



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°C保存。Cell Lysis Buffer -20°C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°C可保存一年, -20°C可保存一个月。

2. 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。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°C
Luciferase Reaction Substrate (50X)	200 μL	-20°C
Luciferase Reaction Buffer II	10 mL	-20°C
Luciferase Reaction Substrate II (50X)	200 μL	-20°C
Cell Lysis Buffer	50 mL	-20°C

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 μ L
12-well	300 μ L
24-well	150 μ L
48-well	60 μ L
96-well	20 μ 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 μ L Cell Lysis Buffer(1个叶片对应100 μ 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10⁵原生质体/100 μ 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 μ L裂解物至不透明96孔板中, 将100 μ 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100μL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 Na₂HPO₄和0.24g KH₂PO₄,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/in²(1034×105Pa)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@geneccreate.com

网址：www.geneccreate.cn

