

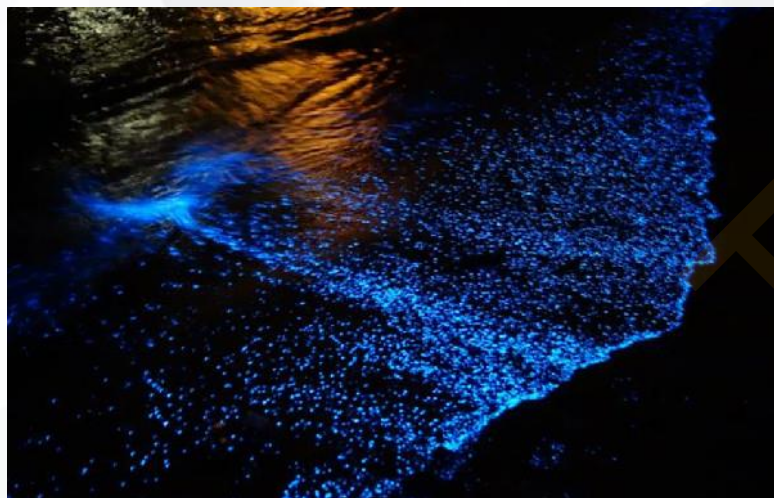


双荧光素酶报告系统应用



背景介绍

- ◆ 荧光素酶（Luciferase）是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称，来自于自然界能够发光的生物。
- ◆ 自然界存在的荧光素酶来自萤火虫、发光细菌、发光海星、发光节虫、发光鱼、发光甲虫等。细菌荧光素酶对热敏感，因此在哺乳细胞的应用中受到限制。目前，以北美萤火虫虫(*Photinus pyralis*)来源的荧光素酶基因应用的最为广泛。
- ◆ 荧光素酶是靠酶和底物的相互反应发光，特异性很强，灵敏度高，由于没有激发光的非特异性干扰，信噪比也比较高。



常见的报告基因

➤ β -半乳糖苷酶 (LacZ)

- 在真核细胞中有内源活性干扰

➤ 氯霉素乙酰转移酶 (CAT)

- 检测方法复杂，灵敏度不高

➤ 绿色荧光蛋白 (GFP)

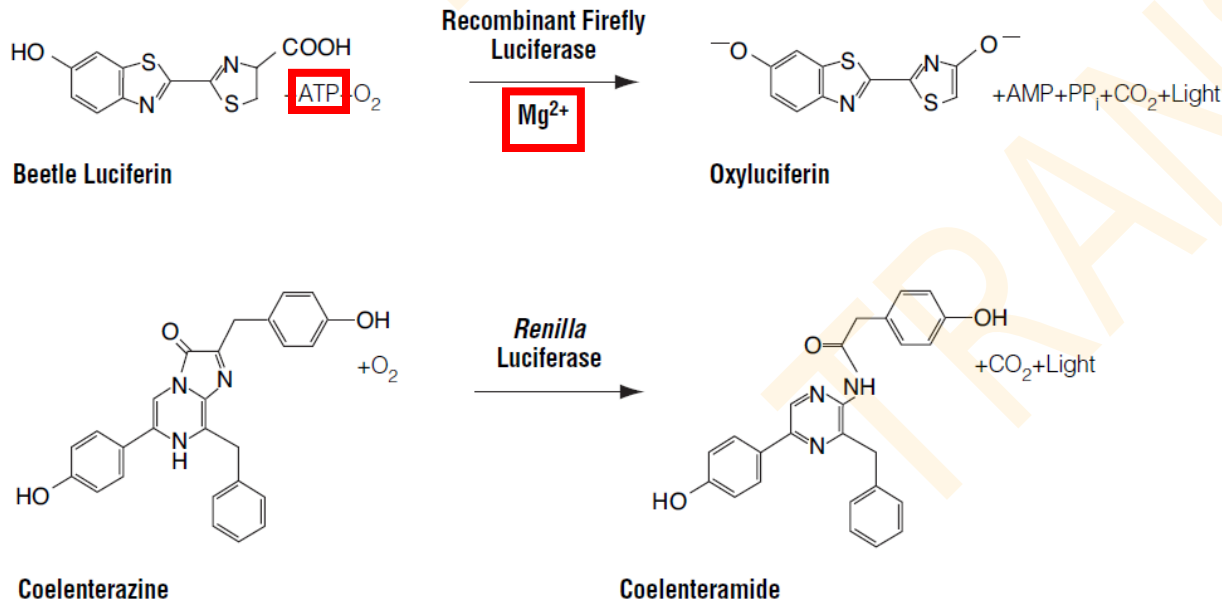
- 有时会有背景荧光，灵敏度不高

➤ 荧光素酶 (Luciferase)

