



GenePharma

双荧光素酶载体构建服务

2020-04-07

Version: B027-V004-20200407



| | |
|--|-----------|
| 一、双荧光素酶报告系统检测简述..... | 3 |
| 1.1 设计理念..... | 3 |
| 1.2 系统工作原理..... | 3 |
| 1.3 常用载体（Promega）..... | 3 |
| 1.4 系统检测方法..... | 4 |
| 1.5 吉玛提供产品..... | 4 |
| 二、pGL•系列 Basic Vector..... | 3 |
| 2.1 使用范围..... | 3 |
| 2.2 载体原理..... | 3 |
| 2.3 载体元件..... | 3 |
| 2.4 检测机制..... | 4 |
| 2.5 使用方法..... | 4 |
| 2.6 模拟实验及结果..... | 5 |
| 2.7 pGL4 Basic vector..... | 5 |
| 三、psiCHECKTM•2 Vector..... | 6 |
| 3.1 使用范围..... | 6 |
| 3.2 载体原理..... | 6 |
| 3.3 载体元件..... | 6 |
| 3.4 检测机制..... | 7 |
| 3.5 使用方法..... | 8 |
| 3.6 模拟实验及结果..... | 9 |
| 四、pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector..... | 9 |
| 4.1 使用范围..... | 9 |
| 4.2 载体原理..... | 9 |
| 4.3 载体元件..... | 10 |
| 4.4 检测机制..... | 10 |
| 4.5 使用方法..... | 11 |
| 4.6 模拟实验及结果..... | 12 |
| 五、双荧光素酶报告实验简易使用方法..... | 13 |
| 5.1 产品组成..... | 13 |
| 5.2 细胞效率评价转染..... | 13 |
| 5.3 细胞转染..... | 15 |
| 5.4 双荧光素酶系统检测（Promega）..... | 16 |
| 5.5 模拟实验及结果..... | 17 |
| 六、联系我们..... | 18 |
| 6.1 上海公司..... | 18 |
| 6.2 苏州公司..... | 18 |
| 6.3 全国各地销售经理..... | 18 |



一、双荧光素酶报告系统检测简述

1.1 设计理念

在检测一个报告基因测量结果的变化时，实验的准确性常被一些客观实验因素影响，如：细胞数目不均一、细胞代次不统一、转染效率不一致等等。引入一个内参报告基因，以此来标定检测用报告基因的测量结果，从而达到有效地减少实验误差的目的。

1.2 系统工作原理

双荧光素酶报告系统包括两个报告基因，一个检测用报告基因 A 与一个内参用报告基因 B。一般是将检测用报告基因 A 序列与调控启动子序列偶连在一起，或将报告基因 A 序列与待检序列串联，报告基因 A 荧光强度的相对改变与偶联的调控启动子的活性或待检序列的改变相关。内参用报告基因 B 与一个组成型启动子偶联，这个启动子不受各种实验条件变化的干扰，所以报告基因 B 的荧光为组成型表达，可以作为内参。

检测用报告基因 A、内参用报告基因 B 可以装在不同的载体上，共同转染细胞，通过这种方法，把可能削弱实验准确性的内在因素的变化降到最小。有的载体上同时含有检测用报告基因 A 和内参用报告基因 B，这样使实验操作更加准确、简便、快捷。

1.3 常用载体（Promega）

实验用报告基因：

pGL3 Luciferase Reporter Vectors（pGL3-Control Vector、pGL3-Basic Vector、pGL3-Promoter Vector、pGL3-Enhancer Vector）；

psiCHECKTM Vector（psiCHECKTM-1 Vector、psiCHECKTM-2 Vector*）；pmirGLO Vector*。

内参用报告基因（组成型表达海肾荧光素酶）：pRL-TK；pRL-SV40；pRL-CMV；pRL-Null。

注：psiCHECKTM-2 Vector*、pmirGLO Vector* 同时表达萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）及海肾荧光素酶（Renilla Luciferase），故无需准备对照 pRL 系列内参质粒，可直接进行下游双荧光素酶检测实验。



1.4 系统检测方法

1. 用适量 Passive Lysis Buffer 裂解；
2. 将一份裂解物与萤火虫检测试剂 II (LAR II) 混合，即启动萤火虫荧光素酶报告基因检测；
3. 萤火虫荧光素酶报告基因检测一旦结束，立刻向样品试管中加入 Stop&Glo™ 试剂，这个试剂可即刻淬灭萤火虫荧光素酶荧光并同时激发海肾荧光素荧光。

详细实验步骤可参考

<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-Luciferase-reporter-assay-system-protocol/>。

1.5 吉玛提供产品

1. 质粒本身：吉玛公司只提供将待检序列构建入目的载体后的质粒，不提供任何形式的空载体（质粒、菌液等），如您对空载质粒有需求，还请移步至 Promega 公司购买。
2. 实验服务：吉玛公司可以提供下游的双荧光素酶检测服务，具体操作欢迎来电来信垂询。（见最后一页）



