

# 双荧光素酶检测试剂盒

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRP025 (50T)	IRP025M (100T)	IRP025L (1000T)	
01	海肾萤光素酶报告基因 细胞裂解液	5mL	10mL	100mL	-20°C
02	海肾萤光素酶检测缓冲液	0.1mL	0.2mL	2mL	-20°C
03	海肾萤光素酶检测底物(100X)	5mL	10mL	100mL	-20°C
04	Luciferase Reaction SubstrateII(50X)	0.1mL	0.2mL	2mL	-20°C
05	Cell Lysis Buffer 1X	25mL	50mL	500mL	-20°C

## 产品简介/Product Description

萤火虫萤光素酶 (firefly luciferase) 和海肾萤光素酶 (Renila luciferase) 可分别催化萤光素 (luciferin) 或腔肠素 (coelenterazine) 氧化形成 oxyluciferin 或 coelenteramide, 并在此过程中产生生物荧光。Double-Luciferase Reporter Assay Kit首先以萤光素为底物检测萤火虫萤光素酶报告基因的活性, 之后在淬灭该荧光反应的同时, 以腔肠素为底物检测海肾萤光素酶报告基因的活性, 具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广、无细胞内源活性干扰等特点。

## 使用流程/Procedure

### 1. 试剂配制

①将 Luciferase Reaction Buffer 与 Luciferase Reaction Buffer II 从 -20°C取出, 恢复至室温, 保证各组分

完全溶解。(注意:LuciferaseReactionBuffer II 如出现沉淀属正常现象,可以 37°C水浴 20min 左右,充分震荡溶解后即可使用。

②按 1:49 的比例将 Luciferase Reaction Substrate 同 Luciferase Reaction Buffer 混合,于 30min 内检测裂解物(最好现配现用),剩余试剂建议 -20°C或 -70°C避光保存。

③LuciferaseReactionReagent II 按 1:49 的比例将 Luciferase Reaction Substrate II 同 Luciferase Reaction Buffer II 混合,于 30min 内检测裂解物(最好现配现用),剩余试剂建议 -20°C或 -70°C避光保存。

**注意:**

1. Luciferase Reaction Buffer II 在溶解过程中可能有部分沉淀析出,使用前应充分需荡或将其置于 37°C水浴锅中,保证其完全溶解后再使用。

2. Luciferase Reaction Reagent 和 Luciferase Reaction Reagent II 反应前需平衡至室温。浴消化期间,每隔 5min 轻弹离心管底部使磁珠悬浮;

## 2. 样品处理

动物细胞:

贴壁细胞:去除细胞培养基,用 1XPBS 小心润洗两次,加入适量 Cell Lysis Buffer,室温充分裂解 10 分钟后,刮取细胞于 1.5mL 离心管中。

悬浮细胞:收集细胞,300xg 离心 5 分钟,去除培养基。加入适量 Cell Lysis Buffer,吹打混匀,室温充分裂解 10 分钟。裂解完成后,2-8°C,12,000xg 离心 10 分钟,取上清待检测。

②植物叶片:

取 3-4 片直径为 6-8 mm 的烟草叶片放入 2 mL 的 EP 管中,同时加入预冷的 3-4 个小钢珠,并加入适量的液氮,使用破碎机进行研磨破碎;或取 3-4 片直径为 6-8mm 的烟草叶片放入研钵中,加入适量液氮,用研磨杵研磨破碎。破碎完成后,成粉末状,加入 300 $\mu$ L Cell Lysis Buffer(1 个叶片对应 100 $\mu$ L 裂解液)。吹打混匀,室温充分裂解 5 分钟。2-8°C,12,000xg 离心 2 分钟,取上清待检测。

③原生质体:

收集原生质体,计数,300xg 离心 5 分钟,去除上清。按照 105 原生质体 /100 $\mu$ L Cell Lysis Buffer 加入裂解液,吹打混匀,室温充分裂解 10 分钟。2-8°C,12,000xg 离心 2 分钟,取上清待检测。

## 3. 荧光检测

吸取 10~20 $\mu$ L 裂解物至不透明 96 孔板中,将 100 $\mu$ L 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent 加入板中,水平震荡混匀,于化学发光仪 (luminometer) 中上机 350~700 nm 测发光值,检测时间 1sec,检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性(如果读值封顶建议降低裂解物体积)。之后吸取 100 $\mu$ L 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent II 加入上述反应管或板中,水平震荡混匀,于化学发光仪中上机 380~780nm 测发光值,检测时间 1sec,检测海肾荧光素酶报告基因的活性。结果计算:萤火虫荧光读值 / 海肾荧光读值。

## 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用,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;
2. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

