

荧光素酶报告基因技术讲座

美仑研发部

区分两个概念

萤光

(Bioluminescence)

□是化学发光 (Chemiluminescence) 的一种，能量来自化学反应

□萤光发光计 (Luminometer)

多功能酶标仪

电荷耦合装置光学成像系统 (CCD optical imaging system)

荧光

(Fluorescence)

□吸收来自光源的光，再发射另一光子

□荧光计 (Fluorometer)

荧光显微镜、流式细胞仪等

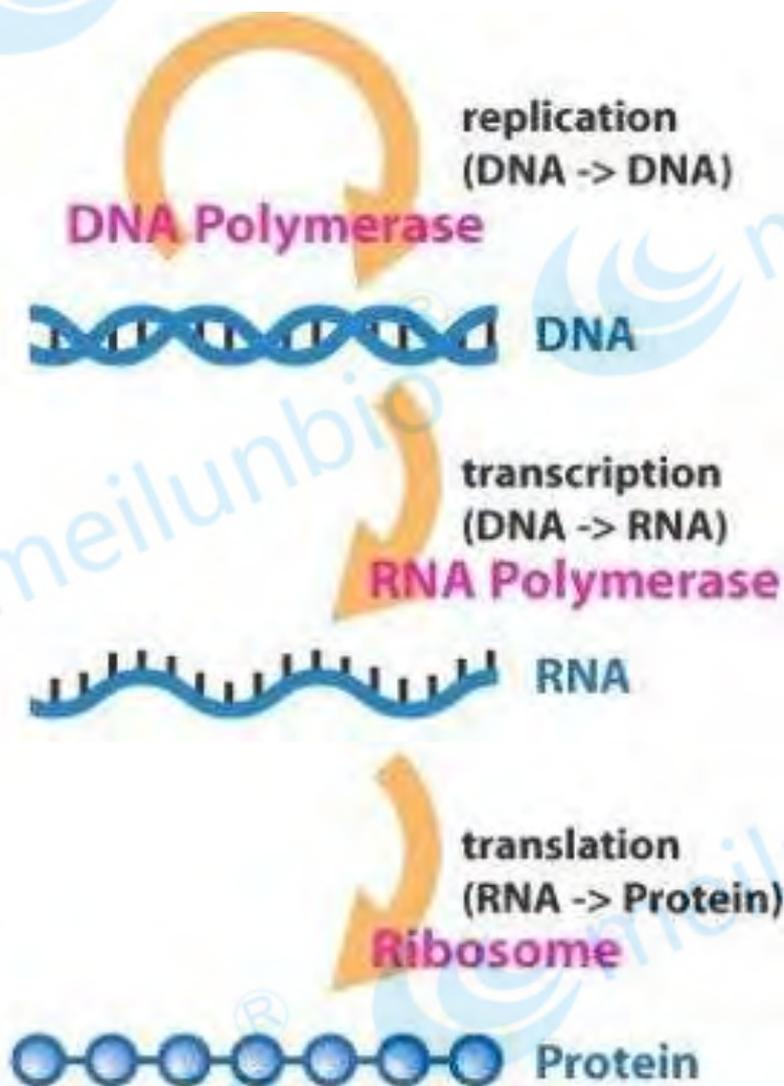
一些概念:

转录元件

启动子

3'-UTR

miRNA



报告基因的作用

◆ 启动子

药物诱导作用

转录因子



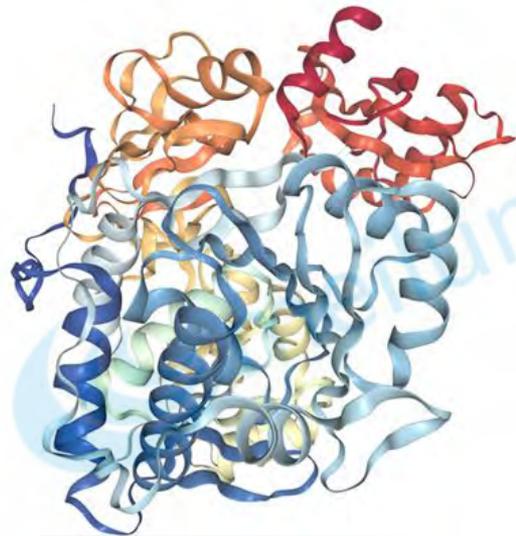
◆ mRNA靶基因验证

萤光素酶报告基因的突出特点

- 非放射性
- 检测快（比CAT等）
- 灵敏度高（可比CAT检测灵敏度高100倍，在理想条件下，可检测到 10^{-20} 摩尔的萤光素酶分子。在哺乳动物细胞中半衰期3小时，在植物细胞中半衰期3.5小时）
- 线性范围广（在 10^{-16} M(10pg/L)至 10^{-8} M(1mg/L)范围内,光强度与萤光素酶浓度成正比）
- 一般比显微镜检测的荧光更灵敏 (对多孔板而言)
- 生物萤光比荧光更稳定，因为自然界进化的酶能保护光子发射器
- 通过基因工程可以延伸生物萤光的性能和能力

萤光素酶结构

Firefly Luciferase



Renilla Luciferase



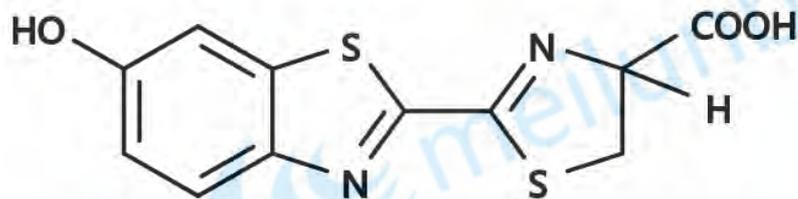
萤火虫荧光素酶反应



萤火虫荧光素酶： 单体, 61,000 Daltons

辅-底物： ATP · Mg²⁺

荧光素 (D-luciferin) :



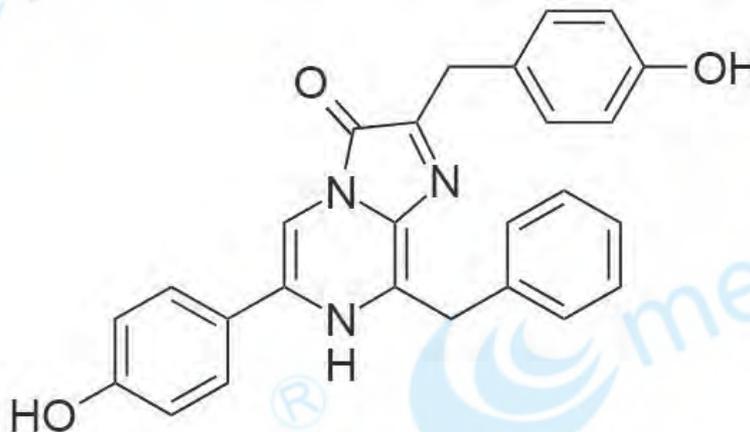
海肾萤光素酶反应



465nm

海肾萤光素酶: 单体, 36,000 Daltons

天然腔肠素:
(Coelenterazine)



为什么要使用双萤光素酶报告基因？

报告基因 A (首要信号)

Firefly Luciferase

特异生物学反馈
+ 非特异生物学反馈

报告基因 B (第二信号)

