

Dual-Luc Luciferase Reporter Gene Assay Kit

Dual-Luc 双萤光素酶报告基因检测试剂盒（预混）

产品编号	产品名称	规格
BL1609A	Dual-Luc双萤光素酶报告基因检测试剂盒（预混）	100T
BL1609B	Dual-Luc双萤光素酶报告基因检测试剂盒（预混）	1000T

产品简介:

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，会发出波长为 560nm 左右的生物萤光。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，可以催化腔肠素氧化成 coelenteramide，在腔肠素氧化的过程中会发出波长为 480nm 左右的生物萤光。生物萤光可以通过化学发光仪或液闪测定仪进行测定。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 的下游等，构建成报告基因质粒。然后转染细胞，用适当药物等处理细胞后裂解细胞，测定萤光素酶活性。通过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。海肾萤光素酶相对更多地被用作转染效率的内参，以消除细胞数量和转染效率的差异。在加入 Dual-Lumi 海肾萤光素酶检测工作液的同时，可以充分终止萤火虫萤光素酶催化的化学发光反应。

Dual-Luc 双萤光素酶报告基因检测试剂盒是一种无需洗涤或收集细胞的用化学发光法先后直接测定细胞内萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的高灵敏度、高信号稳定性的双萤光素酶报告基因检测试剂盒。本试剂盒提供的 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂和经配制的 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测试剂，按照与培养液等体积的比例分别加入到细胞培养板内反应 10 分钟，即可进行两次化学发光检测。本试剂盒使用灵活便捷、检测灵敏度高、测定样品的线性范围宽，性能优越。另外，本产品也可以用于裂解并收集保存的细胞样品的检测。

产品特点:

操作简单，读数稳定，检测速度快，完成整个检测流程仅需约 20 分钟：本产品比其它双萤光素酶测定方法更加简单快捷，细胞可以在同一块多孔板中培养和检测，无需洗涤细胞，无需更换或去除培养液，也无需裂解和收集细胞样品，只需把试剂盒提供的 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂及 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物和 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液按照 1:100 的比例混合配制成 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液，再先后与培养的细胞等体积混合，每次反应 10 分钟后即可进行化学发光检测。并且化学发光非常稳定，在反应开始后的 30 分钟内，萤火虫萤光素酶的信号下降不超过 20%，海肾萤光素酶的信号下降不超过 30%，反应至 60 分钟两种萤光素酶均可保持 60%以上的信号。

稳定性好：本试剂盒中的 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂、Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液和 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)的稳定性均较好。Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂反复冻融 5

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。



次对检测效果基本无影响，反复冻融 10 次检测效果下降不超过 5%；4℃保存 1 天检测效果下降不到 10%，4℃保存 3 天检测效果下降不超过 30%；室温保存 1 天可保留 75%以上的检测效果，室温保存 3 天可保留 50%以上的检测效果；37℃保存 1 天可保留 60%以上的检测效果。Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液反复冻融 10 次检测效果下降不到 10%，4℃和室温保存 3 天、37℃保存 1 天，对检测效果的影响均不超过 5%。Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)在 4℃保存 1 周、室温保存 1 天检测效果下降不到 10%，室温保存 3 天、37℃保存 1 天，仍可保留 80%以上的活力。

使用灵活便捷：本产品不仅适合少量样品的检测，也非常适合大量样品的高通量检测。本产品可以等体积加入到细胞培养孔中进行直接检测。

兼容性强：本产品兼容各种常见培养液，正常培养液中的酚红、10%以内的胎牛血清或小牛血清、2%以内的 DMSO 或乙醇对信号和稳定性基本没有影响，常用的盐类或金属离子在正常浓度下也基本没有影响。

产品组分：

产品编号	产品名称	BL1609A	BL1609B
1	Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂	10ml	100ml
2	Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液	10ml	100ml
3	Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)	100μl	1ml

使用方法：

一、细胞的准备

使用适合进行化学发光检测的 96 孔板，每孔接种 100μl 细胞(如使用 384 孔板，每孔接种 25μl 细胞，具体用量视不同类型的 384 孔板而定)，同时设置不含细胞的培养液孔作为阴性对照，按照细胞培养和细胞转染的常规方法培养和转染细胞。如有需要，可加入药物处理细胞。