- 检测迅速、灵敏度高、检测范围广、无细胞内源活性干扰

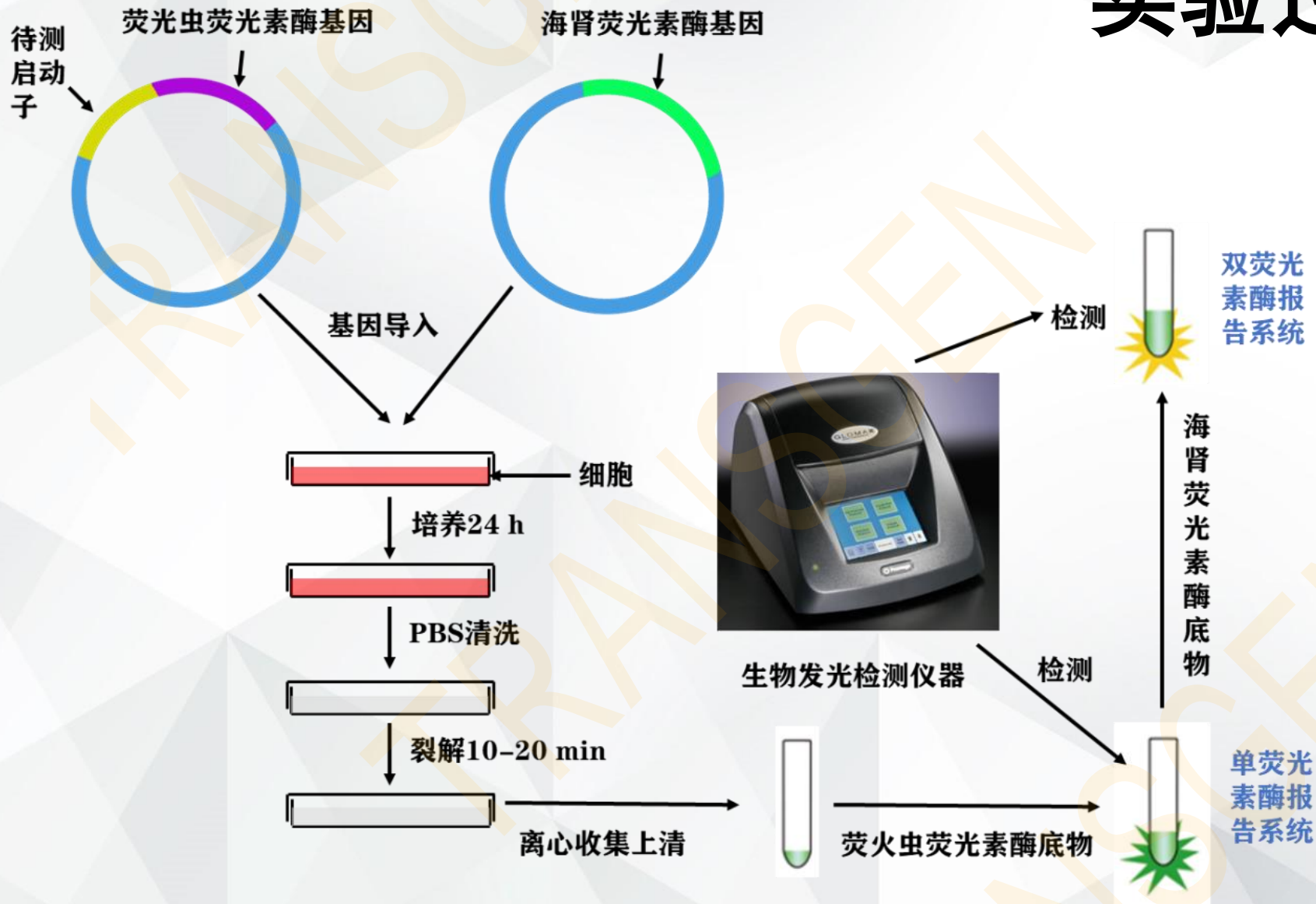
双荧光素酶报告基因系统

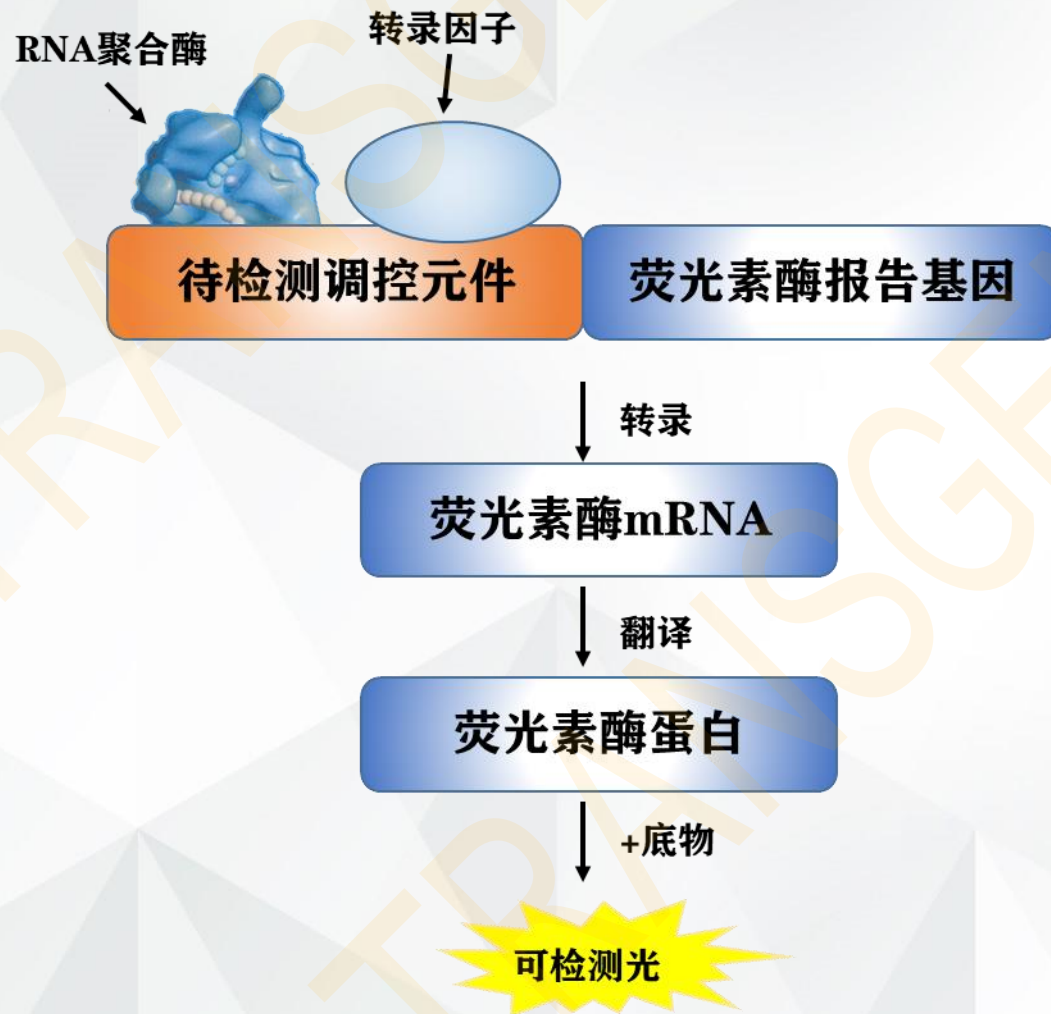
双荧光素酶报告基因检测系统是检测**转录因子与目的基因启动子区DNA**相互作用的一种有效检测方法。在检测过程中，萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase)和海肾荧光素酶(*Renilla luciferase*)可分别催化**荧光素 (luciferin)或腔肠素 (coelenterazine)氧化形oxyluciferin或coelenteramide**，并在此过程中产生生物荧光。



实验过程中，首先以**荧光素**为底物检测**萤火虫荧光素酶报告基因**的活性；之后在淬灭该荧光的同时，以**腔肠素**为底物检测**海肾荧光素酶报告基因**的活性；最后，以**海肾荧光素荧光值为内参**，根据**萤火虫荧光素荧光值的高低**评估检测因子与**DNA**的互作效果。

