**Dual-Luciferase Reporter Assay Kit**

**Cat.No.MG5520**

**Technical literature is available at:** [**www.mesgenbio.com**](http://www.mesgenbio.com)**. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com**

**产品说明**

萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase)和海肾萤光素酶(Renilla Luciferase)可分别催化荧光素 (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。Dual -Luciferase Reporter Assay Kit首先以荧光素为底物检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性，之后在淬灭该荧光的同时，以腔肠素为底物检测海肾荧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。

**产品特点**

* 使用萤火虫萤光素酶及海肾荧光素酶双萤光对照，结果更可靠；
* 适用于多种真核细胞，细胞裂解液可离心分离冻存使用或直接在孔板中检测，节省平板和操作时间，细胞裂解产物可稳定保存室温8小时，或4℃ 7天，或-20℃三个月以上；
* 萤光强度高，持久性强，萤火虫萤光素及海肾萤光素光强1分钟内衰减小于10%，5分钟内衰减小于30%；
* 线性范围达7个数量级，适用于强/弱启动子或高/低水平表达调控的检测；

**试剂盒组成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **100 tests** | **500 tests** | **1000 tests** |
| **5×Cell Lysis Buffer** | 10mL | 50mL | 100mL |
| **Luciferase Reaction Buffer** | 10mL | 50mL | 100mL |
| **Luciferase Substrate** | 1vial | 5vial | 10vial |
| **Stop & Reaction Buffer** | 10mL | 50mL | 100mL |
| **Renilla Substrate** | 200ul | 1mL | 2mL |

**使用步骤**

* **使用前注意事项**

1. 首次使用时将**Luciferase Reaction Buffer**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-80℃；

2. 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；

3. 短暂离心**Renilla Substrate**（溶解于乙醇中）；

4. 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；

5. 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；

6. 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，但针对相同样品，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萤光底物的本底信号，且对于同一样本的检测，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；

* **实验步骤**

1. 细胞裂解

吸掉细胞培养基，用PBS洗涤两次，按下表建议加入适量**1×Cell Lysis Buffer**，室温静置或振摇裂解5分钟，吹打并吸取细胞裂解产物至1.5 ml离心管中，12000g常温离心2分钟，取上清用于后续检测。或在细胞培养板中直接加入底物检测；

|  |  |
| --- | --- |
| **Cell Culture Plate** | **1 ×Cell Lysis Buffer** |
| **6-well** | 500µL |
| **12-well** | 200µL |
| **24-well** | 100µL |
| **48-well** | 50µL |
| **96-well** | 20µL |

注：如果萤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 µl平衡至室温的**Luciferase Substrate**加入检测管或酶标板中，小心吸取20 µl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(Luninometer)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 µl新鲜配制的Renilla底物工作液，迅速混匀后立即于荧光检测仪或酶标仪中检测Renilla Luciferase报告基因活性。

**仅供科学研究 不得用于临床诊断**