二、pGL•系列 Basic Vector

2.1 使用范围

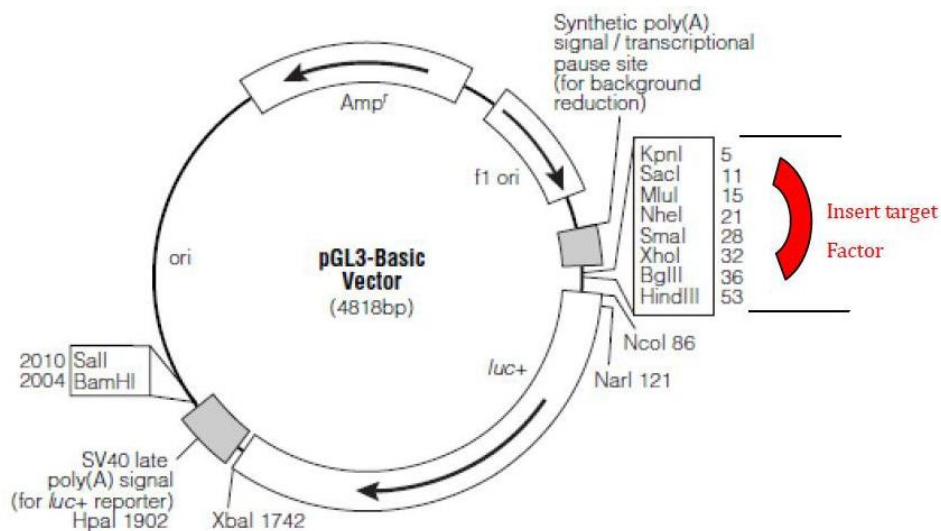
pGL3-Basic Vector 可以用来检测那些潜在调控哺乳动物基因表达的因子，包括顺式作用元件如启动子和增强子以及反式作用因子如大量的 DNA 结合因子。

2.2 载体原理

pGL3-Basic Vector 缺失真核启动子及增强子序列，将待检测的启动子序列构建入载体后，将执行启动萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）表达的功能。如果待测试的因子可以改变启动子的活性，从而影响萤火虫荧光素酶的表达翻译，可通过加入适当的底物，检测荧光的变化，来判断加入因子对启动子的作用。

pGL3-Basic Vector 使用共转染的海肾荧光素酶（pRL 内参质粒需自备）底物荧光作为内参，使萤火虫荧光素酶底物荧光的测量结果正态化，最终数据处理为比值，即：（萤火虫荧光素酶底物荧光/海肾荧光素酶底物荧光）。

2.3 载体元件

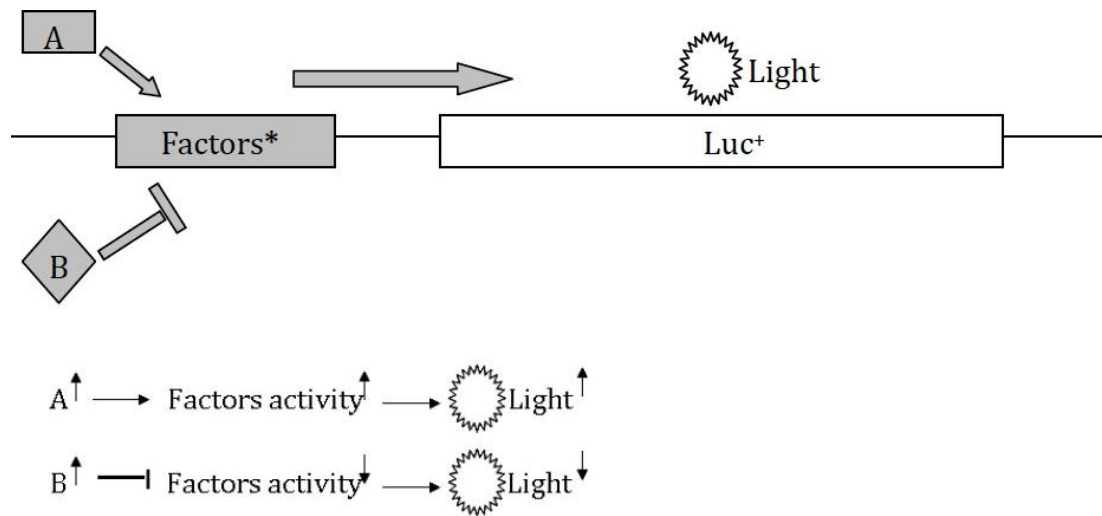


（此图以 Promega 载体图谱为基础绘制）



pGL3-Basic Vector 元件图 Luc⁺: 修饰的萤火虫荧光素酶 cDNA; Amp^r: 大肠杆菌 *E. coli* 中氨苄霉素抗性编码基因; fl ori: 丝状噬菌体复制起始位点; ori: 大肠杆菌 *E. coli* 复制起始位点; Luc⁺ 及 Amp^r 中的箭头走向为转录方向; fl ori 中的箭头走向为 ssDNA 链合成的方向; Insert target factor: 在多克隆位点区插入待检目的因子序列。

