Genomeditech (Shanghai) Co., Ltd.
Order: +86 021-50432825/50432826
Email: service@genomeditech.com

V 1.0.1

GMSteadyOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit

GMSteadyOne-Step 荧光素酶报告基因检测试剂盒

产品信息：

产品编号	产品名称	规格
GM-040506A	GMSteadyOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit GMSteadyOne-Step 荧光素酶报告基因检测试剂盒	10 mL（100 次）
GM-040506B		10 × 10 mL（1000 次）
GM-040506C		100 mL（1000 次）
GM-040506D		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：

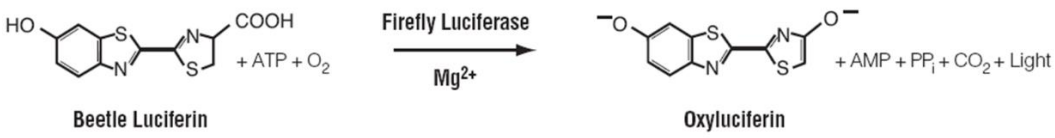

图 1：萤火虫荧光素酶检测原理图

产品简介：

吉满的产品 GMSteadyOne-Step 荧光素酶报告基因检测试剂盒（GMSteadyOne-Step Luciferase Reporter Gene Assay Kit，简称GMSteadyOne-Step)的特点是操作非常简便，半衰期可持续5h以上。尤其在前2h发光值变化较小。适合于超高通量或384孔板检测。实验前无需对细胞进行清洗或收集，而且可以直接使用，对细胞的裂解和检测一步完成，省去了混合试剂的步骤，节省了实验时间。

本产品测定样品的线性范围非常宽。在96孔板中，本产品可以在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

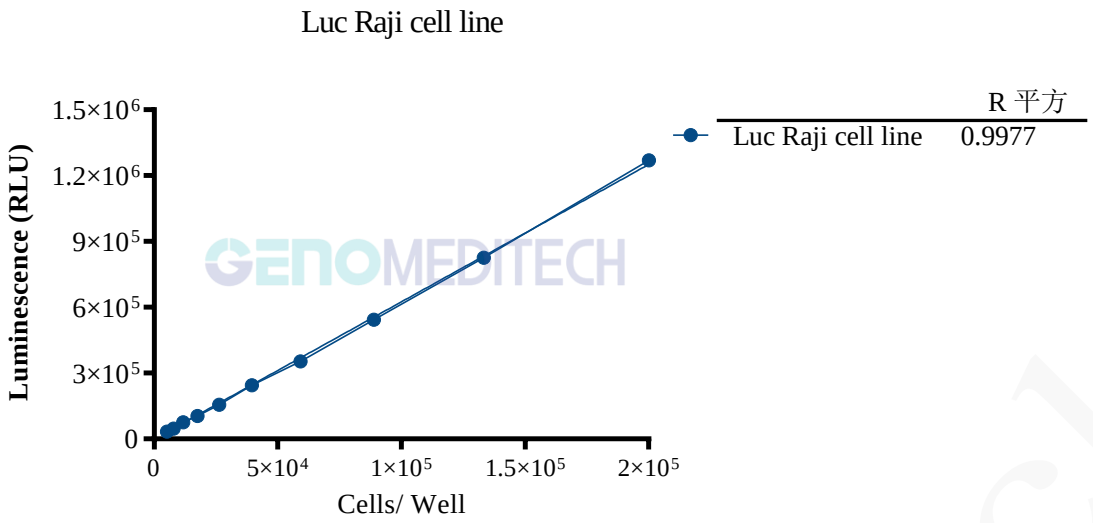

图2：本产品对转染萤火虫荧光素酶报告基因质粒的不同细胞量的Luc Raji cell line细胞的检测效果。首孔细胞数量2E5（悬液），按照1.5倍连续稀释，10个梯度，末孔细胞数量5.2E3。每个梯度3复孔，取均值。实际读数会因各种原因存在差异，图中数据仅供参考。

运输和复温：

干冰运输。使用前完全恢复室温即可。

保存条件：

-80ºC 避光保存，未开封试剂有效期一年；如果-20ºC 避光保存，推荐 2 个星期以内使用。拆封后推荐分装（避光）。

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℃）时再使用；检测试剂复温环境不能超过 25℃。
3. 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。
4. 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）：470 nm。选择 shake before Read。
5. 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。
6. 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 μL	100 μL
添加试剂体积	25 μL	100 μL

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 **10 min**，使细胞充分裂解。

b) 用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 μL 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℃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！

Genomeditech