

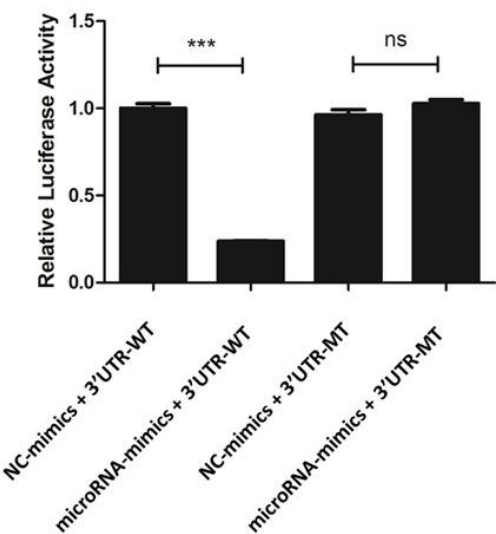
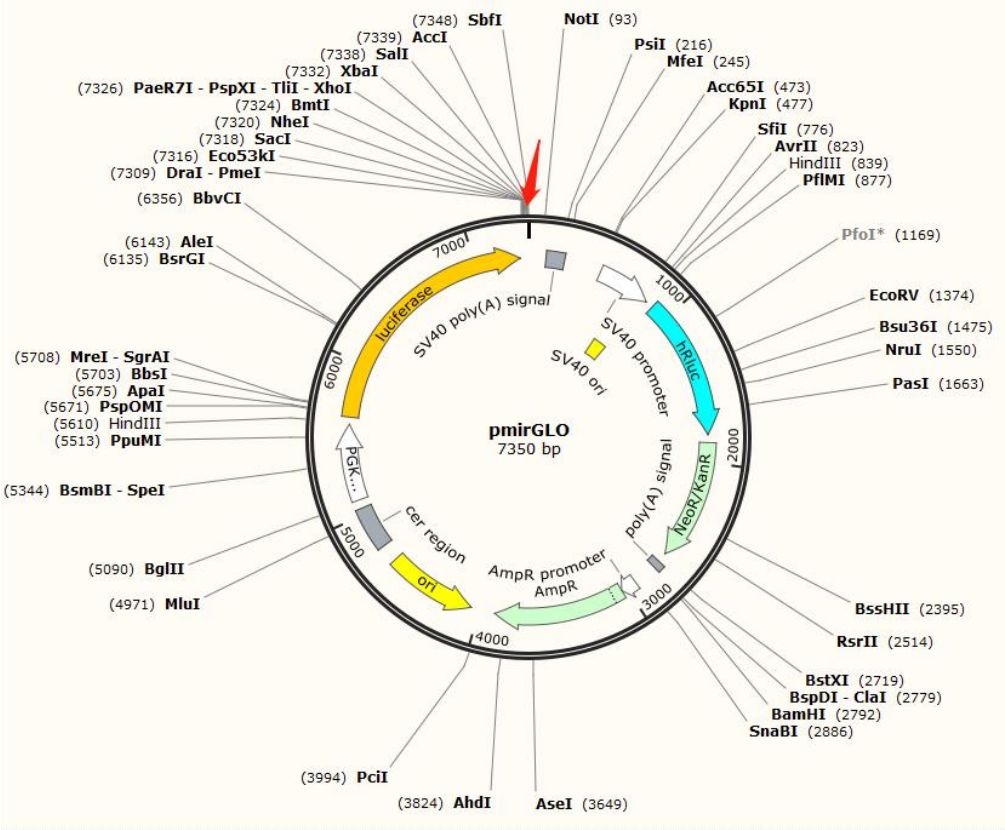
双荧光素酶实验 结果解读

| 专注 | 品质 | 诚信 |

提供核酸和蛋白的整体研究方案

>>>

microRNA-靶基因



1、microRNA与靶基因互作的双荧光素酶实验通常使用pmirGLO载体，如左图所示：将靶基因序列插入到萤火虫荧光素酶序列的3'UTR区域一同转录成mRNA，若microRNA与靶基因发生了结合，则会使萤火虫荧光素酶的mRNA提前降解或干扰其翻译，最终导致荧光值下降。

