

双荧光素酶报告基因检测（启动子活性）实验

一、服务简介

荧光素酶 (Luciferase) 报告基因系统是以荧光素(luciferin)为底物来检测 Luciferase 活性的一种报告系统。Luciferase 可以催化 luciferin 为氧化荧光素，并发出生物荧光。

双荧光素酶报告基因系统指的是在同一细胞中同时表达两种荧光素酶——萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶，利用一个报告基因作为内参来校正另一个报告基因，从而减少细胞活性和转染效率对实验结果的影响，使数据更准确。

二、技术应用

- 1、将待测启动子构建至荧光素酶基因的上游，检测启动子活性；
- 2、在转染启动子荧光报告基因载体的同时转染转录因子的表达载体，检测转录因子与目标启动子的相互作用；

三、技术优势

- 1、灵敏度高，细胞内均无两种荧光素酶的底物，无内源性干扰；
- 2、检测范围宽，大于 7 个数量级；
- 3、检测速度快，样品无需孵育等预处理；
- 4、操作简便，可以在同一管内完成 2 个荧光素酶的检测。

四、服务内容

- 1、构建荧光素酶载体（或客户自备载体）；
- 2、细胞培养与转染；
- 3、荧光素酶检测；
- 4、数据分析。

五、中科生物服务须知

服务项目	客户提供	交付产物	实验周期
启动子活性检测	1、待测启动子序列 2、含待测启动子的质粒模板 3、待转染的细胞和培养信息	1、构建好载体的质粒和甘油菌 2、荧光素酶检测原始数据 3、数据分析结果	3-5 周
转录因子与目的基因 启动子区相互作用检测	1、待测启动子、转录因子序列 2、含待测启动子的质粒模板 3、含待测待转录因子的质粒（可由我方构建） 4、待转染的细胞和培养信息	1、构建好载体的质粒和甘油菌 2、荧光素酶检测原始数据 3、数据分析结果	3-5 周

六、实验周期及实验费用：详情请咨询我司客服人员

案例分享

摘要：通过双萤光素酶报告基因系统检测转录因子 steroidogenic factor-1 (SF-1) 能否与 Oct-4 启动子片段发生作用。实验结果显示二者存在调控关系。

关键词：steroidogenic factor-1 (SF-1) , Oct-4 promoter, transcription factors, Dual-Reporter Assay,

一、实验原理

萤光素酶是理想的报告基因，因为哺乳动物细胞中不含内源性萤光素酶，一旦转录完成立刻就生成功能性的萤光素酶。单报告基因实验往往会受到各种实验条件的影响，而双报告基因则通过共转染的“对照”作为内参为试验提供一基准线，从而可以在最大程度上减小细胞活性和转染效率等外在因素对实验的影响，使得数据结果更为可信。Dual-Luciferase® 双萤光素酶报告基因检测系统在细胞中同时表达萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶，两者没有种源同源性并对应不同的反应底物，故而没有交叉干扰。得益于超强的光信号和超高的信噪比，本系统被广泛用于 miRNA 靶基因验证。

转录因子是一种具有特殊结构、行使调控基因表达功能的蛋白质分子，也称为反式作用

因子。某些转录因子仅与其靶启动子中的特异序列结合,这些特异性的序列被称为顺式因子,转录因子的 DNA 结合域和顺式因子实现共价结合,从而对基因的表达起抑制或增强的作用。萤光素酶报告基因实验 (luciferase Assay) 是检测这类转录因子和其靶启动子中的特异顺序结合的重要手段,其原理简述如下: (1) 用靶启动子的特定片段替换报告基因质粒 (如 pGL3-basic) 的启动子区。(2) 将要检测的转录因子表达质粒与报告基因质粒共转。如果该转录因子能够激活靶启动子,则萤光素酶就会表达,且其表达量与转录因子的作用强度成正比。(3) 加入特定的底物,萤光素酶与底物反应,产生萤光素,检测荧光的强度可以对萤光素酶的活性定量,进而判断该转录因子能否与靶启动子片段发生作用 (及其作用强度)。

