



GenePharma

双荧光素酶 载体构建服务

Version: B027-V005-20230529



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、psiCHECK TM •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
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（GenePharma）.....	15
5.5 模拟实验及结果.....	16
六、联系我们.....	17
6.1 上海公司.....	17
6.2 苏州公司.....	17
6.3 全国各地区销售经理.....	17



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）；

psiCHECK™ Vector（psiCHECK™-1 Vector、psiCHECK™-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：psiCHECK™-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

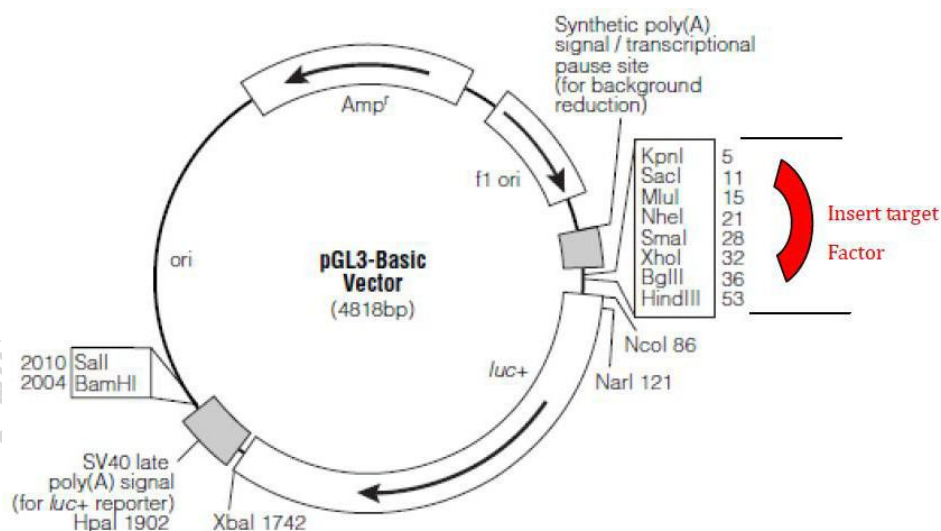
pGL3-Basic Vector 可以用来检测那些潜在调控哺乳动物基因表达的因子，包括顺式作用元件如启动子和增强子以及反式作用因子如大量的 DNA 结合因子。