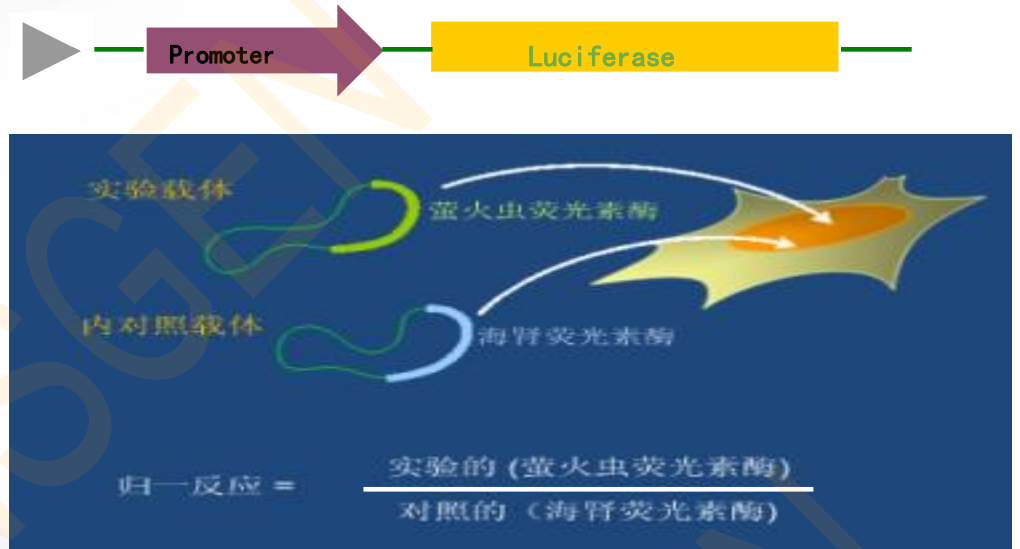
实验过程





通常把感兴趣的元件克隆在*Firefly luciferase*基因的上游或其它位置，构建成报告基因质粒，而以*Renilla luciferae*基因作为转录活力的内参。

- 研究基因转录调控元件（如启动子）
- 研究潜在调控子的核心元件（如增强子、抑制子）
- 研究miRNA的靶标（3'-UTR、LncRNA）
- 研究信号转导通路（如p53通路）
- 研究蛋白对RNA的降解作用（如抗病毒蛋白降解病毒RNA）
- 研究蛋白-蛋白相互作用、药物筛选等