2.4 检测机制



Factors* : factors that potentially regulate mammalian gene expression

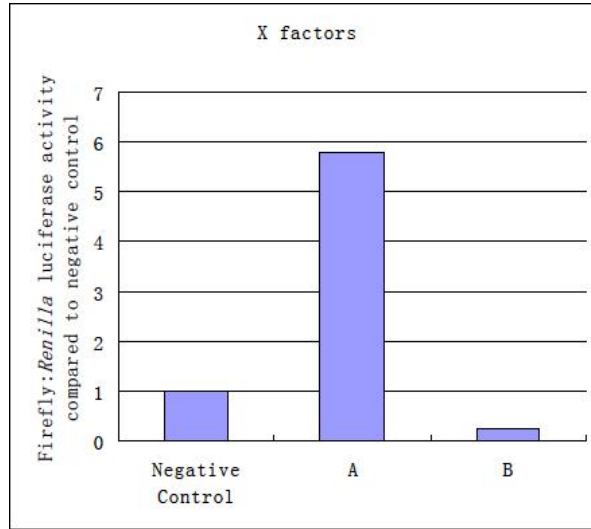
A, B : proteins that may play an important role on factors activity

2.5 使用方法

1. 吉玛公司构建的 pGL3-Basic-target factor 质粒, 出货标准为 50 μg, 出货前会进行抽干步骤, 收到时为粉末状, 可按照实验要求, 稀释至所需浓度。
2. 请根据具体实验安排自行准备对照 pRL 系列内参质粒, 进行下游双荧光素酶检测实验。

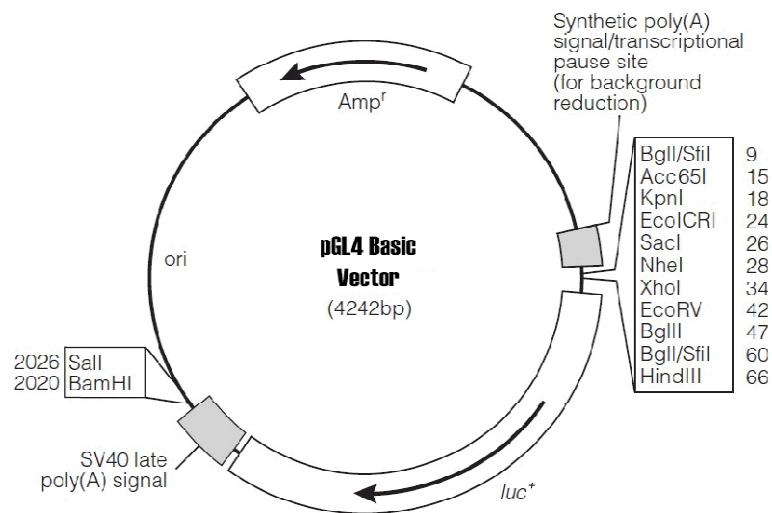


2.6 模拟实验及结果



2.7 pGL4 Basic vector

pGL basic载体是在pGL3 basic基础上经过优化改进过的报告基因载体。这款载体不含有启动子序列，但是克隆了Luc基因序列，可以高效表达优化过的萤火虫荧光素酶。pGL4 basic 载体的优势在于减少了顺势调控序列的使用，可以有效降低由于异常转录造成的本底信号。



pGL4 basic 元件图 Luc⁺: 萤火虫荧光素酶 cDNA; Amp^r: 大肠杆菌 *E. coli* 中氨苄霉素抗性编码基因; f1 ori: 丝状噬菌体复制起始位点; ori: 大肠杆菌 *E. coli* 复制起始位点; Luc⁺ 及 Amp^r 中的箭头走向为转录方向; f1 ori 中的箭头走向为 ssDNA 链合成的方向; Insert target factor: 在多克隆位点区插入待检目的因子序列。

三、psiCHECK™•2 Vector

3.1 使用范围

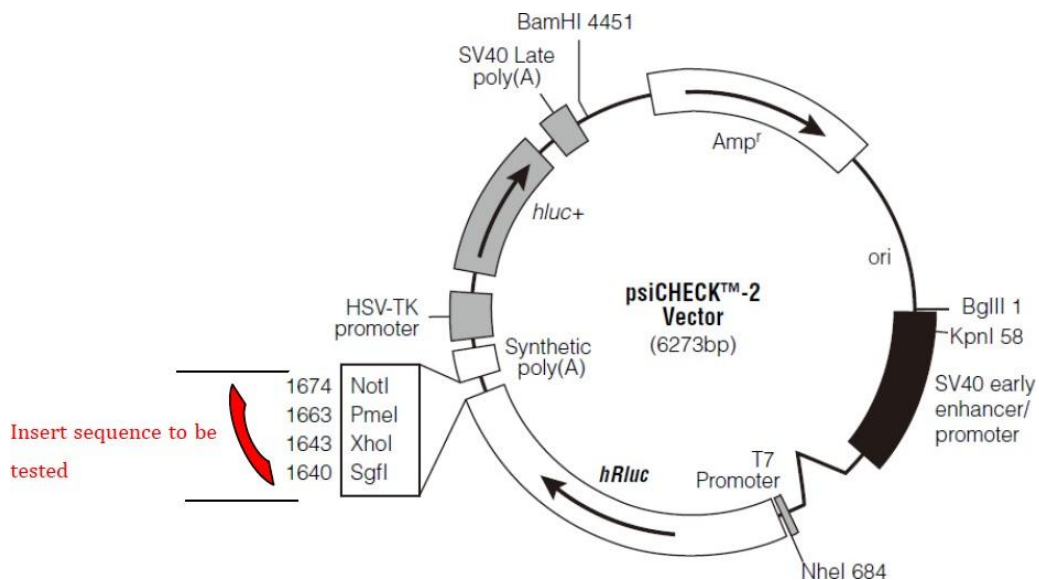
psiCHECK™-2 Vector 可以用来检测合成的短双链干扰 RNA（包括 siRNA 及 microRNA）的干扰效果，是一个初期筛选的平台，但因其启动子为强启动子，所以更适合筛选 siRNA 有效干扰序列。

