

Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit

—稳定型萤火虫荧光素酶检测试剂盒，适用于高通量分析

Cat. No. LF016 (10ml, 75 μ l \times 120 reactions for 96-well plate; 20 μ l \times 480 reactions for 384-well plate)

Cat. No. LF017 (30ml, 75 μ l \times 360 reactions for 96-well plate; 20 μ l \times 1440 reactions for 384-well plate)

Cat. No. LF018 (100ml, 75 μ l \times 1200 reactions for 96-well plate; 20 μ l \times 4800 reactions for 384-well plate)

使用说明书

GeneCopoeia, Inc.

9620 Medical Center Drive, #101

Rockville, MD 20850

USA

301-762-0888

866-360-9531

inquiry@genecopoeia.com

www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司

地址：广州科学城揽月路3号F区F801（510663）

电话：4006-020-200、020-28069288、020-28069233

网站：www.igenebio.com

使用说明书

Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit

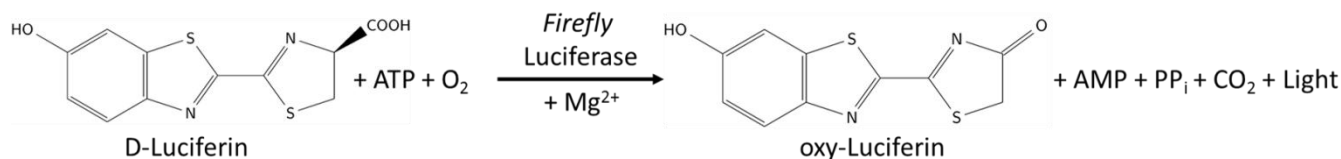
- I. 产品概述
- II. 产品信息及储存条件
- III. 准备细胞样品
- IV. FLuc 工作液的配制
- V. 荧光素酶检测流程
- VI. 有限使用许可及质保声明

I. 产品概述

对报告基因表达的转录调控的研究常被应用于生物学研究和药物发现。荧光素酶在基因表达研究中应用最为广泛，其主要包含以下几个优点：

- 1) 在广泛动态范围内具有高灵敏度
- 2) 在哺乳动物细胞内无荧光素酶、背景极低
- 3) 实验重复性好
- 4) 成本低
- 5) 操作简单

萤火虫荧光素酶作为报告基因被广泛使用，因其具有快捷、简便、灵敏度高的检测特点。萤火虫荧光素酶 (*Photinus pyralis*) 已被证实是检测启动子活性和监测基因转录后调控状态的理想报告基因。它是在细胞质中作用的酶，分子量为 61 kDa 并催化下列反应：



荧光素酶报告基因的测定需要用光度计或多功能微孔板检测仪，且发光强度与荧光素酶的数量成正比。

此体系可以在目的基因的附近监控顺式作用元件的转录激活。然而，它很难通过基因 3'UTR 调节来测定转录抑制效率，因为酶底物的活性非常低。在测定底物抑制物时，酶底物复合物的稳定性有更大的灵活性。由于生物学变异和其它原因的干扰，使观察到的荧光素

酶活性差异变小，所以在标准实验流程中通常会选择一个报告基因作为内对照，使另一个报告基因的检测均一化。标准实验流程也需要调整转染效率和细胞活性之间的差异。

The Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit 提供的试剂可直接用于培养基中的细胞，无需预处理或预裂解细胞，产生稳定的萤火虫荧光信号。本试剂盒经实验优化可用于包含 0~10%血清的多种培养基：DMEM, RPMI1640, EMEM, IMDM, McCoy's-5A, F-12K, MEM, ACL-4, L15, Cho-S-SFMII, NCTC109 等。

GeneCopoeia 的研发团队在 Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit 中添加了几种特殊试剂，使该产品的检测性能大大提高并有效简化实验步骤，其优点如下所示：

- **稳定性高** — 本产品对萤火虫荧光素酶产生的光信号很稳定，半衰期可达2小时（见图1），很适合用于高通量分析。
- **简便快速** — 本产品已经优化用于多种培养基（见图2），无需预先进行细胞裂解，即可进行荧光素酶活性检测。
- **适用范围广** — 适用于多种不同的真核生物（脊椎动物、低等无脊椎动物）细胞系样品在微孔板（如 96-孔板）中检测。
- **背景值低** — 背景更低，数据更准确；
- **操作简便**
- **重复性好** — 检测数据更可靠，且荧光素酶的浓度线性范围超过 9 个数量级。

