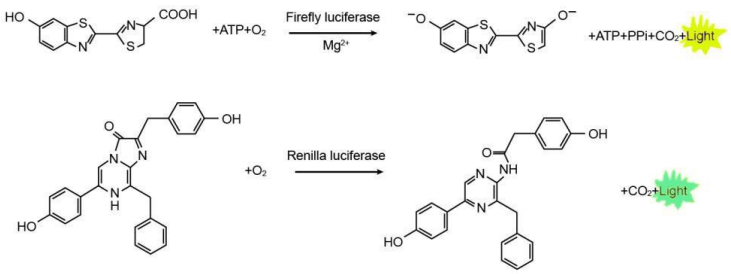
双荧光素酶报告基因检测试剂盒

货号: KTA8010　　规格：100 T/500 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 ATP、镁离子和氧气存在的条件下，萤火虫荧光素酶（Firefly luciferase）可以催化萤火虫荧光素（Luciferin）生成氧化荧光素（Oxyluciferin），在荧光素被氧化的过程中，会产生光信号。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）氧化成腔肠酰胺（Coelenteramide），在腔肠素氧化的过程中也会产生光信号。



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。海肾荧光素酶更多地被用作检测转染效率的内参，以消除细胞数量和转染效率的差异。双荧光素酶报告基因检测试剂盒先以萤火虫荧光素为底物检测萤火虫荧光素酶活性，然后加入抑制萤火虫荧光素酶催化的物质，同时加入腔肠素检测海肾荧光素酶活性，实现双荧光素酶报告基因检测。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		储存条件
	100 T	500 T	
Lysis Buffer (5×)	10 mL	50 mL	-20℃
Firefly Luciferase Assay Buffer	10 mL	50 mL	-20℃，避光保存
Firefly Luciferase Substrate	1 vial	1 vial	-20℃，避光保存
Renilla Luciferase Assay Buffer	10 mL	50 mL	4℃
Renilla Luciferase Substrate (50×)	200 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，离心机	全波长化学发光检测，温度设置在20-25℃
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）	清洗
其他	可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℃。
- 高活性的荧光素酶能够更快速地催化底物发光，产生大量的光信号。然而，这种快速反应往往会导致发光信号的半衰期缩短。
- 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 Firefly Luciferase Solution。
- 检测时需使用全黑色的 96 孔板，防止相邻孔的干扰。
- 萤火虫荧光素酶催化生物发光最强波长为 560 nm，海肾荧光素酶催化生物发光最强波长为 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）
- Renilla Luciferase Substrate 易挥发，注意密封低温保存。

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，内含不溶物，摇匀后使用，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。
Firefly Luciferase Solution	临用前配制，开盖前将粉末离心到管底，然后用 Firefly Luciferase Assay Buffer 溶解 Firefly Luciferase Substrate，将其全部加入 Firefly Luciferase Assay Buffer 瓶中，充分混匀后按需求分装，避光保存于-80℃。	**Firefly Luciferase Solution 冻融多次会影响信号，建议按单次使用量分装成小规格，-20℃避光保存，2 个月内有效，-80℃避光保存，12 个月内有效。（建议-80℃保存最佳）。**
Renilla Luciferase Solution	需现配现用，根据实际使用量，以 50:1 的比例将适量的 Renilla Luciferase Assay Buffer 和 Renilla Luciferase Substrate (50×) 混匀。	**Renilla Luciferase Substrate (50×) 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. 细胞样本

(1) 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。

(2) 将培养基移除，加 PBS 轻轻洗涤细胞 1-2 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。

(3) 细胞置于摇床上震荡 5-15 min，充分裂解细胞。

(4) 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）

(1) 制备原生质体，并将相应的质粒转化原生质体。

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

(3) 室温孵育 5-10 min，充分裂解原生质体。

(4) 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）

(1) 将含相应质粒的农杆菌注射植物叶片。

(2) 注射 2 天后取约 1 cm^2 的叶片加入 500 μL 裂解液，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：检测前将 Firefly Luciferase Solution 从-80℃取出，室温水浴避光解冻，Firefly Luciferase Solution 不耐热，不建议加热解冻或解冻后长时间不用。Renilla Luciferase Assay Buffer 也水浴平衡至室温，检测前再加入底物制备成工作液。

