



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## TOPFlash(报告基因质粒)

产品编号	产品名称	包装
D2501-1μg	TOPFlash(报告基因质粒)	1μg
D2501-100μg	TOPFlash(报告基因质粒)	100μg

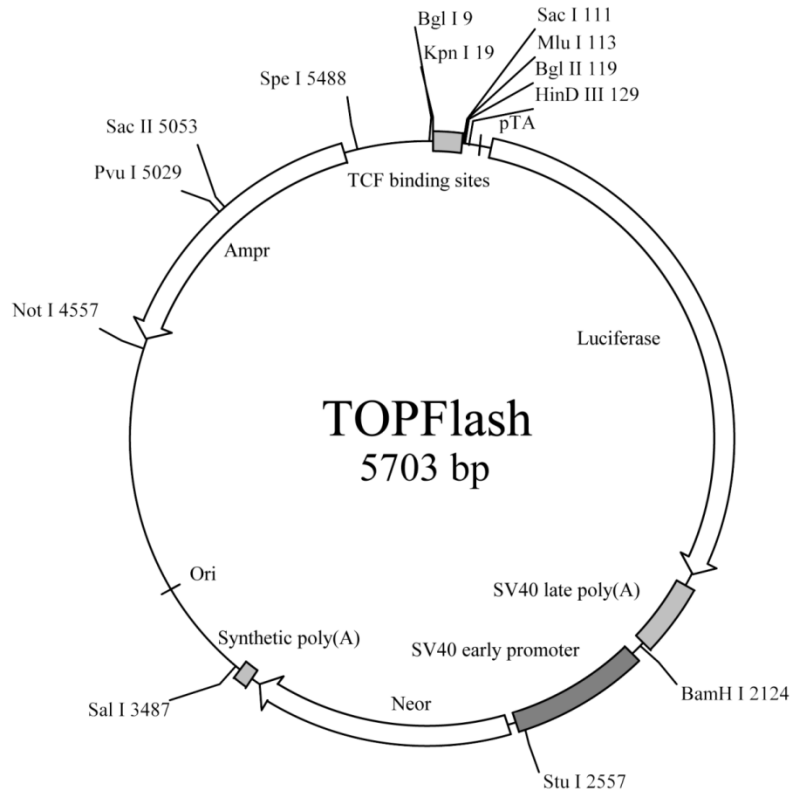
### 产品简介：

- TOPFlash(报告基因质粒)是用于检测Wnt信号通路中 $\beta$ -catenin介导的TCF/LEF转录活性水平的报告基因质粒。TOPFlash是以碧云天的pGL6-TA为模板，在其多克隆位点插入两组TCF/LEF结合位点序列，每组有三个重复序列，一组为正向序列，另一组是它的反向互补序列，可以高灵敏度地检测TCF/LEF的转录活性水平。
- Wnt信号通路是重要的信号通路之一，与干细胞多能性、胚胎发育、肿瘤的发生等都有着密切的关系。
- Wnt信号通路的关键步骤是其关键因子 $\beta$ -catenin的稳定性及是否进入细胞核内，从而决定Wnt信号下游基因的表达。当细胞外缺少Wnt蛋白时，细胞浆内的 $\beta$ -catenin被招募到由APC及Axin等组成的降解复合体上， $\beta$ -catenin被CK1 $\alpha$ 和GSK3 $\beta$ 磷酸化，从而导致其与E3泛素连接酶 $\beta$ -TrCP的结合并进入泛素化和蛋白酶体依赖的降解途径。因此在非激活状态下，细胞浆内的 $\beta$ -catenin蛋白水平保持着较低的水平，而细胞核内LEF和TCF与Groucho结合抑制了Wnt调控的下游基因表达。当Wnt蛋白结合到受体复合物时，相应的信号通路就被激活。辅助受体LRP可以被CK1 $\alpha$ 和GSK3 $\beta$ 磷酸化，Axin被招募到细胞膜上，因此 $\beta$ -catenin不能被磷酸化而被转运到细胞核内。在细胞核内 $\beta$ -catenin和TCF/LEF形成转录复合物，从而激活了Wnt信号通路下游的基因如c-Myc和cyclin D1等的表达。
- 碧云天将TCF/LEF结合位点克隆至含TA病毒最小启动子(minimal TA viral promoter)的萤火虫萤光素酶报告基因载体pGL6-TA中，构建得到TOPFlash质粒。TCF/LEF转录活性水平与萤光素酶的表达量成正比，从而测定细胞内Wnt信号通路的激活水平。
- TOPFlash被广泛应用于Wnt信号通路的研究，FOPFlash (D2503)带有突变的TCF/LEF结合位点序列而作为其阴性对照。
- pGL6-TA是用于在哺乳动物细胞中进行萤火虫萤光素酶(firefly luciferase)报告基因检测的新一代质粒。该报告基因质粒比Promega公司的pGL3系列有了全面的改进，一方面对于luciferase的编码进行了改进，确保能更好地在哺乳动物细胞中进行表达，同时对整个质粒中所有可以被预测出的可能的转录因子结合位点全部进行了适当的突变处理，在保持原有功能不变的情况下，使各种转录因子在质粒上的非特异性结合降到最低。

