择化学发光检测全波长即可）

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Lysis Buffer	临用前配制，用去离子水将 Lysis Buffer (5×) 稀释 5 倍得到 Lysis Buffer。	-20℃条件下保存，使用时遵循现配现用、按需稀释。
Renilla Luciferase Solution	需现配现用，根据实际使用量，以 100:1 的比例将适量的 Renilla Luciferase Assay Buffer 和 Renilla Luciferase Substrate (100×) 混匀。	**Renilla Luciferase Substrate (100×) 使用前需瞬时离心至管底，小心量取管内溶液体积，该试剂易挥发，请注意密封保存。**

05-2 实验步骤

05-2-1 样本制备

(1)细胞：

a. 在合适的孔板上培养细胞后进行转染并用适当的方法处理细胞。

b. 将培养基移除，加 PBS 轻轻洗涤细胞 2 次（贴壁细胞进行此操作，悬浮细胞可直接离心收集细胞），吸弃 PBS，按如下方案加入 Lysis Buffer。

试剂	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
Lysis Buffer (μL)	100	150	200	300	500

注意：Lysis Buffer 使用前摇匀，如荧光素酶的表达水平较低，可适当减少 Lysis Buffer 用量，如 24 孔板每孔加入 100 μL，6 孔板每孔加入 200 μL。如果有白色细胞团可以用移液器吹散有利于加快裂解，注意尽量不要产生气泡，如不可避免最后也全部收集到 EP 管中；另外加入裂解液后冻融 1 次的细胞样本有利于促进细胞完全裂解。

c. 细胞置于摇床上震荡 5-15 min，充分裂解细胞。

d. 将细胞裂解产物 10000 rpm 离心 2 min，取上清用于检测。

(2)原生质体（仅供参考）：

a. 制备原生质体，并将相应的质粒转化原生质体。

b. 16-24 h 后离心收集 2×10^5 原生质体，加入 200 μL 的 Lysis Buffer。

c. 室温孵育 5-10 min，充分裂解原生质体。

d. 将原生质体裂解产物 10000 rpm 离心 2 min，取上清用于检测。

(3)植物叶片（仅供参考）：

a. 将含相应质粒的农杆菌注射植物叶片。

b. 注射后 2 天取约 1 cm^2 的叶片加入 500 μL Lysis Buffer，匀浆器研磨后 10000 rpm 离心 2 min，取上清用于检测。

注意：细胞裂解后可立即检测荧光素酶活性，也可以冻存，需要时再进行检测，冻存样品需融解至室温再进行检测。

05-2-2 实验检测

注意：使用前将 Renilla Luciferase Assay Buffer 水浴平衡至室温，临用前再加入底物制备成工作液；海肾信号半衰期 3 min 左右（不同样本略有差别，烟草样本半衰期略长），且受环境和仪器温度影响，建议在 20–25℃ 条件下检测，以获得最佳信号稳定性；检测前请提前设置好仪器参数并确认工作状态，由于信号衰减迅速，建议尽量在仪器旁快速操作，检测样本数量较多时，可分批加入工作液，并立即检测。

1. 小心吸取 20-50 μL 细胞裂解上清（如果样品量足够，请加入 50 μL，如果样品量不足可以适当减少用量，但同批样品的使用量应保持一致）至检测管或 96 孔全黑酶标板中，将 100 μL 平衡至室温的 Renilla Luciferase Solution 加入检测管或酶标板中，迅速混匀后，立即于发光检测仪或多功能酶标仪中检测 Renilla Luciferase 报告基因活性。

06 结果示例

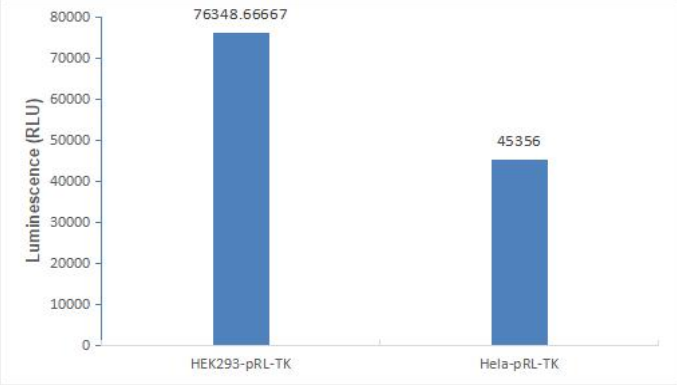


Figure 1.在 HEK293T 细胞与 HeLa 细胞中转染 pRL-TK 质粒后，使用多功能酶标仪检测海肾荧光素酶活性

07 FAQ

1. Luminometer 和荧光分光光度计有何不同?

荧光分光光度计检测的样品本身不能发光，样品需要由特定波长的激发光激发，然后才能产生荧光并被荧光分光光度计检测。Luminometer 检测的样品本身可以发光，不需要激发光进行激发。也就是说 luminometer 是检测化学发光(萤光)的仪器。有些型号的荧光分光光度计也具有 luminometer 的功能，即也可以检测化学发光。您所使用的荧光分光光度计能否用于化学发光的测定请仔细阅读该仪器的说明书。

2. 可以进行 ATP 化学发光检测的仪器是否就可以用于本试剂盒的检测?

是。ATP 化学发光的检测原理和本试剂盒的原理相同，可以用相同的仪器测定。

3. 该款试剂盒是辉光型还是闪光型的?

闪光型。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA8010	双荧光素酶报告基因检测试剂盒
KTA8011	萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒
BMC1041	发光法支原体检测试剂盒
PRP3004	荧光素酶
BMU111-CN	SuperKine™ Lipo3.0高效转染试剂
BMU106-CN	SuperKine™ 超敏型细胞增殖检测试剂（CCK-8）
KTA2030	EdU 法细胞增殖成像分析试剂盒（绿色荧光）
KTA2010	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA0006	Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒

海肾荧光素酶检测试剂盒

（Abbkine 货号 ： KTA8012）

一 样本处理

① 贴壁细胞

细胞培养

弃去培养基
PBS洗涤2次
按需加入Lysis Buffer

② 非贴壁细胞

细胞培养

300g离心收集细胞
PBS洗涤2次
按需加入Lysis Buffer

③ 原生质体

制备原生质体
转化相应质粒

收集2×10⁵原生质体，
加入200 μL Lysis Buffer
室温孵育5 min

④ 植物叶片

植物叶片注射
含相应质粒的
农杆菌

2天后取约1 cm²的叶片，
加入500 μL Lysis Buffer
匀浆器研磨

细胞置于摇床上
震荡5-15 min
充分裂解细胞

裂解产物10000 rpm离心2 min
取上清用于检测

裂解液配置：
Lysis Buffer：
用去离子水将Lysis Buffer (5×) 稀释5倍得到Lysis Buffer，摇匀后使用。

二 样本检测

①取20-50 μL细胞裂解上清至96孔酶标板中
②再加入100 μL平衡至室温的Renilla Luciferase Solution
③迅速混匀

立即于发光检测仪或多功能酶标仪中检测
Renilla Luciferase报告基因活性

工作液配置：
Renilla Luciferase Solution：
以100:1的比例将适量的Renilla Luciferase Assay Buffer和Renilla Luciferase Substrate (100×) 混匀。