(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。**避光进行后续实验操作。**

(2) 将 100 μL 平衡至室温的 Firefly 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 Firefly Luciferase 报告基因活性。

注意：通常细胞样本，萤火虫信号半衰期约 30-40 min；海肾信号半衰期 3 min 左右；萤火虫淬灭率 99%以上。另外环境和仪器温度也会影响半衰期，为了获得最佳的荧光信号和半衰期，建议检测在 20-25℃进行。

(3) **设置好仪器参数及确认仪器状态正常运行，在仪器旁边操作**：在以上反应液中加入 100 μL 新鲜配制的 Renilla Luciferase Solution（**操作快速**），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。

注意：特别注意，海肾信号衰减很快，加入海肾工作液前先设置好仪器参数及确认工作状态，并在仪器旁边快速加入海肾工作液以确保加入后最短时间内进行检测。如果检测样本数量较多，可以分批加入分批检测。

06 结果示例

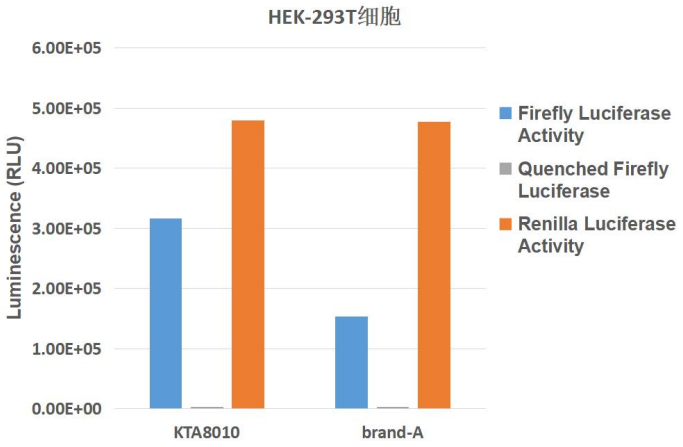


Figure 1.用 HEK-293T 细胞瞬转 pNF-κB-Luc 和 pRL-TK 质粒 24h，分别用 KTA8010 和其它厂家 Brand-A 的双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行检测的结果。

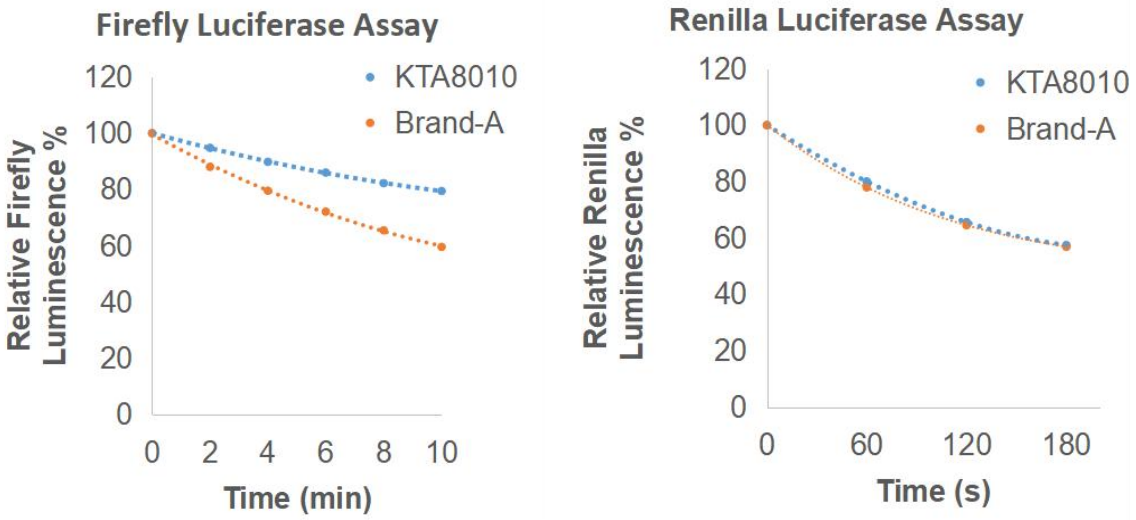


Figure 2.用 HEK-293T 细胞瞬转 pNF-κB-Luc 和 pRL-TK 质粒 24h，分别用 KTA8010 和其它厂家 Brand-A 检测萤火虫信号（左）和海肾信号（右）的稳定性。

