



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-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)

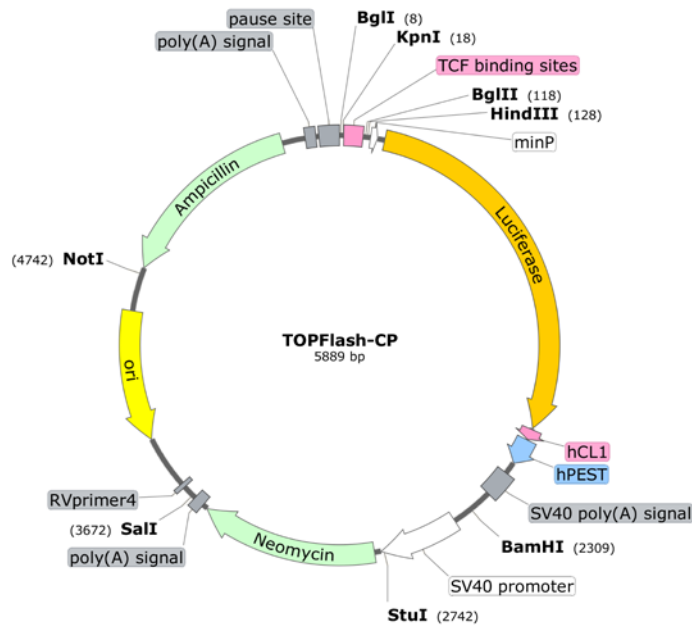
产品编号	产品名称	包装
D2502-1 μ g	TOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1 μ g
D2502-100 μ g	TOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100 μ g

产品简介：

- TOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)是用于检测Wnt信号通路中 β -catenin介导的TCF/LEF转录活性(Transcriptional activity)快速响应、超灵敏检测的报告基因质粒。本质粒的主要特点是使用了可以被细胞内泛素-蛋白酶体系统(Ubiquitin-proteasome system, UPS)识别并快速降解的luciferase-CP (luc-CP), 即包含了泛素化修饰识别序列CP (CL1 and PEST)的luciferase, 确保了更低的背景表达和更好的响应性。本产品检测TCF/LEF转录活性水平的灵敏度高于TOPFlash(D2501)。
- 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 β -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 β -catenin被招募到由APC及Axin等组成的降解复合体上, β -catenin被CK1 α 和GSK3 β 磷酸化, 从而导致其与E3泛素连接酶 β -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 β -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 α 和GSK3 β 磷酸化, Axin被招募到细胞膜上, 因此 β -catenin不能被磷酸化而被转运到细胞核内。在细胞核内 β -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。
- TOPFlash-CP是一种超灵敏快速降解型报告基因质粒(Super sensitive and destabilized reporter plasmid), 也被称为是快速响应萤光素酶报告基因质粒(Rapid response luciferase reporter plasmid), 是以碧云天的pGL6-TA-CP质粒(D2094)为模板, 在其多克隆位点插入两组TCF/LEF结合位点序列, 一组为正向序列, 另一组是它的反向互补序列, 每组有三个重复序列。TCF/LEF转录活性水平与萤光素酶的表达量成正比, 从而用于测定细胞内Wnt信号通路的激活水平。
- pGL6-TA-CP质粒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, 该报告基因质粒和Promega公司的pGL3系列相比有了全面的改进。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; 另一方面应用了快速降解型报告基因技术, 在luciferase后增加了泛素-蛋白酶体系统识别和降解序列CL1和PEST, 合并简称CP, 从而可以促进luc-CP在细胞中的降解, 降低萤光素酶的本底活性。同时整个质粒中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。
- 本质粒中的CP包含针对哺乳动物细胞密码子优化的降解序列hCL1和hPEST。CL1源自酿酒酵母的16个氨基酸序列, 可以引导蛋白质通过泛素-蛋白酶体系统降解[1]; PEST源自小鼠鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase) C端的40个氨基酸序列(富含脯氨酸/proline (P)、谷氨酸/glutamic acid (E)、丝氨酸/serine (S)和苏氨酸/threonine (T), PEST), 该序列可通过泛素-蛋白酶体系统促进蛋白质的降解[2]。与普通报告基因相比, 快速降解型报告基因的背景更低, 响应性更好, 检测灵敏度更高, 更适合监测动态变化过程, 例如转录活性的节律变化等。
- TOPFlash-CP被广泛应用于Wnt信号通路的研究, FOPFlash-CP (D2504)带有突变的TCF/LEF结合位点序列而作为其阴性对照。
- 萤光素、萤光素酶、萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶也经常被称作荧光素、荧光素酶、萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶。
- TOPFlash-CP质粒的主要信息如下:

Base pairs	5889
TCF binding sites	20-105
Minimal TA promoter (pTA)	140-171
Luciferase reporter gene	204-1853
hCL1	1860-1907
hPEST	1911-2030
SV40 late poly(A) signal	2086-2207
SV40 early enhancer/promoter	2401-2758
Neomycin	2789-3583
Synthetic poly(A) signal	3608-3656
Reporter Vector primer 4 (RVprimer4) binding region	3723-3742

➤ TOPFlash-CP质粒的图谱如下:



➤ TOPFlash-CP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 TACCCCTTT
	CTAGTTTCCC	CCGGGGGAAA	CTAGAATGGG	GGAAACTAGA ATGGGGGAAA
	Sac I	Mlu I	Bgl II	HinD III
101	GATCTGAGCT	CACGCGTAGA	TCTGCAGGAA	GCTTAGACAC
	CTAGACTCGA	GTGCGCATCT	AGACGTCCTT	CGAATCTGTG

➤ TOPFlash-CP质粒中没有的酶切位点包括:

Aat 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	sp1406 I	PspA I	Rsr II
Sma I	SnaB I	Spl I	Srf I	Tth111 I	Vsp I	Xcm I
Xho I						

➤ TOPFlash-CP质粒中的单酶切位点包括:

Sfi I	GGCCN, NNN`NGGCC	8	EcoN I	CCTNN`N, NNAGG	3263
Bgl I	GCCN, NNN`NGGC	8	BstB I	T`CG, AA	3658
Acc65 I	G`GTAC, C	14	Sal I	G`TCGA, C	3672
Asp718	G`GTAC, C	14	ApaL I	G`TGCA, C	4236
Kpn I	G, GTAC`C	18	Not I	GC`GGCC, GC	4742
Sac I	G, AGCT`C	110	BstX I	CCAN, NNNN`NTGG	4766
Mlu I	A`CGCG, T	112	BstE II	G`GTNAC, C	4769
Bgl II	A`GATC, T	118	Ahd I	GACNN, N`NNGTC	4844
HinD III	A`AGCT, T	128	Bsu36 I	CC`TNA, GG	5200
BsrG I	T`GTAC, A	694	Pvu I	CG, AT`CG	5214
Gsu I	CTGGAG 21/19	1584	Sac II	CC, GC`GG	5238
Bpm I	CTGGAG 22/20	1584	Bst1107 I	GTA TAC	5354
Mun I	C`AATT, G	2216	Spe I	A`CTAG, T	5673
BamH I	G`GATC, C	2309	BsmA I	GTCTC`/9	5686
Stu I	AGG CCT	2742	BsmB I	CGTCTC 7/11	5686

➤ TOPFlash-CP质粒中推荐的测序引物序列如下:

RVprimer3 (5838-5857): CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC

➤ TOPFlash-CP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
D2502-1μg	TOPFlash-CP	1μg
D2502-100μg	TOPFlash-CP	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. 100μg包装的本产品质粒浓度为0.1μg/μl，共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。
3. TOPFlash-CP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荧光素酶报告基因检测试剂盒(RG005/RG006)或双荧光素酶报告基因检测试剂盒(RG027/RG028)进行检测。

参考文献：

1. Gilon T, Chomsky O, Kulka R.G. EMBO J. 1998. 17:2759-66.
2. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Science. 1986. 234 (4774):364-8.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D2093-1μg	pGL6-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2093-100μg	pGL6-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2094-1μg	pGL6-TA-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2094-100μg	pGL6-TA-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2110-1μg	pAP1-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2110-100μg	pAP1-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2113-1μg	pARE-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2113-100μg	pARE-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2180-1μg	pISRE-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2180-100μg	pISRE-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2208-1μg	pNFκB-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2208-100μg	pNFκB-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2224-1μg	pp53-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2224-100μg	pp53-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2260-1μg	pSTAT3-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2260-100μg	pSTAT3-TA-luc-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2502-1μg	TOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2502-100μg	TOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2504-1μg	FOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2504-100μg	FOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2506-1μg	SuperTOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2506-100μg	SuperTOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg
D2508-1μg	SuperFOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	1μg
D2508-100μg	SuperFOPFlash-CP(超灵敏快速降解型报告基因质粒)	100μg