3.2 载体原理

psiCHECK™-2 Vector 同时表达萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）及海肾荧光素酶（Renilla Luciferase），靶基因构建入海肾荧光素酶基因 3'端，有效的 siRNA 或 shRNA 序列通过与靶基因完全互补，从而引起靶基因 mRNA 降解，检测为海肾荧光素酶底物荧光减弱。psiCHECK™-2 Vector 海肾荧光素酶的启动子为SV40，当用于 siRNA 或 shRNA 实验时，这款启动子能在萤火虫荧光素酶的表达及 RNAi 活性检测间达到一个较好的平衡。

psiCHECK™-2 Vector 使用本身表达的萤火虫荧光素酶底物荧光作为内参，使海肾荧光素酶底物荧光的测量结果正态化，最终数据处理为比值，即：（海肾荧光素酶底物荧光/萤火虫荧光素酶底物荧光）。

3.3 载体元件





GenePharma

(此图以 promega 载体图谱为基础绘制)

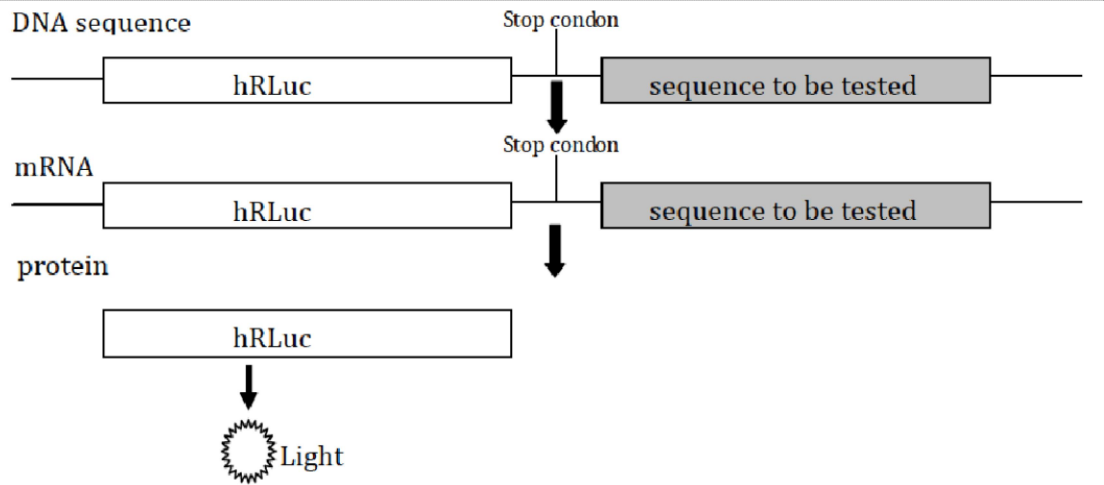
psiCHECK™-2 Vector 元件图 Rluc: 海肾荧光素酶cDNA; Luc⁺: 萤火虫荧光素酶cDNA;
Amp^r: 大肠杆菌*E. coli* 中氨苄霉素抗性编码基因; ori: 大肠杆菌*E. coli* 复制起始位点; Rluc、
Luc⁺及 Amp^r 中的箭头走向为转录方向; Insert sequence to be tested: 在多克隆位点区插入待
检目的序列cDNA。

3.4 检测机制

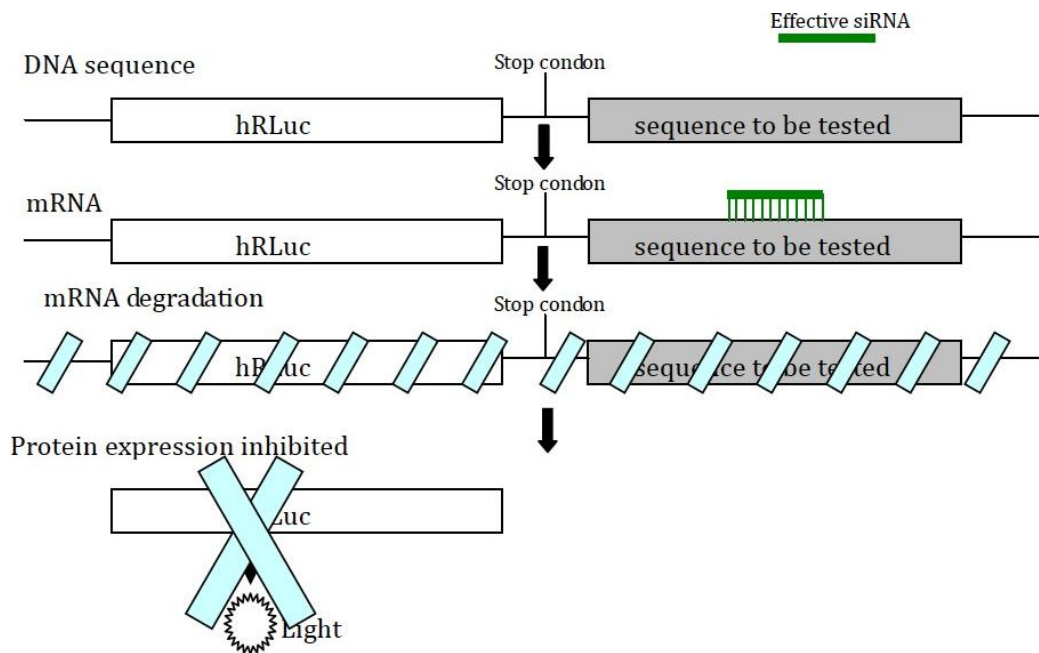
未添加针对目的序列有效 siRNA 或 shRNA 干扰序列, 正常的转录翻译过程:



GenePharma



添加针对目的序列有效 siRNA 或 shRNA 干扰序列后，与靶基因完全互补的转录翻译过程：



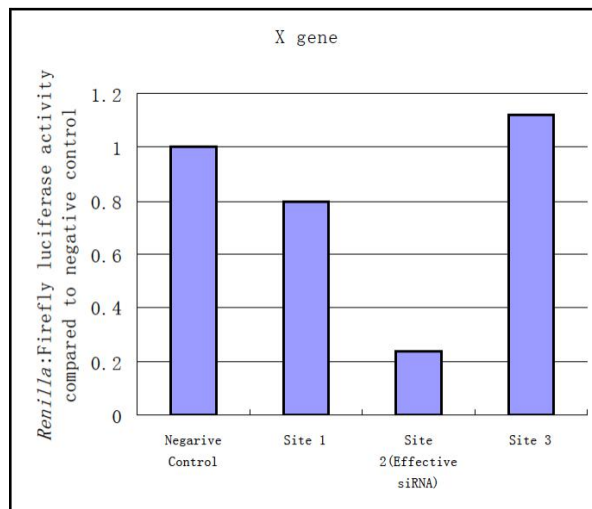
3.5 使用方法

1. 吉玛公司构建的 psiCHECK™-2 质粒，出货标准为 50 μg，出货前会进行抽干步骤，收到时为粉末状，可按照实验要求，稀释至所需浓度。



- 因 psiCHECK™-2 Vector 同时表达萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）及海肾荧光素酶（Renilla Luciferase），故无需准备对照 pRL 系列内参质粒，可直接进行下游双荧光素酶检测实验。

3.6 模拟实验及结果



四、pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector

4.1 使用范围

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 可以用来判断 microRNA (miRNA) 潜在的结合位点，是一个初期的筛选平台，为进一步靶点的鉴定提供依据。

4.2 载体原理

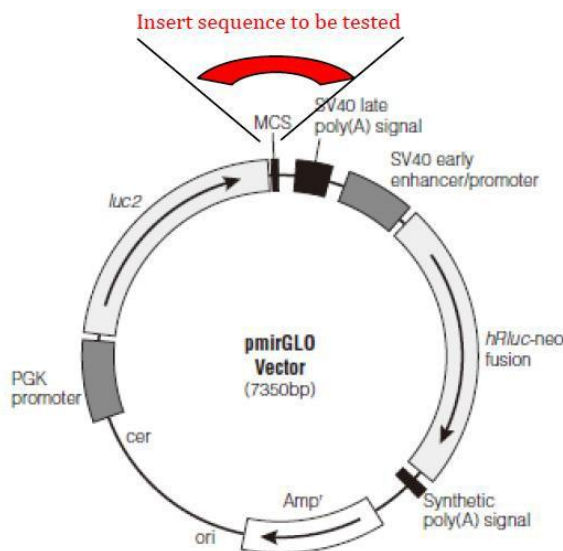
pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 同时表达萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）及海肾荧光素酶（Renilla Luciferase），miRNA 靶基因构建入萤火虫荧光素酶基因 3'端，有效的 miRNA 序列通过与靶基因 3'-UTR 种子区（seed region）不完全碱基互补结合，从而引起靶基因 mRNA 降解或直接抑制蛋白表达翻译过程，检测为萤火虫荧光素酶底物荧光减弱。



pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 萤火虫荧光素酶的启动子为 PGK 启动子（human phosphoglycerate kinase promoter），为一个弱启动子，启动较低的翻译水平，适合于希望得到抑制效果的实验，尤其适用于检测 miRNA 与靶基因的结合，因为 miRNA 与靶基因结合较弱，本身抑制效果并不明显。

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 使用本身表达的海参荧光素酶底物荧光作为内参，使萤火虫荧光素酶底物荧光的测量结果正态化，最终数据处理为比值，即（萤火虫荧光素酶底物荧光/海肾荧光素酶底物荧光）。

4.3 载体元件



（此图以 Promega 载体图谱为基础绘制）

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 元件图
Rluc 海肾荧光素酶 cDNA；**Luc2**：萤火虫荧光素酶 cDNA；**Amp^r**：大肠杆菌 *E. coli* 中氨苄霉素抗性编码基因；**ori**：大肠杆菌 *E. coli* 复制起始位点；**Rluc**、**Luc2** 及 **Amp^r** 中的箭头走向为转录方向；**Insert sequence to be tested**：在多克隆位点区插入待检目的序列 cDNA。