Renilla Luciferase

非特异生物学反馈

数据处理

比较首要与第二信号确定
特异生物学反馈

双萤光素酶报告基因简化实验流程（萤火虫+海肾）

1. 药物刺激对目的启动子活性的影响

◆ 制备含有 *luc2*/
Rluc 的质粒

◆ 共转染

◆ 提供刺激

◆ 测量萤光

◆ 数据处理

实验质粒

萤火虫萤光素酶

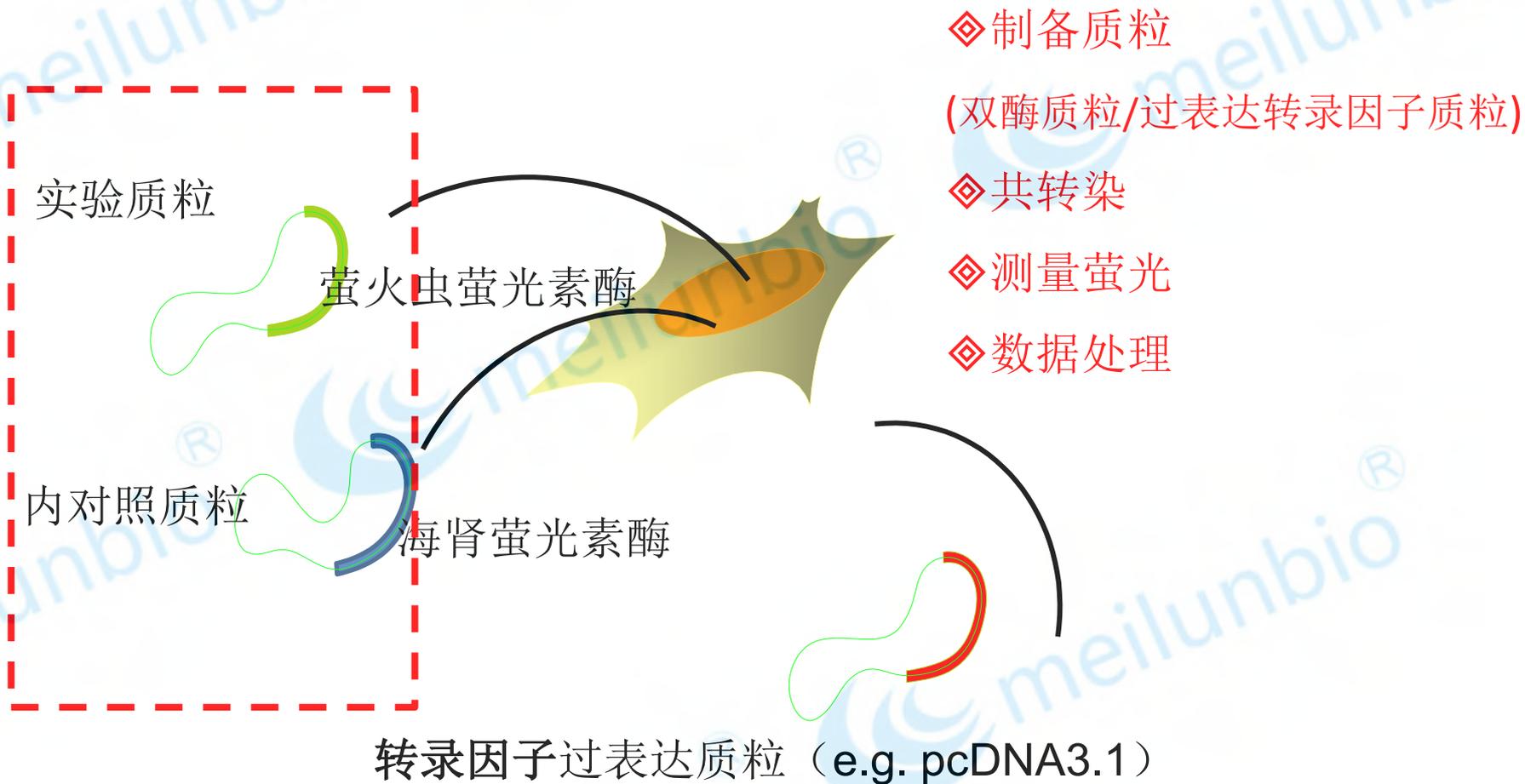
内对照质粒

海肾萤光素酶

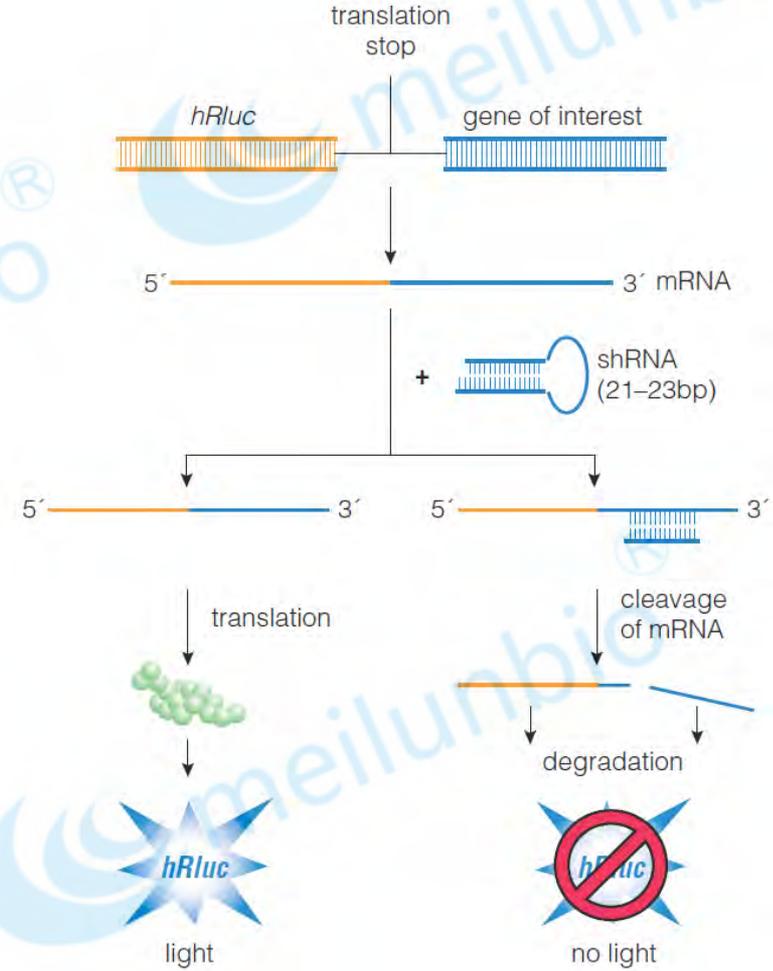
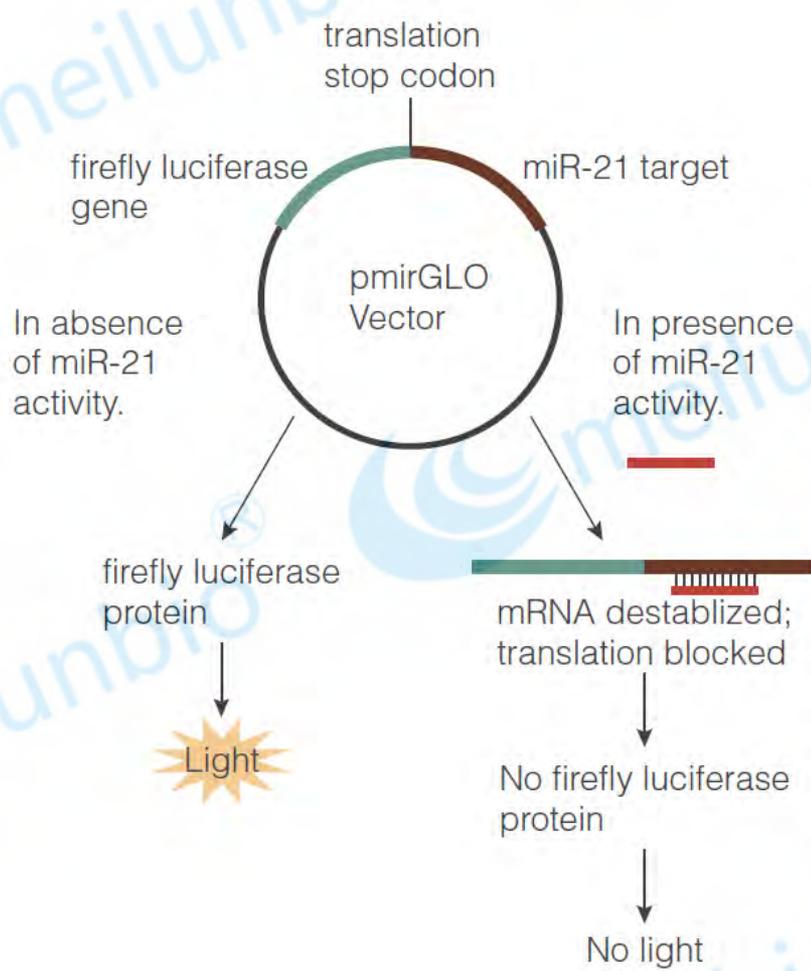
用海肾萤光素酶作对照约化处理

$$\text{约化数据} = \frac{\text{实验的 (萤火虫萤光素酶)}}{\text{对照的 (海肾萤光素酶)}}$$

2. 转录因子对目的启动子活性的影响



3.miRNA靶基因验证 (针对3'UTR元件)