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）

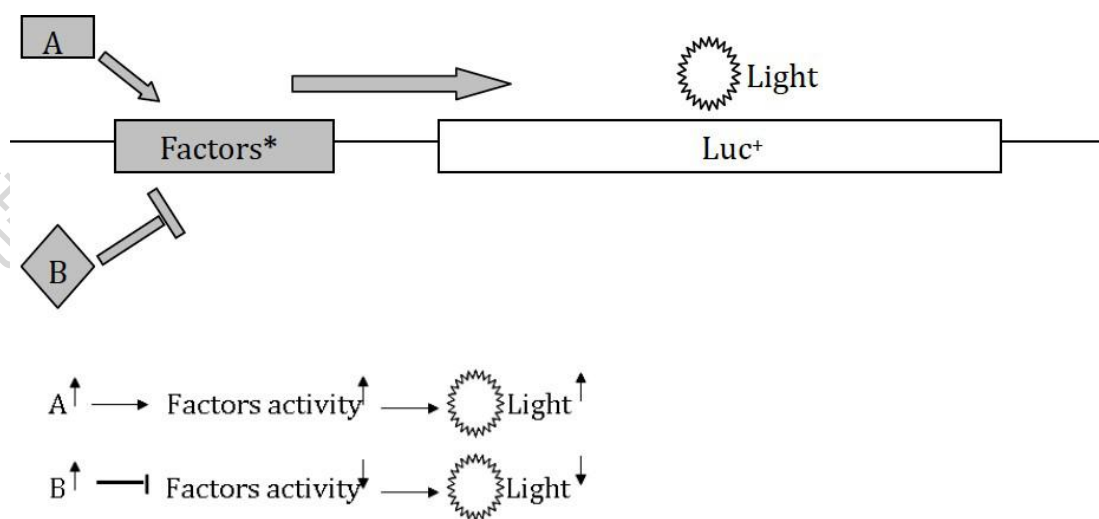


GenePharma

GenePharma---a siRNA company

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

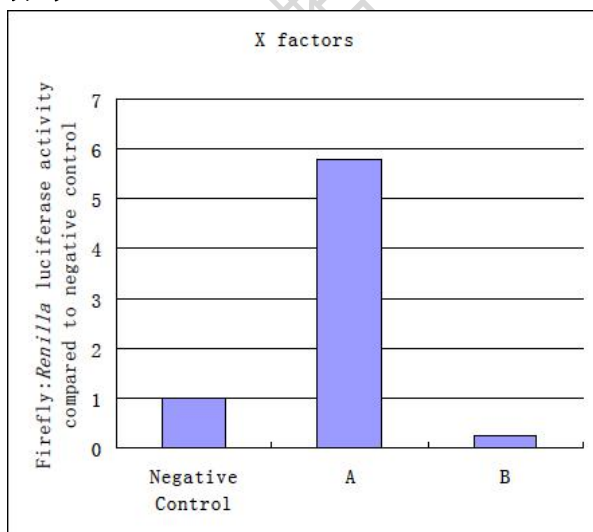
A, B : proteins that may play an important role on factors activity

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，收到时为液体。
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。

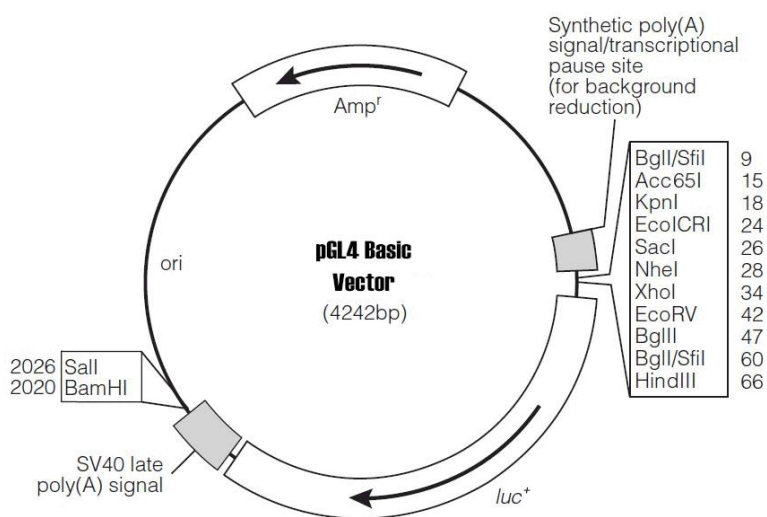


2.6 模拟实验及结果



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。



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

三、psiCHECK™•2 Vector

3.1 使用范围

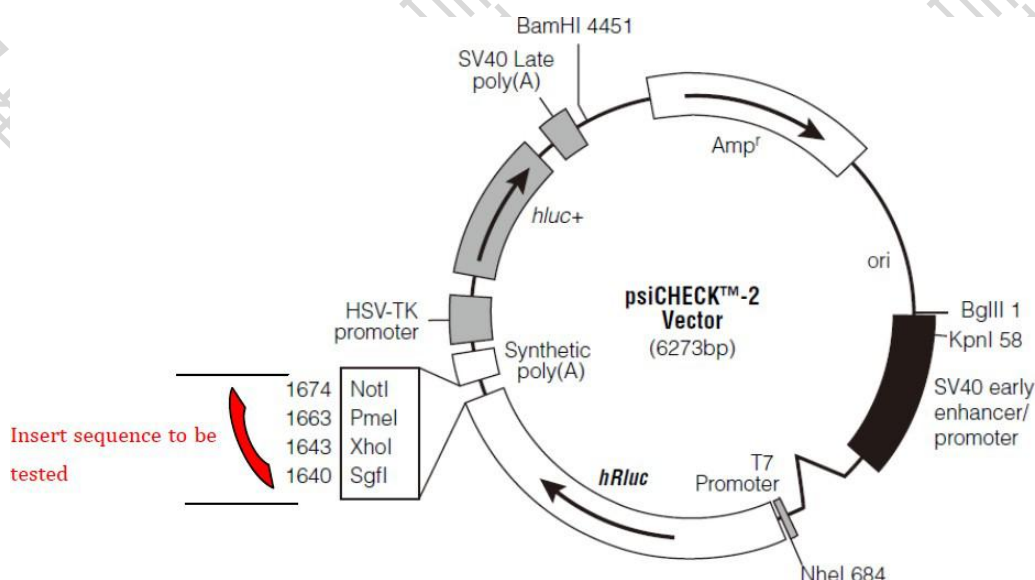
psiCHECK™-2 Vector 可以用来检测合成的短双链干扰 RNA（包括 siRNA 及 microRNA）的干扰效果，是一个初期筛选的平台，但因其启动子为强启动子，所以更适合筛选 siRNA 有效干扰序列。