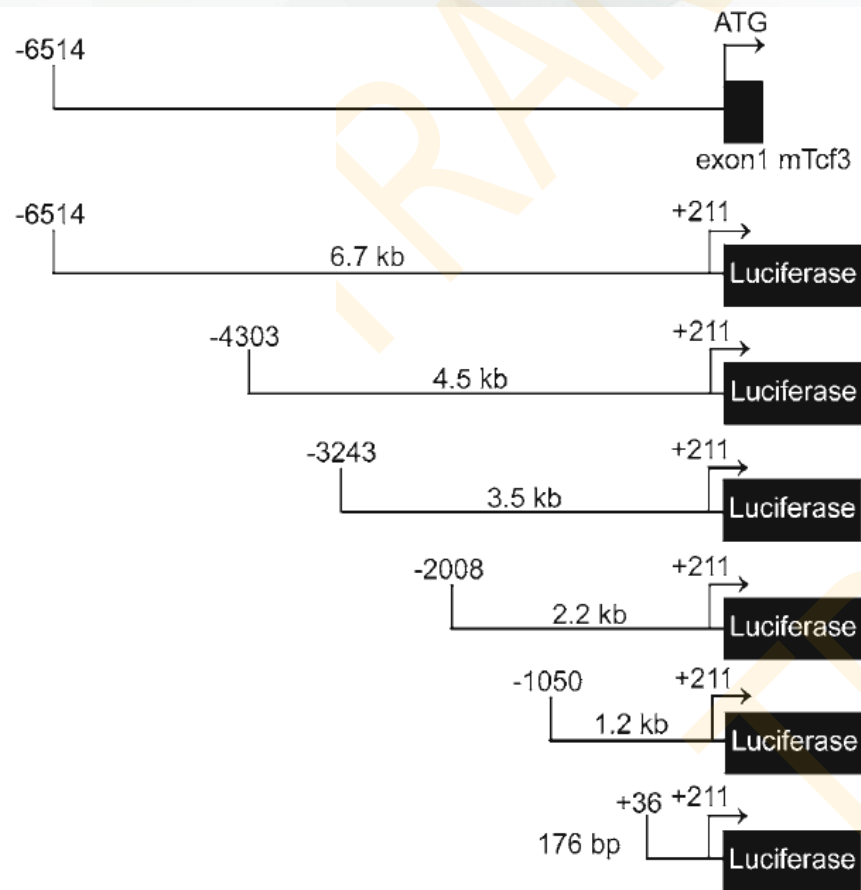
灵敏度高：
在同一个试管内即可完成两种荧光素酶检测



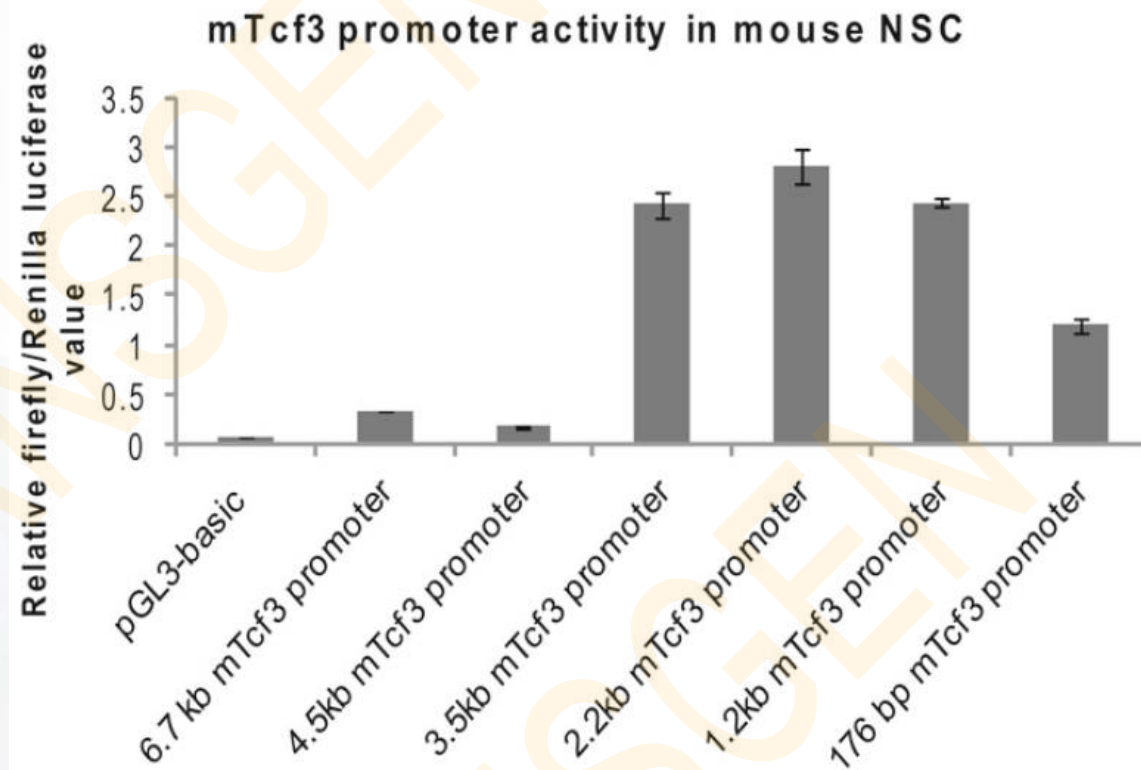


潜在启动子活性研究

报告载体构建

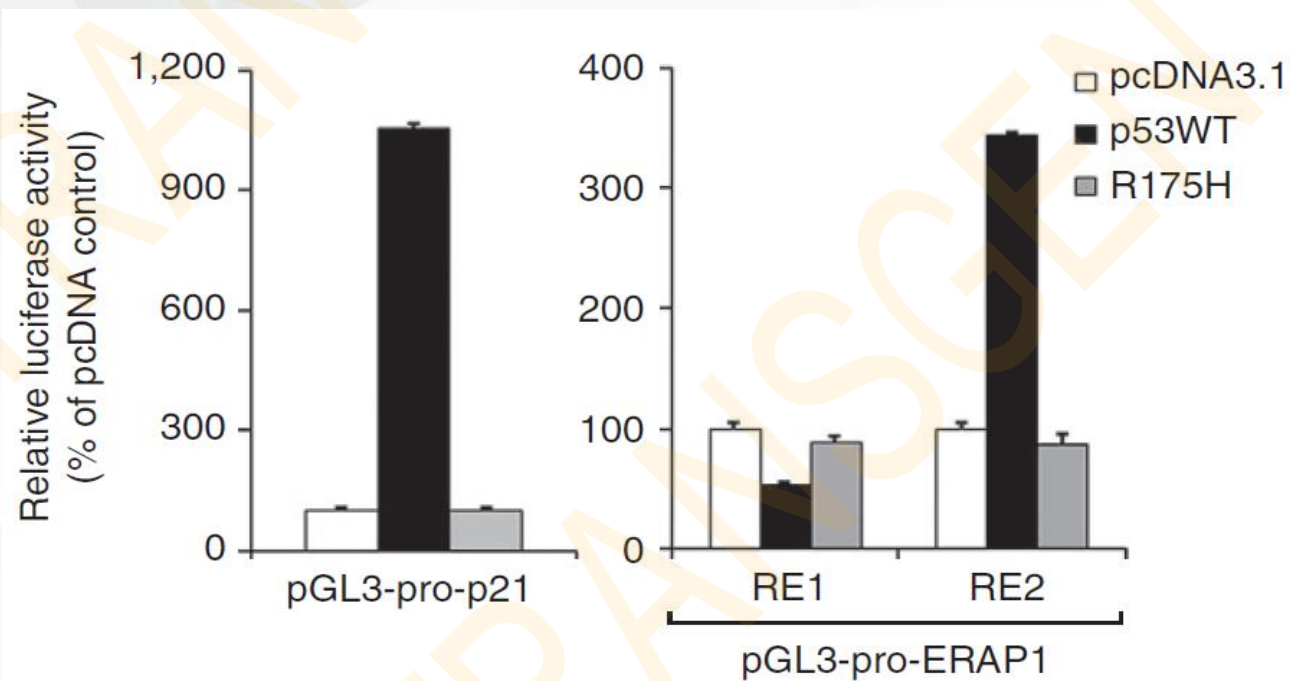


荧光素酶检测结果



核心调控元件的研究-1

p53通过ERAP1的反应元件调控其转录

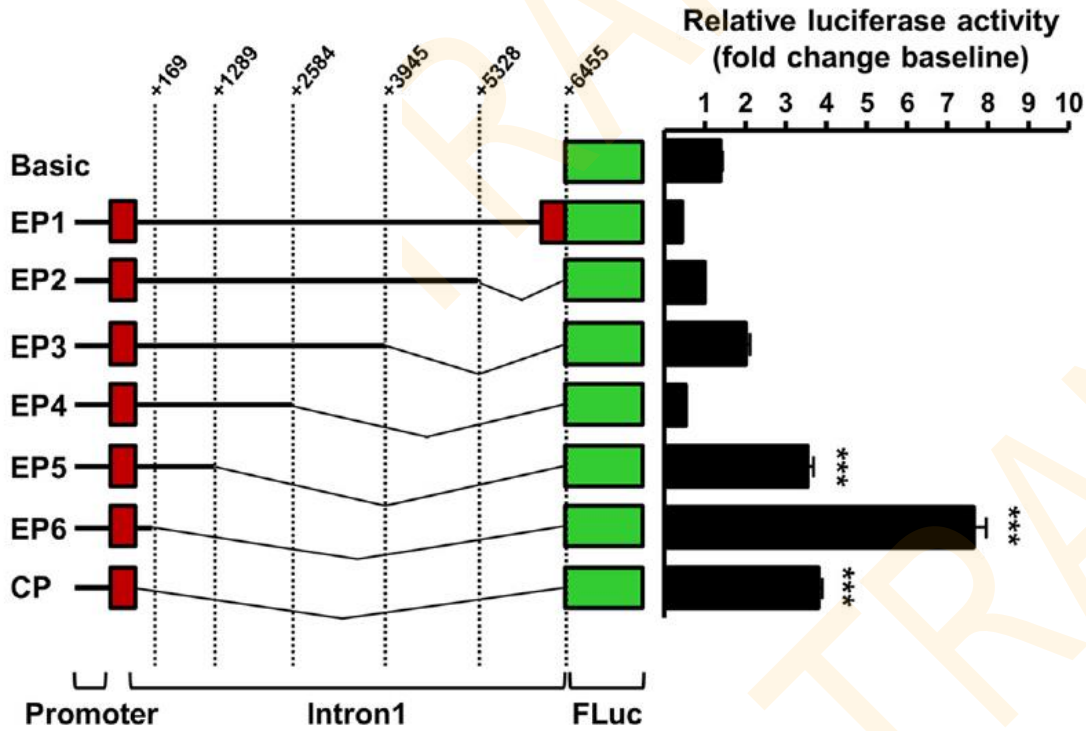


Potential REs	Sequence (5'-3')
RE1	TCACTTGCCTtaattttaggATACTAGCAT
RE2	TGTCATGTGTcagGCACATGTTA

核心调控元件的研究-2

序列截短实验

核心调控元件预测



SRE 1

+1816 CCACCAGGAT ACC**ATGAGGA GAG**TCAGCTG CCCCCACAGT
AGAAGTA ACG

+1856 GCATTCCAGG CCTGGGCAGG GAAGCCAGTG CCTCCCTGCT

MyoG/MyoD **PPAR γ /RXR α**

+1896 **GGGAAGGAGC** CAAGCCTTGC TGCTCTTCTG **TAGGGCAAAG**

+1936 **GGGAACGAGG** CCTGAGCAAA TGGAGAGCAT GTCTCTAAAC

SP1/SP3 **SRE 2**

+1976 **ATGCCTACCC** **TGCTCTTCT****CT CAGCCAAGTT** GGCTGTAAAG
CG TCGTTTAG

... (228bp) ...

