

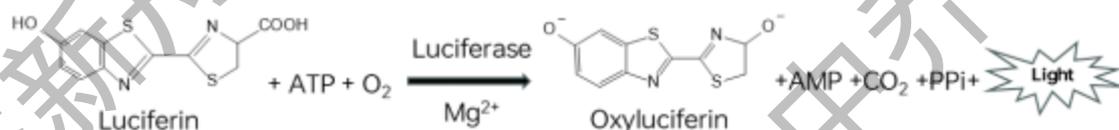
## 双萤光素酶报告基因检测试剂盒 说明书

名称	双萤光素酶报告基因检测试剂盒
英文	Dual luciferase reporter gene detection kit
货号	CSP252
规格	100T
保存	长期-20°C保存 12个月
用途	仅供科研使用

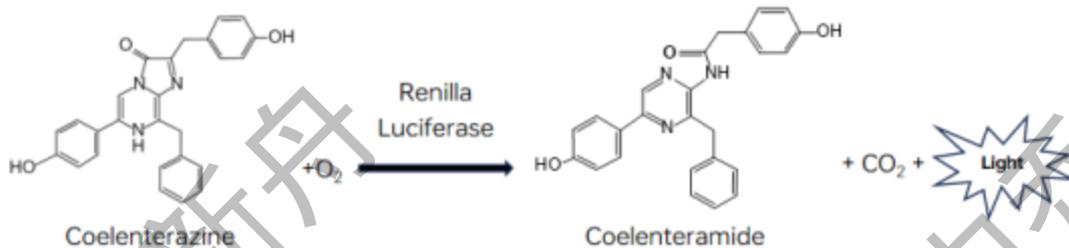
### 【产品描述】

本产品将萤火虫萤光素酶检测试剂直接加入细胞培养物中，使细胞裂解，并提供萤火虫萤光素酶底物，产生的光信号半衰期通常可达 30min。后加入海肾萤光素酶检测试剂终止萤火虫萤光素酶反应的发光(终止效率>10,000倍)，并提供海肾萤光素酶底物，产生的光信号也可在 30min 内读取。此外，海肾萤光素酶作为校正转染效率的内参，消除了因孔间细胞数量、转染效率，以及细胞生长状态不同而造成的影响，使得检测结果的准确性更高。

本品内含有高纯度萤火虫萤光素酶底物和海肾萤光素酶底物（腔肠素 h），可同时用于萤火虫萤光素酶报告基因和海肾萤光素酶内参基因的检测。其中萤火虫萤光素酶是从甲虫（*Photinus pyralis*）中分离得到，分子量为 61kDa；在 ATP、O<sub>2</sub>、Mg<sup>2+</sup>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 560 nm 左右的生物荧光。



海肾荧光素酶 (Renilla Luciferase) 则是从海肾 (*Renilla reniformis*) 中分离, 分子量为 36kDa。仅需要  $O_2$  的存在下, 即可催化腔肠素 (coelenterazine) 氧化成 coelenteramide, 从而发出 480 nm 左右的生物荧光。



### 【组成成分】

组份编号	组分名称	100T
CSP252-A	萤火虫荧光素酶检测底物	1vial
CSP252-B	萤火虫荧光素酶检测缓冲液	10mL
CSP252-C	海肾荧光素酶检测底物(100X)	100μL
CSP252-D	海肾荧光素酶检测缓冲液	10mL

### 【操作说明】

#### 一、准备试剂:

1. 融化: 将萤火虫荧光素酶检测缓冲液置于 2~8°C 或室温条件下融化, 也可将本品放置于 20°C 水浴融化, 但需要注意水温不可超过 25°C。
2. 将融化的萤火虫荧光素酶检测缓冲液全部倒入萤火虫荧光素酶检测底物中, 温和颠倒 3-5 次, 配置成萤火虫荧光素酶检测试剂。
3. 海肾荧光素酶检测试剂准备: 计算实验所需的检测试剂体积。将海肾荧光素酶检测底物按 1:100 稀释到相应体积的海肾荧光素酶检测缓冲液中, 并轻柔颠倒混匀。(例如: 制备 5mL 的海肾荧光素酶检测试剂检测试剂时, 可将 50 μl 海肾荧光素酶检测底物加入到 5 ml 海肾荧光素酶检测缓冲液中。)

