

## 产品概述

Duo-Lite 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萤火虫荧光素(Firefly 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。

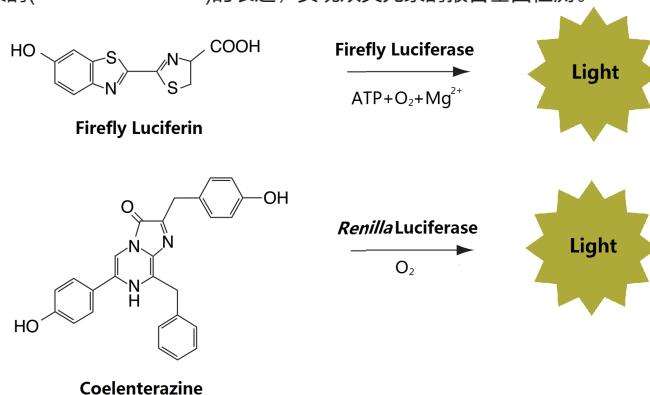


图1. Duo-Lite检测原理示意

如图2所示, 将Duo-Lite 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Duo-Lite Stop & Lite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。

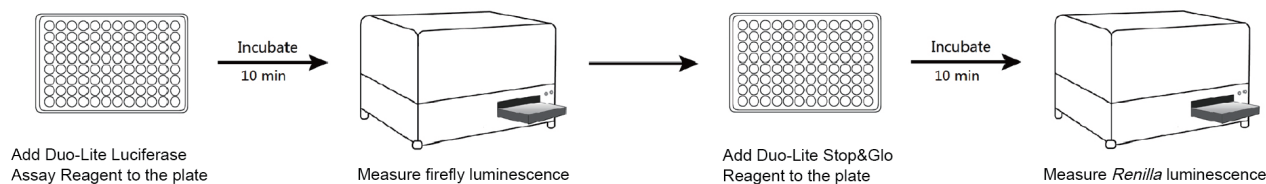


图2. Duo-Lite操作流程示意

## 产品组分

组 分	DD1205-01	DD1205-02
Duo-Lite Luciferase Buffer	10 ml	100 ml
Duo-Lite Luciferase Substrate (lyophilized)	1 vial	1 vial
Duo-Lite Stop & Lite Buffer	10 ml	100 ml
Duo-Lite Stop & Lite Substrate	100 μl	1 ml

## 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。

## 保存条件

长期保存: -30 ~ -15°C; 运输条件: ≤0°C。

混合前: Duo-Lite Luciferase Buffer和Duo-Lite Stop & Lite Buffer可在室温长期保存, 以防止在混合试剂时需要长时间温度平衡;  
Duo-Lite Luciferase Substrate和Duo-Lite Stop & Lite Substrate可在2 ~ 8°C保存14天。

混合后: Duo-Lite Luciferase检测试剂可在室温保存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, 未使用完的试剂若长期不用建议置于-70°C保存。

Duo-Lite Stop & Lite检测试剂需现配现用。

## 实验准备

### 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。

## 操作流程

### 试剂准备

1. 融化：将Duo-Lite Luciferase Buffer置于2~8℃或室温条件下融化，也可将本品放置于22℃水浴融化，但需要注意水温不可超过25℃。
2. Duo-Lite Luciferase检测试剂准备：将融化后的整瓶Duo-Lite Luciferase Buffer加入到Duo-Lite Luciferase Substrate中，轻柔颠倒混匀3-5次使底物充分溶解。
3. Duo-Lite Stop & Lite检测试剂准备：计算实验所需的Duo-Lite Stop & Lite检测试剂体积。将Duo-Lite Stop & Lite Substrate按1:100稀释到相应体积的Duo-Lite Stop & Lite Buffer中，并轻柔颠倒混匀。例如：制备5 ml Duo-Lite Stop & Lite检测试剂时，可将50 μl Duo-Lite Stop & Lite Substrate加入到5 ml Duo-Lite Stop & Lite buffer中。  
▲ 使用前，确保Duo-Lite Luciferase Buffer以及Duo-Lite Stop & Lite Buffer已平衡至室温，若Duo-Lite检测试剂保存于-20℃或-70℃，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Duo-Lite 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Duo-Lite Stop & Lite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。  
▲ 应在添加Duo-Lite Luciferase试剂的4 h内将Duo-Lite Stop & Lite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。  
▲ 应按照与测量萤火虫发光相同的板顺序来测量海肾发光。

## 注意事项

1. 低温保存可降低Duo-Lite Luciferase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22℃水浴一段时间以平衡至室温。使用时，仅准备实验所需量的Duo-Lite Stop & Lite检测试剂，以确保获得最佳结果，Duo-Lite Stop & Lite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℃)，因此，检测时将试剂与待测培养物平衡至室温非常重要。建议将Duo-Lite Luciferase Buffer和Duo-Lite Stop & Lite 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℃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+Duo-Lite Luciferase检测试剂  
背景Renilla：未转染细胞+Duo-Lite Luciferase检测试剂+Duo-Lite Stop & Lite检测试剂  
▲ 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)  
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非合理用途。