

Dual Luciferase Reporter Assay Kit

DL101-01

Version 10.2



Vazyme biotech co., Ltd.

产品概述

Dual Luciferase Reporter Assay Kit用于通过报告质粒转染细胞后检测Luciferin底物荧光强度以反映Luciferase表达量的方法，检测基因调控作用。先以萤光素(Luciferin)为底物检测萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)，后以腔肠素(Coelenterazine)为底物检测海肾荧光素酶(*Renilla* luciferase)，同时抑制Firefly luciferase的催化反应，实现双荧光素酶报告基因检测。Dual Luciferase Reporter Assay Kit可灵敏高效地检测受基因元件调控的Luciferase表达，通常将转录调控元件克隆于Luciferase的上游，或把3'UTR调控区克隆于Luciferase下游，转染细胞后进行相应的刺激物诱导，裂解细胞并测定荧光素酶活性。通过荧光素酶活性评价调控元件受刺激物诱导的作用强弱。*Renilla* luciferase作用为校正转染效率的内参，以消除孔间细胞数量和转染效率的差异。萤火虫荧光素酶催化Luciferin发光波长为560 nm，海肾荧光素酶催化Coelenterazine发光波长为465 nm。

产品组分

组 分	DL101-01 100 rxn (100 µl/rxn)
5 × Cell Lysis Buffer	10 ml
Reaction Buffer II (Luciferase)	10 ml
Luciferase Substrate (Lyophilized)	1 vial
Stop & Reaction Buffer	10 ml
<i>Renilla</i> Substrate	200 µl

保存条件

试剂盒-30 ~ -15°C保存；运输条件：≤0°C；

溶解分装后的Reagent可于-70°C以下长期保存，或-20°C短期保存不超过一个月；

Stop & Reaction Buffer可于2 ~ 8°C长期保存。

实验准备和指南

自备材料

PBS；移液器或排枪；酶标板(黑色)；Luminometer发光检测计或全波长酶标仪。

使用指南

- 首次使用时将Reaction Buffer II (Luciferase)全部倒入含有冻干底物的Luciferase Substrate棕色避光瓶中，充分混匀后按使用需求分装并避光保存于-70°C；
- 每次使用前以1:4的比例将5 × Cell Lysis Buffer与ddH₂O充分混合，置于冰上备用；
- Renilla* Substrate溶解于无水乙醇中，首次使用时请短暂离心，小心量取管内溶液体积，如发现液体体积有明显减少，请加入无水乙醇补足体积后保存；
- 使用时将*Renilla* Substrate于冰上暂存，计算实际使用量，以50:1的比例将适量的Stop & Reaction Buffer和*Renilla* Substrate混匀，室温避光备用；
- 酶促反应对温度较为敏感，因此加样检测前需将细胞裂解产品和检测底物液均平衡至室温后使用；
- 检测仪器选择：能够检测化学发光的仪器都适用于本试剂盒的检测，但针对同一样品，不同检测仪器的本底信号值和测量值均可能不同，因此需在预实验中检测仅加入荧光底物的本底信号，且对于同一样品的检测，不同仪器的数值不可横向比较。若使用全波长酶标仪进行检测，为防止孔间干扰，推荐使用不透明酶标板，且检测孔间有一定间隔。

实验流程

1. 细胞裂解

吸弃细胞培养基，用PBS洗涤两次，按下表建议加入适量1 × Cell Lysis Buffer，室温静置或振荡裂解5 min，吹打并吸取细胞裂解产物至1.5 ml离心管中，12000 g常温离心2 min，取上清用于后续检测。

Cell Culture Plate	1 × CLB
6-well	500 μ l
12-well	200 μ l
24-well	100 μ l
48-well	50 μ l
96-well	20 μ l

▲ 如果荧光素酶的表达水平过低，可适当减少裂解液的使用量以提高蛋白浓度。

2. Firefly luciferase反应检测

将100 μ l平衡至室温的Luciferase Substrate加入检测管或酶标板中，小心吸取20 μ l细胞裂解上清至检测管或酶标板孔中，迅速混匀后立即于荧光检测仪(luminometer)或酶标仪中检测 Firefly luciferase报告基因活性。

3. Renilla Luciferase反应检测

在以上反应液中加入100 μ l新鲜配制的Renilla substrate工作液，迅速混匀后立即于荧光检测仪(luminometer)或酶标仪中检测Renilla luciferase报告基因活性。

注意事项

1. 对于不同的细胞株，最适的裂解时间可能不同，推荐从5 min开始，可延长至10 min以得到更充分的裂解效果。裂解完成后吹打细胞不宜过久，以防产生大量泡沫影响酶活性。
2. 如果体系中荧光素酶表达量较低，可适当减少裂解液用量以提高蛋白浓度，同时应增加检测复孔的数量，以减少低浓度表达造成的孔间差异，确保结果的可靠性。
3. 通常加入Stop & Reaction Buffer后对下一步Firefly荧光素酶的抑制可达到99%以上，但可能残留微量活性，因此在转染时需将Renilla luciferase的表达量控制在其RLU读值与Firefly luciferase相当或略高的水平。
4. 裂解产物与底物接触后约一分钟内荧光强度较为稳定，为取得最佳检测结果，在使用单管的化学发光仪检测时，不同样品和底物混合后至上机检测的时间间隔应尽量一致；使用全波长酶标仪时，应先把细胞裂解液在孔内加好，然后统一加入检测底物并尽快上机检测。测定时间根据荧光值的强弱可设定在1 - 10 sec区间内，增加检测时长会同时增加样本和本底的荧光读值。



ISO 9001: 2015