

GenePharma 表达载体使用说明书

上海电话：021-51320195
苏州电话：0512-86668828

E-mail: support@genepharma.com
E-mail: szsupport@genepharma.com

官网网址：www.genepharma.com



B016-V004-20231211

目录

一、载体介绍	- 2 -
1. pEX表达载体元素	- 2 -
2. 质粒及菌液说明	- 2 -
二、基因过表达实验设计	- 3 -
1. 实验对照组的确立	- 3 -
2. 细胞转染条件的确定	- 3 -
3. 基因表达效率的检测方法确定	- 3 -
三、实验流程	- 4 -
1. 转染前准备	- 4 -
2. 细胞转染	- 5 -
3. 基因表达效率的检测	- 6 -
附录1: 重要产品信息	- 7 -
附录2: 吉玛pEX系列载体列表	- 8 -
附录3: 吉玛pEX系列载体基因图谱	- 8 -



一、载体介绍

吉玛pEX表达载体是~5 kb载体，可以在大多数哺乳动物细胞中进行高度稳定或非复制性瞬时表达。

1.pEX表达载体元素

- CMV启动子可以在许多哺乳动物细胞中实现高表达。
- 多个克隆位点，以方便克隆。
- 在某些细胞系中游离性复制，比如表达SV40大T抗原的细胞系(如COS-1、COS-7)。
- 对照质粒可以作为阳性对照在选择的细胞系中转染和表达。
- Neomycin/Puromycin/Hygromycin等多种抗性基因用于稳定细胞系构建。如需构建，我们建议预先测试目标细胞对相应抗生素的敏感性。

2.质粒及菌液说明

1) GenePharma所提供的过表达质粒经过多步纯化，为高纯度的DNA溶液制品，通常浓度 500ng/μl左右，可直接用于细胞转染及其他分子生物学实验。质粒溶液建议在-20°C的环境中储存，避免多次冻融处理。

2) 甘油菌液为含有重组质粒的菌液的过夜培养物与甘油的混合物，甘油的终浓度为20%。客户收到甘油菌液建议即刻活化（例如取50~100μl到5ml含有相应抗性（根据载体种类可以选择25~50μg/ml 卡那霉素或50~100μg/ml 氨苄霉素）的LB培养基过夜活化（12-16h），活化后的菌液与适量甘油混匀后于-80°C保存。）

3) 重组质粒测序峰值图文件结果请参见附件报告中的.abl文件。测序序列文件参见与峰值图文件同名的.seq文件。测序结果比对文件参见附件报告中的.sqd文件，还可见同名的.pdf文件。



二、基因过表达实验设计

在使用载体法针对某一基因进行过表达研究过程中，通常会遇到如下几个问题：实验对照组的确立、细胞转染条件的确定、基因表达效率的检测。

1. 实验对照组的确立

在一个完善的基因过表达实验设计中，必须考虑设立正确合理的实验对照组。通常，这些对照组包括阴性对照、转染试剂对照。阴性对照通常是用基因过表达选择的载体对应的空载体来作为对照。

2. 细胞转染条件的确定

使用DNA载体转染细胞时，为了选择合适的转染方法和确定转染效率，通常采用报告基因来检测DNA的导入情况。最常用的报告基因是绿色荧光蛋白。吉玛公司提供的过表达载体有一部分载体中包含绿色荧光蛋白(红色荧光蛋白)的表达框架，转入细胞后可以表达绿色荧光蛋白，是用荧光显微镜或流式细胞仪可以很容易的确定转染效率；如果您所定购的载体中不含荧光蛋白(红色荧光蛋白)的表达框架，您可以先使用可以表达绿色荧光蛋白的表达载体来确定转染效率和转染条件，然后使用同样的条件来转染过表达质粒。(吉玛公司在过表达载体出货时根据需要会附带带有包含荧光蛋白表达框架的空载体作为转染效率评价的对照质粒)