SRE 3

+2244 GAGCCGG**ATC ACCCACAGT**GTA CTGGAGCTT
AGT CCCATCC

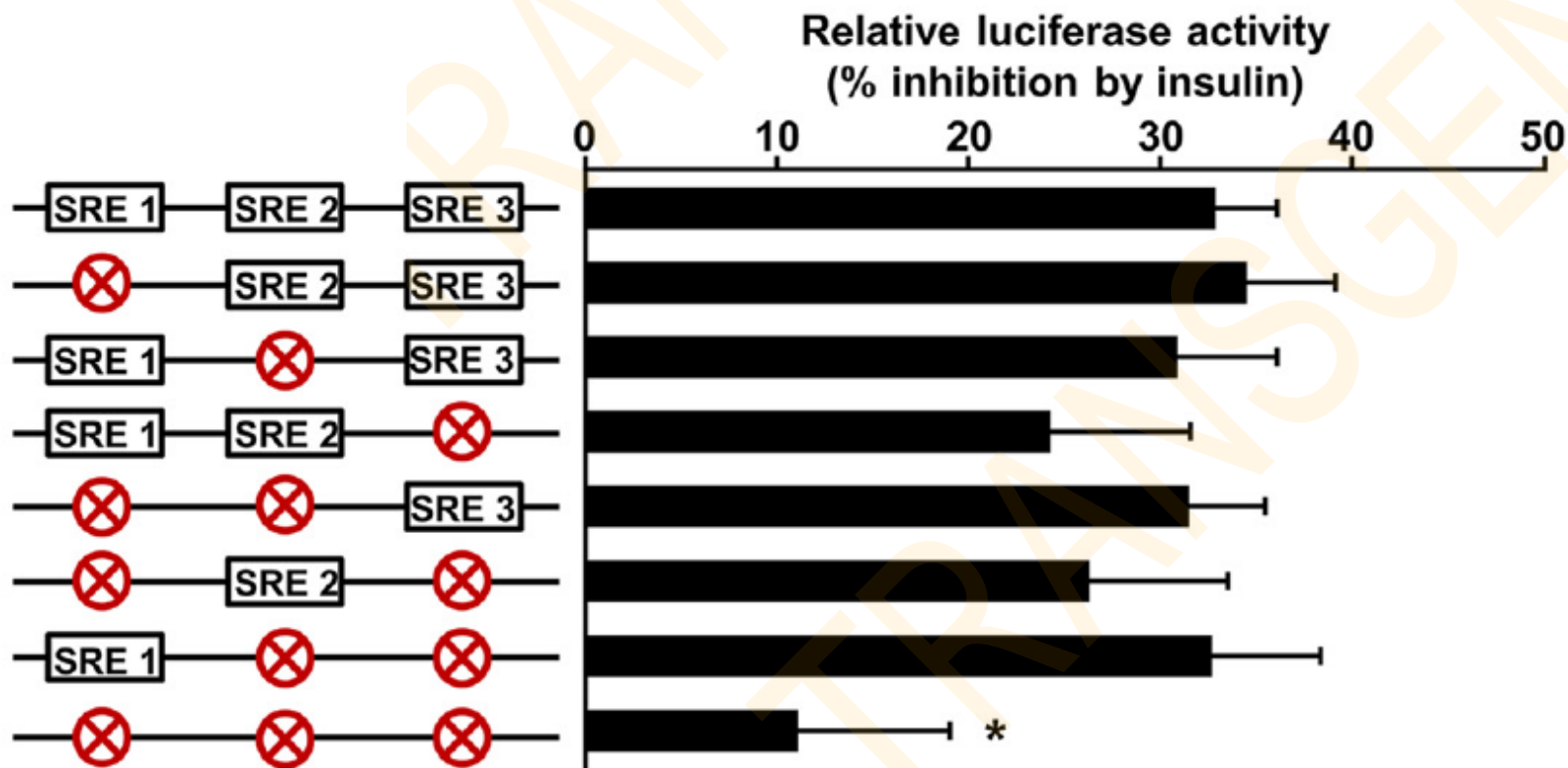
Chronic Hyperinsulinemia Causes Selective Insulin Resistance and Down-regulates Uncoupling Protein 3 (UCP3) through the Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1 Transcription Factor in the Mouse Heart.

CP: Core promoter of mouse Ucp3

EP1: Extended version of the promoter including the core promoter, exon 1, intron 1, and a part of exon