4. 启动子/增强子经典研究方法

“碰撞启动子”（截短型分析法）：

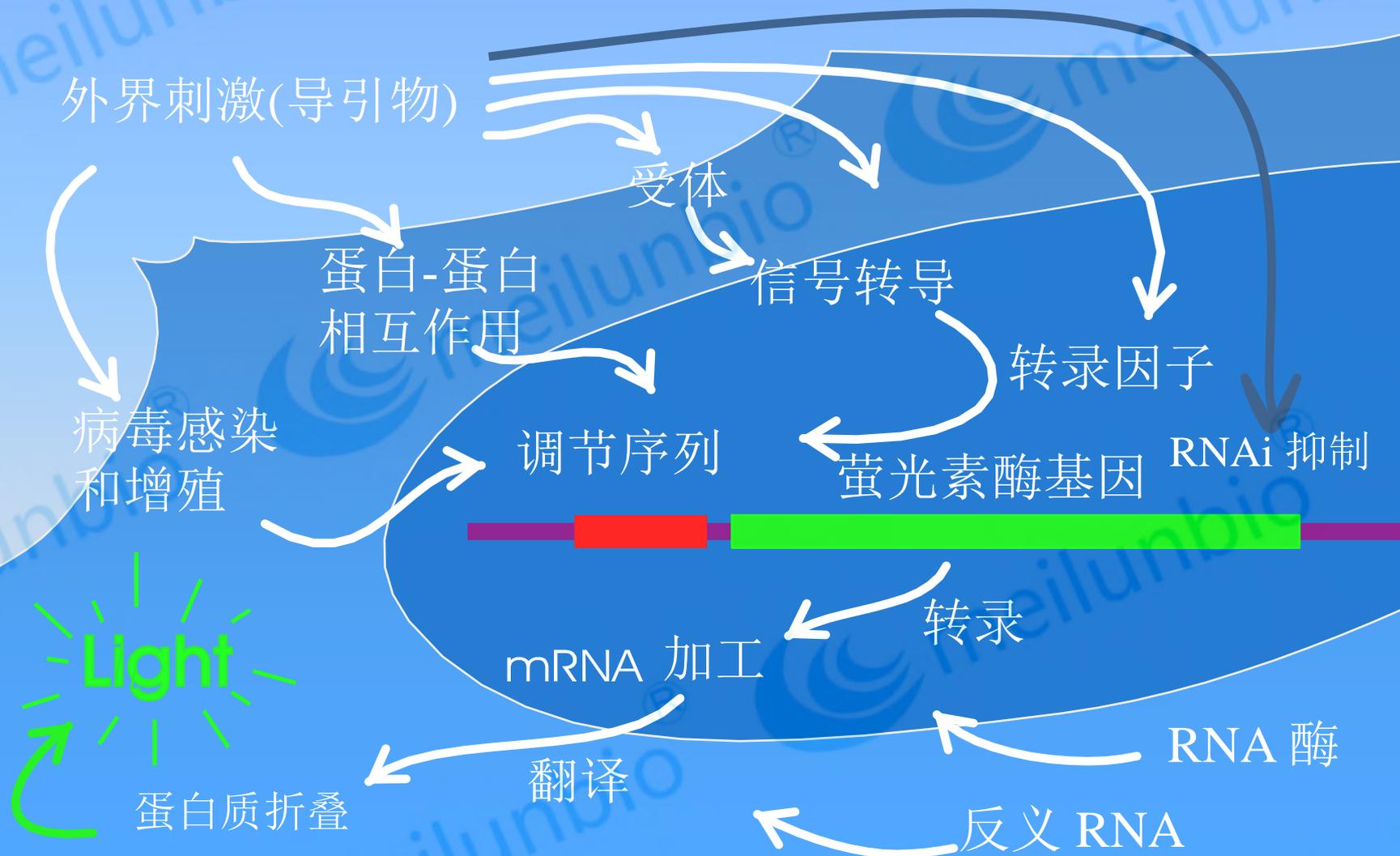
1) 全序列：



2) 逐步缺失：



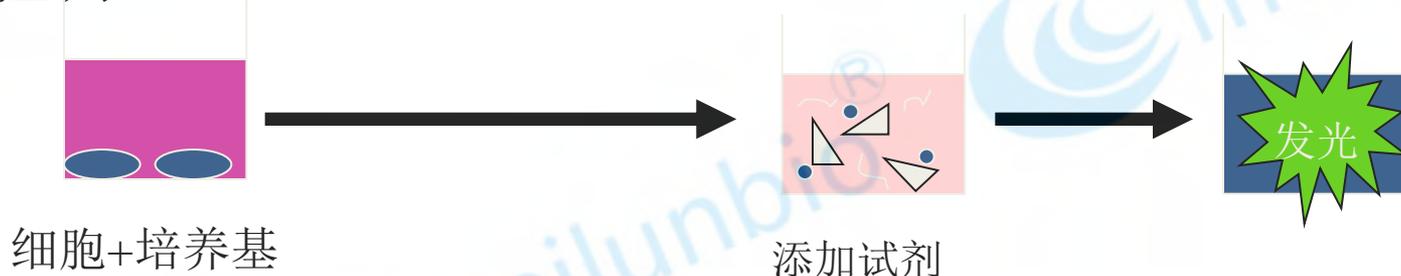
报告基因检测汇总



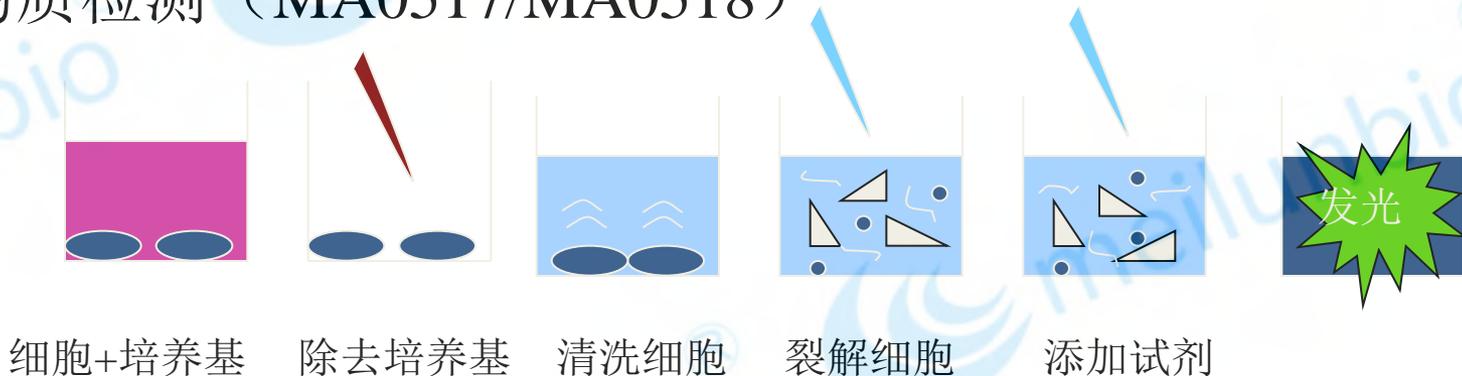
检测方式

均质检测与非均质检测

均质检测 (MA0519)



非均质检测 (MA0517/MA0518)



Meilunbio® 报告基因检测类产品

Meilun货号	检测萤光素酶	发光类型	检测方法	特点
MA0517	Firefly luciferase单酶	闪光型	非均质检测	单酶检测无内参对照 对前期细胞转染等操作要求高 适用于稳转细胞株检测
MA0518	Firefly&Renilla luciferase 双酶	闪光型	非均质检测	设置内参对照检测结果更准确 要求30s内完成检测 高灵敏度 高通量检测需自动进样器
MA0519	Firefly-Glo luciferase单酶	辉光型	均质检测	单酶检测无内参对照 对前期细胞转染等操作要求高 适用于稳转细胞株检测 信号稳定性好, 半衰期可达2h 适合高通量检测, 无需依赖自动进样器
待更新	Firefly&Renilla-Glo luciferase 双酶	辉光型	均质检测	设置内参对照检测结果更准确 信号稳定性好, 半衰期可达2h 适合高通量检测, 无需依赖自动进样器
待更新	Nano&Firefly-Glo luciferase 双酶	辉光型	均质检测	引入nanoluc新型报告基因质粒 发光信号更强 设置内参对照检测结果更准确 信号稳定性好, 半衰期可达2h 适合高通量检测, 无需依赖自动进样器

Meilunbio® Firefly&Renilla Luciferase Reporter Assay Kit

美仑双萤光素酶报告基因检测试剂盒

- ◇ MA0518 100次
- ◇ MA0518-L 1000次

分别对应Promega E1910 \E1980

属于第一代产品！
闪光型、灵敏度高！
非均质检测
高通量检测需依赖自动进样器



Meilunbio[®] Firefly&Renilla Luciferase Reporter Assay Kit

美仑双萤光素酶报告基因检测试剂盒组分

产品组成	MA0518 (100T)	MA0518-L (1000T)
Cell Lysis Buffer (5x)	10mL	30mL
Firefly Luciferase Reaction Buffer	10mL	100mL
Firefly Luciferase Substrate	1 vial	1 vial-L
Stop & Renilla Reaction Buffer	10mL	100mL
Renilla Luciferase Substrate (50x)	200uL	1mLx2



Meilunbio® Firefly Luciferase Reporter Assay Kit

美仑萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒

- ◆ MA0517 100次
- ◆ MA0517 -L 1000次

属于闪光型单萤光素酶产品！
非均值检测
高通量检测需依赖自动进样器
无内参对照，更适用于对稳转细胞株的研究
分别对应Promega E1500/E4550



产品组成

Cell Lysis Buffer (5x)

