

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F072

产品规格: 48T/96T

检测仪器: 化学发光检测仪

## **Elabscience®萤火虫荧光素酶报告基因化学发光法 测试盒 (闪光型)**

### **Firefly Luciferase Reporter Gene Luminescence Assay Kit (Flash Type)**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于萤火虫荧光素酶低表达水平样本检测。

## 检测原理

萤火虫荧光素酶报告基因检测是指以荧光素(Luciferin)为底物来检测萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)活性的一种报告系统。

本测试盒的检测原理为在氧气、ATP 和镁离子同时存在的条件下，萤火虫荧光素被样本中的萤火虫荧光素酶催化氧化生成氧化荧光素并发出黄绿色的光，通过化学发光仪器就可检测样本中萤火虫荧光素酶的表达量。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	裂解液 (Lysis Buffer)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色透底酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

仪器：化学发光检测仪或多功能酶标仪（具有检测化学发光的功能）

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温（25°C）。

② 工作液的配制：

取一支试剂三，加入3 mL试剂二溶解，未用完的溶液，分装后-20°C避光可保存一个月。

## 样本准备

### 样本处理

① 接种细胞后，可按照以下组别进行细胞组设计：

空白组：未转染细胞。

对照组：质粒转染样本，未加药物刺激。

实验组：质粒转染样本后，并根据实验设计需要，加入药物刺激。

② 细胞裂解：

贴壁细胞：参考下表加入相应体积试剂一，静置10 min，同时每5 min振荡一次让细胞充分裂解待测。

悬浮细胞：500 × g离心3 min，弃去培养基，参考下表加入相应体积试剂一，静置10 min，同时每5 min混匀一次让细胞充分裂解，4°C，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测。

细胞培养板	96孔板	24孔板	12孔板	6孔板
试剂一加入量(μL)	100	200	300	500

## 实验关键点

① 避免工作液反复冻融，可分装后-20°C避光保存。

② 一次性检测孔需控制在10个以下。

## 操作步骤

- ① 测定孔：取 20  $\mu\text{L}$  待测样本，加入到相应的酶标孔中。
- ② 加入 100  $\mu\text{L}$  工作液，振板 2-3s，在化学发光仪上检测发光值。

## 操作表

	测定孔
待测样本( $\mu\text{L}$ )	20
工作液( $\mu\text{L}$ )	100
振板 2-3s，在化学发光检测仪上检测发光值 F	

## 结果计算

实验组 = 实验组 F - 空白组 F

对照组 = 对照组 F - 空白组 F

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

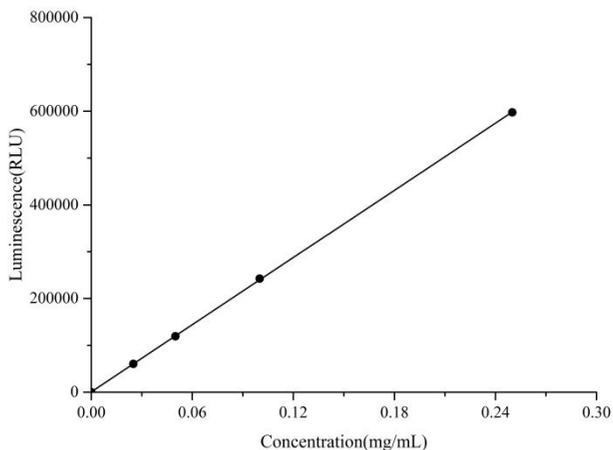
批间差	5.3-6.8 %	批内差	2.3-4.5 %
-----	-----------	-----	-----------

### 2. 萤火虫荧光素酶反应曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度萤火虫荧光素酶加样量20  $\mu\text{L}$ ，按照操作步骤进行实验，化学发光值如下表所示：

荧光素酶浓度 (mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.5
化学发光值	67	61286	114251	231454	563113
	89	59434	124583	253566	632215
平均发光值	78	60360	119417	242510	597664
绝对发光值	0	60282	119339	242432	597586

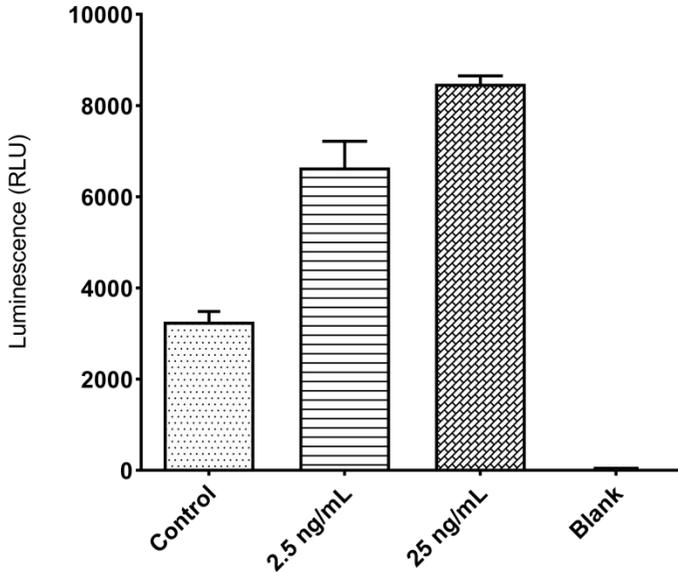
② 绘制曲线(如下图)：



## 附录2 实例分析

例如检测肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )诱导刺激对萤火虫荧光素酶NF-KB 反应元件质粒表达的影响:

24孔板接种293T细胞, 每孔约 $5 \times 10^4$ 个, 培养过夜。加入含pNF-KB-luc质粒的转染试剂, 观察细胞状态良好后, 培养24 h。加入不同浓度TNF- $\alpha$ 刺激诱导5 h。参考说明书操作步骤检测化学发光值, 结果如下图:



## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