核心调控元件的研究-2

核心元件突变实验



构建序列系列截短报告载体



双荧光素酶检测



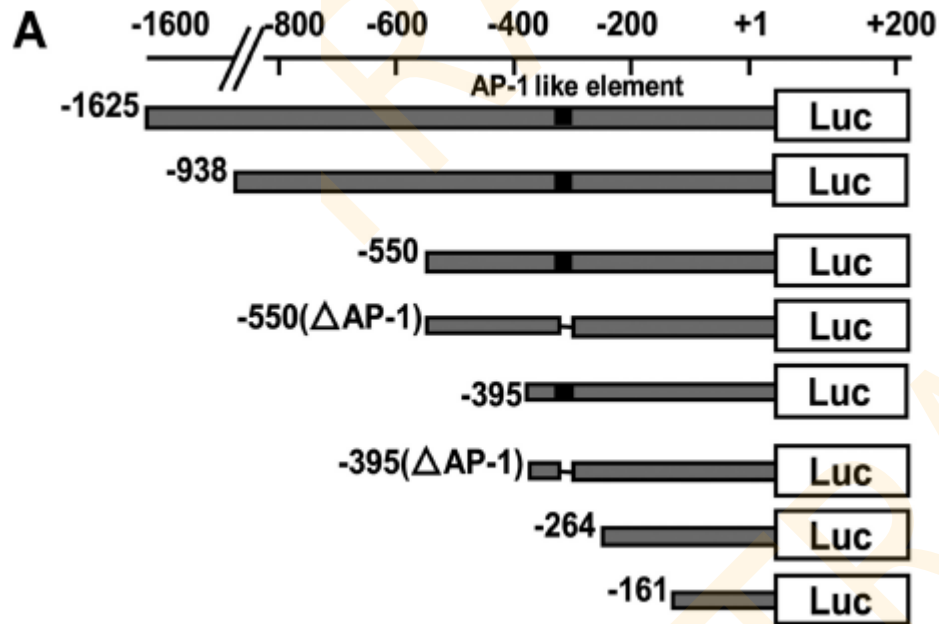
寻找核心调控元件



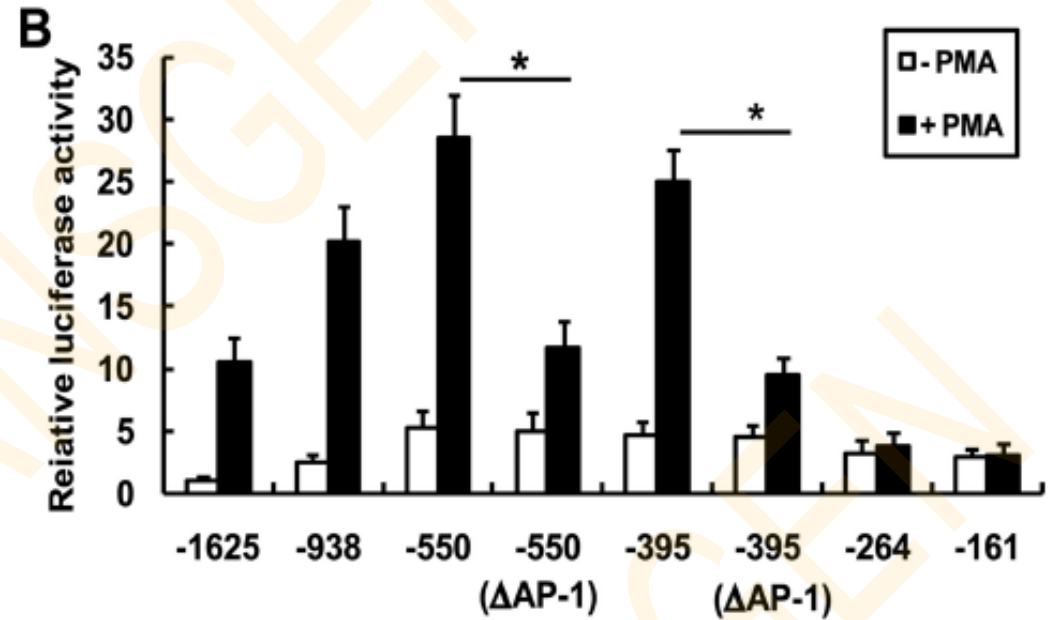
突变验证核心调控元件

核心调控元件的研究-3

序列截短实验



荧光素酶检测结果



microRNA作用位点（靶位点）研究

核心调控元件预测

BID mRNA 3' UTR

1.....730.....740.....1430.....
 5'-CGGACAGTTC-ACAAA**ATCAGG**TAACTAA---CTAACACTACAAAAA-3'
 putative binding site

ebv-miR-BART4-5p: 3'- GUCGUAGUCCAG-5'

|||||||
 BID mRNA 3' UTR: 5'- CAAA**ATCAGG**TAACT-3'

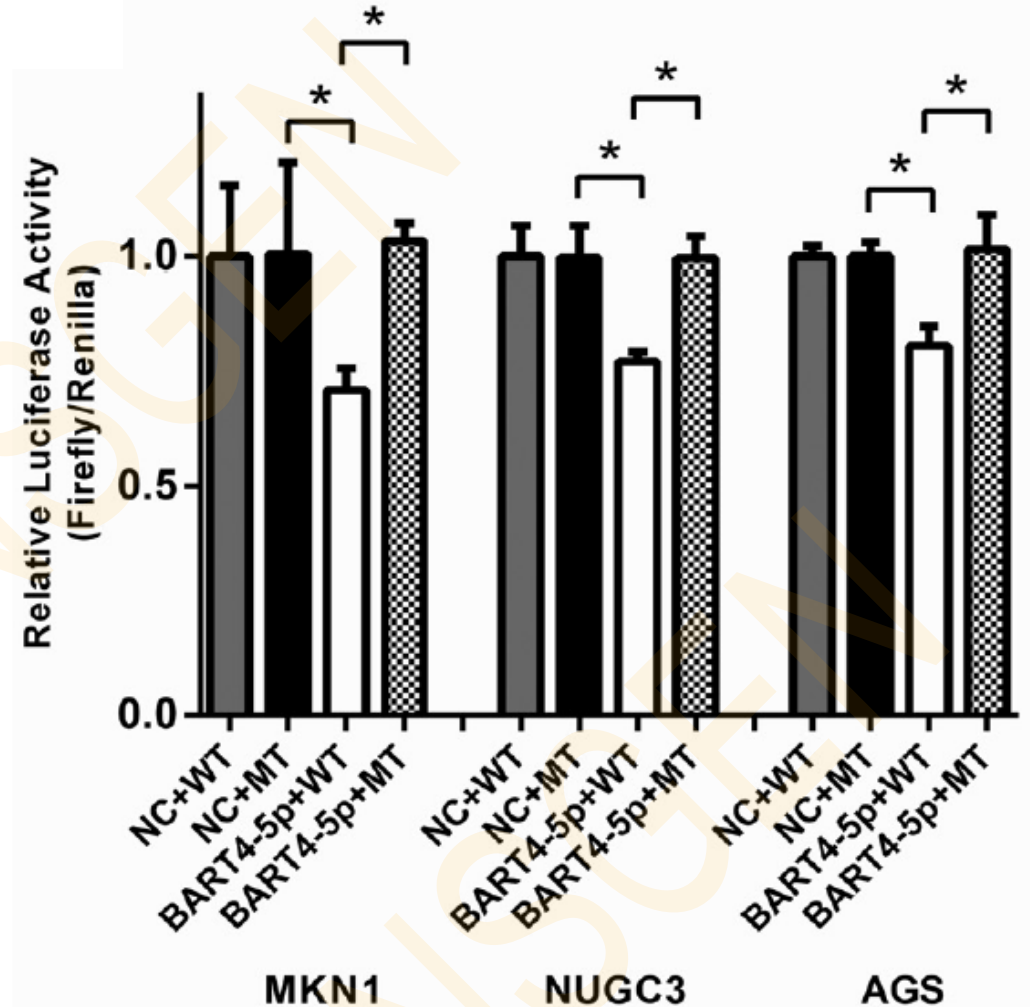
|||||||
 Mutated BID mRNA 3' UTR: 5'- CAAA**ATATAT**TAACT-3'

