



GenePharma 表达载体使用说明

质粒及菌液说明

1、GenePharma 所提供的过表达质粒为高纯度的 DNA 粉末制品，经过真空冷冻干燥的质粒是呈薄膜状或粉末状附在离心管中，请适当离心(10000r/min 10~15s)后小心开启，以免飞扬丢失。请根据实验需要的质粒浓度和质粒的总量加入适量的 ddH₂O (通常建议储存液浓度 500ng~1μg/μL)，合上管盖充分震荡使其溶解后可用于细胞转染及其他分子生物学实验。粉末制品的 DNA 可长期保存(建议最好不要超过6个月)，质粒溶解后建议在-20℃的环境中存贮，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℃保存。)

3、重组质粒测序峰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。

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(红色荧光蛋白)，是用荧光显微镜或流式细胞仪可以很容易地确定转染效率；如果您所订购的载体中不含绿色荧光蛋白(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(红色荧光蛋白)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

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。

1 转染条件的确定



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。



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。

- 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℃ 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℃ 5% CO₂ 培养 24h。
- 6、转染试剂 Lipofectamin2000 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 1.5mL EP 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 Lipofectamin2000，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。

2 细胞的转染

- 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。
- 2、按照前面实验确定的细胞接种量接种。37℃ 5% CO₂ 培养至 40-70% 融合。
- 3、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。
- 4、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。