4.4 检测机制

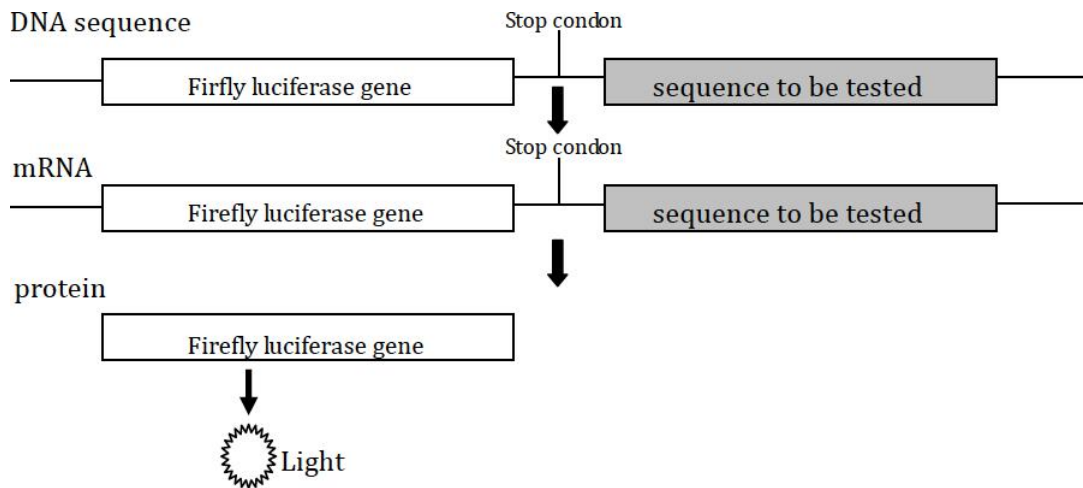
未添加针对目的序列有效 miRNA 干扰序列，正常的转录翻译过程；

或将靶基因 3'-UTR 种子区（seed region）突变为 miRNA 不结合的位点后的转录翻译过程：

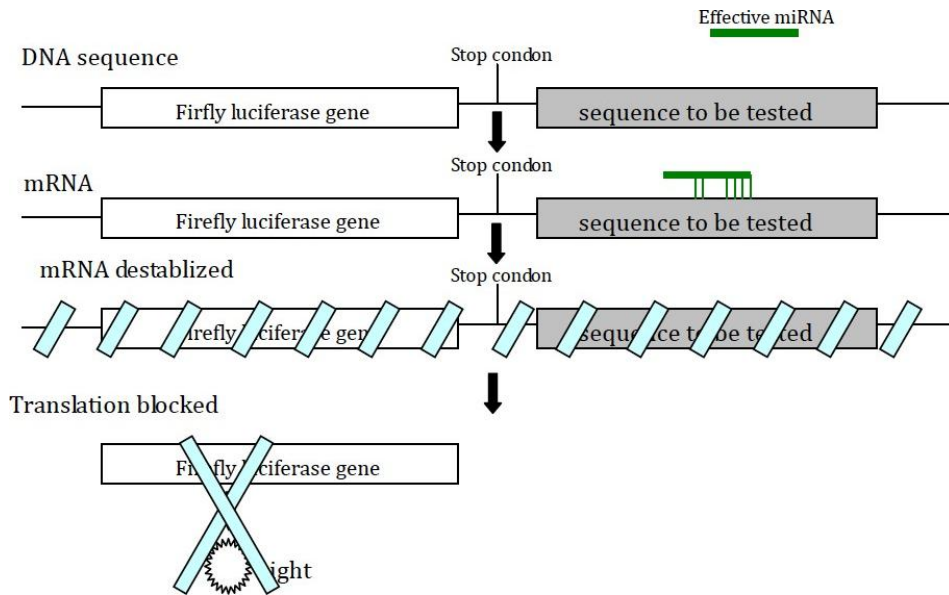


GenePharma

添加针对目的序列有效 miRNA 干扰序列后，通过与靶基因 3'-UTR 种子区 (seed region) 不完全碱基互补结合的转录翻译过程：



添加针对目的序列有效 miRNA 干扰序列后，通过与靶基因 3'-UTR 种子区 (seed region) 不完全碱基互补结合的转录翻译过程：



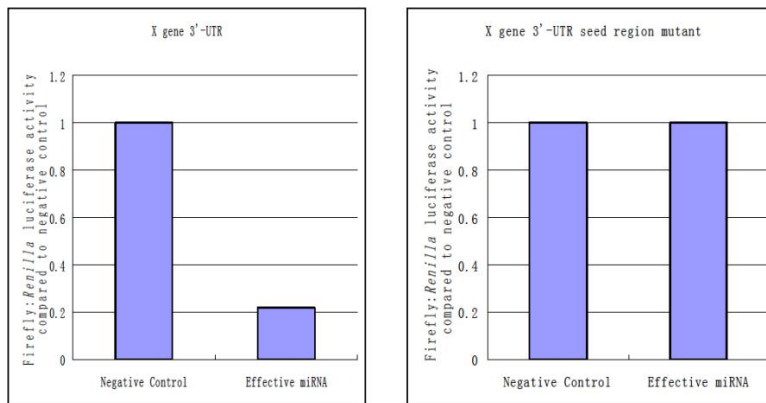
4.5 使用方法

1. 吉玛公司构建的 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector-sequence to be tested 质粒，出货标准为 50 μg ，出货前会进行抽干步骤，收到时为粉末状，可按照实验要求，稀释至所需浓度。