Firefly Luciferase Reaction Buffer

Firefly Luciferase Substrate

**MA0517
(100T)**

10mL

10mL

1 vial

**MA0517-L
(1000T)**

30mL

100mL

1 vial-L

美仑双酶报告基因检测步骤

- 裂解细胞

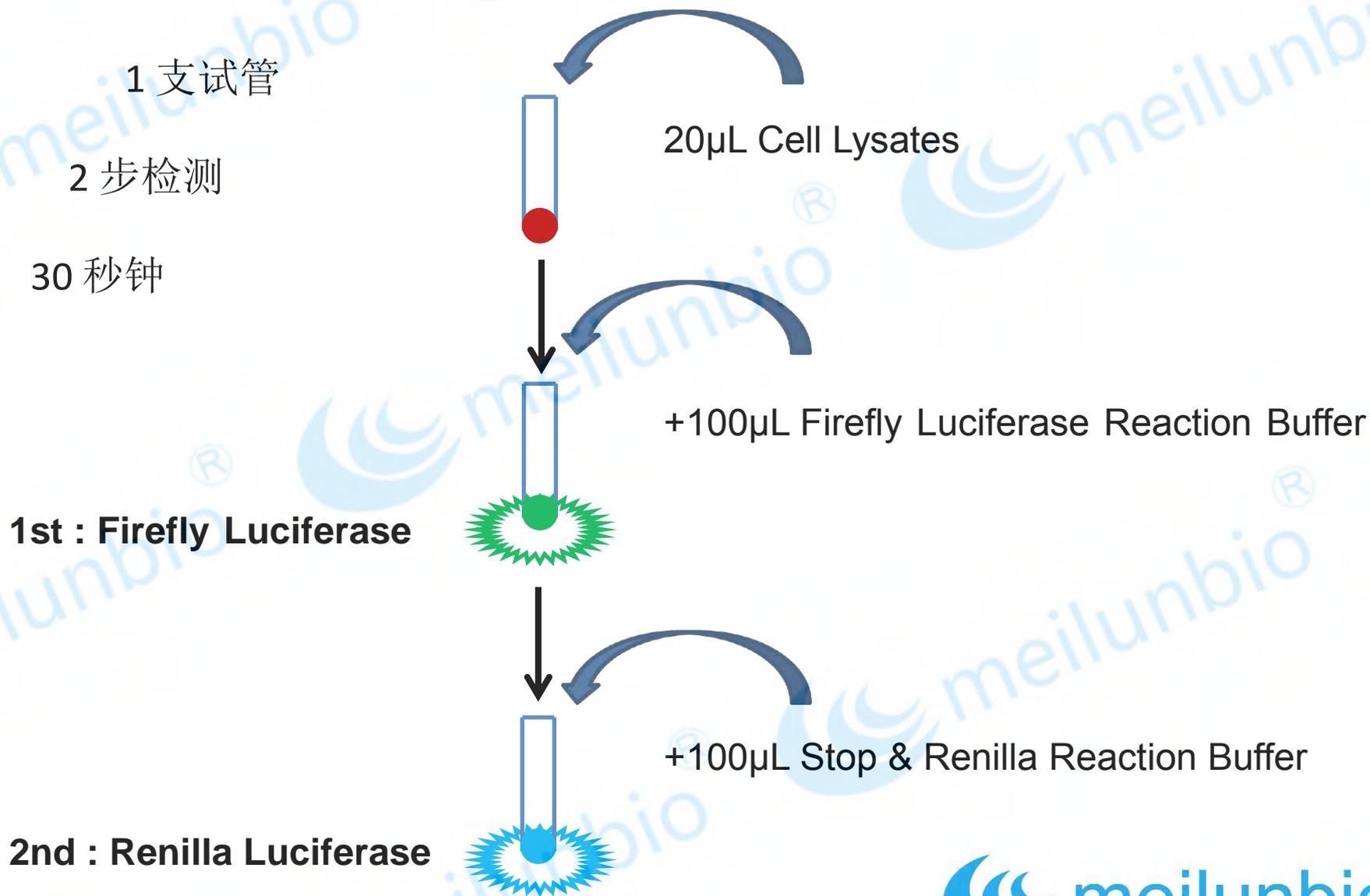
- 被动裂解

- 除去培养基..PBS洗..加1x Cell Lysis Buffer, 振荡15分钟

Cell Culture Plate	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
1xCell Lysis Buffer	500uL	200uL	100uL	50uL	20uL

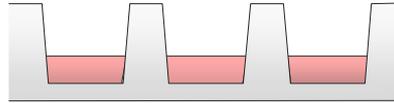
- 检测：高通量检测，需要依赖自动进样器。

双萤光素酶单管检测方案



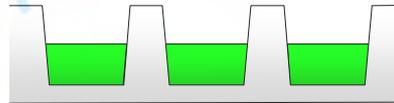
双萤光素酶报告基因高通量检测 需配自动进样器

Cells lysates



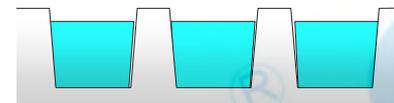
*Add Firefly
Luciferase Reaction Buffer*

**Primary reporter:
Firefly bioluminescence**



*Add Stop
& Renilla Reaction Buffer*

**Secondary reporter:
Renilla bioluminescence**



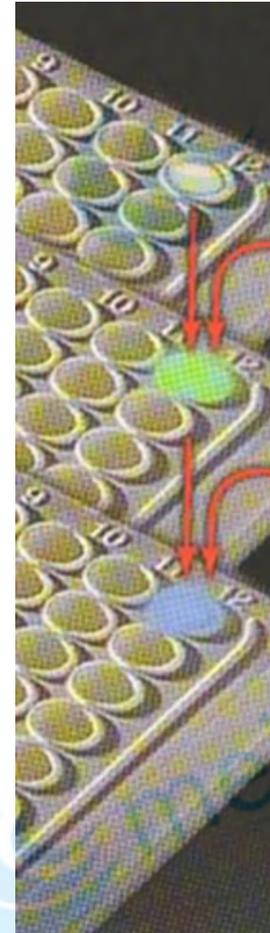
Cell lysates

Firefly Luciferase Reaction Buffer

Firefly

Stop & Renilla Reaction Buffer

Renilla



数据处理举例

第一天 样品处理重复 对照	荧光素酶活性(RLU)		比率 (F:R)	归一的活性 变化倍数
	F	R		
1	5,128	2,511		
2	7,553	3,815		
3	10,555	5,413		
	7,745	3,913	1.98	1.00
处理 A				
1	5,1376	4,467		
2	40,712	3,574		
3	88,787	7,654		
	6,0292	5,232	11.52	5.82
处理 B				
1	587,635	5,144		
2	988,347	8,832		
3	409,881	3,564		
	661,954	5,847	113.21	57.18
第二天 对照				
1	15,529	20,433	0.76	
2	21,897	30,841	0.71	
3	10,760	13,620	0.79	
	16,062	21,631	0.74	1.00
处理 C				
1	850,239	20,843		
2	578,951	14,830		
3	943,873	21,788		
	791,021	19,154	41,30	55,81
处理 D				
1	14,865	19,305		
2	8,967	12,284		
3	13,767	20,246		
	12,533	17,278	0.73	0.99

Δ活性倍数

$$= \frac{(F/R)_{\text{样品}}}{(F/R)_{\text{对照}}}$$

第二天处理 C 计算如下：

$$\begin{aligned} \Delta \text{活性倍数} &= \frac{(791,021/19,154)}{(16,062/21,631)} \\ &= 55.81 \end{aligned}$$

双酶报告基因检测结果展示



萤光光强及淬灭效果各厂家对比(MA0518)

