



## 萤火虫荧光素酶检测试剂盒

### (Fire-Lucy Assay Kit)

#### 产品说明:

报告基因检测，是真核基因表达调控研究的常用方法。由于检测光量子的方法非常敏感，采用生物发光(bioluminescent)法，是报告基因检测最常用的有效手段。荧光素酶(luciferase)催化底物荧光素的转化，发射出光子。萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)催化的发光反应，具有很好的线性浓度范围(7~8个数量级的线性范围，酶的检测灵敏度达到 $10^{-20}$  mol。本试剂盒采用通用裂解缓冲液，能与其他类型的报告基因检测和蛋白含量检测兼容；优化的酶反应体系，使发光反应持续数十分钟，以便于手工操作多个样品。可与Ren-Lucy Assay Kit共同使用进行一体化的双荧光素酶检测。

#### 产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
5x Universal Lysis Buffer (通用裂解液)	25 ml	-20°C
Fassay Buffer (虫酶缓冲液)	10 ml	-20°C
Fassay Substrate (虫酶底物)	0.5 ml	-20°C

可作100次双荧光素酶检测。低温运输，-20°C或-80°C避光保存。有效期6个月。

#### 所需其它试剂:

使用者需准备PBS、双蒸水等。

#### 操作方法:

##### 裂解细胞:

- 1) 新鲜配制裂解液: 临用前，取适量5xUniversal Lysis Buffer (ULB)，用双蒸水稀释至1xULB，混匀。1xULB可在4°C存放数周。
- 2) 细胞清洗: 倾去培养板/皿中的培养液，加入足量PBS，轻轻洗涤细胞。完全倾去洗涤液。
- 3) 细胞裂解: 推荐按照表中的体积，在孔/皿中加入1xULB，混匀。培养板可在微型振荡器上震荡5~10 min; 培养皿可直接用细胞刮刀刮下细胞，将细胞悬液移入1.5 ml离心管，在涡旋振荡器上充分混悬震荡30秒。裂解细胞悬液可直接用于发光测定，也可离心30秒，取上清做发光测定。

##### 配制发光反应液:

测定前，在室温待Fassay Buffer和Fassay Substrate溶化，混匀（注意避光）。按20/1比例用Fassay Buffer稀释Fassay Substrate，配制所需体积的Fassay Reagent（注意避光）。

##### 测定仪器的设置:

按仪器操作说明开启发光测定仪。手动操作型仪器，将测读时间设为10-20秒。自动操作型仪器，一般将测定延迟设为2秒，将测读时间设为10-20秒，Fassay Reagent的注入体积设定为100  $\mu$ l。

*手动发光测定:*

取待测样品20  $\mu$ l加入测量管底部，取Fassay Reagent 100  $\mu$ l加入管底部，轻轻敲击管壁3~5次混匀，放入仪器中立即测定，记录发光值为Firefly luciferase的发光单位(RLU)。如用多孔板同时手动测定多个样品，则将各待测样品20  $\mu$ l分别加入连续的各孔底部，用多道加样器于各孔底加入Fassay Reagent 100  $\mu$ l，轻轻敲击板侧3~5次混匀，放入仪器中立即测定，记录发光值为Firefly luciferase的发光单位(RLU)。

*自动发光测定:*

配制好的Fassay Reagent置于测定仪内并连接好对应管道。各待测样品20  $\mu$ l分别加入测定管/板孔底部，启动自动测量程序。记录Firefly luciferase的发光单位(RLU)。

**注意事项:**

- 1) Fassay Buffer和Fassay Substrate应避免反复冻融，可分装成合适体积分次使用。配制好未用完的Fassay Reagent可在-20 $^{\circ}$ C保存1月左右。
- 2) 细胞裂解液一般在当天测定。如需隔日测定，应将样品于-20 $^{\circ}$ C保存。长期保存应在-80 $^{\circ}$ C。测定样品量可为10~30  $\mu$ l。
- 3) 用多孔板同时手动测定多个样品时，要尽量缩短样品间试剂加入的时间间隔。

**表：不同容器细胞所需1xULB的体积。**

96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	35 mm平皿	60 mm平皿
50 $\mu$ l	80 $\mu$ l	150 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l