

## Duo-Glo Luciferase Assay System

Cat# KC134-100

### 产品概述

Duo-Glo Luciferase Assay System 是一种高灵敏度、稳定、均质的双报告基因检测试剂盒。本试剂盒中含有高纯度的荧光素(Luciferin)和腔肠素(Coelenterazine)，先以荧光素为底物检测萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase)，后终止萤火虫荧光素酶的催化反应，并同时以腔肠素为底物检测海肾荧光素酶(Renilla Luciferase) 的表达，实现双荧光素酶报告基因检测。

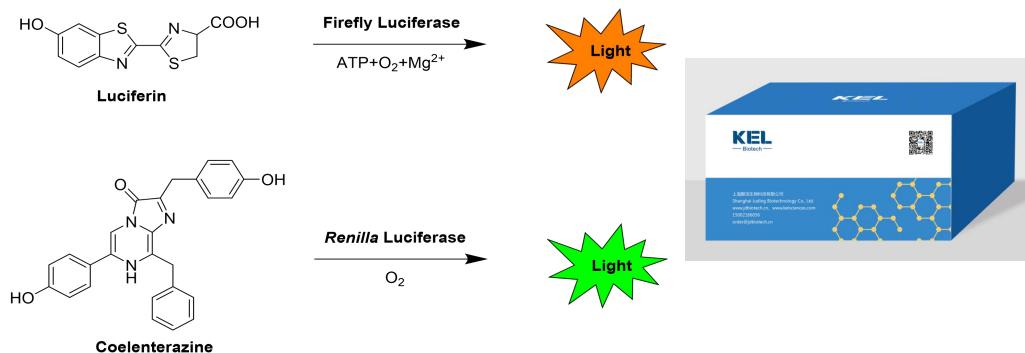


图 1. Duo-Glo 检测原理示意图

将 Duo-Glo Luciferase 检测试剂直接加入细胞培养物中，使细胞裂解，并提供萤火虫荧光素酶底物，产生的光信号半衰期通常可达 2 h。后加入 Stop & Reaction 检测试剂终止萤火虫荧光素酶反应的发光(终止效率>10,000 倍)，并提供海肾荧光素酶底物，产生的光信号也可在 2 h 内读取。因此，本试剂盒更适合于 96/384 孔板的高通量检测。此外，海肾荧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。

### 适用范围

本产品可用于对哺乳动物细胞所表达的萤火虫和海肾荧光素酶进行定量分析，且不受血清浓度影响。

### 产品/组分信息

组分编码	产品组成	KC134-100T	KC134-100T×10
KC134-A	Luciferase Buffer	10.0 mL	10.0 mL × 10
KC134-B	Luciferase Substrate (lyophilized)	1 vial	1 vial × 10
KC134-C	Stop & Reaction Buffer	10.0 mL	10.0 mL × 10
KC134-D	Stop & Reaction Substrate	100 μL	100 μL × 10

### 储存方式

长期保存: -25 ~ -15°C;

混合前: Luciferase Buffer 和 Stop & Reaction Buffer 可在室温放置，以防止在混合试剂时需要长时间温度平衡。

混合后: 本检测盒试剂可在室温保存 1 天(>80%活性)或在 2 ~ 8°C保存 1 天(>90%活性)；反复冻融 10 个循环仍可保持稳定，未使用的试剂若长期不用建议置于-70°C保存。

Stop & Reaction 检测试剂需现配现用。



## 自备材料

单/多通道移液器；白色/黑色细胞培养板；具有发光检测模块的酶标仪。

## 注意事项

1. 低温保存可降低本检测试剂盒的活性损失，切勿在高于 25°C 的温度下融化混合后的检测试剂，建议使用前可将其至于 22°C 水浴一段时间以平衡至室温。使用时，仅准备实验所需量的 Stop & Reaction 检测试剂，以确保获得最佳结果，Stop & Reaction 检测试剂需现配现用。
2. 发光的强度以及衰减速率取决于荧光素酶的反应速率。温度对酶反应速率有直接影响，两种荧光素酶活性的最适温度约为室温(20 ~ 25°C)，因此，检测时将试剂与待测培养物平衡至室温非常重要。使用前，可将 Luciferase Buffer 和 Stop & Reaction Buffer 于室温条件保存。如果试剂的温度低于室温，请在使用前将其放置于 22°C 水浴以平衡至室温。
3. 若批量操作，需在每个多孔板上设置相同的对照孔，以确保板间结果的可比性。
4. 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 + Luciferase 检测试剂

背景 Renilla：未转染细胞 + Luciferase 检测试剂 + Stop & Reaction 检测试剂

【注】：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)

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

5. 本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途。

## 操作步骤

### 试剂准备

1. 融化：将 Luciferase Buffer 置于 2 ~ 8°C 或室温条件下融化，也可将本品放置于 22°C 水浴融化，但需要注意水温不可超过 25°C。
2. Luciferase 检测试剂准备：将融化后的整瓶 Luciferase Buffer 加入到 Luciferase Substrate 中，轻柔颠倒混匀 3 - 5 次使底物充分溶解。
3. Stop & Reaction 检测试剂准备：计算实验所需的 Stop & Reaction 检测试剂体积。将 Stop & Reaction Substrate 按 1:100 稀释到相应体积的 Stop & Reaction Buffer 中，并轻柔颠倒混匀。例如：制备 5 mL Stop & Reaction 检测试剂时，可将 50 μL Stop & Reaction Substrate 加入到 5 mL Stop & Reaction buffer 中。

【注】：使用前，确保 Luciferase Buffer 以及 Stop & Reaction Buffer 已平衡至室温，若检测试剂保存于-20°C 或 -70°C，融化后，需轻柔颠倒混匀 3 - 5 次后使用。

### 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 Luciferase 检测试剂，并混合均匀。例如：使用 96 孔培养板时，将 75 μL 试剂添加到 75 μL 培养物中。使用 384 孔培养板时，将 20 μL 试剂添加到 20 μL 培养物中。
3. 室温放置 10 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 Stop & Reaction 检测试剂，并混合均匀。例如：使用 96 孔培养板时，将 75 μL 试剂添加到待测培养物中。使用 384 孔培养板时，将 20 μL 试剂添加到待测培养物中。

【注】：应在添加 Luciferase 试剂的 4 h 内将 Stop & Reaction 试剂添加到平板孔中。

5. 室温放置 10 min，检测海肾荧光素酶发光。

【注】：应按照与测量萤火虫发光相同的板顺序来测量海肾发光。

