

1 双荧光素酶检测实验

1.1 样本来源及编号

1.1.1 样本来源状态

由实验室保存的293T细胞，为贴壁生长细胞。

1.1.2 样本用途

样本用于荧光素酶活性的检测。

1.1.3 实验分组（常规四个分组）

1.1.3.1 mir 和靶基因(mRNA、circRNA、lncRNA)

- 1: pmirGLO- 3'utr wt +miRNA mimics-NC
- 2: pmirGLO- 3'utr wt +miRNA mimics
- 3: pmirGLO- 3'utr mut +miRNA mimics-NC
- 4: pmirGLO- 3'utr mut +miRNA mimics

1.1.3.2 转录因子和靶基因启动子

- 1: pGL3- promoter wt +TF 质粒-NC
- 2: pGL3- promoter wt +TF 质粒
- 3: pGL3- promoter mut +TF 质粒-NC
- 4: pGL3- promoter mut+ TF 质粒

2 主要仪器试剂

2.1 主要仪器

表 2.1 实验所用主要仪器
Tab. 2.1 Main instruments for the experiment

所用仪器	仪器型号	产地	公司
超纯水系统	NW10LVF	香港	Heal Force
超速冷冻离心机	H-2050R	长沙	湖南湘仪
CO ₂ 培养箱	HF-90	上海	上海力申
倒置相差显微镜	AE31	厦门	麦克奥迪
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州	苏净安泰
电热恒温培养箱	DH36001B	天津	天津泰斯特
化学发光仪	Lumat LB 9507	德国	Berthold

2.2 主要试剂

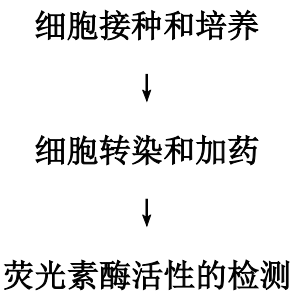
表 2.2 主要试剂及其生产公司

Tab. 2.2 Main Reagents and manufacturing company

试剂名称	货号	生产公司
DMEM	12100-46	Gibco
胎牛血清	SH30084.03	Hyclone
PBS	P10033	双螺旋
脂质体 2000	1024993	Invitrogen
荧光素酶检测试剂盒	E1910	Promega

3 实验内容

3.1 实验流程



3.2 实验步骤

3.2.1 细胞接种和培养

- (1) 培养细胞至密度为 90%左右，PBS 清洗 1-2 次。
- (2) 弃去上清，加入适当体积的 0.25%胰酶消化细胞，待细胞变圆后，轻轻拍打瓶壁侧面，并加入 DMEM 完全培养基终止反应。
- (3) 用 5ml 枪头吹打细胞瓶内各处细胞，收集混合液至 15ml 试管，800rpm 离心 3min。
- (4) 去上清，并进行细胞计数，按实验内容接种细胞，将培养瓶或培养板置于 37℃，5%CO₂ 的培养箱内培养过夜。
- (5) 24h 后，根据实验要求，更改培养基内胎牛血清含量，并对其进行转染处理。

3.2.2 细胞转染（mir-靶基因为例）

- (1) 细胞铺板：转染前一天将培养瓶中细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，接种至 96 孔培养板中，24h 后待细胞长成单层即可进行转染，细胞密度大约在 80%左右。

- (2) 细胞转染：转染萤光素酶报告基因质粒，每个样品设置 6 个复孔（或者至少 3 个）。
- (3) 溶液 A：lip3000（0.3ul）与 opti-MEM（15ul）混合，孵育 5 min。
- (4) 溶液 B：mimics(20uM 存储液 1ul)和萤光素酶质粒（0.1ug）与 opti-MEM（15ul）混合，孵育 5min。
- (5) 将溶液 A 与溶液 B 混合，室温下放置 20min。（lipo3000 需要配合 p3000 使用 p3000 参考用量 0.4ul/孔（96））
- (6) 将溶液 A 与溶液 B 的混合液逐滴加入孔中，摇动培养板，轻轻混匀。37℃、5%CO2 培养 5 h（293t 比较容易转染，目的细胞可能时间要根据情况延长转染时间再换液）。
- (7) 吸弃转染培养基上清，更换为 10%血清的 DMEM 培养基，37℃、5%CO2 继续培养。
- (8) 转染 48h 后进行萤光素酶活性的检测。

分组合比参考表：（仅供参考）luc、rluc 单载体

转录因子-启动子	分组 1	分组 2	分组 3	分组 4
TF-NC	0.1ug		0.1ug	
TF 质粒		0.1ug		0.1ug
pGL3- promoter mt	0.1ug	0.1ug		
pGL3- promoter wt			0.1ug	0.1ug
Lipo3000	0.3ul	0.3ul	0.3ul	0.3ul
P3000	0.4ul	0.4ul	0.4ul	0.4ul
Opti-MEM	30 ul	30 ul	30 ul	30 ul

mir-靶基因	分组 1	分组 2	分组 3	分组 4
mimics-NC (20uM)	1		1	
mimics (20uM)		1		1
pmirGLO- 3'utr wt	0.1ug	0.1ug		
pmirGLO- 3'utr mt			0.1ug	0.1ug
Lipo3000	0.3ul	0.3ul	0.3ul	0.3ul
P3000	0.4ul	0.4ul	0.4ul	0.4ul
Opti-MEM	30 ul	30 ul	30 ul	30 ul

注：1、转染试剂不同，配比体系会有不同，需要参考转染试剂使用说明。

2、如果海肾荧光素酶载体与萤火虫荧光素酶是双载体的，萤火虫荧光素酶质粒：

海肾荧光素酶质粒=10:1

3.3 双荧光素酶检测

- (1) 融解萤火虫荧光素酶检测试剂和海肾荧光素酶检测缓冲液，并达到室温。海肾荧光素酶检测底物(100×)置于冰浴或冰盒上备用。
- (2) 按照每个样品需 100 微升的量，取适量海肾荧光素酶检测缓冲液，按照 1:100 加入海肾荧光素酶检测底物(100×) 配制海肾荧光素酶检测工作液。例如，1 毫升海肾荧光素酶检测缓冲液中加入 10 微升海肾荧光素酶检测底物(100×)充分混匀后即可配制成药 1 毫升海肾荧光素酶检测工作液。
- (3) 按仪器操作说明书开启化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪，将测定间隔设为 2 秒，测定时间设为 10 秒。
- (4) 每个样品测定时，取样品 20-100 微升(如果样品量足够，请加入 100 微升;如果样品量不足可以适当减少用量，但同批样品的使用量宜保持一致)。
- (5) 加入 100 微升萤火虫荧光素酶检测试剂，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU(relative light unit)，以转染的无关质粒组为对照空白组。
- (6) 在完成上述测定萤火虫荧光素酶步骤后，加入 100 微升海肾荧光素酶检测工作液，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU(relative light unit)。

4 数据分析

在以海肾荧光素酶为内参的情况下（除去背景值），用萤火虫荧光素酶测定得到的值（除去背景值）除以海肾荧光素酶测定得到的值。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。