

V 1.0.0

GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit

GMOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

产品信息:

产品编号	产品名称	规格
GM-040513A	GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit GMOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒	10 mL (100 次)
GM-040513B		10 × 10 mL (1000 次)
GM-040513C		100 mL (1000 次)
GM-040513D		10 × 100 mL (10000 次)

检测原理:

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 是一种分子量约为 61 kDa 的蛋白, 在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 能够催化荧光素 (luciferin) 氧化成 oxyluciferin, 在氧化的过程中会发出波长为 560 nm 左右的生物荧光。

检测原理如图所示:

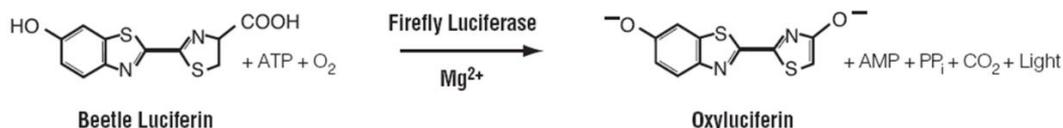


图 1: 萤火虫荧光素酶检测原理图

产品简介:

吉满的产品 GMOne-Step 2.0 荧光素酶报告基因检测试剂盒 (GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit, 简称 GMOne-Step 2.0) 的特点是操作非常简便, 且信号强度高。实验前无需对细胞进行清洗或收集, 将试剂直接加入培养基中即可, 对细胞的裂解和检测一步完成, 节省了实验时间。本试剂盒在信号强度与稳定性之间做到了相对平衡。即保持了相对较高的信号强度, 又在一定的时间内保持信号强度的相对稳定。使得实验结果准确可靠。半衰期通常可达 1h 以上。

本产品测定样品的线性范围非常宽。在 96 孔板中, 可以在 20 万个细胞范围内呈现良好的线性关系。本产品对转染萤火虫荧光素酶报告基因质粒的不同细胞量的 Raji 细胞 (Luc Raji cell line) 的检测效果如下图 2

Luc Raji cell line

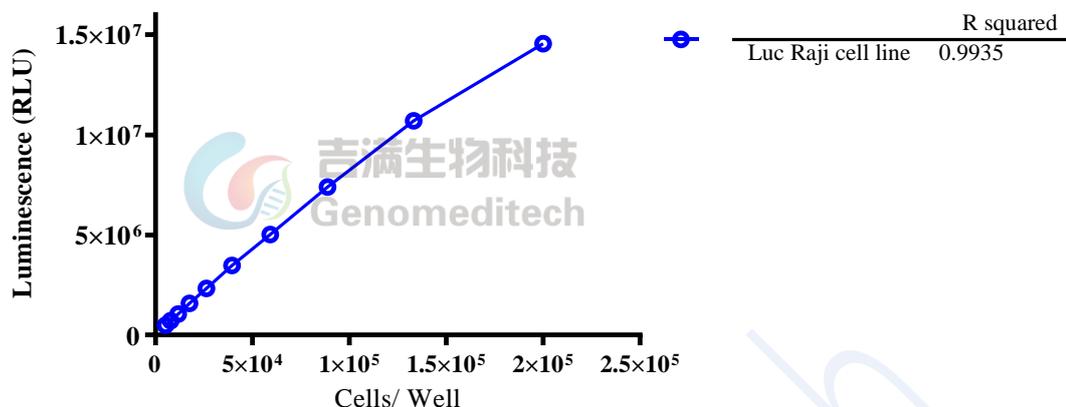


图2: 本产品对转染萤火虫荧光素酶报告基因质粒的不同细胞量的Luc Raji cell line细胞的检测效果。首孔细胞数量 $2E5$ (悬液), 按照1.5倍连续稀释, 10个梯度, 末孔细胞数量 $5.2E3$ 。每个梯度3复孔, 取均值。实际读数会因各种原因存在差异, 图中数据仅供参考。

运输和复温:

干冰运输。使用前完全恢复室温即可。

保存条件:

-80°C 避光保存, 未开封试剂有效期一年; 如果 -20°C 避光保存, 推荐 2 个星期以内使用。拆封后推荐分装 (避光)。不建议长时间放在室温。

实验准备:

1. 主要实验耗材与设备: 200 μL 移液器或者排枪; 不透光白色酶标板或黑色酶标板; 多功能酶标仪或者其他能够检测生物发光的仪器。
2. 反应温度: 酶促反应对温度较为敏感, 请将细胞培养板, 检测试剂, 酶标仪 (可在机器设定温度) 平衡至室温 (最好 $20-25^{\circ}\text{C}$) 时再使用; 检测试剂复温环境不能超过 25°C 。

注: 培养箱中取出培养板, 室温放置 20min 以平衡至室温。检测试剂解冻后要完全恢复到室温再使用。

3. 检测仪器设置: 以 Molecular Devices Spectra Max L 机器为例。PMT Setting (检测器参数设置): AutoRange ; Target Calibration Wavelength (校准波长): 570 nm (Firefly Luciferase)。选择 shake before Read。
4. 检测板: 为防止孔间干扰, 推荐使用不透光白色酶标板或者黑色酶标板; 如测量光度值较高, 为避免互相干扰, 也可隔孔上样。

5. 实验中请穿实验服并戴一次性手套。

实验步骤（以96孔板为例）：

1. 裂解细胞

- 1) 贴壁细胞：推荐汇合度在 90% 以上。不用吸除细胞培养基，通常加入与培养基同体积的混合试剂即可。
- 2) 悬浮细胞：只要细胞生长良好，一般无密度要求。其他同贴壁细胞。

推荐使用量

细胞培养皿	384 孔板	96 孔板
培养基体积	25 μ L	100 μ L
添加试剂体积	25 μ L	100 μ L

- a) 直接加入试剂后用枪头吹打 5 次，使细胞裂解更充分。等待 **5 min**，使细胞充分裂解。
- b) 枪头吹打时尽量不要有泡沫和气泡出现。

2. 上样

每孔吸取 100 μ L 混合液（检测试剂+细胞培养基）到检测板。

3. 荧光检测

设置酶标仪参数（参考 **实验准备 3**）。将检测板放入酶标仪。震动几秒。检测即可。

注意事项：

温度影响：温度直接影响荧光素酶的反应速率。而发光强度和半衰期取决于荧光素酶的反应速率。所以在加样前，应将需要将本试剂盒细胞培养板均平衡至室温，以保证检测结果的一致性。如将多孔板堆叠放置，将需要更长时间恢复到室温。如未充分平衡，可导致中心孔和四周孔之间的梯度效应。

FAQ:

1. 问：冻融对试剂盒的检测效果是否有影响？

答：经相关实验表明-70 $^{\circ}$ C反复冻融 5 次对发光值影响极其微小，且稳定性基本无变化。但为了获得相对较好的实验数据，不推荐多次冻融。

本试剂盒仅供科研使用！