WT: Wild Type

MT: Mutant Type

NC: Negative Control

BART4-5p: EBV编码的microRNA



microRNA作用位点（靶位点）研究

构建3'UTR荧光报告载体



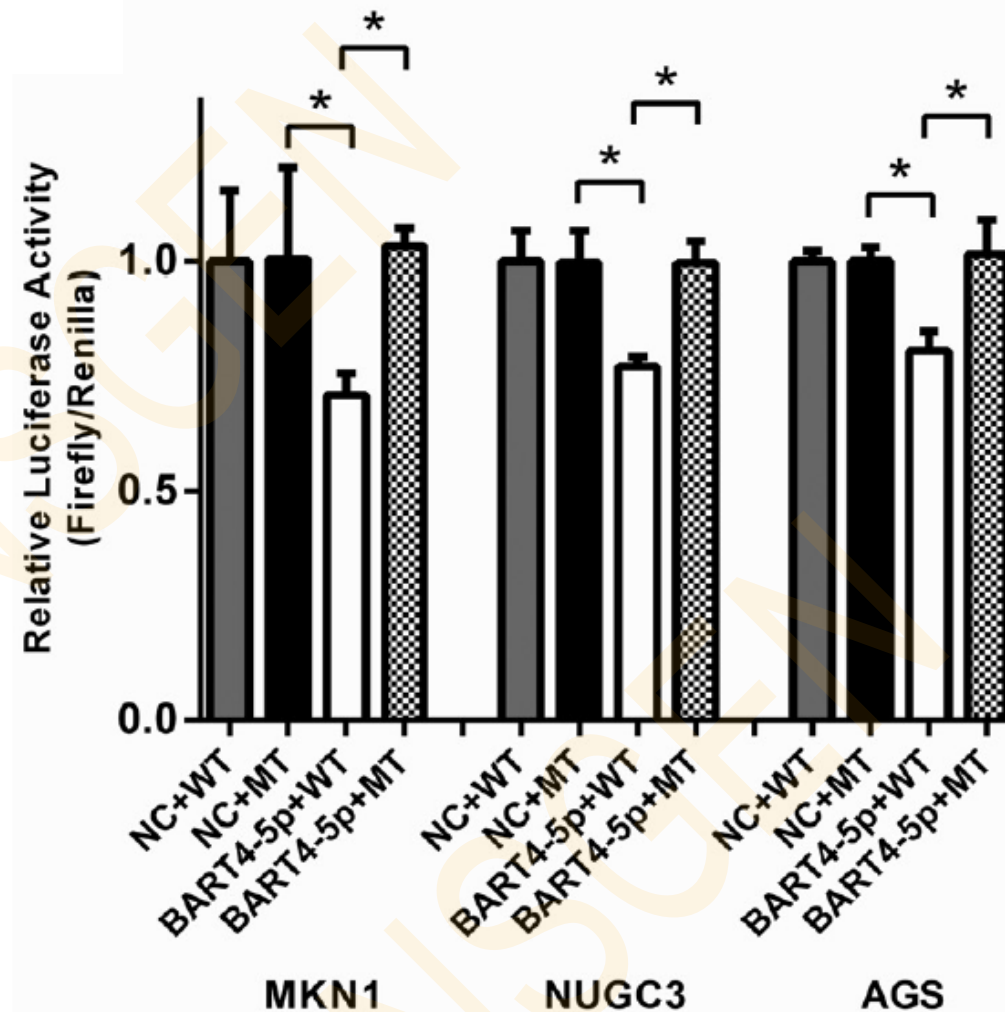
双荧光素酶检测



突变结合序列

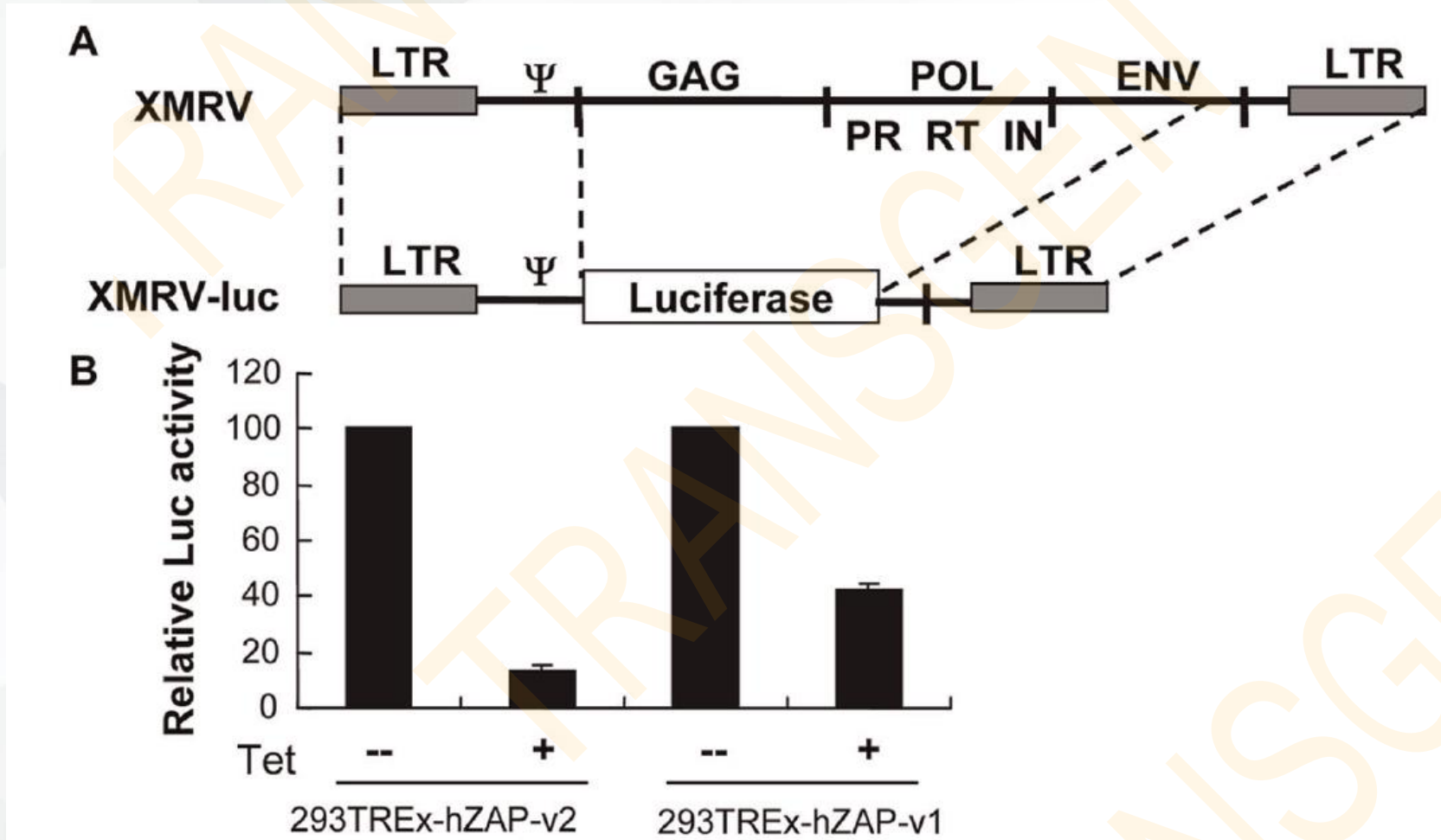