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。

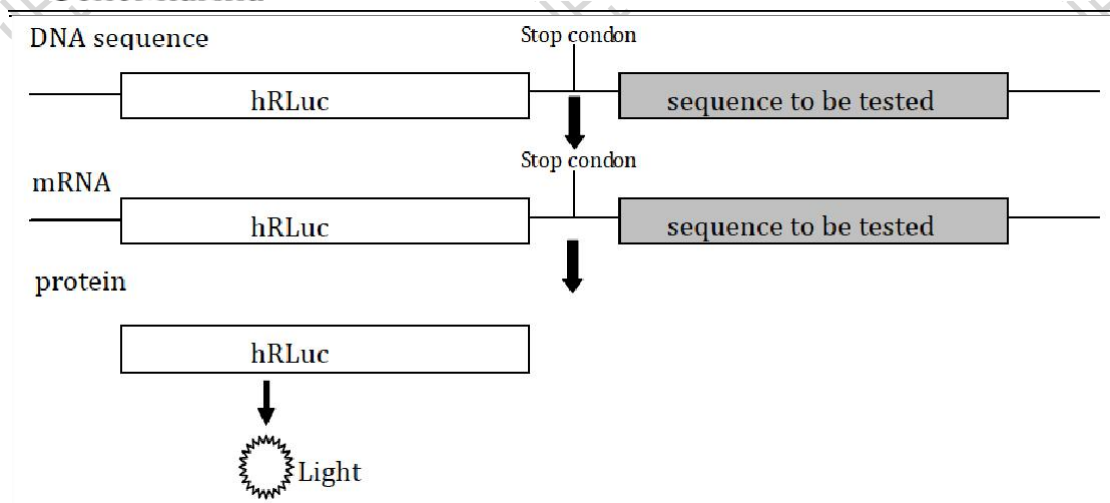
3.4 检测机制

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:

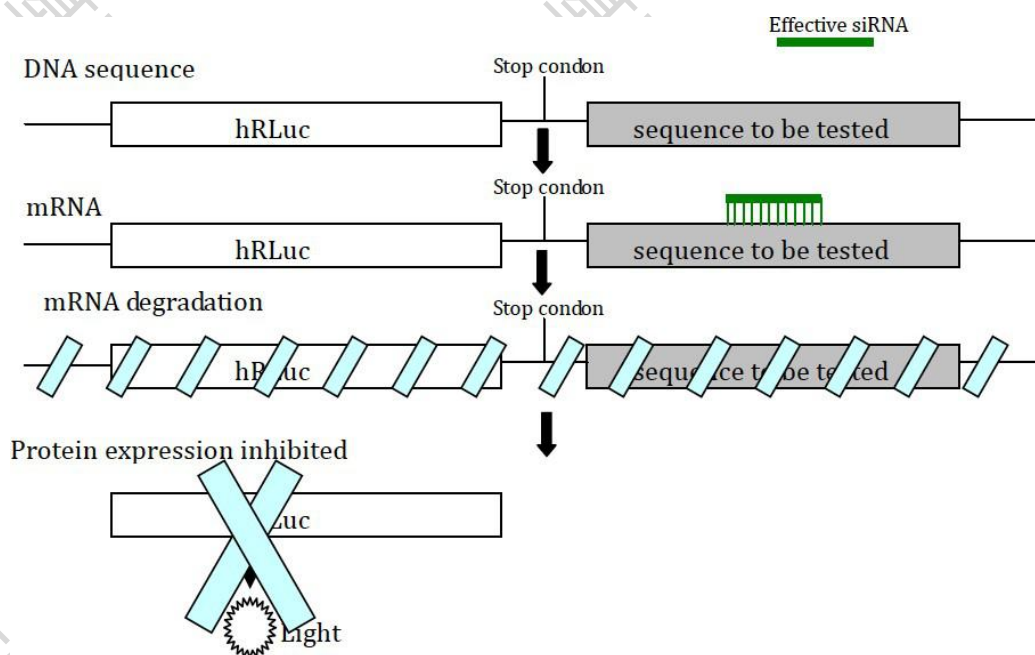


GenePharma---a siRNA company

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 psiCHECKTM-2 质粒，出货标准为 50 μ g，收到时为液体。

