



质粒转染后luciferase检测

操作手册

实验流程描述

培养生长状态良好的293T细胞，质粒转染前一天将细胞分入24-well培养板培养，转染当天按实验设计的组别进行质粒转染实验。转染24小时后荧光显微镜下观察细胞内荧光标记基因（如GFP）的表达情况，然后使用“Dual-Glo™ Luciferase Assay System（E2920, promega）”试剂盒处理细胞、进行luciferase表达检测。

实验材料：

试剂

试剂名称	试剂来源	cat.No.
胎牛血清 FBS	GIBCO	
DMEM	GIBCO	
胰酶	上海化学试剂公司	
Opti-MEM	Invitrogen	
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	promega	E2920

仪器

仪器名称	仪器来源	cat.No.
------	------	---------

荧光显微镜	奥林帕斯	micropublisher 3.3RTV
CO2 培养箱	日本三洋 SANYO	MCO-175
生物安全柜	上海振样创空气净化设备公司	Bio 1200-II-A2
酶标仪	睿星公司提供	

实验步骤:

1. 准备目的细胞

1.1 细胞复苏

- 1) 从液氮罐中取出细胞冻存管
- 2) 迅速放入37°C水浴中, 并不时摇动使其尽快解冻
- 3) 完全解冻后, 1000 rpm, 离心2 min
- 4) 75%酒精擦拭冻存管消毒后, 移至超净台
- 5) 吸去冻存液上清, 加入1 ml 新鲜的完全培养基重悬细胞, 将细胞悬液接种至含有3 ml 完全培养基的6-cm dish中, 轻轻晃匀后置于37°C、5%CO₂ 培养箱培养

6) 次日更换一次培养液后再继续培养

1.2 细胞传代

- 1) 将生长至90%汇合的细胞进行传代
- 2) 弃去旧培养液, 加入2 ml灭菌的D-Hank' s溶液, 洗涤细胞生长面, 然后弃去该溶液
- 3) 加入1 ml胰酶消化液, 37°C消化约1-2 min, 直到细胞完全消化下来
- 4) 加入完全培养基2ml, 用刻度吸管吹打数次, 将壁上的细胞冲洗下来
- 5) 混匀细胞后分至两个新的6-cm dish 中, 补足完全培养基至4ml, 继续培养



2. 目的细胞质粒转染

- 1) 将处于对数生长期的293T细胞进行胰酶消化，制成细胞悬液
- 2) 将细胞悬液（细胞数约为 4×10^5 ）接种于24-well培养板中，37°C、5%CO₂培养箱培养至细胞融合度达到约80%
- 3) 根据invitrogen lipofectamine 2000转染试剂使用说明书进行转染操作：
 - a) 将培液换成400 μ l的opti-MEM培养基
 - b) 每孔转染1 μ g质粒、需要2 μ l lipofectamine 2000，按照此比例，将质粒和 lipofectamine 2000分别溶解于opti-MEM中，混匀，室温静置5 min
 - c) 将b) 中稀释好的质粒和lipofectamine 2000混匀，室温静置 20 min
 - d) 把质粒DNA与Lipofectamine 2000的混合液加入 293T 细胞中，37°C 5%CO₂ 培养箱中培养5小时后，换成新鲜的含10%血清的完全培养基
- 4) 转染24小时后观察质粒上荧光标记基因的表达情况以判断转染效率，同时该过程用来平衡培养体系至室温下

3. luciferase检测

- 1) 初次使用 Dual-Glo™ Luciferase Assay kit 时，需要将 Dual-Glo® Luciferase Buffer 和 Dual-Glo® Stop & Glo® Buffer 提前数天放于室温下平衡；将 Dual-Glo® Luciferase Buffer 完全加入到 Dual-Glo® Luciferase Substrate 瓶中，完全溶解底物，形成 Dual-Glo® Luciferase Reagent，分装保存于-70°C
- 2) 24 孔板中每孔去除 250 μ l 培养基，加入剩余体积同等量（即 250 μ l）的 Dual-Glo® Luciferase Reagent，室温反应 10min 以待细胞充分裂解，吹打混匀转移至 1.5mL ep 管中
- 3) 根据需要的量配制 Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent 待用（该试剂必须现配现用），

如配制 1.1mL Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent, 即取 11 μ l Dual-Glo® Stop & Glo® Substrate 加入到 1089 μ l Dual-Glo® Stop & Glo® Buffer 中

4) 吸取 100 μ l 步骤 2) 中的细胞裂解液 100 μ l 于 Lockwell maxisorp 检测板中, 酶标仪检测 firefly luminescence (萤火虫荧光酶荧光值), 该步骤在细胞经 Dual-Glo® Luciferase Reagent 裂解反应 10min-2hours 之内完成

5) 检测 firefly luminescence 后, 再在每孔中加入 50 μ l Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent, 室温反应, 在 10min-2hours 之内完成 Renilla luminescence (海肾荧光酶荧光值) 的检测, 该检测时间点距 Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent 加入时间点应与 firefly luminescence 检测时间点距 Dual-Glo® Luciferase Reagent 加入时间点一致

6) 数据收集和分析 (详见报告)