

双荧光素酶报告基因 miRNA 靶基因实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
1.5ml 离心管	科兔生物	KTL-15-P
15ml 普通离心管	科兔生物	KTL-150-P
50 ml 离心管	科兔生物	KTL-500-P
96 微孔板发光检测仪	GloMax	Promega
洁净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD

2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit	YEASEN	11402ES60
Hieff Trans TM Liposomal Transfection Reagent	YEASEN	40802ES03

二、试剂配制

配制萤火虫荧光素酶反应工作液和海肾荧光素酶反应液,即萤火虫荧光素酶底物(50 X)和海肾荧光素酶底物(50 X)分别用对应的缓冲液稀释至1 X 工作液。并孵育至室温,现配现用。

三、实验步骤

(1) 转染体系(每孔)

试剂	用量
Hieff Trans TM 试剂	0.45 ul
报告基因载体	0.15ug
miRNA (10uM)	2ul
无血清 DMEM	20ul



(2) 转染程序

1. 转染前一天, 将细胞用胰酶消化铺 96 孔板, 控制第二天细胞汇合度约为 70-80%
2. 将 Hieff Trans™、报告基因载体、miRNA、无血清培养基平衡至+15-25°C;
3. 对于每孔用 10ul 无血清培养基稀释 0.15ug 报告基因载体, 用 10ul 无血清培养基稀释 0.45ul Hieff Trans™ 试剂,并在室温孵育 5min;
4. 轻轻涡旋载体溶液, 并逐滴添加稀释的 Hieff Trans™ 试剂, 充分混匀后, 室温静置 10-25 min 以形成 DNA-Hieff Trans™ 复合物;
5. 对于每孔用 3ul 无血清培养基稀释 0.3ul Hieff Trans™ 试剂,并在室温孵育 5min;
6. 轻轻涡旋溶液, 并添加 0.25ul miRNA(20uM), 充分混匀后, 室温静置 10-25 min 以形成 RNA-Hieff Trans™ 复合物;
7. 96 孔细胞培养板每孔换成 80ul 无血清培养基;并将复合物逐滴加入孔中, 边加边摇晃;
- ⑧ 37°C, 5% CO₂ 培养箱培养 6h 后更换成完全培养基, 不会降低转染活性。

四、荧光素酶检测

1. 将荧光检测仪打开, 设定参数测定时间为 10s, 测定间隔为 2s;
2. 裂解细胞: 对于贴壁细胞, 96 孔板培养板吸尽细胞培养液, 加入 100ul 细胞裂解液, 轻轻旋转培养板使裂解液完全覆盖细胞,冰上孵育 5 min, 充分裂解细胞;
3. 配制萤火虫荧光素酶反应工作液和海肾荧光素酶反应液, 即萤火虫荧光素酶底物(50 X)和海肾荧光素酶底物(50 X) 分别用对应的缓冲液稀释至 1 X 工作液。并孵育至室温;
4. 取 20 μL 细胞裂解液, 加至黑色酶标板中。⑤ 加入 100 μL 萤火虫荧光素酶反应液, 震板混匀, 检测萤火虫荧光素酶的活力,
5. 加入 100 μL 海肾荧光素酶反应液, 震板混匀, 静置 10min 后检测海肾荧光素酶的活力;

五、数据统计分析及处理

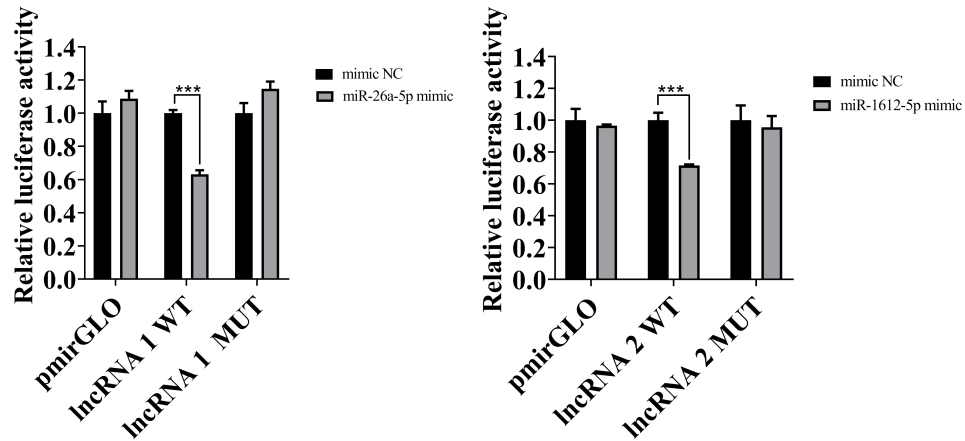
检测值比值 ratio=萤火虫荧光素酶检测值 / 海肾荧光素酶检测值;

六、实验结论

经双荧光素酶报告基因检测：测 gga-miR-26a-5p 靶向抑制 lncRNA 1；gga-miR-1612-5p 靶向抑制 lncRNA 2

七、实验结果

1. 例图：



2. 组别设置

分组	报告基因	miRNA 基因干预分组
空载	pmirGLO	mimic NC、mimic
野生型	pmirGLO-Gene-wt	mimic NC、mimic
突变型	pmirGLO-Gene-mut	mimic NC、mimic

3. DLR 的检测结果 数据

请参考附件 excel;

4. DLR 的检测结果

请参考附件 excel;

仅供科研用途，不可用于临床诊断！