注意: 使用前, 确保萤火虫荧光素酶检测试剂以及海肾荧光素酶检测试剂已平衡至室温, 若萤火虫荧光素酶检测试剂保存于 -20°C 或 -70°C, 融化后, 需轻柔颠倒混匀 3-5 次后使用。

## 二、检测步骤

1. 于培养箱中取出待测细胞培养板，室温放置 30 min，以使培养板温度平衡至室温。
2. 检测萤火虫荧光素酶活性：加入与待测细胞培养物等体积的萤火虫荧光素酶检测试剂，并混合均匀。（例如：使用 96 孔培养板时，将 75  $\mu$ l 试剂添加到 75  $\mu$ L 培养物中。使用 384 孔培养板时，将 20  $\mu$ L 试剂添加到 20  $\mu$ L 培养物中。）
3. 室温放置 5 min，检测萤火虫荧光素酶发光。
4. 检测海肾荧光素酶活性：加入与原始待测细胞培养物等体积的海肾荧光素酶检测试剂，并混合均匀。（例如：使用 96 孔培养板时，将 75  $\mu$ l 试剂添加到待测培养物中。使用 384 孔培养板时，将 20  $\mu$ l 试剂添加到待测培养物中。）

注意：应在添加萤火虫荧光素酶检测试剂的 30min 内将海肾荧光素酶检测试剂添加到平板孔中。

5. 室温放置 5 min，检测海肾荧光素酶发光。

注意：应按照与测量萤火虫发光相同的板顺序来测量海肾发光。

## 三、数据分析

在计算结果时，为了确保准确性，萤火虫和海肾荧光素酶的发光值都应减去相应的背景值。

背景 Firefly: 未转染细胞+萤火虫荧光素酶检测试剂

背景 Renilla: 未转染细胞+萤火虫荧光素酶检测试剂+海肾荧光素酶检测试剂

注意：用于背景测量的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。

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

未转染细胞，用以背景扣除（即背景 Firefly 和背景 Renilla）

实验组：转染细胞经实验化合物处理（即实验组 Firefly 和实验组 Renilla）

对照组：转染细胞不经处理，用以标准化结果（即对照组 Firefly 和对照组 Renilla）

$$\text{最终结果} = \frac{(\text{实验组 Firefly} - \text{背景 Firefly}) / (\text{实验组 Renilla} - \text{背景 Renilla})}{(\text{对照组 Firefly} - \text{背景 Firefly}) / (\text{对照组 Renilla} - \text{背景 Renilla})}$$

### 【注意事项】

1、低温保存可降低萤火虫萤光素酶检测试剂的活性损失，切勿在高于 25℃ 的温度下融化混合后的检测试剂，建议使用前可将其至于 20℃ 水浴一段时间以平衡至室温。使用时，仅准备实验所需量的海肾萤光素酶检测试剂，以确保获得最佳结果，海肾萤光素酶检测试剂需现配现用；

2、发光的强度以及衰减速率取决于萤光素酶的反应速率。温度对酶反应速率有直接影响，两种萤光素酶活性的最适温度约为室温 (20~25℃)，因此，检测时将试剂与待测培养物平衡至室温非常重要；

3、长期储存 -20℃ 可保存 12 个月。混合前萤火虫萤光素酶检测缓冲液可在 2~8℃ 长期保存，萤火虫萤光素酶检测底物可在 2~8℃ 保存 30 天；混合后可在 2~8℃ 保存一天，-25~-15℃ 保存 14 天，仍有 >90% 的活性，反复冻融 10 次不影响使用，长期不用请置于 -80℃ 保存更佳。

海肾萤光素酶检测试剂需要现配现用；

4、注意无菌操作，避免污染；

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；

6、仅供科研使用。