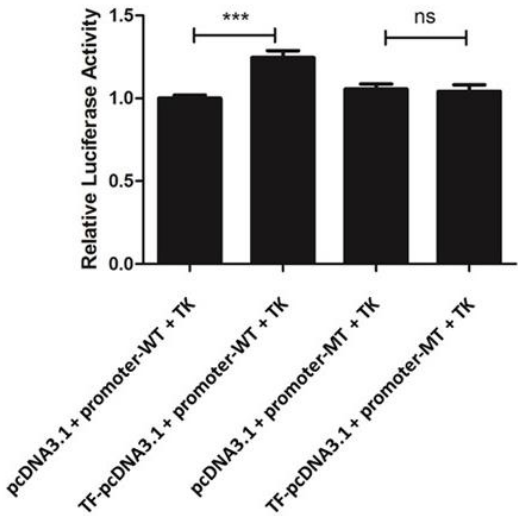
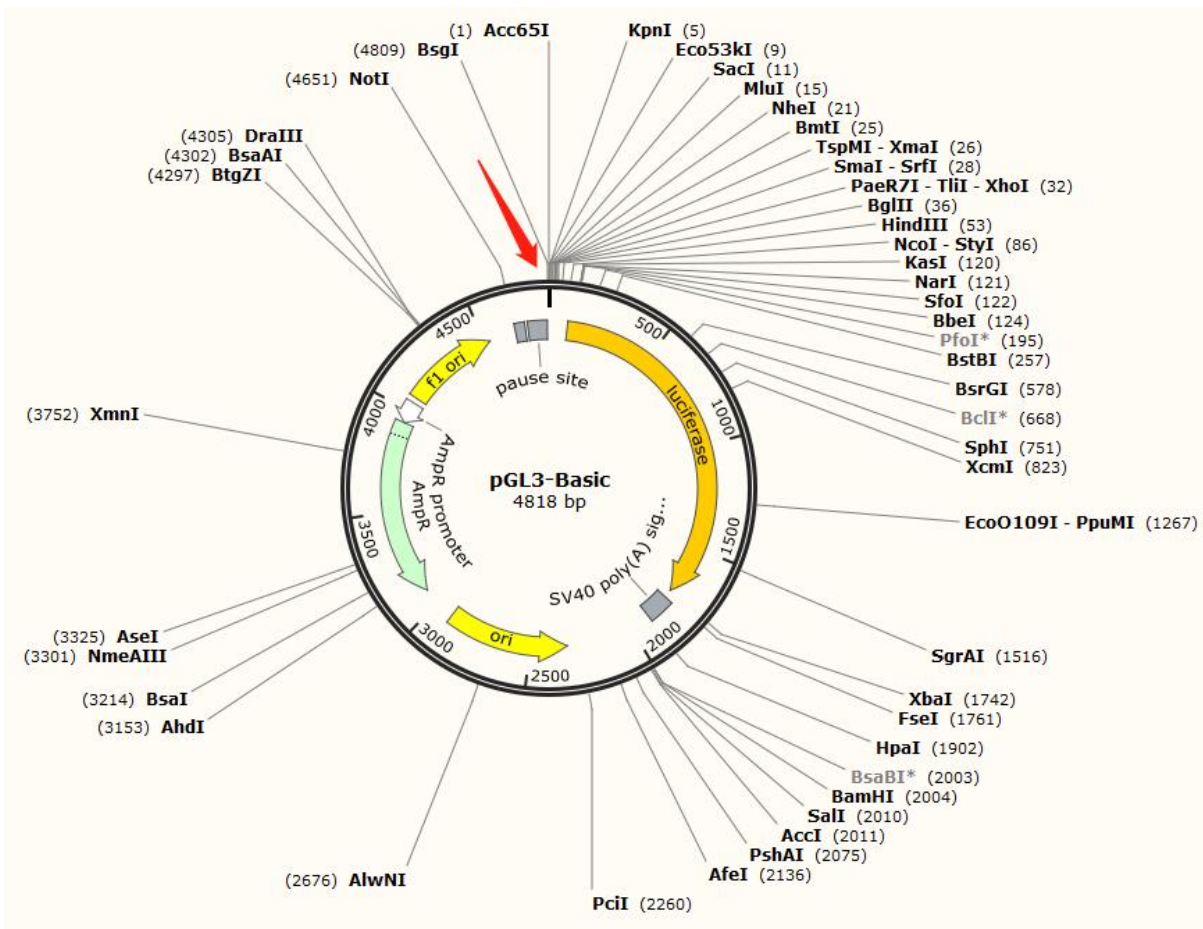
2、常见分组如上图所示：

- NC-mimics：作为microRNA的对照，通常是一段随机的RNA
- microRNA-mimics：化学合成的与microRNA拥有相同序列的RNA
- 3'UTR-WT：靶基因原始序列
- 3'UTR-MT：将结合位点突变后的靶基因序列

3、由于NC-mimics通常不会与RNA发生结合，因此第①组与第③组是对照组的作用；若microRNA能够与靶基因结合，根据上述原理，第②组荧光值会显著性下降；在此前提下，第④组由于突变了结合位点，microRNA无法与突变后的靶基因结合，因此荧光值与第③组无显著性差异。

*其他验证实验：RNA pull down

转录因子-启动子



1、转录因子与启动子互作的双荧光素酶实验通常使用pGL3-Basic载体，如左图所示：将靶基因序列插入到萤火虫荧光素酶序列的启动子位置一同转录成mRNA，若转录因子与启动子发生结合，激活了萤火虫荧光素酶mRNA的转录，则会导致荧光值上调，有的蛋白结合到启动子上反而会抑制mRNA的转录，最终导致荧光值下调。

2、常见分组如上图所示：

- pcDNA3. 1：过表达转录因子或其他蛋白的空载质粒
- TF-pcDNA3. 1：插入了目的蛋白CDS序列的目的蛋白过表达质粒
- promoter-WT：启动子的原始序列
- promoter-MT：将结合位点突变后的启动子序列
- TK：作为内参的海肾荧光表达质粒，无需关注

3、第①组与第③组转染的是蛋白空载质粒，起对照组的作用；若转录因子能够与启动子结合并激活转录，根据上述原理，第②组荧光值会显著性上调，如果过表达的是抑制转录的蛋白，则荧光值会下调；在此前提下，第④组由于突变了结合位点，转录因子无法与突变后的启动子结合，因此荧光值与第③组无显著性差异。

*其他验证实验：DNA pulldown、酵母单杂交、EMSA

提供核酸和蛋白的整体研究方案

感谢聆听

提供核酸和蛋白的整体研究方案

>>>