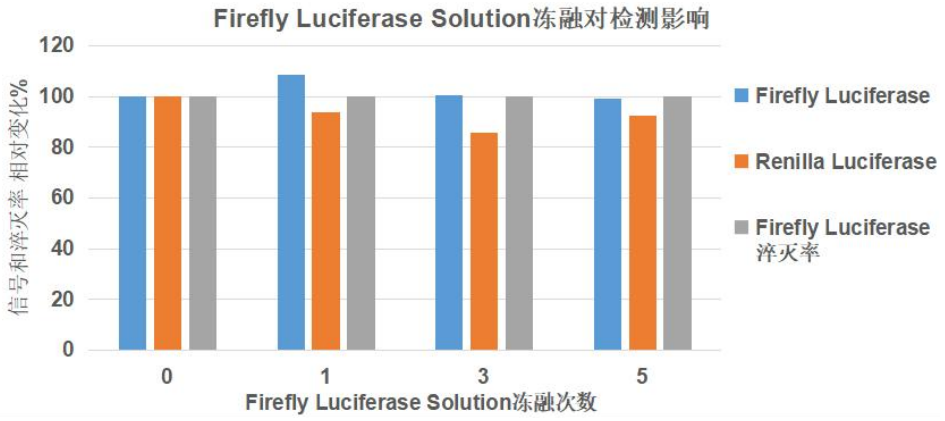


Figure 3.将配好的 Firefly Luciferase Solution 分装，室温水浴解冻及-80℃反复冻融多次，检测萤火虫信号、海肾信号和萤火虫淬灭率的影响。

07 FAQ

1．加完萤火虫荧光试剂检测到值之后，海肾荧光素酶检测试剂加入到萤火虫检测试剂的孔里吗？还是将海肾荧光素酶检测试剂加入新的只加细胞裂解液的孔里呢？

在同一个孔内检测，即先检测萤火虫荧光素酶活性，后检测海肾荧光素酶活性。

2．该试剂盒是闪光型还是辉光型？

是闪光型，信号高，半衰期短。

3．海肾荧光素酶检测底物的作用是什么？

该底物的作用不但抑制萤火虫荧光素酶活性，还能检测海肾荧光素酶活性。

4．样品裂解后，加入 96 孔板中的步骤，需要在冰上操作吗？

不需要在冰上操作的，建议常温操作即可。

5．细胞裂解之后的裂解液能否在-80℃保存？

可保存在-80℃，基本与蛋白的保存方法类似。裂解后的样本可在 -80 ℃保存半年，-20 ℃保存一个月。

6．双荧光素酶报告基因检测试剂盒中的两个底物是否需要避光？

这两个底物操作过程不需要严格避光。保存时需避光，更重要的保存条件是低温，尤其是萤火虫工作液推荐-80℃分装保存。

7．双荧光素酶报告基因载体共转染时比例该如何进行优化与调整？

根据具体实验情况进行调整。建议做预实验：如海参载体与萤火虫载体比例分别用 1:10、1:20、1:50、1:100。萤火虫荧光素酶检测发光值大于海参荧光素酶发光值的比例比较好。

8．海肾和萤火虫是在同一个孔里面检测吗？萤火虫的萤光不会影响海肾的萤光吗？能否分开检测呢？

同一个孔里检测。不会相互影响，我们的海肾荧光素酶底物中有淬灭萤火虫荧光值的物质。可以分开检测，但是在一个孔里检测会更加准确。

9．如果贴壁细胞非常容易飘起来，可以不用 PBS 清洗，弃掉上清直接加入细胞裂解液裂解吗？

可以。

10．如果只想测海肾荧光素水平，裂解后能不能跳过荧光素酶的步骤直接加海肾荧光素酶工作液？

不可以。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
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**

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

（Abbkine 货号：KTA8010）

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Firefly 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
Firefly Luciferase报告基因活性

①取96孔板，再加入100 μL平衡至室温的
Renilla Luciferase Solution
② 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：
Firefly Luciferase Solution：
用Firefly Luciferase Assay Buffer溶解Firefly Luciferase Substrate，然后将其全部加入Firefly Luciferase Assay Buffer瓶中，充分混匀。

Renilla Luciferase Solution：
以50:1的比例将适量的Renilla Luciferase Assay Buffer和Renilla Luciferase Substrate (50×) 混匀。