- TOPFlash质粒的主要信息如下：

Feature	Nucleotide	Position
TCF binding sites		20-105
Minimal TA promoter (pTA)		140-162
luc2 reporter gene		194-1856
SV40 late poly(A) signal		1891-2112
SV40 early enhancer/promoter		2160-2578
Synthetic neomycin phosphotransferase (Neor) coding region		2603-3397
Synthetic poly(A) signal		3422-3470
Reporter Vector primer 4 (RVprimer4) binding region		3537-3556
ColE1-derived plasmid replication origin		3794
Synthetic Beta-lactamase (Ampr) coding region		4585-5445
Synthetic poly(A) signal/transcriptional pause site		5550-5703
Reporter Vector primer 3 (RVprimer3) binding region		5652-5671

- TOPFlash质粒的图谱如下：



➤ TOPFlash质粒的TCF/LEF结合位点序列如下:

	Bgl I	Kpn I	TCF binding sites		
1	GGCCTAACTG	GCCGGTACCA	GATCAAAGGG	GGTAAGATCA	AAGGGGGTAA
	CCGGATTGAC	CGGCCATGGT	CTAGTTTCCC	CCATTCTAGT	TTCCCCCATT
51	GATCAAAGGG	GGCCCCCTTT	GATCTTACCC	CCTTTGATCT	TACCCCTTTT
	CTAGTTTCCC	CCGGGGGAAA	CTAGAATGGG	GGAAACTAGA	ATGGGGGAAA
	Sac I	Mlu I	Bgl II	Hind III	
101	GATCTGAGCT	CACGCGTAGA	TCTGCAGGAA	GCTTAGACAC	
	CTAGACTCGA	GTGCGCATCT	AGACGTCCTT	CGAATCTGTG	

➤ TOPFlash质粒中没有的酶切位点(Restriction enzymes that do not cut TOPFlash)包括:

Aat II	Afl II	Asc I	Ase I	Bsa I	BsaA I	BsiW I	BspM II
BssH II	Eco72 I	EcoR I	EcoR V	Nde I	Nhe I	Nru I	PaeR7 I
PflM I	Pme I	Pml I	Psp1406 I	PspA I	Rsr II	Sma I	SnaB I
Spl I	Srf I	Tth111 I	Vsp I	Xcm I	Xho I		

➤ TOPFlash质粒中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut TOPFlash once)包括:

Sfi I	GGCCN,NNN`NGGCC	9	EcoN I	CCTNN`N,NNAGG	3078
Bgl I	GCCN,NNN`NGGC	9	BsiC I	TT`CG,AA	3473
Acc65 I	G`GTAC,C	15	BstB I	T`CG,AA	3473
Asp718	G`GTAC,C	15	Sal I	G`TCGA,C	3487
Kpn I	G,GTAC`C	19	ApaL I	G`TGCA,C	4051
Sac I	G,AGCT`C	111	Not I	GC`GGCC,GC	4557
Mlu I	A`CGCG,T	113	BstX I	CCAN,NNNN`NTGG	4581
Bgl II	A`GATC,T	119	BstE II	G`GTNAC,C	4584
Hind III	A`AGCT,T	129	Ahd I	GACNN,N`NNGTC	4659
BsrG I	T`GTAC,A	695	Bsu36 I	CC`TNA,GG	5015
Dra III	CAC,NNN`GTG	1351	Pvu I	CG,AT`CG	5029
Gsu I	CTGGAG 21/19	1584	Sac II	CC,GC`GG	5053
Bpm I	CTGGAG 22/20	1585	Bst1107 I	GTA TAC	5169
Apo I	R`AATT,Y	1967	Xca I	GTA TAC	5169
Mun I	C`AATT,G	2031	Spe I	A`CTAG,T	5488
BamH I	G`GATC,C	2124	BsmA I	GTCTC`/9	5500
Stu I	AGG CCT	2557	BsmB I	CGTCTC 7/11	5501