3. 基因表达效率的检测方法确定

通常用两大类方法来检测过表达质粒中目的基因表达的效率，一类方法是直接检测目的基因在不同水平如mRNA和蛋白水平的变化，具体的方法如qPCR和Western blot等；另一类方法是通过检测目的基因的生物学效应和细胞效应来间接的反映目的基因的表达变化，这一类方法很多，不同的基因有不同的检测方法。通常多选用qPCR和Western blot等方法直接检测目的基因的变化情况。由于细胞种类和蛋白表达翻译及抗体因素，吉玛构建表达载体通常可保证qPCR检测转染工程细胞293T，目的基因mRNA表达水平有2倍上调。



基因过表达实验操作

由于在基因过表达实验中有多种条件选择，如试剂和细胞株等，在本实验操作中仅以pEX-1空载体为阴性对照，Lipofectamin2000为转染试剂，293T细胞为实验细胞株，按照上述条件分步阐述过表达质粒转染实验的操作过程。如果用户使用不同的细胞株和转染试剂，可根据不同的目的基因和实验条件进行相应的调整。

三、实验流程

1. 转染前准备

- 1) 293T细胞在6cm dish中培养至80-90%融合时，倾去培养液，用3ml PBS洗涤细胞两次。
- 2) 加1ml Trypsin-EDTA solution, 混匀后，小心吸去胰酶溶液，37°C放置3分钟。
- 3) 再加入2 ml 含10% FBS的DMEM培养液，吹打使细胞形成单细胞悬液。
- 4) 血球计数板计数，将细胞稀释至 3×10^5 细胞/ml。
- 5) 按 5×10^3 细胞/孔的浓度接种96孔板，混匀后于37°C 5% CO₂培养24h。
- 6) 转染试剂Lipofectamine2000用于转染过表达质粒，剂量如下，每个剂量设三复孔。

Lipo(μl)	0.2	0.3	0.4
质粒(μg)	0.2	0.4	0.5

- 7) 在1.5 ml EP管中加入75 μl (25μl/well*3well) 无血清DMEM，再加入根据上述表格算出的不同剂量的质粒，混匀；取另一1.5mlEP管，加入75 μl (25μl/well*3well) 无血清DMEM，加入根据上述表格算出的相应剂量的Lipofectamine2000，混匀，室温放置5分钟后将两组管混合，室温放置20分钟。吸去96孔板中的培养液，每孔加入50 μl无血清的DMEM培养液。
- 8) 将转染混合物逐滴加入96孔板中，混匀后，在培养箱中温育5小时。



9) 转染质粒组，吸弃转染液，更换为完全培养基，在培养箱孵育24h后观测。

10) 如果在转染条件摸索实验中没有找到较高效率的转染方法，请更换转染方法和试剂。如无其他方法选择，可以使用流式细胞仪将转染的细胞分选出来用于后续实验。如果无法分选细胞，可以在计算基因表达效率时去除转染效率的影响，也可以使用抗生素对转染后的细胞进行初筛后再进一步检测抑制效率。



NOTE

如果您选用可表达绿色荧光蛋白的pEX-1或pEX-5载体，可以直接用这些载体来确定转染效率；也可用其他荧光蛋白的载体来确定转染条件，



IMPORTANT

选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。DNA的用量及其与转染试剂的比例可在推荐范围内适当调整。

2. 细胞转染

1) 设定合理的实验组，包括转染试剂对照（mock transfection）、阴性对照(negative control)和目的基因实验组。

按照前面实验确定的细胞接种量接种。37° C，5% CO₂培养至40-70%融合。

2) 按照前面实验确定的转染条件转染细胞。如果需要转染不同培养量的细胞，试剂的用量可以根据转染试剂说明书进行相应的变化。

Procedure Details			
Component	96-well	24-well	6-well
Adherent cells	1-4 x 10 ⁴	0.5-2 x 10 ⁵	0.25-1 x 10 ⁶
DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL
Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng
Lipo used per well	0.2-0.5 µL	1.0-2.5 µL	5.0-12.5 µL