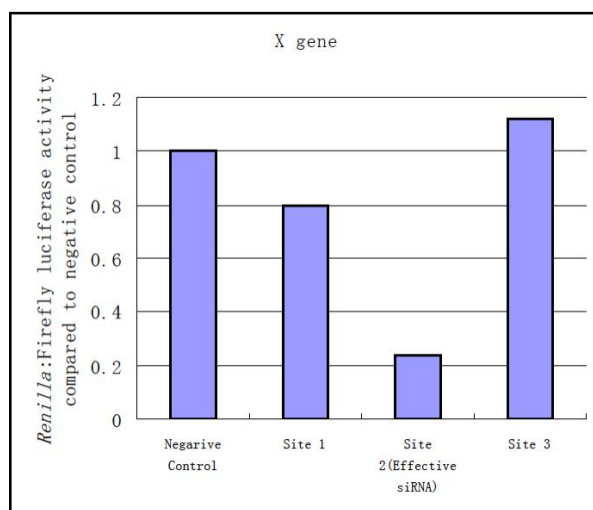


GenePharma

GenePharma---a siRNA company

2. 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。



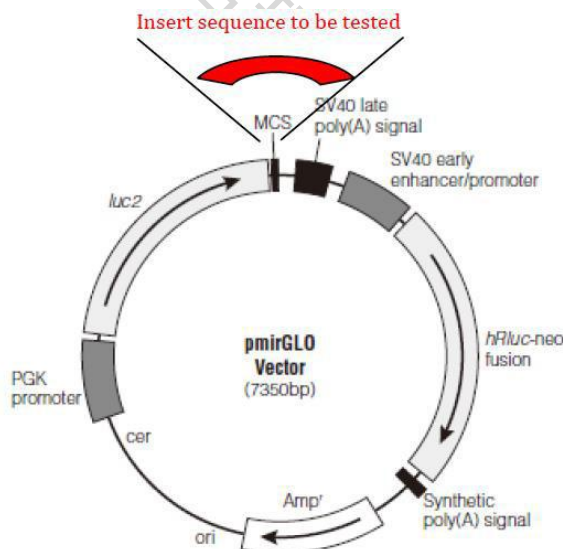
GenePharma

GenePharma---a siRNA company

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。

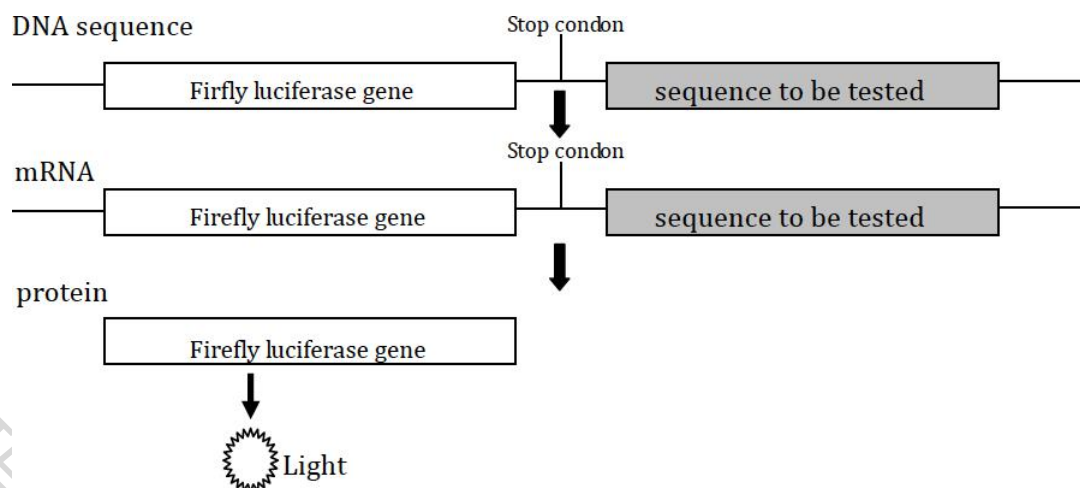
4.4 检测机制

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；

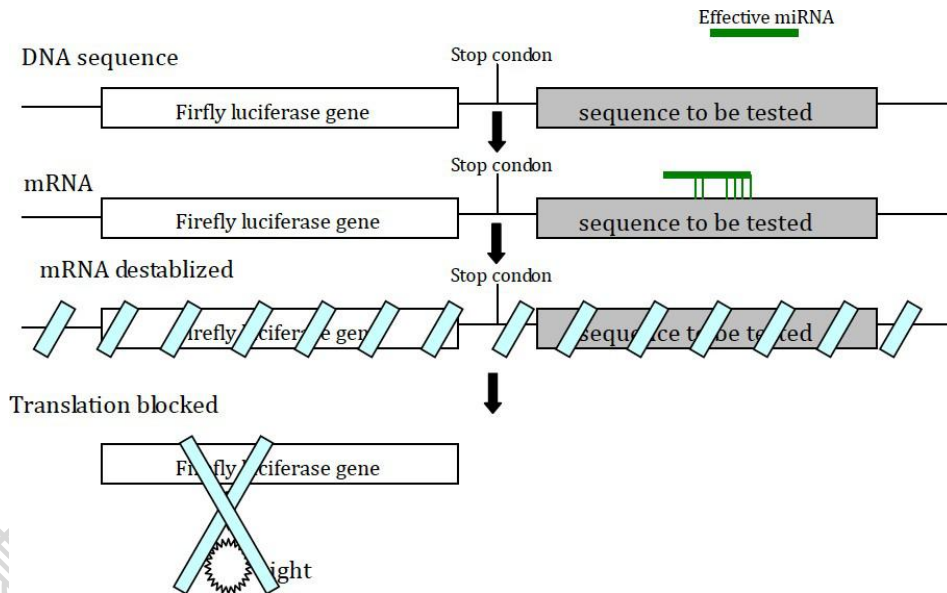
或将靶基因 3'-UTR 种子区（seed region）突变为 miRNA 不结合的位点后的转录翻译过程：



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 ，收到时为液体。
2. 因 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 同时表达萤火虫荧光素



GenePharma---a siRNA company

GenePharma

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。



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

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℃ 保存运输：常温

5.2 细胞转染效率评价

5.2.1 实验材料及试剂

1. 培养基
2. FBS
3. PBS
4. Trypsin-EDTA Solution (Gibco)
5. 24 孔板 (Corning)
6. GP-transfect-Mate (GenePharma)
7. oligo (NC-FAM/ NC-Cy3) (GenePharma)
8. 质粒 PEX-1-GFP (GenePharma)



5.2.2 oligo转染实验步骤

1. 将状态良好的待测细胞消化后重悬，取适量细胞接种至24孔板中，37℃培养箱中过夜，密度约60%~70%。
2. 按下表分组：

分组	转染试剂用量	oligo 用量	oligo 终浓度
A	2μl	12.5pmol	50nM
B		25pmol	100nM
C		50pmol	200nM

3. 配制转染复合物（以一个孔为例）：先取转染试剂加入到25μl 无血清培养基中，混匀；再取转染物加入25μl 无血清培养基中，混匀。室温放置5min后将两者混合，再室温放置20min。
4. 吸去24孔板中原培养基，加入200μl 无血清培养基，再逐滴加入转染复合物，37℃培养箱中培养。
5. 6h换液于荧光倒置显微镜下观察并记录结果。