2. 因 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 同时表达萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase) 及海肾荧光素酶(Renilla Luciferase), 故无需准备对照 pRL 系列内参质粒, 可直接进行下游双荧光素酶检测实验。

4.6 模拟实验及结果



五、双荧光素酶报告实验简易使用方法

5.1 产品组成

1. 吉玛公司构建的 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector-sequence to be tested 质粒，出货标准为 50 μg ，出货前会进行抽干步骤，收到时为粉末状，可按照实验要求，稀释至所需浓度。
2. 因 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 同时表达萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）及海肾荧光素酶（Renilla Luciferase），故无需准备对照 pRL 系列内参质粒，可直接进行下游双荧光素酶检测实验。

| 产品 | 包装 | 目录号 |
|--|---|--------|
| 双荧光素酶检测系统质粒野生型 WT ($\leq 500\text{bp}$) | 50 μg (含菌液 500 μl) | C09005 |
| 双荧光素酶检测系统质粒突变型 MUT | 50 μg (含菌液 500 μl) | C09006 |

保存条件：-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存运输：常温

5.2 细胞效率评价转染

5.2.1 实验材料及试剂

1. 完全培养基
2. PBS
3. Trypsin-EDTA Solution (Gibco)
4. 96 孔板 (Corning)
5. 转染试剂
6. Oligo: Cy3-NC (GenePharma)
7. 质粒: pEX-1 (GenePharma)



5.2.2 oligo 转染步骤

1. 待测细胞在 10cm dish 中培养至 80-90% 融合时，倾去培养液，用 3ml PBS 洗涤细胞两次；
2. 加 1ml Trypsin-EDTA solution, 混匀后，小心吸去胰酶溶液，37°C 放置 1-5分钟；
3. 在分别加入 2 ml 完全培养基，吹打使细胞形成单细胞悬液；
4. 血球计数板计数，将细胞稀释至 3×10^5 细胞/ml；
5. 按 5×10^3 细胞/孔的浓度接种 96 孔板，混匀后于 37°C 5% CO₂ 培养 24h；
6. 每 1 OD₂₆₀ siRNA- Cy3-NC 用 120 μ l DEPC-H₂O 溶解，终浓度约为 20 μ M；
7. 在 3个 1.5 ml EP 管中都加入 50 μ l 无血清培养基，再分别加入不同剂量（0.5 μ l、1 μ l、2 μ l）的 Cy3-NC，混匀；取另一 1.5 ml EP 管，加入 150 μ l（50 μ l/well \times 3 well）无血清培养基，加入 1.5 μ l 的转染试剂，混匀，室温放置 5 分钟后三等分含 1.5 μ l 转染试剂的无血清 DMEM 分别与含 oligo 的 EP 管混合，室温放置 20 分钟；
8. 吸去 96 孔板中的培养液，将转染混合物逐滴加入 96 孔板中，混匀后，在培养箱中温育 4-6 小时；
9. 转染 Cy3-NC 组吸弃转染液，用 PBS 漂洗后，转染细胞加入适量 PBS，观察转染结果并拍照。



5.2.3 质粒转染步骤

1. 待测细胞在 10 cm dish 中培养至 80-90% 融合时，倾去培养液，用 2ml PBS 洗涤细胞两次；
2. 加 1ml Trypsin-EDTA solution, 混匀后，小心吸去胰酶溶液，37°C 放置 1-5分钟；
3. 加入 2 ml 完全培养基，吹打使细胞形成单细胞悬液；
4. 血球计数板计数，将细胞稀释至 1×10^6 细胞/ml；
5. 取 100 μ l 上述细胞稀释液加入 96 孔板，使细胞密度达到 1×10^5 个细胞/孔，混匀后于 37°C 5% CO₂ 培养 24 小时；
6. 在 3 个 1.5 ml EP 管中各加入 50 μ l 无血清培养基，分别加入 0.2 μ g, 0.4 μ g, 0.8 μ g pEX-1 质粒，混匀；取另一 1.5 ml EP 管，加入 150 μ l 无血清 DMEM，加入 1.5 μ l 转染试剂，充分混匀，室温放置 5 分钟后将 150 μ l 平均 3 等份对应加入含有质粒的 3 个 EP 管，充分混合，室温放置 20 分钟；
7. 吸去 96 孔板中的培养液，将转染混合物逐滴加入 96 孔板中，混匀后，在培养箱中温育 5 小时；
8. 吸弃转染液，加入 100 μ l 完全培养液。37°C 5% CO₂ 继续培养, 24h 和 48h 观察并拍照质粒转染效果图片。

5.3 细胞转染

5.3.1 实验材料及试剂

1. 待测细胞
2. 完全培养基
3. 无血清培养基
4. PBS
5. Trypsin-EDTA Solution (Gibco)
6. 转染试剂
7. 12 孔板 (Corning)
8. Oligo (GenePharma)