二、检测试剂的准备

融解 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂和 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液，并达到室温。Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)置于冰浴或冰盒上备用，按照检测每个样品需 100μl Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液的量，配制适量 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液。按照 1:100 的比例混合适量的 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)和 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液，即配制成 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液。例如，5ml Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液中加入 50μl Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)充分混匀后即可配制成约 5ml Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液。

注意：严格来说 100×底物需要按照 1:99 进行稀释和配制，为便于计算和操作，按照 1:100 进行操作也可以获得一致的检测效果。

三、萤光素酶检测

1、萤火虫萤光素酶的检测

- (1) 取出细胞培养板在室温平衡 10 分钟（通常不宜超过 30 分钟）。
- (2) 96 孔板每孔加入 100μl Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂（384 孔板每孔 25μl），混匀。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



(3) 室温（约 25℃）孵育 10 分钟，使发光信号趋于稳定。

(4) 使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。请根据仪器要求设置相应的参数，每个孔的检测时间一般为 0.25-1 秒或更长时间，具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。

2、海肾萤光素酶的检测

(1) 96 孔板每孔加入 100μl Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液（384 孔板每孔 25μl），混匀。

(2) 室温（约 25℃）孵育 10 分钟，使发光信号趋于稳定。

(3) 使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。

3、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。

四、裂解并收集细胞后的检测（本步骤仅当细胞量比较大的情况下，例如细胞培养在培养皿或 6 孔板中时，可以考虑采用）

1、对于贴壁细胞：吸尽细胞培养液后，参考下表加入适量的萤火虫萤光素酶报告基因细胞裂解液；

对于悬浮细胞：离心去上清后，参考下表加入适量萤火虫萤光素酶报告基因细胞裂解液。

器皿类型	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
报告基因细胞裂解液(μl/孔)	100	150	200	300	500

注意：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 100μl。

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

注意：细胞裂解后可立即测定萤光素酶，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。

3、取 20μl 样品，加入 100μl 已经平衡至室温的 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂，适当混匀。

4、室温（约 25℃）孵育 5 分钟，使发光信号趋于稳定。

注意：如果对于数据的稳定性的要求不太高，可以忽略本步骤，在混匀后立即进行化学发光检测。

5、使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。请根据仪器要求设置相应的参数，每个孔的检测时间一般为 0.25-1 秒或更长时间，具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。

6、加入 100μl 已经平衡至室温的 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液，适当混匀。

7、使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。

注意事项：

1、本试剂盒中的 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂在 -20℃ 保存其检测效果会逐渐下降，保存半年后其发光效果会降低约 40%。因此，本产品如果保存于 -20℃，推荐在 3-6 个月内使用。

2、由于萤光素酶的活性对温度比较敏感，所以反应前细胞、Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂及 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液均需达到室温后再进行测定。可将检测试剂和检测缓冲液在室温或不超过 25℃ 的水浴中融解并混匀后使用。

3、尽管经测试 Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂反复冻融 5 次对于检测效果无显著影响，为保证本产品的稳定性、取得良好的使用效果，第一次解冻后可以采取适当分装后避光保存的方法，以避免反复冻融和长时间暴露于室温。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



4、Dual-Luc 萤火虫萤光素酶检测试剂和 Dual-Luc 海肾萤光素酶检测缓冲液在反复冻融过程中，可能会导致检测试剂中出现少量沉淀，此时宜平衡至室温，并尽量溶解。如仍有残留的不溶物，可以离心去除后使用，经测试不会影响后续的检测效果。

5、请使用适合于细胞培养的白色或黑色的 96 孔板或 384 孔板。如果使用普通透明的 96 孔板或 384 孔板，相邻孔之间会产生相互干扰。

6、Dual-Luc 海肾萤光素酶检测底物(100×)配制在含有高浓度乙醇的溶液中。由于乙醇容易挥发，有时会在初次使用时发现体积明显小于所标示的包装体积 100μl 或 1ml 的情况，此时用无水乙醇把体积补足至 100μl 或 1ml，并混匀后即可使用。

7、Dual-Luc 海肾萤光素酶检测工作液宜配制后立即使用。如不能立即使用，-20℃可以保存一周。随着保存时间的延长检测效果会不断下降，因此不可配制成工作液后长期保存。

8、待测药物的溶剂含量较高时可能会干扰萤光素酶反应，从而影响化学发光信号。可以通过设置含有溶剂的细胞培养液对照孔排除溶剂的干扰。经测试，最终反应体系中 DMSO 含量在 2%以内不会对反应产生影响。

9、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。

10、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

-80℃避光保存，一年有效。