➤ TOPFlash质粒中推荐使用的测序引物序列如下:

RVprimer3(5652-5671):

CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC

➤ TOPFlash质粒的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D2501-1μg	TOPFlash(报告基因质粒)	1μg
D2501-100μg	TOPFlash(报告基因质粒)	100μg
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存。

### 注意事项：

- 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

1. 首次使用时请先取少量本质粒转化大肠杆菌，进行质粒小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。抽提获得的质粒可以通过酶切电泳进行鉴定，或通过测序进行鉴定。
2. TOPFlash可以用常规的细胞转染方法转染细胞。检测时可采用碧云天的萤光素酶报告基因检测试剂盒(RG005/RG006)或双萤光素酶报告基因检测试剂盒(RG027/RG028)进行检测。

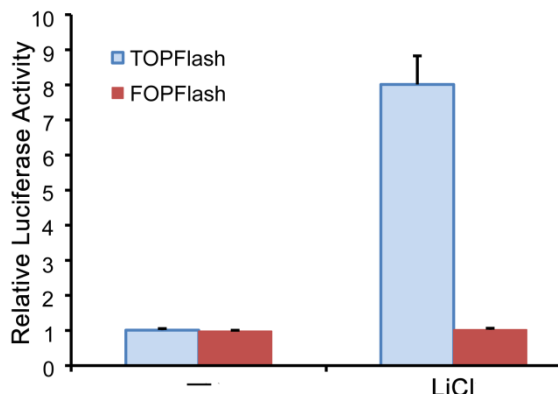


图1. 293a细胞分别转染TOPFlash和FOPFlash质粒24小时，再用20mM的氯化锂(LiCl)刺激24小时，最后用碧云天的萤光素酶报告酶基因检测试剂盒(RG005)进行报告基因的检测。氯化锂是Wnt信号通路中GSK3β的抑制剂。本图仅作参考，不同的样品不同的检测条件，实际测定获得的结果可能和上图有较明显的差别。

3. Wnt蛋白、氯化锂等是常见的可以激活Wnt信号通路的试剂，转染β-catenin质粒也可以激活Wnt信号通路，可以用作TOPFlash报告基因检测时的阳性对照。

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D2501	TOPFlash(报告基因质粒)	1μg
D2503	FOPFlash(报告基因质粒)	1μg
D2505	SuperTOPFlash(报告基因质粒)	1μg
D2507	SuperFOPFlash(报告基因质粒)	1μg
D2760	pRL-TK(报告基因质粒)	1μg
D2806	pCMV-β-Galactosidase	1μg
RG005	萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒	100次
RG006	萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒	1000次
RG016	海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒	100次
RG017	海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒	1000次
RG027	双萤光素酶报告基因检测试剂盒	100次
RG028	双萤光素酶报告基因检测试剂盒	1000次
RG0036	β-半乳糖苷酶报告基因检测试剂盒	200次

## 使用本产品的文献：

1. Ruihuan Yang, Ruyi Li, Zhuo Huang, Yining Zuo, Haitang Yue, Hailin Wu, Fan Gu, Fei Wang, Miao He, Zhuan Bian. Mycn deficiency underlies the development of orofacial clefts in mice and humans. Hum Mol Genet. 2023 Mar ; 32(12):3456-3465 .
2. Mengtian Zhang, Libo Su, Wenwen Wang, Chenxiao Li, Qingli Liang, Fen Ji, Jianwei Jiao. Endothelial cells regulated by RNF102 orchestrate the proliferation and differentiation of neural precursor cells during embryonic development. Cell Rep. 2023 Sep ; 42(9):13123-13135 .
3. Ruihuan Yang, Ruyi Li, Zhuo Huang, Yining Zuo, Haitang Yue, Hailin Wu, Fan Gu, Fei Wang, Miao He, Zhuan Bian. Mycn deficiency underlies the development of orofacial clefts in mice and humans. Hum Mol Genet. 2023 Mar ; 32(12):3456-3465 .

Version 2024.03.12