

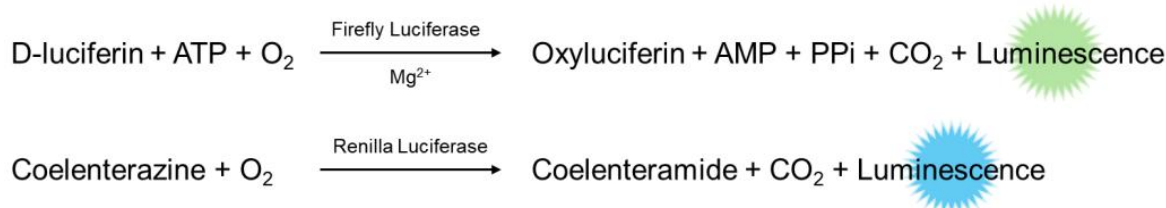
货号	名称	规格	存储
W450-100T	双荧光素酶报告基因试剂盒 (Firefly/Renilla 闪光型)	100T	-20℃
W450-1000T	双荧光素酶报告基因试剂盒 (Firefly/Renilla 闪光型)	1000T	

产品简介

报告基因体系常用于真核生物基因表达、细胞生理相关研究，可开展受体活性、转录因子、信号通路、mRNA加工及蛋白折叠等方向实验。采用双报告基因检测模式，可在同一体系同步检测两种独立报告基因，大幅提升实验精准度。实验组报告基因反映实验条件影响，海肾荧光素酶作为内参用于基线校正。将两组数据归一化处理，可消除转染效率、细胞活性、取样操作、裂解程度及仪器检测带来的误差，减少外界干扰，保证实验数据准确可信。

沃博生物的双荧光素酶报告基因试剂盒 (Firefly/Renilla 闪光型)，可在同一样品中先后检测萤火虫与海肾荧光素酶活性，检测时自动淬灭萤火虫荧光信号，操作简便、检测灵敏高效。实验可将启动子、转录调控元件或 3'-UTR 序列构建至萤火虫荧光素酶载体，与海肾内参质粒共转染细胞，经药物处理后裂解细胞检测荧光活性，以此判定受试物质对目的基因的转录调控效果，内参可有效校正实验误差。萤火虫荧光素酶最大发射波长 560nm，海肾荧光素酶为 465nm，常规实验选用全波段检测即可，无需单独设置波长参数。

反应原理如下：



产品组成

组分编号	组分名称	储存	产品规格	
			100T	1000T
W501-A	Cell Lysis Buffer (5x)	-20℃避光	10mL	30mL
W501-B	Firefly Luciferase Reaction Buffer	-20℃避光	10mL	100mL
W501-C	Firefly Luciferase Substrate	-20℃避光	1bottle	1bottle
W501-D	Stop & Renilla Reaction Buffer	-20℃避光	10mL	100mL
W501-E	Renilla Luciferase Substrate (100x)	-20℃避光	100μL	1mL

存储及有效期

低温运输。全新未开封试剂盒-20℃避光密封保存，有效期 12 个月；溶解分装后的 Firefly Luciferase Substrate 于-80℃避光保存一年，或-20℃短期保存不超过一个月。

本产品仅限科研。

使用方法

一、所需自备实验耗材

无菌 PBS 缓冲液、移液枪 / 多道移液枪、黑色不透光酶标板、化学发光检测仪或多功能酶标仪；如需大批量样本检测，可搭配自动进样器使用。

二、实验前期准备工作

- 1) 试剂盒初次启用时，将 Firefly Luciferase Reaction Buffer 全部加入 Firefly Luciferase Substrate 瓶内，充分涡旋混匀至完全溶解，依据单次实验用量分装，置于 -80℃ 避光保存，严禁反复冻融。
- 2) 实验临用前，将 Cell Lysis Buffer(5x) 与超纯水按照 1:4 体积比例稀释混匀，配制完成后放置于冰面待用，稀释裂解液建议即配即用。
- 3) Renilla Luciferase Substrate(100x) 使用前置于冰上避光存放，按实验用量配比，将 Stop&Renilla Reaction Buffer 与 Renilla Luciferase Substrate 以 100:1 比例均匀混合，室温避光放置备用。该混合工作液建议现配现用，实验结束后剩余废液直接丢弃，不可留存再次使用。

三、操作方法

(1) 单管检测方法

1) 裂解细胞

- a. 贴壁细胞：吸去细胞培养基，用 PBS 缓慢轻柔地洗涤一次，洗去残留的培养基，然后将液体全部吸弃。悬浮细胞：离心去上清后，清洗细胞一次再次离心收集细胞沉淀。
- b. 按照下表推荐加入适量的 1×Cell Lysis Buffer，室温下静置或振动摇晃裂解 15min，吹打并吸取全部细胞裂解产物至 1.5mL 离心管中，16000g 离心 5min，取上清用于后续检测。

Cell Culture Plate	6-wel	12-wel	24-wel	48-wel	96-wel
1×Cell Lysis Buffer	500μL	200μL	100μL	50μL	20μL