5.3.2 实验步骤

1. 待测细胞在 10 cm 培养皿中培养至 80-90% 融合时，倾去培养液，用 2 ml PBS 洗涤细胞两次；
2. 加入 2 ml Trypsin-EDTA solution, 混匀后，37°C 放置 1-5 分钟；
3. 小心吸去胰酶溶液，加入 2 ml 完全培养基，吹打使细胞形成单细胞悬液；
4. 血球计数板计数，将细胞稀释至 1×10^6 细胞/ml。按 5×10^5 细胞/孔的浓度接种 12 孔板，混匀后于 37°C 5% CO₂ 培养 24 小时；
5. 每 1 OD₂₆₀ microRNA 用 125 μ l DEPC-H₂O 溶解，终浓度约为 20 μ M；
6. 在 1.5 ml EP 管中加入 100 μ l 无血清培养基，加入 2-8 μ l microRNA（推荐加入 5-6 μ l），再加入对应的双荧光报告载体 1 μ g，混匀；取另一 1.5 ml EP 管，加入 100 μ l 无血清 DMEM，加入 4 μ l lipofectamine 2000，混匀，室温放置 5 分钟后将两管混合，室温放置 20 分钟；
7. 实验分组：
验证分组为：A. mimic NC+ WT；B. mimic NC+ MUT；C. miRNA + WT；D. miRNA + MUT；E. mimic NC+ miRNA PC；F. miRNA + miRNA PC，各组设 3 复孔；
8. 吸去 12 孔板中的培养液，将转染混合物逐滴加入 12 孔板中，混匀后，在培养箱中温育 5 小时；
9. 吸弃转染液，加入 500 μ l 完全培养基。37°C 5% CO₂ 继续培养 24、48 小时，分别收样；
10. 所得细胞用于双荧光素酶系统检测。

5.4 双荧光素酶系统检测（Promega）

5.4.1 实验材料及试剂

1. PBS
2. 96 孔板（Corning）
3. Dual-Luciferase 报告基因检测系统试剂盒（Promega）
4. 多功能酶标仪
5. 非透明多孔板



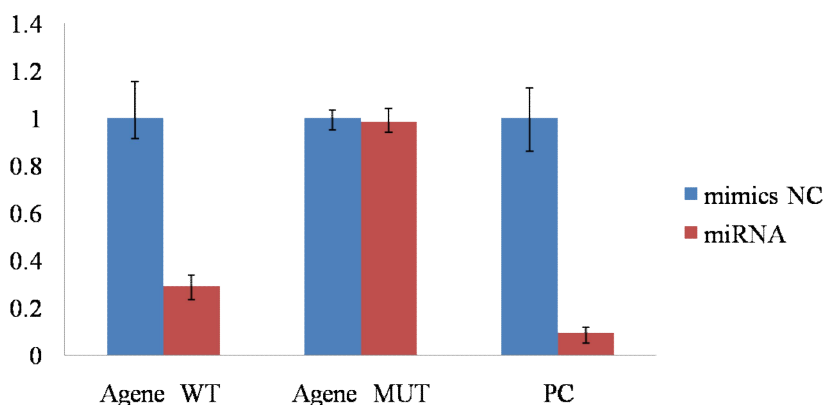
5.4.2 试剂准备

1. 制备被动裂解缓冲液 1×PLB：将 1 倍体积的 5 × Passive Lysis Buffer (PLB) 加到 4 倍体积的蒸馏水中，混合均匀。4°C 储存待用；
2. LARII：用 Luciferase Assay Buffer II 溶解冻干粉 Luciferase Assay Substrate，储存于-20°C 待用；
3. 配制 1× Stop&Glo® 试剂（现用现配）：按本次实验所需用量，取一定量的 50×Stop&Glo®加入到相应量的Stop&Glo® Buffer 中，配种成终浓度为 1× 浓度，待用。

5.4.3 荧光素酶活性检测步骤

1. 倾去 12 孔板中的培养液，用 500 μl PBS 洗涤细胞两次，此过程必须仔细，不要接触贴壁细胞；
2. 将 1×PLB 300 μl 加入到培养孔中。细胞被动裂解：在室温轻缓晃动培养板15 分钟，把裂解液转移到检测试板中。每孔 100 μl，实验设计 3 复孔；
3. 打开 tecan M1000 酶标仪，预热，选择双荧光素酶检测系统；
4. 每孔加入 10 μl 的 LARII 试剂，选择 1-2 秒延迟，5-10 读数，酶标仪上检测萤火虫荧光素酶活性；
5. 取出测试板，每孔加入 10 μl Stop&Glo®试剂，选择 1-2 秒延迟，5-10 读数，酶标仪上检测海肾荧光素酶活性；
6. 结果统计与分析。

5.5 模拟实验及结果





GenePharma

GenePharma---a siRNA company

六、联系我们

6.1 上海公司

联系电话：021-51320195, 51370738, 51370739

传真：021-51320295 邮编：201203

公司地址：上海浦东新区张江高科技园区哈雷路 1011 号

技术支持：021-51320195-8009 E-Mail: rnaisupport@genepharma.com

6.2 苏州公司

联系电话：0512-86668828

传真：0512-86665900 邮编：215123

公司地址：苏州工业园区东平街 199 号

技术支持：0512-86668828-8043 E-Mail: szsupport@genepharma.com

6.3 全国各地销售经理

华东销售：13611923763; shanghai@genepharma.com

华北销售：13691331614; beijing@genepharma.com

华南销售：13543459726; guangzhou@genepharma.com

华中销售：13971638650; wuhan@genepharma.com

东北销售：18704071504; dongbei@genepharma.com

西北销售：18710319550; xibei@genepharma.com

苏南销售：18862118458; sales@genepharma.com

西南销售：13983008042; chongqing@genepharma.com