5.2.3 质粒转染实验步骤

1. 将状态良好的待测细胞消化后重悬，取适量细胞接种至24孔板中，37℃培养箱中过夜，密度约60%~70%。
2. 按下表分组：

分组	转染试剂用量	质粒用量	质粒终浓度
A	2μl	0.25μg	1ng/μl
B		0.5μg	2ng/μl
C		1.0μg	4ng/μl

3. 配制转染复合物（以一个孔为例）：先取转染试剂加入到25μl 无血清培养基中，混匀；再取转染物加入25μl无血清培养基中，混匀。室温放置5min后将两者混合，再室温放置20min。
4. 吸去24孔板中原培养基，加入200μl 无血清培养基，再逐滴加入转染复合物，37℃培养箱中培养。
5. 6h换液，37℃培养箱中培养至转染后24h、48h于荧光倒置显微镜下观察并记录结果。



5.3 正式实验细胞转染

5.3.1 实验材料及试剂

1. 培养基
2. FBS
3. PBS
4. Trypsin-EDTA Solution (Gibco)
5. GP-transfect-Mate (GenePharma)
6. 12 孔板 (Corning)
7. 质粒 (GenePharma)
8. oligo (GenePharma)

5.3.2 实验步骤

1. 将状态良好的待测细胞消化后重悬，取适量细胞/孔接种至 12 孔板中，37℃培养箱中过夜，密度约 60%~70%。
2. 按以下分组进行转染：

分组	质粒	oligo
1	WT	NC
2		miR mimics
3	MUT	NC
4		miR

3. 转染复合物制备：先取 4 μ l GP-transfect-Mate 加入到 50 μ l 无血清培养基中，混匀；再取上 50 pmol oligo 和 1 μ g 质粒加入 50 μ l 无血清培养基中，混匀；室温放置 5 min 后将两者混合，再室温放置 20 min。
4. 吸去 12 孔板中原培养基，加入转染复合物，37℃培养箱中培养。
5. 6 h 后更换新鲜培养基，37℃培养箱中培养。
6. 转染后 24h/48h 收样检测。

5.4 Luciferase检测

5.4.1 实验材料及试剂

1. 双荧光素酶试剂盒 (GenePharma)



2. PBS
3. 非透明 96 孔板
4. 多功能酶标仪 (Synergy HTX)

5.4.2 试剂准备

使用前短暂离心萤火虫/海肾荧光素酶底物 (200×)，根据每次实验需要现用现配：

1. 细胞裂解液 (5×)

5×细胞裂解液使用ddH₂O按照1:5稀释成工作液 (1×) 后使用。

2. 萤火虫荧光素酶反应液

萤火虫荧光素酶底物 (200×) 用萤火虫荧光素酶缓冲液按照1:200稀释成反应液后使用。

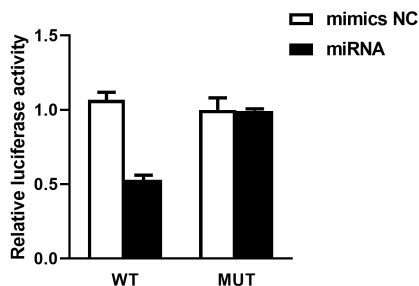
3. 海肾荧光素酶反应液

海肾荧光素酶底物 (200×) 用海肾荧光素酶缓冲液按照1:200稀释成反应液后使用。

5.4.3 实验步骤

1. 除去培养细胞中的培养基。
2. 用1×PBS清洗培养细胞，去掉清洗液。
3. 加入400 μl 1×细胞裂解液/孔至养孔中。
4. 取 50 μl 细胞裂解液，加至酶标板中。按照实验需要，可设置3孔-5孔重复；
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，检测尽量在 30 min 内完成；
6. 加入100 μl 海肾荧光素酶反应液，立即上机震板混匀，检测海肾荧光素酶的活力；
7. 分析数据。

5.5 模拟实验结果





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 全国各地区销售经理

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: 15895836225; 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