



# Double-Luciferase Reporter Assay Kit

**Catalog#JKR23008-100T**

**Instruction Manual**

Sufficient reagents for 100T Double-Luciferase Reporter Assay per kit.  
Store at -20°C

# 目录

|          |    |
|----------|----|
| 1. 保存    | 02 |
| 2. 产品说明  | 02 |
| 3. 试剂盒组成 | 02 |
| 4. 操作步骤  | 03 |
| 5. 注意事项  | 05 |
| 6. 附录    | 05 |



## 1. 保存

试剂盒于-20℃保存。Cell Lysis Buffer -20℃保存一年，配制好的荧光素酶反应试剂 (Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II)需分装后避光保存，-70℃可保存一年，-20℃可保存一个月。

## 2. 产品说明

萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)和海肾荧光素酶(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。Double-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，之后在淬灭该荧光反应的同时，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。

## 3. 试剂盒组成

| Component                              | JKR23008 (100 rxns) | 保存温度 |
|--|---------------------|------|
| Luciferase Reaction Buffer             | 10 mL               | -20℃ |
| Luciferase Reaction Substrate (50X)    | 200 µL              | -20℃ |
| Luciferase Reaction Buffer II          | 10 mL               | -20℃ |
| Luciferase Reaction Substrate II (50X) | 200 µL              | -20℃ |
| Cell Lysis Buffer                      | 50 mL               | -20℃ |

## 4. 操作步骤

### 自备

| Product Name   |
|----------------|
| PBS(1X): 配方见附录 |
| 小钢珠或研钵、研磨杵     |

### 4.1 试剂配制

将Luciferase Reaction Buffer与Luciferase Reaction Buffer II从-20°C取出,恢复至室温,保证各组分完全溶解。(注意: Luciferase Reaction Buffer II 如出现沉淀属正常现象,可以37°C水浴20min左右,充分震荡溶解后即可使用。)

#### 4.1.1 Luciferase Reaction Reagent

按1: 49的比例将Luciferase Reaction Substrate同Luciferase Reaction Buffer混合,于30min内检测裂解物(最好现配现用),剩余试剂建议-20°C或-70°C避光保存。

#### 4.1.2 Luciferase Reaction Reagent II

按1:49 的比例将Luciferase Reaction Substrate II 同Luciferase Reaction Buffer II 混合,于30min内检测裂解物(最好现配现用),剩余试剂建议-20°C或-70°C避光保存。

### 4.2 样品处理

#### a. 动物细胞

- 1) 贴壁细胞:去除细胞培养基,用1XPBS小心润洗两次,加入适量Cell Lysis Buffer,室温充分裂解10分钟后,刮取细胞于1.5 mL离心管中。
- 2) 悬浮细胞:收集细胞,300xg离心5分钟,去除培养基。加入适量Cell Lysis Buffer,吹打混匀,室温充分裂解10分钟。

| Cell Culture Plate | Cell Lysis Buffer/Well |
|--------------------|------------------------|
| 6-well             | 500 $\mu$ L            |
| 12-well            | 300 $\mu$ L            |
| 24-well            | 150 $\mu$ L            |
| 48-well            | 60 $\mu$ L             |
| 96-well            | 20 $\mu$ L             |

裂解完成后, 2-8°C, 12,000xg离心10分钟, 取上清待检测。

#### b. 植物叶片(以烟草叶片为例)

- 1) 取3-4片直径为6-8 mm的烟草叶片放入2 mL的EP管中, 同时加入预冷的3-4个小钢珠, 并加入适量的液氮, 使用破碎仪进行研磨破碎; 或取3-4片直径为6-8 mm的烟草叶片放入研钵中, 加入适量液氮, 用研磨杵研磨破碎。
- 2) 破碎完成后, 成粉末状, 加入300 $\mu$ L Cell Lysis Buffer(1个叶片对应100 $\mu$ L裂解液)。吹打混匀, 室温充分裂解5分钟。
- 3) 2-8°C, 12,000xg离心2分钟, 取上清待检测。

#### c. 原生质体

- 1) 收集原生质体, 计数, 300xg离心5分钟, 去除上清。
- 2) 按照10<sup>5</sup>原生质体/100 $\mu$ L Cell Lysis Buffer加入裂解液, 吹打混匀, 室温充分裂解10分钟。
- 3) 2-8°C, 12,000xg离心2分钟, 取上清待检测。

### 4.3 荧光检测

吸取10~20 $\mu$ L裂解物至不透明96孔板中, 将100 $\mu$ L平衡至室温的Luciferase Reaction

Reagent加入板中,水平震荡混匀,于化学发光仪(luminometer)中上机350~700 nm测发光值,检测时间1sec,检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性(如果读值封顶建议降低裂解物体积)。之后吸取100 $\mu$ L平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent II 加入上述反应管或板中,水平震荡混匀,于化学发光仪中上机 380~780nm测发光值,检测时间 1sec,检测海肾荧光素酶报告基因的活性。结果计算:萤火虫荧光读值/海肾荧光读值

## 5. 注意事项

- Luciferase Reaction Buffer II 在溶解过程中可能有部分沉淀析出,使用前应充分需荡或将其置于37°C水浴锅中,保证其完全溶解后再使用。
- Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II 反应前需平衡至室温。
- 为保证实验数据准确可靠,建议测量大量样品时使用排枪添加Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II,使用过程中务必留意排枪各孔吸取的液体是否一致。
- Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II 均易发生氧化反应,请合理安排实验,避免样品解冻后在室温下长时间放置。

## 6. 附录

PBS配制方法:称取8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,溶于800mL蒸馏水中,用HCl调节溶液的pH值至7.4,最后加蒸馏水定容至1L即可。在15lbf/in<sup>2</sup>(1034 $\times$ 105Pa)高压下蒸气灭菌(至少20分钟),保存于室温或4°C冰箱中。



## 武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENECREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：[marketing@genecreate.com](mailto:marketing@genecreate.com)

网址：[www.genecreate.cn](http://www.genecreate.cn)

