

一步法萤火虫萤光素酶 ADCC 检测试剂盒

1 产品基本信息

产品名称（中文）：一步法萤火虫萤光素酶 ADCC 检测试剂盒

产品名称（英文）：One-Step Firefly Luciferase ADCC Assay Kits

产品编号：MX1550

产品规格：50 T, 500 T, 2 × 500 T

产品组分

组分	MX1550S (50 T)	MX1550M (500 T)	MX1550L (5 × 500 T)
A. One-Step Firefly Luciferase Assay Buffer	5 mL	50 mL	2 × 50 mL
B. D-Luciferin	1 mg	10 mg	2 × 10 mg

注：B 组分建议预先使用无菌水配置为 2 mg/mL 储液，A 组分及配置为储液的 B 组分，根据实验需求进行小批量分装。检测工作液建议现配现用，避免反复冻融。

2 产品介绍

报告基因检测是现代分子生物学研究领域分析结构基因旁侧区域潜在的顺式元件（如启动子、增强子和沉默子等）和反式作用因子相互作用关系的一种重要工具。萤火虫萤光素酶（Firefly Luciferase）分子量约 61 kDa 的蛋白，在 ATP、Mg²⁺和 O₂ 存在条件下，催化其底物甲虫萤光素（Beetle Luciferin）氧化成氧化萤光素（Oxyluciferin）并发出波长是 560 nm 左右的荧光。本试剂盒的光信号是一种闪光型化学发光，信号半衰期约为 20 min。请用酶标仪的化学发光检测模块进行测定。检测原理见图 1。



图 1 检测原理图

产品特点：

- 快速省时：细胞裂解在 10~15 min 内完成；
- 操作简便：将冻干粉底物与缓冲液简单混合即可使用，样品检测步骤简单；
- 灵敏度高：能够检测最低 10⁻²⁰ mol 的萤光素酶；
- 荧光亮度高：更强的光输出，产生比其它萤光素酶检测试剂高 10 倍的光强度。

适用范围：

ADCC、ADCP 活性常规检测、抗体筛选、抗体糖基化修饰

3 储存与运输

储存条件：-80 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

4 使用方法（仅供参考）

一、自备材料

1. 耗材

离心管

2. 试剂

(1) 1 × PBS

3. 仪器

(1)微型振荡器 (2)摇床 (3)多功能酶标仪

二、操作步骤

1. 工作液配制

(1)将所有组分恢复至室温。

(2)用 B 组分充分稀释 C 组分（储液），配制成 0.2 mg/mL 的萤火虫萤光素酶工作液，涡旋震荡，确保充分混匀。

注：萤火虫萤光素酶工作液不能反复冻融，若单次实验用量较少，建议按单次使用量分装成小规格。

2. 化学发光值检测

(1)从培养箱中拿出细胞培养板，室温孵育 20 min，使其恢复至室温(22~25℃)。

(2)向培养板中加入与培养基等体积的萤火虫萤光素酶工作液，混匀。

(3)室温孵育 5 min。

注：孵育时间可随细胞类型和细胞数目适当调整。

3. 用多功能酶标仪或化学发光仪读取数值（仪器参数：测定时间为 10 s，测定间隔为 2 s）。

5 常见问题

Q1：C 组分的颜色到底是无色还是黄绿色？

答：本底物是我们公司自主合成的，不同批次间存在批间差，这是正常现象。

Q2：为什么试剂盒使用到最后发现 E 组分不够？

答：E 组分易挥发，请每次使用完毕后尽快保存至-20℃密封保存，减少 E 组分的挥发。

Q3：酶标仪的检测设置？

答：Luminescence, 350~700 nm，建议检测时间设为 2~10 s。请注意不是吸光度(Absorption)板块。

Q4：检测使用的板子应该怎么选择？

答：为防止孔间干扰，建议使用白色不透光孔板。黑色不透光孔板也可使用，但相较于白色不透光板测得的荧光值会低。

Q5：双报告基因表达载体应该怎么选择？

答：(1)萤火虫报告基因质粒原则上含有 luc 基因就可以，但是不同实验所需的载体有一定差异，如果您要自己构建载体，要注意有些载体没有启动子，需要自行插入启动子，如 pGL3 Basic。

