

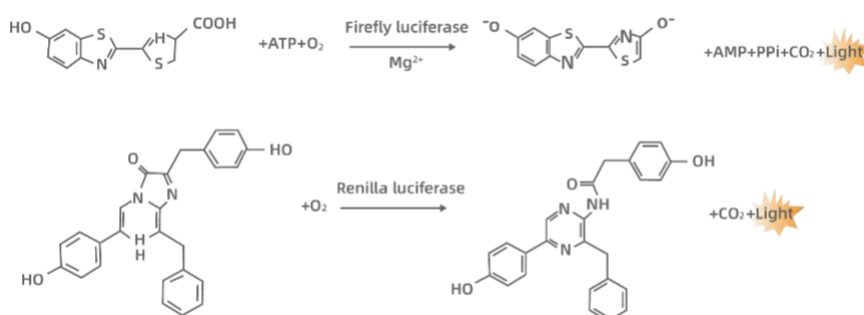
Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Glow type)

双萤光素酶报告基因检测试剂盒（辉光型）

产品简介

萤火虫萤光素酶（Firefly luciferase）是一种分子量约为 61KDa 的蛋白，在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下，能够催化萤光素（luciferin）氧化成 oxyluciferin，在氧化的过程中会发出波长为 560nm 左右的生物荧光。海肾萤光素酶（Renilla luciferase）是一种分子量约为 36KDa 的蛋白，在氧气存在的条件下，可以催化腔肠素（coelenterazine）氧化成 coelenteramide，在氧化的过程中会发出波长为 480nm 左右的生物荧光。两种生物荧光都可通过化学发光仪进行测定。

检测原理如图所示：



Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit (Glow type) 是一种辉光型双萤光素酶报告基因检测试剂盒，先以萤火虫萤光素为底物检测萤火虫萤光素酶，后淬灭其信号，以腔肠素为底物检测海肾萤光素酶，从而实现双萤光素酶报告基因检测。以海肾萤光素酶作为内参，消除了因孔间细胞数量、转染效率不同等造成的影响，使得检测结果更准确。本品灵敏度高，发光信号更稳定，无需依赖自动进样器，无需弃培养液、离心等步骤，简化了实验流程。本试剂盒可用于多种常用细胞培养液：RPMI 1640、DMEM、MEM-a、F12、DMEM/F12 等，其半衰期均为 2h 左右（22℃），满足绝大多数高通量实验需求。

产品规格

货号	N220013S/N220013M
规格	100 T/1000 T

组分信息

组分编号	组分名称	N220013S	N220013M
N220013-A	D-辉光型萤火虫萤光素酶缓冲液	10 mL	100 mL
N220013-B	D-辉光型萤火虫萤光素酶底物	1 vial	1 vial
N220013-C	D-辉光型海肾萤光素酶缓冲液	10 mL	100 mL
N220013-D	D-辉光型海肾萤光素酶底物(100×)	100 μL	1 mL

储存条件

-25~-15℃保存, 有效期 1 年。

注意事项

1. 反应温度: 酶促反应对温度较为敏感, 加样检测前务必将检测试剂以及细胞培养液平衡至室温 (20-25 °C)。
2. 检测仪器: 能检测化学发光的仪器都适用, 但由于不同仪器的设置和灵敏度不同, 测得的光信号值也会不同。
3. 检测板: 为防止孔间干扰, 推荐使用不透光细胞培养白板。
4. 检测设置: Luminescence, 350-700 nm, 建议读板时间设为 0.5-1 sec。
5. 发光信号会受到检测环境如培养基组分、温度等影响, 应确保同组内不同样本检测条件一致。
6. 多个细胞培养板检测时, 请尽量确保每板加入检测溶液后孵育时间一致, 以获得最佳的检测结果。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 需自备的材料

单/多道移液器; 不透光细胞培养白板; 化学发光仪或带化学发光检测模块的酶标仪。

2. 检测试剂准备

- 1) 萤火虫萤光素酶检测试剂: 首次使用时将 D-辉光型萤火虫萤光素酶缓冲液一次性全部倒入 D-辉光型萤火虫萤光素酶底物瓶中, 充分混匀直至底物完全溶解。按使用需求分装, 建议-70℃长期保存或-20℃保存不超过一个月。
- 2) 海肾萤光素酶检测试剂: 根据实际使用量, 以 100:1 的比例将适量的 D-辉光型海肾萤光素酶缓冲液与 D-辉光型海肾萤光素酶底物 (100x) 混匀, 室温避光备用 (例如: 如果需要 100 mL 缓冲液, 则需要加入 1 mL 的底物), 建议现配现用。

【注】两种缓冲液都可以 4℃, 室温或水浴融化, 但温度不能超过 25℃。D-辉光型海肾萤光素酶底物(100x), 每次开盖前需进行短暂低速离心。

3. 操作步骤

- 1) 从细胞培养箱中取出含哺乳动物细胞的培养板, 放置 5-15 min, 平衡至室温。
- 2) 萤火虫萤光素酶活性检测:
 - a. 加入与待测细胞培养液等体积并平衡至室温的萤火虫萤光素酶检测试剂 (例如, 96 孔板建议加入 80 μL 培养液, 相应加入 80 μL 检测试剂; 384 孔板通常加入 20 μL 培养液, 相应加入 20 μL 检测试剂)。
 - b. 在水平摇床上室温混匀至少 10 min。

【注】 不要用移液器吹吸混匀，产生的气泡会影响发光检测读数。

- c. 在化学发光检测仪或带化学发光模块的多功能酶标仪上检测萤火虫萤光素酶发光信号，加入检测试剂后 2 h 内完成检测。

3) 海肾萤光素酶活性检测:

- a. 加入平衡至室温的海肾萤光素酶检测试剂，加样体积与初始细胞培养液体积相同并充分混匀（例如，96 孔板建议加入 80 μ L 培养液，相应加入 80 μ L 检测试剂；384 孔板通常加入 20 μ L 培养液，相应加入 20 μ L 检测试剂）。
- b. 在水平摇床上室温混匀至少 10 min。
- c. 在化学发光检测仪或带化学发光模块的多功能酶标仪上检测海肾萤光素酶发光信号，加入检测试剂后 2 h 内完成检测。海肾萤光素酶在微孔板上的检测顺序应与萤火虫萤光素酶的检测顺序相同。

4) 数据分析:

实验设计：根据不同实验目的，在每个培养板中都应设置空白对照组，实验组和对照组。

a. 空白对照组

背景 F：未转染细胞+萤火虫萤光素酶检测试剂。

背景 R：未转染细胞+萤火虫萤光素酶检测试剂+海肾萤光素酶检测试剂。

【注】 用于空白对照组样品量必须与实验样品量相同，并且包含与实验样品相同的培养基血清组合。

- b. 实验组：转染细胞经实验化合物处理（即实验组 F 和实验组 R）。
- c. 对照组：转染细胞不经处理，用以标准化结果（即对照组 F 和对照组 R）。

计算结果：实验组比值=（实验组 F-背景 F）/（实验组 R-背景 R），对照组比值=（对照组 F-背景 F）/（对照组 R-背景 R）
表达倍数=实验组比值/对照组比值。