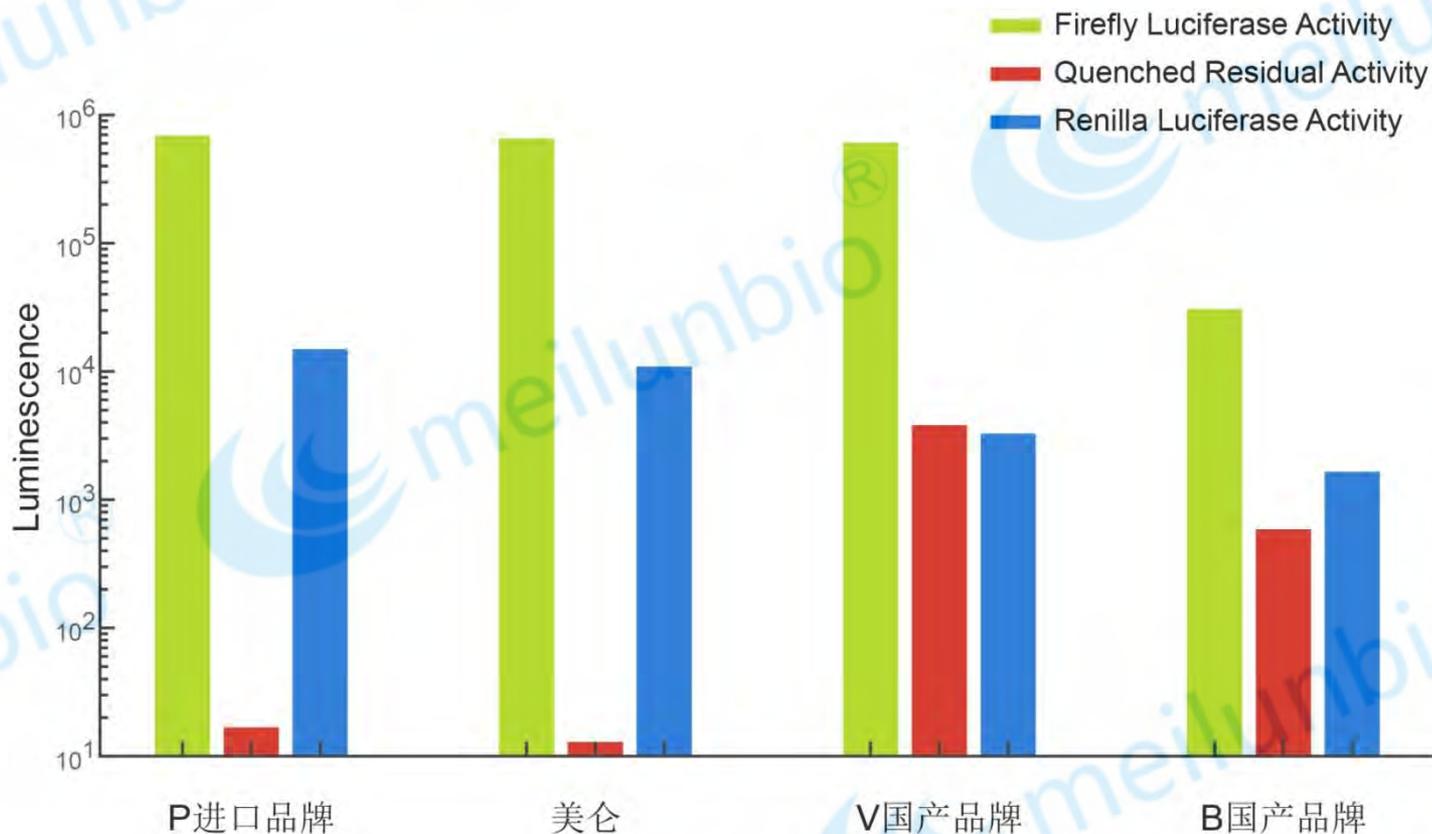


图1.萤火虫萤光素酶发光强度、淬灭效果以及海肾萤光素酶发光强度对比。由图可知，各组间Firefly luciferase/ Renilla luciferase浓度和比例相同的前提下，美仑组的发光强度高于国产品牌。更为重要的是，美仑组的Firefly luciferase 淬灭效果最佳，远超国内其他品牌，荧光残留量仅为0.001%！几乎完全不影响Renilla再发光，因而具有最高的Renilla信噪比，使得测试结果更加准确，数据可重复性提高！而其他国产试剂Firefly萤光淬灭很差，背景很高，直接影响Renilla读值。（仪器：BioTek HTX）

Firefly Luminescence Stability (MA0517/MA0518)

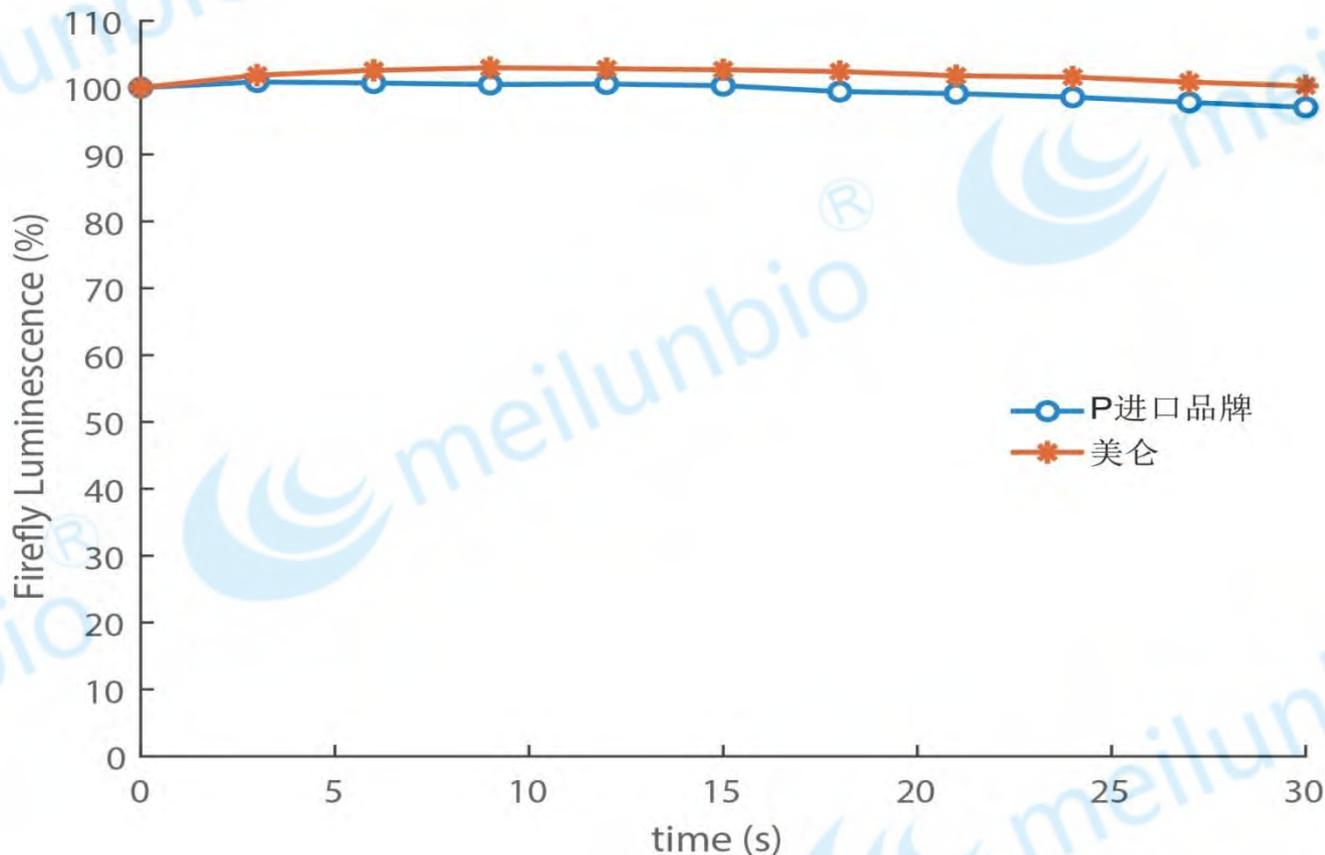


图2.美仑Firefly luciferase萤光信号稳定性（动力学）检测。从反应初始时刻持续追踪Firefly luciferase萤光信号30s，可以发现美仑组的萤光信号近乎无衰减，信号稳定性极好，远远满足常规机器操作所需时长！（仪器参数：VILBER/化学发光/-90制冷CCD）

美仑萤火虫荧光素酶线性区间测试 (MA0517/MA0518)

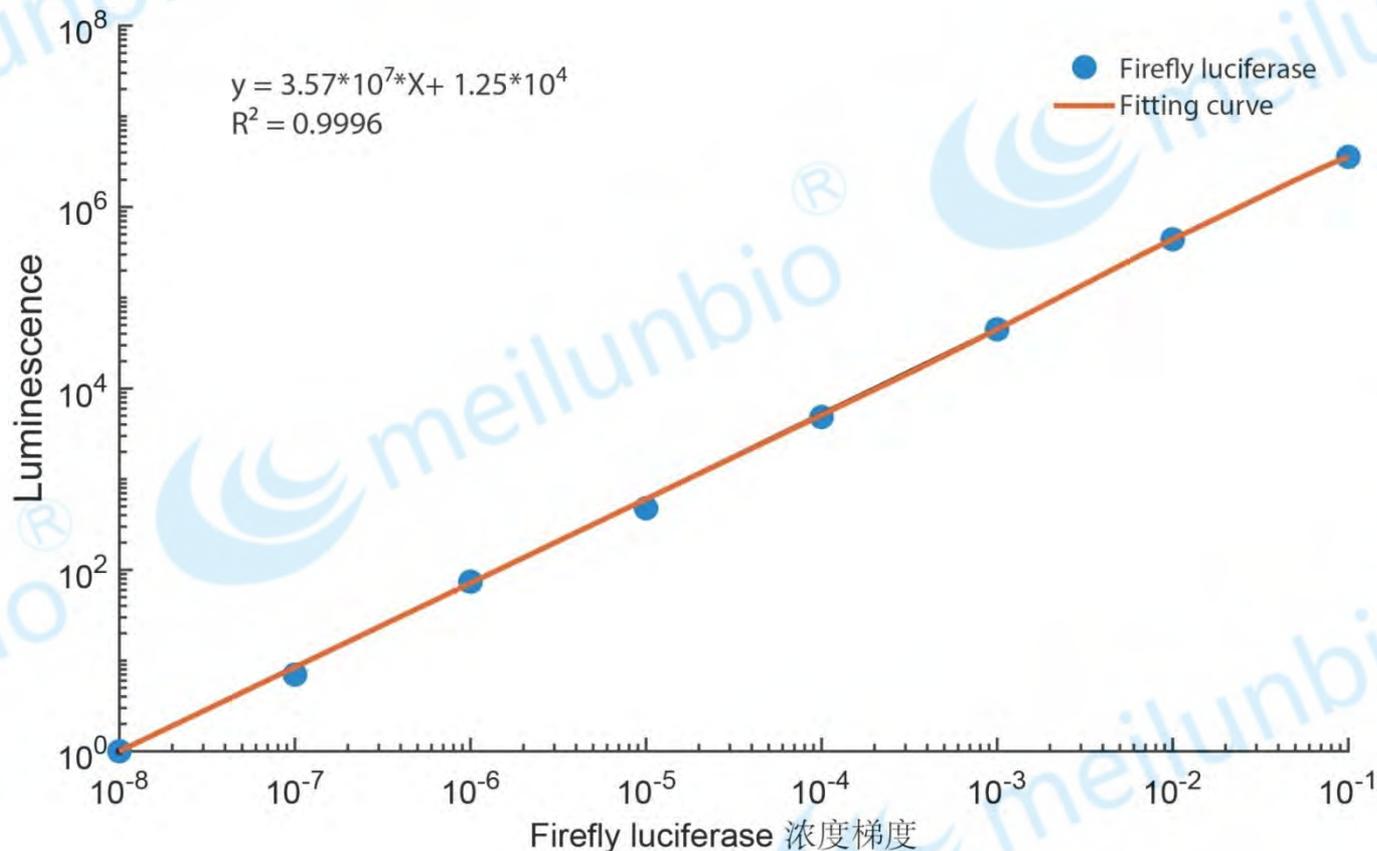


图3.美仑组Luminescence-Firefly luciferase浓度梯度标准曲线。在仪器（BioTek HTX）允许的最大测试范围内，美仑Firefly luciferase 萤光线性检测范围可达8个数量级， R^2 可达0.9996！（仪器：BioTek HTX）