(2)海肾报告基因质粒尽量选择中等强度的启动子，如 TK 启动子等，不要选择强启动子 CMV、SV40 等。海肾基因的表达活性应显著高于背景组，同时不干扰萤火虫萤光素酶报告基因的表达。

(3)报告基因表达载体可选择分别带有萤火虫萤光素酶报告基因和海肾萤光素酶报告基因的两个表达载体共转染，若海肾萤光素酶作为内对照，构建对照载体，那么萤火虫萤光素酶作为实验组，构建实验载体，共转染时，实验载体：对照载体组合之比可以在 10：1~100：1（或更大）是可行的。或者也可选择一个表达质粒（可同时表达萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶，但二者的表达分别由不同的启动子控制表达），选择表达量相对弱的作为内对照。

Q6：怎么保证数据重复性和复孔误差？

答：(1)为取得最佳测定效果，在用单管的化学发光仪测定时，样品和测定试剂混合后到测定前的时间应尽量控制一致；使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时，宜先把样品全部加好，然后用排枪统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。

(2)由于温度对酶反应有影响，所以测定时，样品和试剂均需达到室温后再进行测定。

Q7：荧光值过高是什么原因造成的？该怎么解决？

答：(1)荧光值过高可能会超出仪器检测范围，从而检测不到值。

(2)减少质粒转染量。

(3)细胞样品裂解后，离心取上清后检测或对裂解产物进行稀释后检测。

(4)不建议通过减少底物量来降低荧光值，需要保证底物的饱和来反映荧光素酶真实的表达水平，否则会造成检测结果出现大的偏差。

Q8：荧光值过低或无荧光值是什么原因造成的？该怎么解决？

答：(1)荧光素酶的表达水平与启动子活性相关，正常表达水平下检测到的荧光值应在 10^5 数量级左右，若检测到的荧光值比较低或无荧光值，可从启动子活性、转染效率、检测过程这几方面进行考虑。

(2)转染效率低。

1)优化转染实验条件，用较易转染的质粒做阳性对照（如转染过表达荧光蛋白质粒）；

2)确保转染 DNA 的质量，可通过酶切或琼脂糖凝胶电泳的方法对 DNA 质量进行鉴定；

3)选择活性较高，处于指数分裂期的细胞进行转染。

(3)启动子活性低或诱导失败。

1)转染后的细胞培养使用特异性诱导启动子的条件；

2)优化细胞的培养条件，提高荧光素酶的表达量；

3)更换强启动子（如 SV40、CMV）。

4)海肾荧光素酶基因作为内对照，其表达应不受时期、部位、环境影响，因此常用组成型表达的 TK 启动子。

(4)样品裂解效率低。

1)细胞培养时间不宜过长，12~36 h 内最好，长时间培养后，细胞可能会难裂解。

2)加入的裂解液需足量，保证细胞能够充分裂解。

(5)检测过程操作不规范。

1)选择合适的检测仪器，能够检测化学发光或者生物发光的仪器都适用于该实验；

2)需加入足量底物，保证底物的饱和，否则会造成检测结果出现很大偏差；

3)室温反应。反应时各个组分（细胞裂解产物，底物工作液等）都需要调整到室温；

4)荧光素酶的半衰期一般约 30 min，加完底物后可立即检测，尽量在 30 min 内完成。

(6)底物氧化失效。

1)底物避光密封保存，萤火虫荧光素酶底物-20℃保存；海肾荧光素酶底物推荐-20℃保存；

2)反应工作液建议现用现配。

6 注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 萤火虫荧光素酶催化的生物发光的最强波长为 560 nm。请用化学发光（Luminescence）模块进行检测。
- 如果单管萤光测定仪测定，每个样品与测定试剂混合后到测定前的时间应保持一致。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。