注：若荧光素酶的表达水平过低，可适当减少细胞裂解液用量以提高蛋白浓度，但需保证裂解液体积可以覆盖细胞孔板底面否则会影响裂解效果。

2) Firefly Luciferase 反应检测

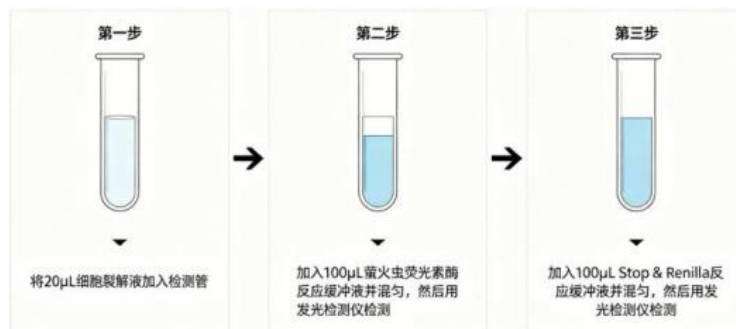
小心吸取 20μL 细胞裂解上清依次加入至检测管或酶标板中，再加入 100μL 平衡至室温的含有底物的 Firefly Luciferase Reaction Buffer，迅速混匀后立即于化学发光仪或酶标仪中检测 Firefly Luciferase 报告基因活性。

(注：务必将反应缓冲液恢复至室温，使酶促反应在最适温度 25℃ 进行。加样后，需要进行混匀，使酶促反应充分稳定进行。本品 Firefly 荧光稳定性可达 30s 以上。)

3) Renilla Luciferase 反应检测

在以上反应液中加入 100μL 现配制的 Renilla 检测工作液迅速混匀后立即于化学发光仪或酶标仪中检测 Renilla

Luciferase 报告基因活性。



(2)通过自动进样器进行高通量检测方法

1) 裂解细胞

a、贴壁细胞：用排枪吸去细胞培养基，PBS 缓慢轻柔地洗涤一次，洗去残留的培养基，然后将液体全部吸弃。悬浮细胞：参考单管检测细胞收集方法，不适合原位裂解。

b、以 96 孔板为例，用排枪每孔加入 20μL 1×Cell Lysis Buffer，室温下静置或振动摇晃裂解 15min。

2) 双酶反应检测

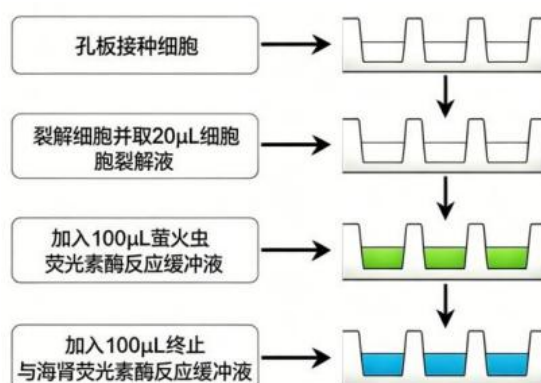
按照仪器说明书完成自动进样器的初始化操作，设定自动进样器 1 为溶解底物后的 Firefly Luciferase Reaction

Buffer；自动进样器 2 为加入底物的 Stop&Renilla Reaction Buffer。设置检测程序，通过自动进样器 1 加入 100μL

平衡至室温的含有底物的 Firefly Luciferase Reaction Buffer，振板 1-2s 混匀，检测 Firefly Luciferase 报告基因活

性。通过自动进样器 2 加入 100μL 的 Renilla 检测工作液，振板 1-2s 混匀，检测 Renilla Luciferase 报告基因活

性。以此程序完成 96 孔板的所有样品检测。（注：务必将反应缓冲液恢复至室温，使酶促反应在最适温度 25℃进行。加样后，需要进行振板混匀，使酶促反应充分稳定进行。本品 Firefly 荧光稳定性可达 30s 以上。）



注意事项：

1) 检测仪器：各类化学发光检测仪均可适用，同款样本在不同仪器测得数值不可对比；推荐使用黑色酶标板规避孔

间干扰。适配带自动进样器酶标仪，可降低操作误差，具体操作参照进样器说明书。

2) 低表达样本处理：荧光素酶低表达时，减少裂解液用量提升蛋白浓度，增加检测复孔数量，保障检测结果准确。

3) 温度要求：酶促反应受温度影响大，细胞裂解液与检测底物需提前平衡至室温再使用。

4) 试剂保存与复融：检测试剂分装后置于 - 80℃避光密封保存，严禁反复冻融、久放室温；使用前取分装试剂 25℃水浴复融，涡旋混匀后方可使用。

5) 发光检测时机：裂解液与萤火虫发光反应液混合后 30s 内发光值稳定。单管检测仪需统一样本混合后上机时长；多功能酶标仪先加裂解液，排枪统一加底物并快速上机检测。

6) 淬灭操作：加入终止海肾反应缓冲液可抑制 99.999% 以上萤火虫荧光素酶活性。单管仪加液后轻柔吹打混匀 2-3 次，禁止产生大量气泡；酶标仪可调高混匀幅度或延长 1-2s 振荡时间提升淬灭效果。

7) 高通量进样设置：自动进样酶标仪高通量检测时，添加萤火虫荧光素酶反应液选用低速，防止起泡；添加终止海肾反应缓冲液选用中速，促进混匀增强淬灭效果。

8) 海肾底物配制：100x 的海肾荧光素酶底物溶于无水乙醇，溶剂易挥发致体积不足 100μL 时，补加无水乙醇定容至 100μL，混匀即可使用。