上海电话: 021-51320195

苏州电话: 0512-86668828

E-mail: support@genepharma.com

E-mail: szsupport@genepharma.com

官网网址: www.genepharma.com



B016-V004-20231211

3) 转染后24-48h后, 收集细胞进行下一步的检测工作。通常, 目的基因在转染后24-48h内就会表达, 但有一些蛋白可根据稳定性、半衰期或表达调控周期的不同, 需要适当延长缩短检测时间。

3. 基因表达效率的检测

1) 在本公司网站主页的qPCR及Western blot服务栏目中较详细地介绍了使用荧光定量PCR技术和Western blot方法检测目的基因表达变化的操作步骤和注意事项, 用户可以酌情选用。

2) 用户也可选用其他间接的方法(如目的基因的生物学功能或细胞生物学特性的变化)来检测目的基因的表达情况。鉴于这方面的检测手段多种多样, 需要用户自己进行选择, 在此不再赘述。



附录1: 重要产品信息

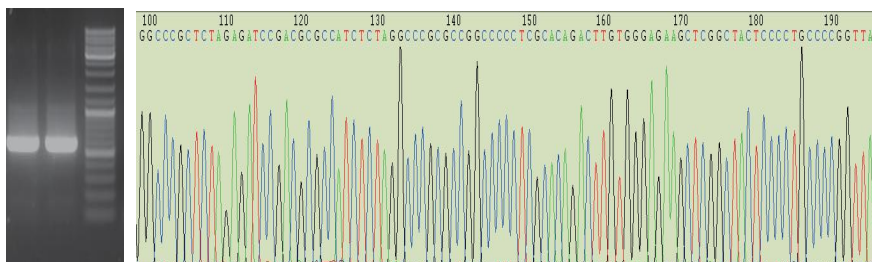
出货提供产品及数据资料

- 1) 高纯度质粒，大约10-50 μg DNA；
- 2) 含有重组质粒的甘油菌液（500 μl ）；
- 3) 测序原始图谱、序列及质粒图谱；
- 4) 全基因合成报告单；
- 5) 备注：通常不提供合成的具体方法和实验步骤；如必须提供则200元/份。