美仑检测结果对比进口品牌 (MA0518)

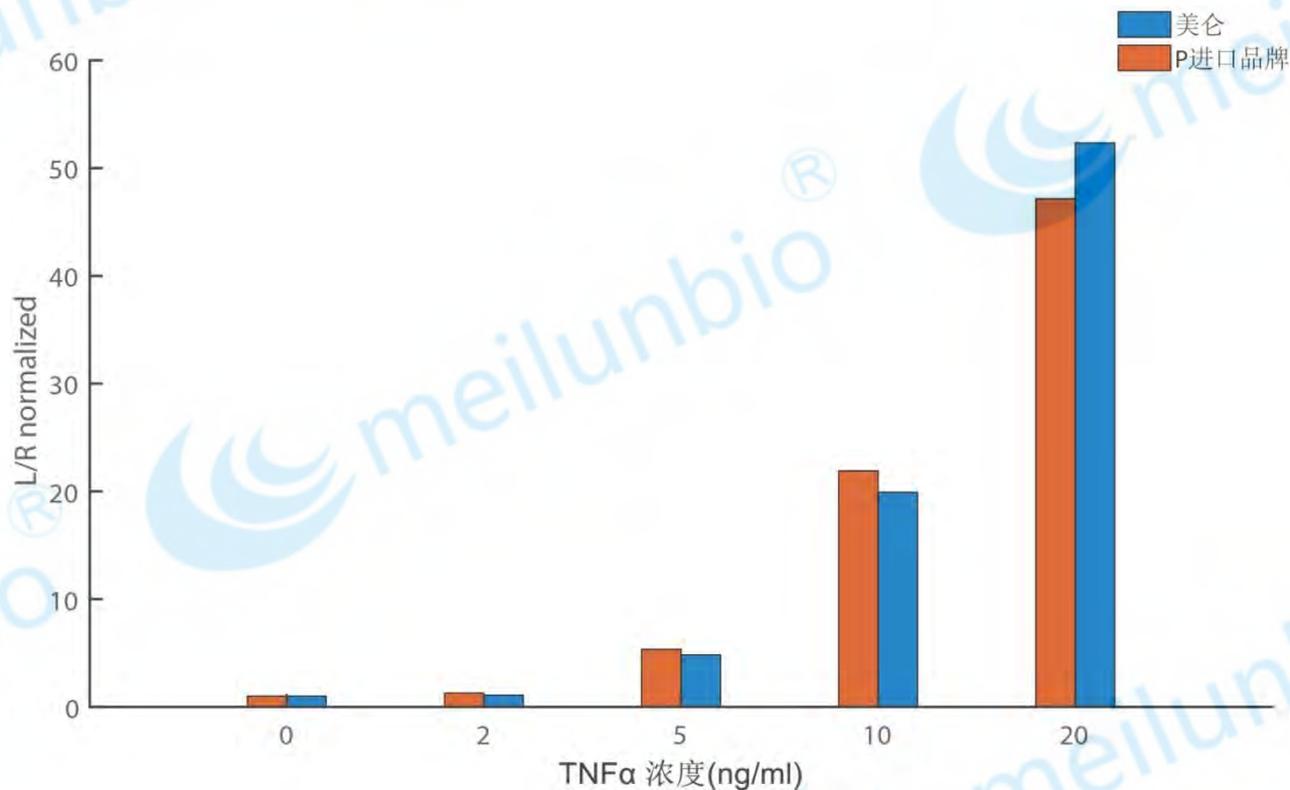


图4.美仑双萤光素酶报告基因检测试剂盒实际应用举例。HEK-293T细胞共转染了萤火虫萤光素酶NF- κ B response reporter 和海肾萤光素酶内参质粒。转染后12h, 进行TNF α 浓度梯度诱导, 5h后收集细胞并进行裂解。酶标仪检测双酶的信号读值, 对数据进行约化和归一化处理, 可以明显看出Firefly/Renilla 归一值与给药浓度呈正相关, 且与进口品牌差异不大 (仪器: BioTek HTX)

Meilunbio® Firefly-Glo Luciferase Reporter Assay Kit

美仑Firefly-Glo萤光素酶报告基因检测试剂盒

- ◆ MA0519-1 100次
- ◆ MA0519-2 1000次



属于辉光型单萤光素酶产品！

分别对应Promega E8110/ E8120

产品组成

Firefly-Glo Luciferase Reaction Buffer

Firefly-Glo Luciferase Substrate

MA0519-1
(100T)

10mL

1vial

MA0519-2
(1000T)

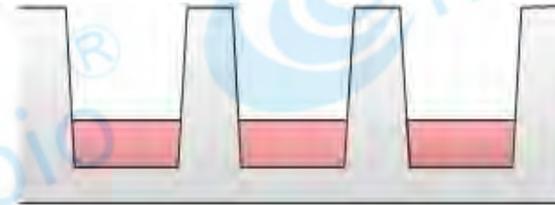
100mL

1vial

Firefly-Glo 萤光素酶报告基因检测方法

Add-Mix-Measure

Cells

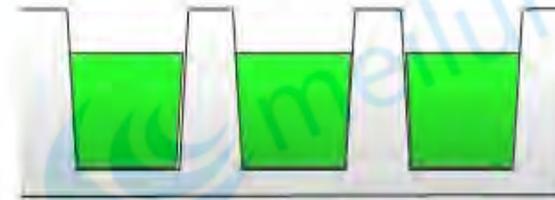


Add Firefly-Glo
Luciferase Reaction Buffer



Mix 5-10min

Measure firefly luminescence



Firefly-Glo发光稳定性以及线性 (MA0519)

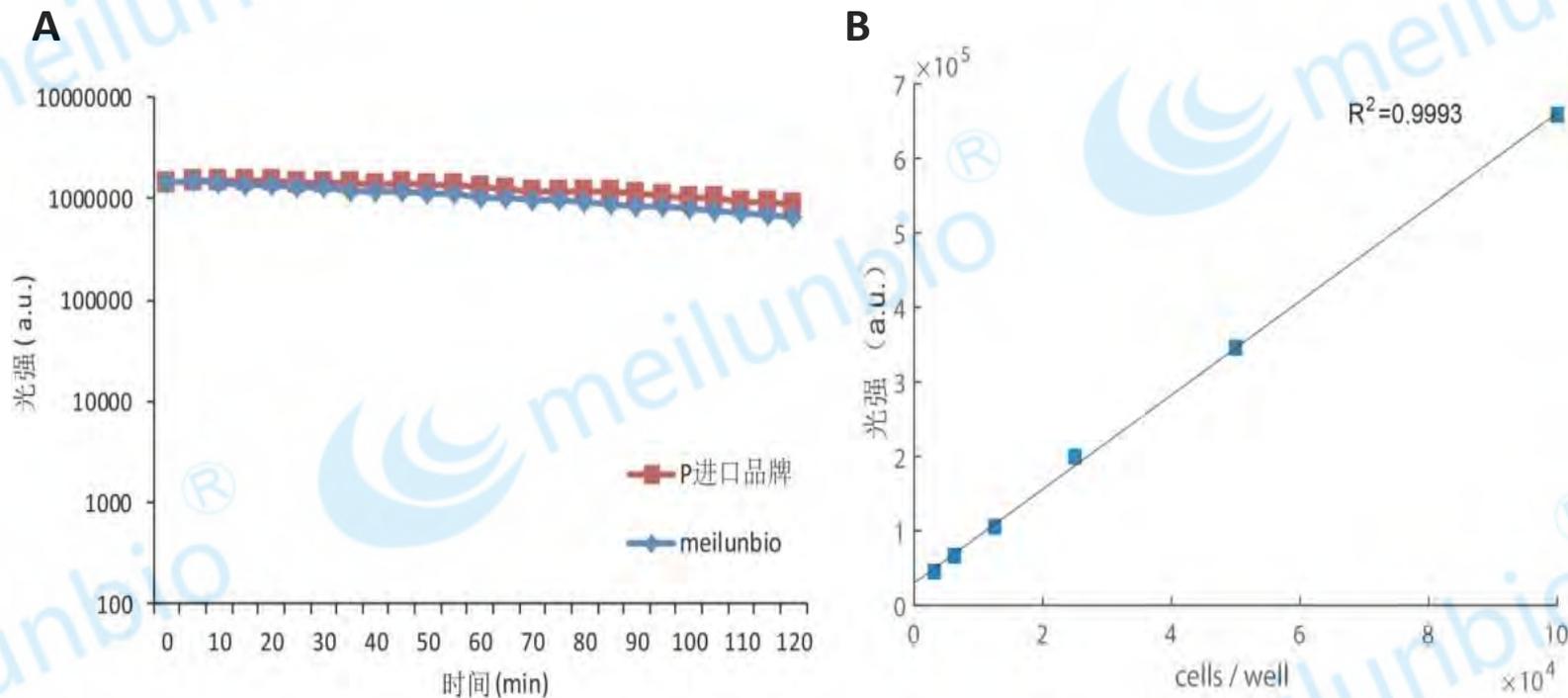


图1. (A)细胞浓度梯度光强稳定性和(B)细胞浓度-光强标曲示例。在细胞培养基环境中，原位追踪检测Firefly Luciferase发光情况。由图可知，荧光稳定性和绝对光强与P进口品牌差异不大；而且，单一时刻光强-细胞数标曲线性良好 ($R^2=0.9993$)。