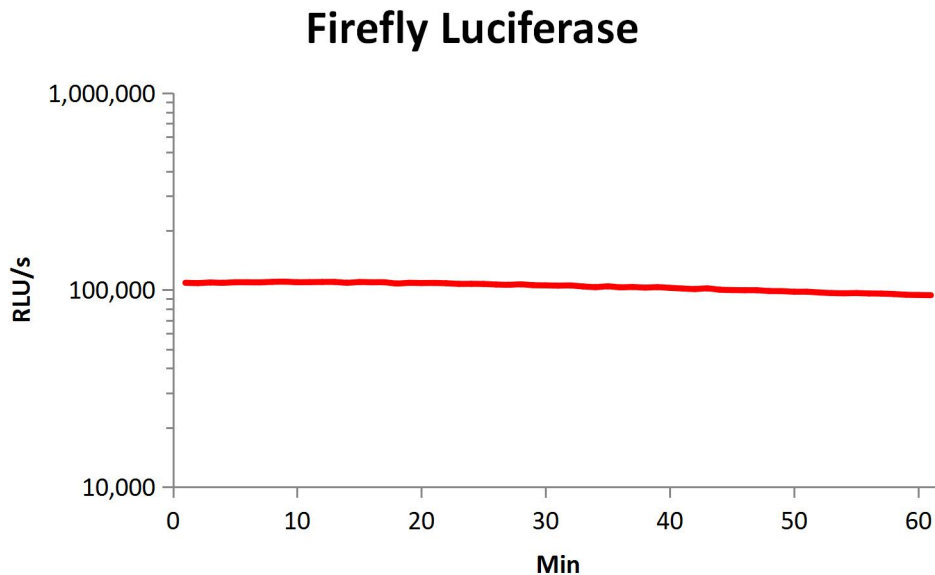


图1. 萤火虫荧光素酶活性分析。用Promega的pGL4.13 报告载体转染HEK293细胞，转染48小时之后，使用GeneCopoeia 的 Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit检测萤火虫荧光素酶的活性，结果如上图显示。

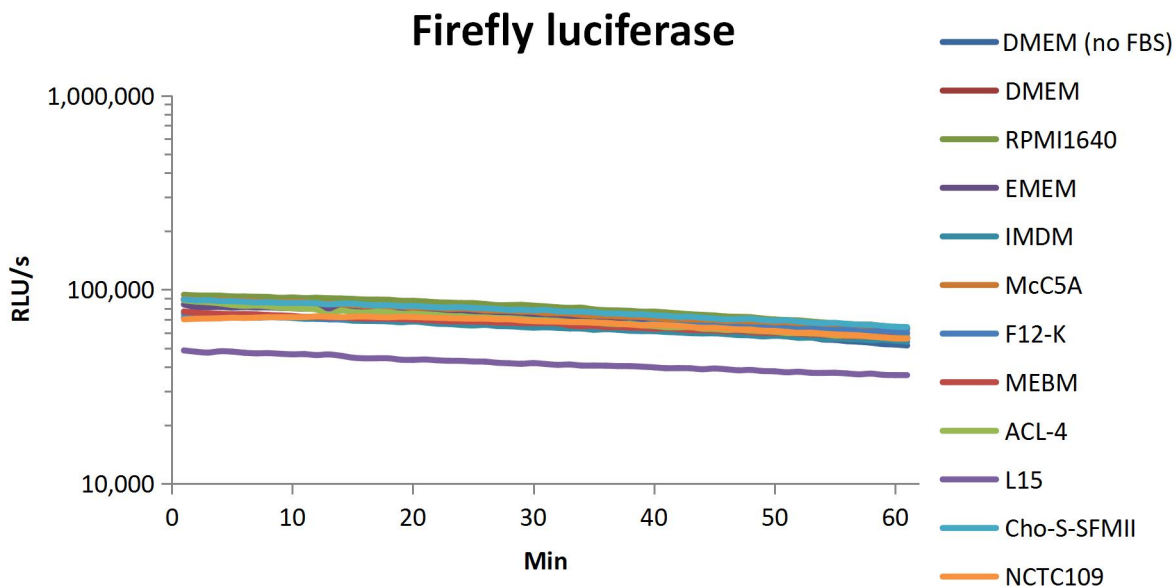


图2. 在不同培养基中检测萤火虫荧光素酶的活性。用Promega的pGL4.13和pGL4.75 报告载体转染HEK293细胞48小时之后，收集 5×10^4 个细胞悬浮于无血清的DMEM，或者包含10%血清的DMEM, RPMI1640, EMEM, IMDM, McCoy's5A, F-12K, MEBM, ACL-4, L15, Cho-S-SFMII, NCTC109。按照GeneCopoeia 的Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit实验操作说明检测萤火虫荧光素酶的活性，结果如上图显示。

II. 产品信息及储存条件

the Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit (货号: LF016, LF017 和 LF018) 试剂盒组份如下表所示。

产品编号	产品内容	包装规格	寄送条件	储存条件
LF016-01 LF016-01 LF018-01	FLuc-HT Buffer (5×) Firefly luciferase buffer	10 mL 30 mL 100 mL	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月
LF016-02 LF016-02 LF018-02	FLuc-HT Sub (100×) Firefly luciferase substrate	100 μL 100 μL×3 500 μL×2	冰袋	-20°C 至少保存 6 个月