运输/储存条件：常温运输；-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

产品质量控制

琼脂糖凝胶电泳，基因测序。



上海电话：021-51320195
苏州电话：0512-86668828

E-mail: support@genepharma.com
E-mail: szsupport@genepharma.com

官网网址：www.genepharma.com



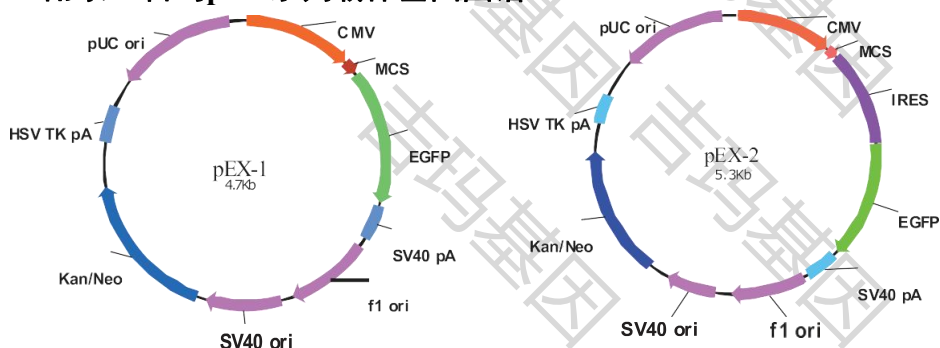
B016-V004-20231211

附录2: 吉玛pEX系列载体列表

编号	载体名称	启动子	荧光标签	真核抗性	原核抗性
C05001	pEX-1 (pGCMV/MCS/EGFP/Neo)	CMV	EGFP	Neo	Kan
C05002	pEX-2 (pGCMV/MCS/IRES/EGFP/Neo)	CMV	EGFP	Neo	Kan
C05003	pEX-3 (pGCMV/MCS/Neo)	CMV	--	Neo	Kan
C05004	pEX-4 (pGCMV/MCS/T2A/EGFP/Neo)	CMV	EGFP	Neo	Kan
C05005	pEX-5 (pGCMV/EGFP/MCS/Neo)	CMV	EGFP	Neo	Kan
C05006	pEX-6 (pGCMV/MCS/RFP/Neo)	CMV	RFP	Neo	Kan
C05007	pEX-7 (pGCMV/RFP/MCS/Neo)	CMV	RFP	Neo	Kan

注：如需订购其他抗性基因，请详细备注！

附录3: 吉玛pEX系列载体基因图谱



上海电话：021-51320195
苏州电话：0512-86668828

E-mail: support@genepharma.com
E-mail: szsupport@genepharma.com

官网网址：www.genepharma.com



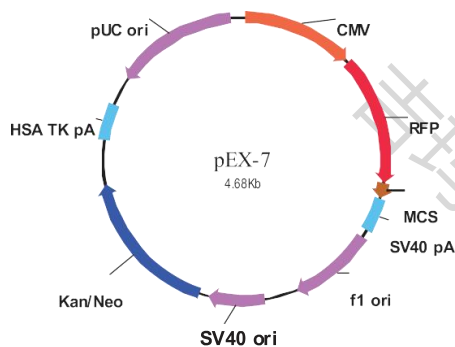
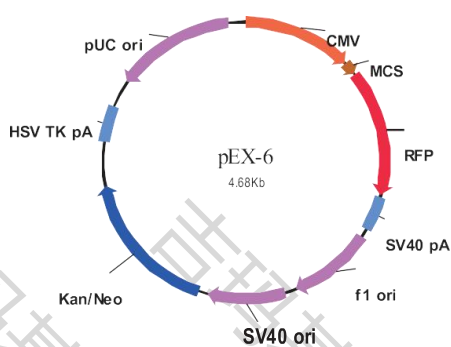
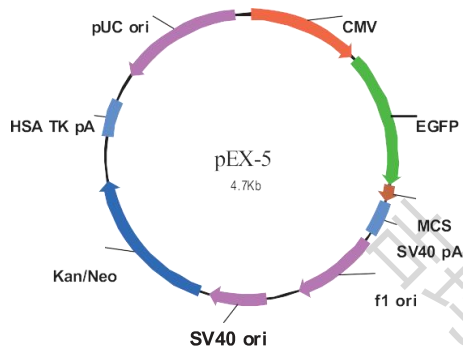
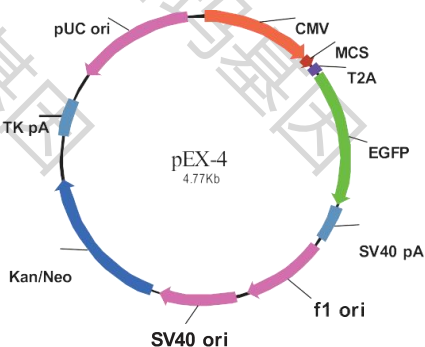
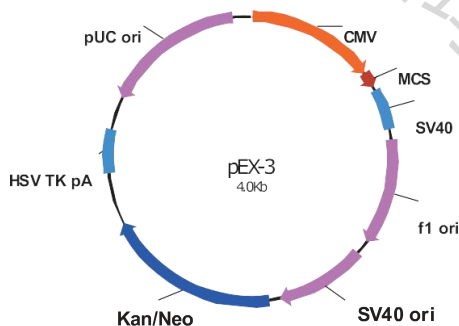
B016-V004-20231211



GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com



上海电话: 021-51320195
苏州电话: 0512-86668828

E-mail: support@genepharma.com
E-mail: szsupport@genepharma.com

官网网址: www.genepharma.com



B016-V004-20231211