美仑检测结果对比进口品牌 (MA0519)

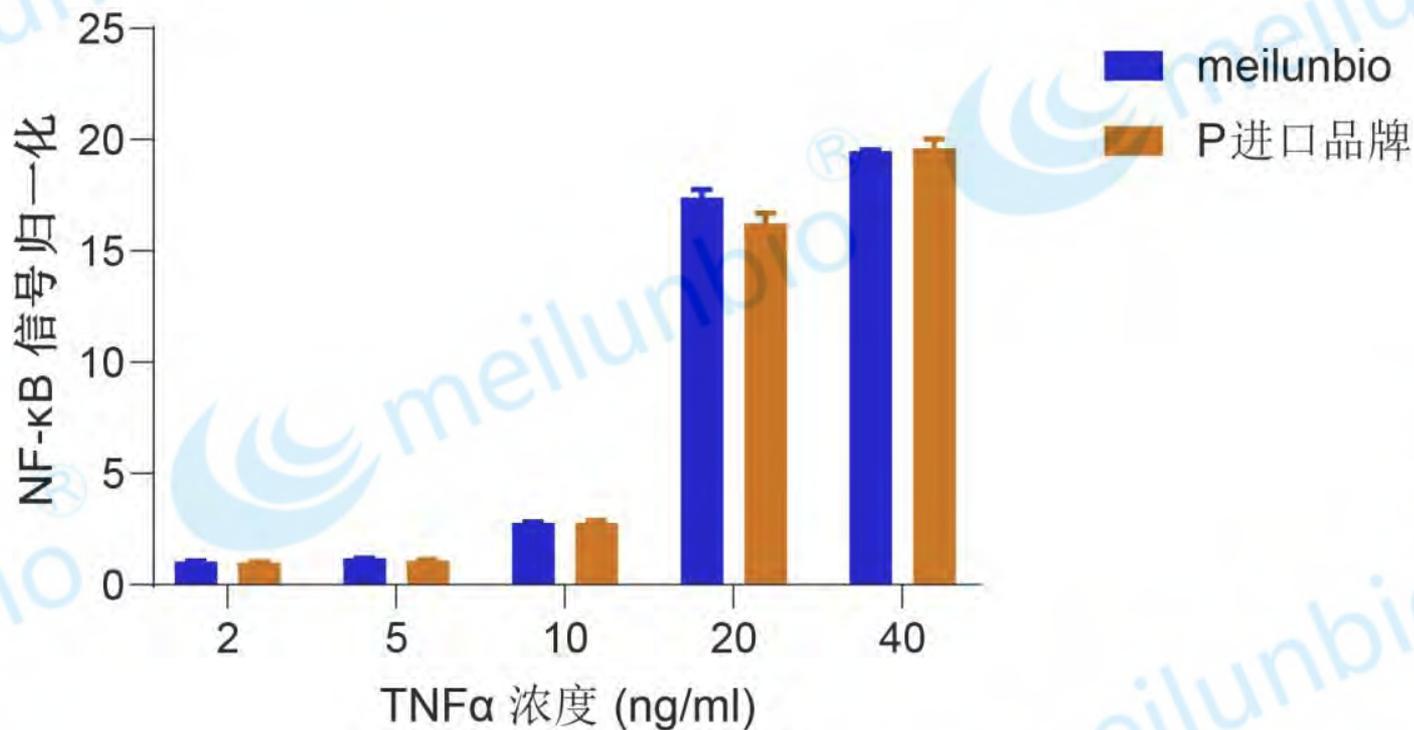
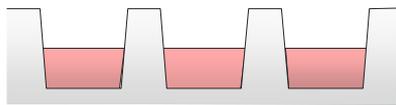


图2. (293T细胞中TNF α 浓度梯度诱导NF- κ B通路检测效果美仑对比P进口品牌。TNF α 浓度梯度诱导NF- κ B通路效果美仑对比P进口品牌，结果无显著性差异。

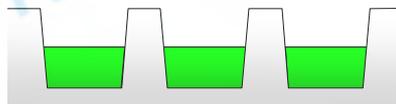
Firefly&Renilla-Glo 双酶检测试剂盒 (原位裂解, 长时稳定)

细胞培养液



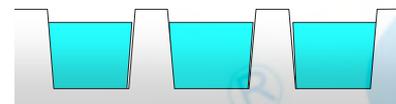
加入萤火虫发光液

Primary reporter:
Firefly bioluminescence



加入海肾发光液

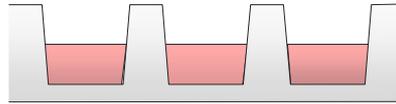
Secondary reporter:
Renilla bioluminescence



半衰期2h, 适用于高通量检测;
但是, 灵敏度不如一代

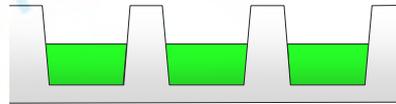
Nano&Firefly-Glo双酶检测试剂盒 (原位裂解, 长时稳定)

细胞培养液



加入萤火虫-Glo发光液

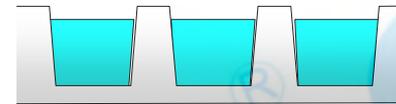
Primary reporter:
Firefly-Glo bioluminescence