III. 准备细胞样品

请注意使用与荧光检测仪匹配的细胞培养板，对于贴壁细胞和悬浮细胞，培养至合适的密度用于下游分析。

对于不同规格的细胞培养板，选用合适体积的细胞生长培养液，比如96孔板，每孔75 μ L培养液；384孔板，每孔20 μ L培养液。

IV. FLuc 工作液的配制

备注1: FLuc-HT Buffer (5 \times) 在-20 $^{\circ}$ C 至少可保存 6 个月。试剂反复冻融 5-6 次不影响检测荧光素酶的活性。

备注2: 光强度用于测量荧光素酶的催化速率，因此对温度变化非常敏感。两个荧光素酶的活性的最佳温度是室温 (20-25 $^{\circ}$ C)，因此在测试之前需要将试剂恢复到室温。

1. 在室温下解冻 FLuc-HT Buffer，上下颠倒管 3-5 次，然后涡旋振荡 3-5 秒。

备注1: FLuc-HT Buffer 解冻后可能出现浑浊现象，涡旋混匀即可，对实验分析不会产生影响。

2. **配制1 \times FLuc-HT Buffer:** 将FLuc-HT Buffer (5 \times) 稀释至1 \times 缓冲液，根据不同体积的细胞培养液准备等体积的1 \times 缓冲液，比如96孔板，每孔75 μ L细胞培养液需要75 μ L的1 \times 缓冲液；比如384孔板，每孔20 μ L细胞培养液需要20 μ L的1 \times 缓冲液。建议每个细胞样品做 2-3 次重复。

举例说明: 比如96孔板中检测30个细胞样品并做2次重复实验，共60个测试孔，需要配制 5ml 1 \times 缓冲液，配制稍多量的1 \times 缓冲液可避免因移液时的误差造成的短缺。

3. **准备 FLuc工作液:** 将FLuc-HT Sub (100 \times) 稀释到合适体积的 1 \times FLuc-HT Buffer 中。上下颠倒管子数次，混匀溶液。

举例说明: 比如准备5 mL 的FLuc 工作液，加入50 μ L的FLuc-HT Sub (100 \times) 至5mL的1 \times FLuc-HT Buffer 中，上下颠倒管子数次，混匀溶液。

4. 加样品前，配好的试剂先在室温孵育 5 分钟。

备注: 配制好的工作液 (含底物的 1 \times 缓冲液) 在室温下存放 1-2 小时是稳定的，建议每次只配制所需要的量。

V. 荧光素酶检测流程

5. 开启多孔板荧光检测仪，根据仪器说明书设置测试条件，设置每孔检测时间为 1-2 秒。

6. 从培养箱中取出细胞培养多孔板，确保多孔板与荧光检测仪匹配。

7. 加入合适体积的 Fluc 工作液到样品中。温和的吹打混匀，不要涡旋振荡。比如96孔板，每孔加入75 μ L的Fluc 工作液至75 μ L细胞培养液中；比如384孔板，每孔需要加入20 μ L的Fluc 工作液至20 μ L细胞培养液中。

备注: 使用 96孔板或384孔板测试，建议使用多道移液器加样以节约时间并减少重复测试孔之间的误差。

自动注射器: 本试剂盒不适合使用。

8. 将培养板放置于振荡仪上轻柔混匀10分钟。

9. 放入仪器检测。如果发光仪或光度计不能自动保存数据，请手工记录数据。
10. 测试完毕后，取出多孔板。

重要提示： 因为发光信号受试验条件的影响，原始结果的比较应该是同一时间测定的样品，并使用相同的培养基、血清等试剂。

VII. 有限使用许可协议及质量保证

有限使用许可协议

以下条款适用于The Luc-Pair™ Firefly Luciferase HT Assay Kit 产品。如果不接受以下条款，所有的产品必须在5个工作日内返回GeneCopoeia。GeneCopoeia的产品仅限购买方内部研究使用，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。GeneCopoeia的产品不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经GeneCopoeia的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。此产品必须按照国家卫生研究院的DNA重组和基因研究的指导方针使用。

有限质量保证

GeneCopoeia保证您收到的产品符合产品目录上的规格。如果GeneCopoeia的产品未能满足这些规格，GeneCopoeia将替换该产品。如果不能提供替换产品，GeneCopoeia将退款给购买方。这个有限质量保证不得延伸至产品的原始购买者以外的人。如果产品与订购信息不符，所有的产品必须在30天内返回回GeneCopoeia。GeneCopoeia的责任仅限于替换产品，且退款只限于实际的购买价格。GeneCopoeia不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。GeneCopoeia不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。

GeneCopoeia致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果你对我们的产品有任何问题和担忧，请和我们联系，电话：301-762-0888。

© 2017 GeneCopoeia, Inc.