www.bioss.com.cn
sales@bioss.com.cn
techsupport@bioss.com.cn
400-901-9800

双萤光素酶报告基因检测试剂盒
Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

产品编号： C6289

保存条件： -20°C & -80°C避光保存，一年有效。

产品介绍： 产品组成：

组分序号	组分名称	规格	保存条件
C6289-A	1× Passive Luciferase Lysis Buffer	10ml	-20°C Protect from light 1 year
C6289-B	Firefly Luciferase Assay Buffer	10ml	-20°C Protect from light 1 year
C6289-C	D-Luciferin	2mg	-80°C Protect from light 1 year
C6289-D	Renilla Luciferase Assay Buffer	10ml	-20°C Protect from light 1 year
C6289-E	Coelenterazine	400ug	-80°C Protect from light 1 year

保存条件：最好在-80℃保存。将C组分溶解到B组分后，该混合液不可反复冻融，建议进行小批量分装，并于-20℃(最长可储存1个月)或-80℃（最长可储存1年）条件下储存。Renilla Luciferase Assay solution（D+E）应新鲜配制，当天使用。

产品介绍：

双萤光素酶报告基因检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit)，是先以萤光素(luciferin)为底物来检测萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase)，后以肠腔素(coelenterazine)为底物来检测海肾萤光素酶(Renilla luciferase)，并且在后续加入海肾萤光素酶底物时，同时加入抑制萤火虫荧光素酶催化luciferin发光的物质，使后续检测仅仅检测到海肾萤光素酶的活性，实现双萤光素酶报告基因检测。

萤火虫萤光素酶是一种分子量约为61kD的蛋白，在ATP、镁离子和氧气存在的条件下，可以催化luciferin氧化成oxyluciferin，在luciferin氧化的过程中，会发出生物萤光(bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量约为36kD的蛋白，在氧气存在的条件下，可以催化coelenterazine氧化成coelenteramide，在coelenterazine氧化的过程中也会发出生物萤光。生物萤光可以通过化学发光仪(luminometer)或液闪测定仪进行测定。本试剂盒的检测原理参考下图.

Bioluminescent reactions catalyzed by firefly luciferase and Renilla luciferase.

双萤光素酶报告基因检测试剂盒为检测基因的表达量提供有效的手段，在DLR检测中，萤火虫萤光素酶（Firefly luciferase）和海肾萤光素酶（Renilla luciferase）的活性可在单个样品中依次检测。先以萤光素（Luciferin）为底物来检测萤火虫萤光素酶的活性，然后加入抑制萤火虫萤光素酶催化的物质，同时加入腔肠素（Coelenterazine）

Important Note: This product as supplied is intended for research use only, not for use in human, therapeutic or diagnostic applications.

检测海肾萤光素酶的活性，实现双萤光素酶报告基因检测。通过萤光素酶和其底物这一生物发光体系，可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。通常把感兴趣基因的转录调控元件或 5’ 启动子区克隆在Luciferase 的上游，或把3'-UTR 区克隆在Luciferase 的下游，构建成报告基因（Reporter gene）质粒，然后转染细胞，用适当药物等处理细胞后裂解细胞，通过检测萤光素酶活性的高低来判断药物处理等对目的基因的转录调控作用。海肾萤光素酶更多地被用作检测转染效率的内参，以消除细胞数量和转染效率的差异。

萤火虫萤光素酶催化luciferin发光的最强发光波长为560nm。海肾萤光素酶催化coelenterazine发光的最强发光波长为465nm。

本试剂盒的光信号可以通过化学发光仪、酶标仪或液闪测定仪进行测定。该试剂盒具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广，无细胞内源活性干扰等特点。

使用说明：

1. 裂解细胞：

将报告基因细胞裂解液充分混匀后，按如下方式加入报告基因细胞裂解液，充分裂解细胞。

1.1） 对于贴壁细胞：吸尽细胞培养液后，参考下表加入适量的报告基因细胞裂解液；对于悬浮细胞：离心去上清后，参考下表加入适量报告基因细胞裂解液。

Cell Culture Plate	96-well plates	48-well plates	24-well plates	12-well plates	6-well plates
Lysis Buffer (A) uL/per well	20ul	65ul	100ul	250ul	500ul

注：裂解产物可室温保存 6 h，-70°C可长期存放(裂解产物不能反复冻融)；

注：如果萤光素酶的表达水平比较低，可以尝试使用更少的裂解液，例如6孔板的每孔用量可以最小为100微升。

1.2）充分裂解后，10,000-15,000g离心3-5分钟，取上清用于测定。

注：细胞裂解后可以立即测定萤光素酶，也可以先冻存，待以后再测定。冻存样品需融解，并达到室温后再进行测定。

2. Preparation of Firefly Working Solution

2.1）将所有组分恢复至室温。

2.2）配置10 mg/mL D-luciferin储存液。2mg组份E溶解在200uL超纯水中。储存液-20℃可以储存6个月反复冻融5次。

2.3）工作液配置 ：用组分 B 按照1:50稀释以上D-luciferin储存液，配制成 0.2 mg/mL 的萤火虫萤光素酶工作液。

注：萤火虫萤光素酶工作液不能反复冻融超过5次，若单次实验用量较少，建议按单次使用量分装成小规格。

3. Preparation of Renilla Working Solution

3.1） 将所有组分恢复至室温。

3.2）配置2 mg/mL Coelenterazine储存液。400ug组份C溶解在200uL超纯水中。储存液-20℃可以储存3个月反复冻融5次。

3.3）工作液配置 ：用组分 D 按照1:50稀释以上coelenterazine储存液，配制成 0.04 mg/mL 的1x coelenterazine工作液。

注：1×Coelenterazine工作液现配现用，配置后在3小时内使用。

Important Note: This product as supplied is intended for research use only, not for use in human, therapeutic or diagnostic applications.

4. 化学发光值检测

4.1）按仪器操作说明书开启具有检测化学发光功能的仪器如酶标仪。

4.2）每个样品测定时，取样品 20-100uL(如果样品量足够，请加入 100 μL；如果样品量不足可适当减少用量，但检测孔用量需保持一致）。1× Lysis Buffer为空白对照。

4.3）加入 100uL萤火虫萤光素酶检测液，用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU（relative light unit）值。

注：由于该发光为瞬时发光，建议加入萤火虫萤光素酶工作液后，立即进行检测。

4.4）加入 100uL 1× Coelenterazine 工作液，用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU（relative light unit）值。

4.5）在以海肾萤光素酶为内参的情况下，用萤火虫萤光素酶测定得到的 RLU 值除以海肾萤光素酶测定得到的 RLU 值。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。如果以萤火虫萤光素酶为内参，也可以进行类似计算。

注意事项：

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。

3. 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。

4. 为了您的安全和健康，本产品须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！