双荧光素酶检测



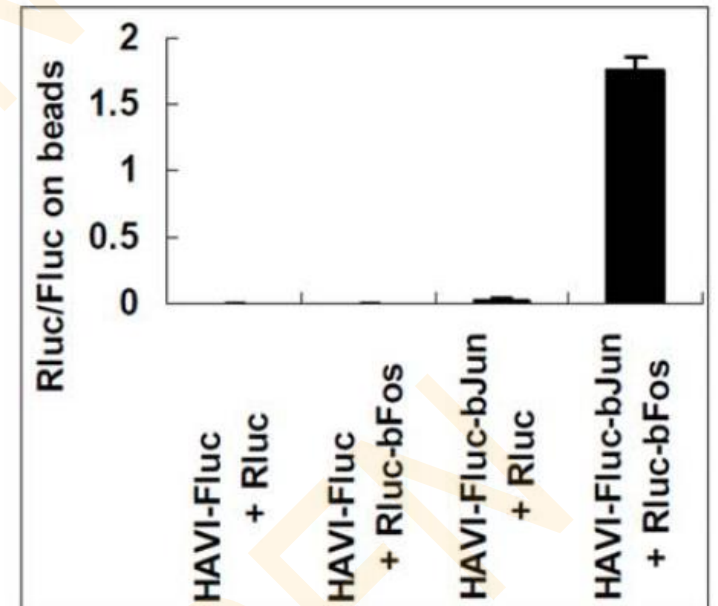
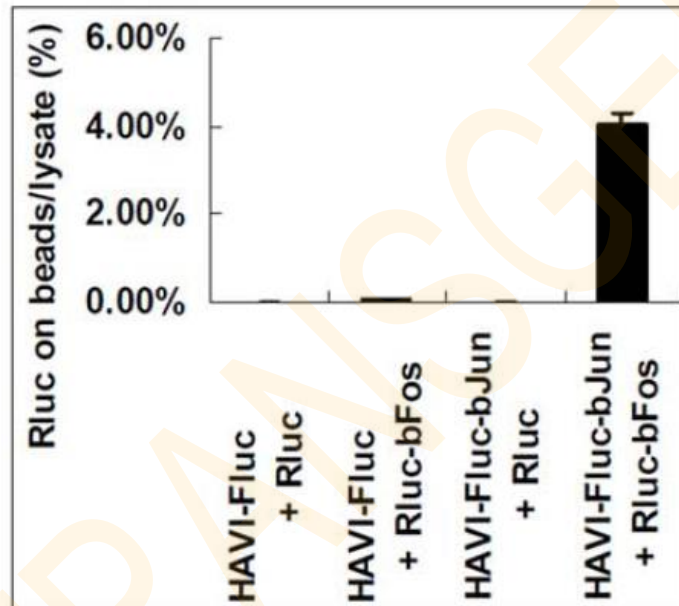
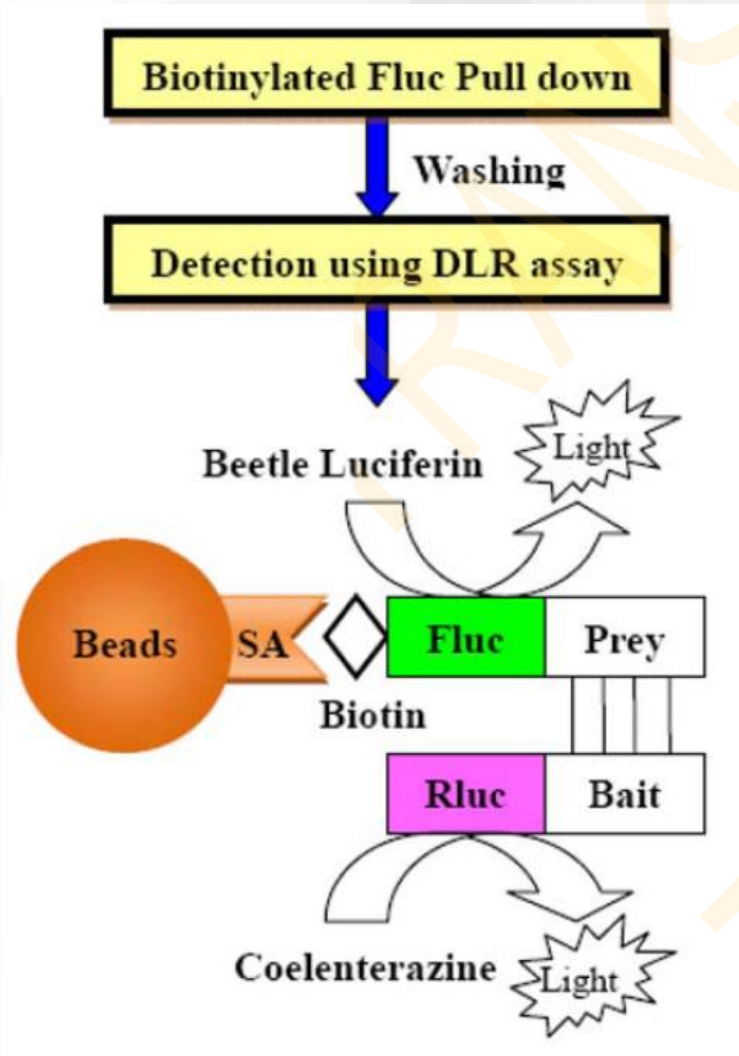
研究蛋白对RNA的降解作用

过表达hZAP抑制XMRV的感染



研究蛋白-蛋白相互作用

基于荧光素酶报告系统的蛋白相互作用检测





北京全式金生物技术有限公司