二、 实验目的

验证转录因子 SF-1 能否与 Oct-4 启动子片段发生作用。

三、 实验步骤

1. 质粒转染细胞:

- 1) 细胞铺板: 将细胞按 70% 的汇合度接种到 96 孔板。
- 2) 转染: 16h 后转染萤光素酶报告基因质粒和 RNA, 每个样品设置 6 个复孔
 - a) 配制 DNA 和转染试剂: 96 孔板转染质粒时每孔比例为 pLenti: Firefly: Renilla: 转染试剂=0.2 μ g: 0.1 μ g: 0.01 μ g: 0.25 μ L
 - b) 稀释好 DNA 及转染试剂, 常温孵育 5min
 - c) 将稀释好的 DNA 分别和转染试剂混匀, 常温孵育 20min
 - d) 每孔弃去 15 μ L 培养基, 将 15 μ L DNA 转染混合液添加到每孔细胞样品中
 - e) 转染 6h 后, 换新鲜完全培养基

2. 双报告基因检测

- a) 质粒共转染 48h 后, 弃去培养基, 用 100 μ L 1XPBS 洗 1 遍
- b) 倾斜 96 孔板, 吸干剩余的 PBS
- c) 去离子水将 5XPLB 稀释成 1XPLB, 使用前放到常温
- d) 每孔加 50 μ L 稀释好的 1X PLB, 摇床常温条件下摇 15min, 进行裂解
- e) 白色不透光的 96 孔酶标板中每孔加步骤 4 的上清液 10 μ L, 加入 100 μ L 预先混好的 LAR II, 2s 后测数据
- f) 每孔添加 100 μ L 预先混好的 Stop&Glo Reagent, 静止 2s 后, 测数据

注意: 进行 Luciferase 活性检测时, 需在避光条件下进行。

四、 实验结果

空白校准后的数据：

Data 1		NC+Oct-4 promoter	SF-1+Oct-4 promoter
Firefly luciferase	Group 1	765667	6702857
	Group 2	772333	6609524
	Group 3	827190	6453810
	Group 4	787000	6178571
	Group 5	852381	7193333
	Group 6	954762	8029524
Renilla luciferase	Group 1	858273	1178500
	Group 2	776000	1230364
	Group 3	865227	1176773
	Group 4	831682	1207091
	Group 5	1024227	1367409
	Group 6	1432682	1819818
Ratio	Group 1	0.892102	5.687617
	Group 2	0.995275	5.372008
	Group 3	0.956038	5.48433
	Group 4	0.946275	5.118563
	Group 5	0.832219	5.260557
	Group 6	0.666416	4.412267

Firefly luciferase 的数据除以 Renilla luciferase 的数据，用平均值做图。

p 值的计算方法为双侧 student-T-test。P 值判断两组数据的差异是否显著。

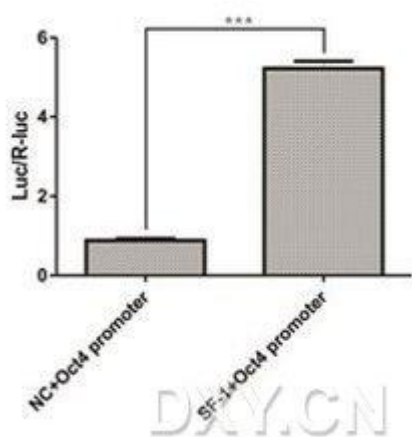


图 1. SF-1 调控 Oct-4 启动子区

***表示 $p < 0.001$

结论：从图 1 的结果可以看到，在 SF-1 过表达的情况下，Oct-4 启动子活性相对对照组明显升高 ($p < 0.001$)。

五、 参考文献

1. Yang HM, Do HJ, Kim DK, Park JK, Chang WK, Chung HM, Choi SY, Kim JH. Transcriptional regulation of human Oct-4 by steroidogenic factor-1. *J Cell Biochem.* 2007;101(5):1198-1209.
2. Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ. Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 15;88(10):4438-42.
3. Farr A, Roman A. pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Res.* 1992 Feb 25;20(4):920.
4. 3. Sherf, B.A. et al. Dual-Luciferase® reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. 1996 Promega Notes 57, 2-9.