半衰期2h, 适用于高通量检测

加入Nano-Glo发光液

Secondary reporter:
Nano-Glo bioluminescence



美仑双酶报告基因实验产品：配套质粒

◇ 萤火虫萤光素酶质粒

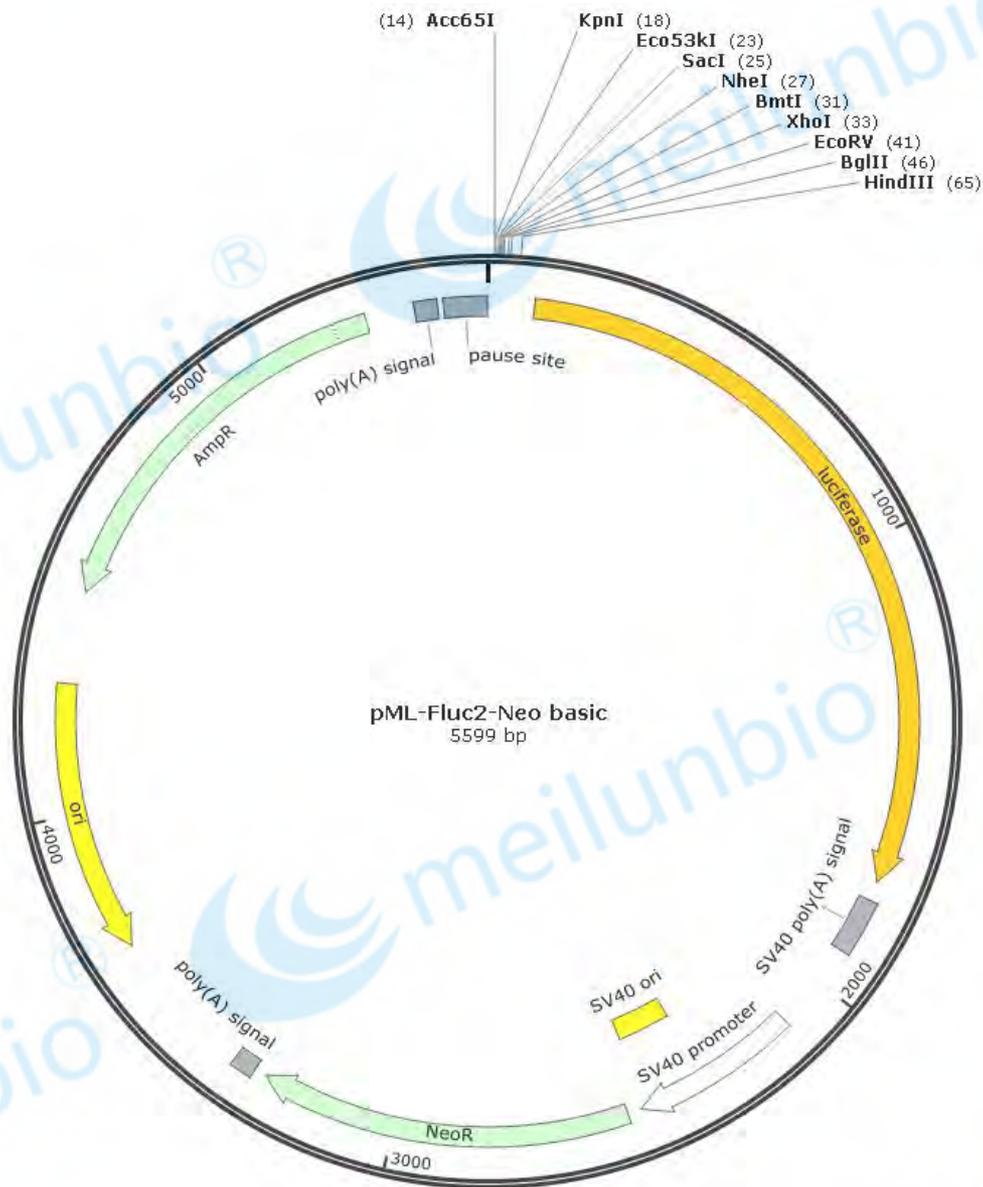
Firefly&Renilla萤火虫双酶组合

◇ 海肾萤光素酶质粒

货号	品名	抗性及用途
MA0500	pML-Fluc2-Neo basic报告基因质粒	Firefly luciferase 空载体 抗性: Amp/真核Neo
MA0501	pML-Fluc2-Neo enhanced报告基因质粒	Firefly luciferase 启动子增强型空载体 抗性Amp/真核Neo
MA0502	pML-TK-hRluc报告基因质粒	中弱型 Renilla 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0503	pML-SV40-hRluc报告基因质粒	中强型 Renilla 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0504	pML-NFkB-Fluc2-Neo enhanced报告基因质粒	NF-κB 报告基因质粒 抗性Amp/真核Neo
MA0509	pML-SV40-Fluc2报告基因质粒	中强型 FireflyLuc 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0510	pML-TK-Fluc2报告基因质粒	中弱型 FireflyLuc 内参载体 抗性Amp/真核无抗

萤火虫萤光素酶系列载体优势

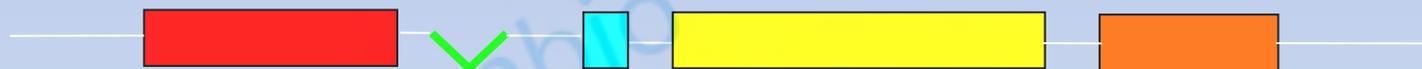
- ◆ 更亮的萤光
- ◆ 更高的灵敏度
- ◆ 提高的应答能力
- ◆ 假性表达的风险性减小
- ◆ 扩展的能力



内对照载体 - 海肾萤光素酶报告基因载体系列

MA0502-
pML-TK-hRluc

HSV TK 启动子 T7 启动子



MA0503-
pML-SV40-hRluc

SV40 早期
增强子/启动子



美仑双酶报告基因实验产品： 配套质粒

◆ Nano荧光素酶质粒

Nano&Firefly萤火虫双酶组合

◆ 萤火虫荧光素酶质粒

货号	品名	抗性及用途
MA0504	pML-NFκB-Fluc2-Neo enhanced报告基因质粒	NF-κB 报告基因质粒 抗性Amp/真核Neo
MA0505	pML-Nanoluc basic报告基因质粒	Nano luciferase 空载体 抗性： Amp/真核无
MA0506	pML-Nanoluc_PEST basic报告基因质粒	Nano luciferase 空载体 带PEST序列 抗性： Amp/真核无
MA0507	pML-CMV-Nanoluc报告基因质粒	强型 NanoLuc 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0508	pML-TK-Nanoluc报告基因质粒	中强型 NanoLuc 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0509	pML-SV40-Fluc2报告基因质粒	中强型 FireflyLuc 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0510	pML-TK-Fluc2报告基因质粒	中弱型 FireflyLuc 内参载体 抗性Amp/真核无抗
MA0511	pML-NFκB-Nanoluc_PEST报告基因质粒	NF-κB 报告基因质粒带PEST序列 抗性： Amp/真核无

荧光素酶上带有的PEST序列

形成不稳定的快速反应的荧光素酶基因

为什么需要快速反应荧光素酶基因？[®]（未带有PEST序列）

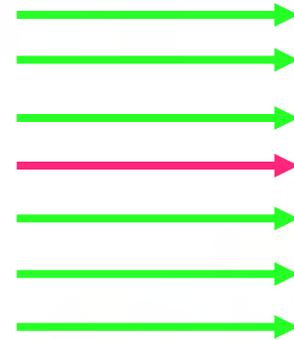
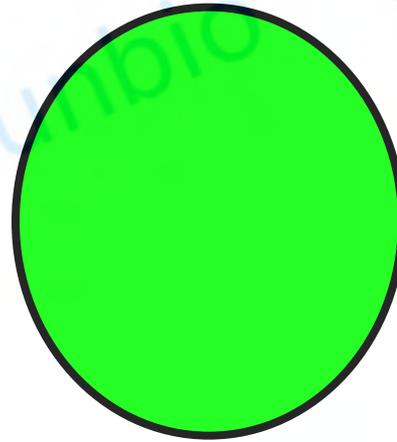
- 想要报告基因应答与细胞事件在时间上更快地耦联
- 需要更强的应答
- 较长的敷衍时间可能导致检测到次级效应(假阳性)

为什么快速应答的报告基因应答性更强？

细胞内报告
基因池

非-快速应答 (未带**PEST**序列)

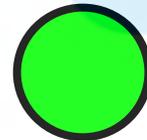
新表达的
报告基因



信号

快速应答 (带有**PEST**序列)

新表达的
报告基因



信号

仪器耗材



GloMax™ 20/20 Single
tube luminometer

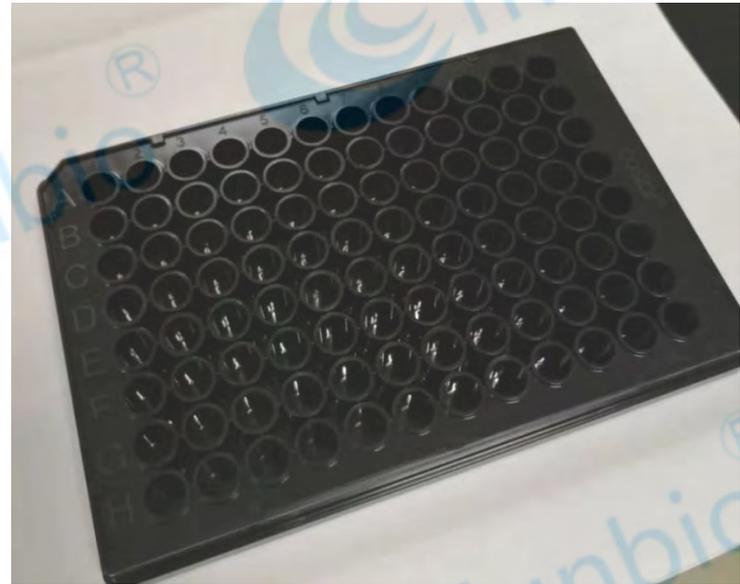


Biotex HTX 多功能酶标仪
(配备自动进样器)

◆ 检测系统

- ◆ 非均质双报告基因检测系统（单管检测通量较低，但是配有自动进样器同样可以适合高通量，自动化检测！）

White or black microplates for luminescence



注意事项

1. 检测仪器选择：能够检测化学发光的仪器都适用本试剂盒的检测，但是针对相同的样品，不同检测器本底信号值和测量值均可能不同，且对于同一样本检测，**不同仪器的数值不可横向比较**。为防止孔间干扰，推荐使用黑色酶标板或不透光白板。
2. 由于发光信号会受到检测环境如培养基组分、温度等影响，所以应确保同组内不同样本**检测条件一致**。
3. 酶促反应对温度较为敏感，加样检测前务必将细胞裂解产物和检测底物均**平衡至室温后使用**。
4. 为保证萤光素酶检测试剂稳定性，**适量分装**后建议-70℃长期避光保存或者短期存放于-20℃不超过一个月，并尽快使用，尽量避免多次反复冻融。
5. 如需同时检测多个细胞培养板，且无自动进样器，建议使用辉光型检测试剂盒。尽量确保每个细胞板加入检测溶液后孵育时间一致，再进行数据读取，以此获得最佳的检测结果。

联系我们

- 销售地址：大连市开发区双D港双D二街75号
- 客服热线：400-659-9898
电话：0411-66771944, 0411-66771943, 66771942, 82593920
- 传真：0411-66771945
电子邮件：sales@meilune.com
企业QQ：4006599898
技术咨询及投诉：support@meilune.com
- 官网：www.meilune.com
- 企业公众微信号：meilune-com



品质深耕，价值臻选！

谢谢！