

Code No. 3243/3244

研究用

---

**TAKARA**

pBApo-EF1  $\alpha$  Neo DNA

pBApo-EF1  $\alpha$  Pur DNA

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 载体图谱和多克隆位点	1
● 使用方法	2
● 实验例	2
● 关联产品	3

## ● 制品说明

pBApo-EF1  $\alpha$  系列载体是一类简单的应用于哺乳动物细胞的基因表达载体。该载体具有人多肽链延伸因子基因来源的启动子 (EF1  $\alpha$  promoter)、单纯疱疹病毒胸苷激酶来源的 polyA 信号。通过在 MCS 区域插入目的基因的开放阅读框 (ORF)，可以构建含目的基因的表达载体。除了通常的基因外，该载体可以用于前体 microRNA 的转录。

pBApo-EF1  $\alpha$  系列载体在动物细胞内的筛选标记是新霉素和嘌呤霉素，可以根据实验目选择合适的载体。

## ● 制品内容

pBApo-EF1  $\alpha$  Neo DNA (Code No. 3243) 20  $\mu$ g (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

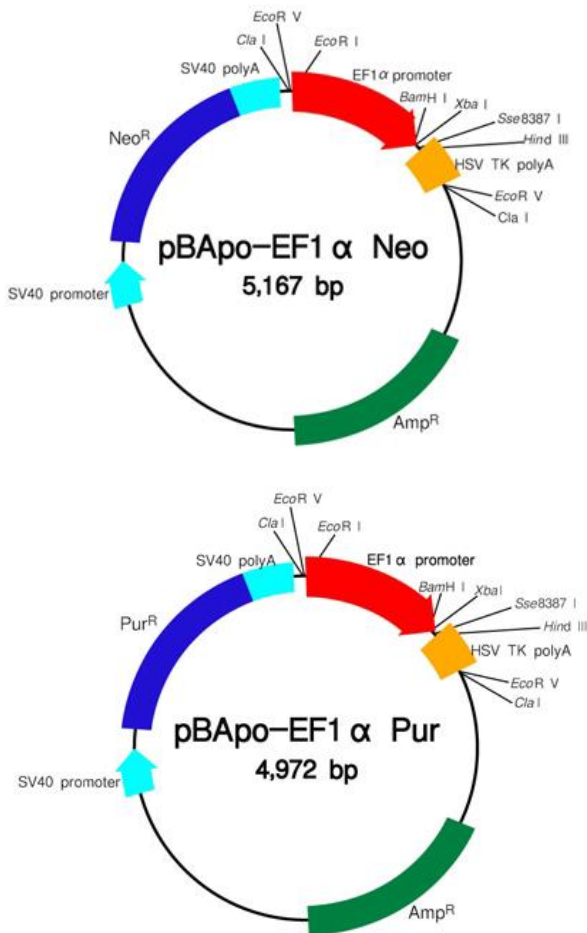
pBApo-EF1  $\alpha$  Pur DNA (Code No. 3244) 20  $\mu$ g (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

贮存溶液 10 mM Tris-HCl, pH8.0、1 mM EDTA

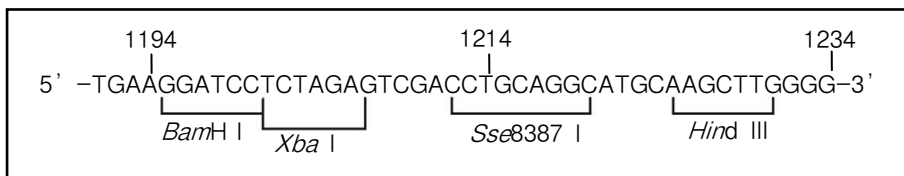
● 保存: -20°C。

\*自收到之日起，适当条件下保存，两年内有效。

## ● 载体图谱和多克隆位点



载体图谱



pBApo-EF1  $\alpha$ Neo DNA 和 pBApo-EF1  $\alpha$ Pur DNA 克隆位点

## ● 使用方法

### 1. 插入基因

在质粒载体的克隆位点处插入目的基因的开放阅读框 (ORF)。因为载体上有氨苄青霉素抗性基因，可以从大肠杆菌中筛选重组体。

### 2. 转染

使用 *TransIT* 系列、*Xfect* 系列 (Code No. 631317 等) 等转染试剂将质粒导入细胞内。转染条件请参考转染试剂的实验流程。

### 3. 转染细胞的筛选

pBApo-EF1  $\alpha$ Neo DNA 具有新霉素抗性基因、pBApo-EF1  $\alpha$ Pur DNA 具有嘌呤霉素抗性基因，可以利用抗生素筛选转染细胞。

在质粒转染后培养 24 小时以上，开始使用抗生素筛选。在细胞密度较高的情况下，可以适当稀释细胞后重新培养。每 3~4 天更换含抗生素的培养基。通常 1~2 周可以获得转染细胞的克隆。

由于不同细胞对抗生素的耐药性不同，需要研讨适合的抗生素浓度。一般情况下，对于 Neo<sup>R</sup> 基因，G418 的浓度范围为 500~1,000  $\mu$ g/ml；对于 Pur<sup>R</sup> 基因，嘌呤霉素的浓度范围为 1~3  $\mu$ g/ml。

## ● 实验例

### 1. 构建荧光蛋白质 (AcGFP1) 表达载体

1) 使用 *Hind* III 酶切 pBApo-EF1  $\alpha$ Neo DNA、末端平滑化，然后使用 *Xba* I 酶切，琼脂糖凝胶电泳回收 5.1 kb DNA 片段。

2) 使用 *Nhe* I 和 *Ssp* I 酶切 pAcGFP1-C1 Vector (Code No. 632470)，回收 AcGFP1 基因的 DNA 片段，然后使用 DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Code No. 6023) 将其与酶切后的 pBApo-EF1  $\alpha$ Neo 进行连接反应。

3) 连接液转化 *E.coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052)，涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上。

4) 所得的克隆用 2~5 ml LB-Amp 培养液培养，提取质粒，筛选正确的克隆。

5) 纯化 pBApo-EF1  $\alpha$  Neo/AcGFP1 后用于转染。

<在人培养细胞中使用 EF1  $\alpha$  启动子表达基因>

使用转染试剂 *Xfect*<sup>TM</sup> Transfection Reagent (Code No. 631317) 向预先培养的 HeLa 细胞中导入质粒。24 小时后荧光显微镜下观察，确认 AcGFP1 的表达 (图 1)。

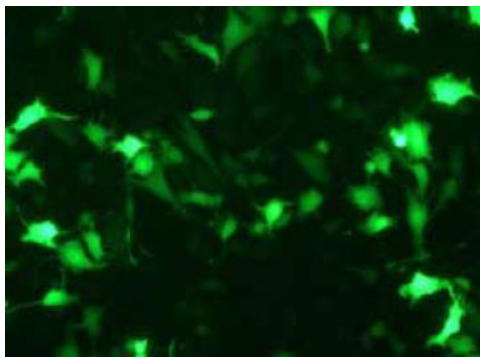


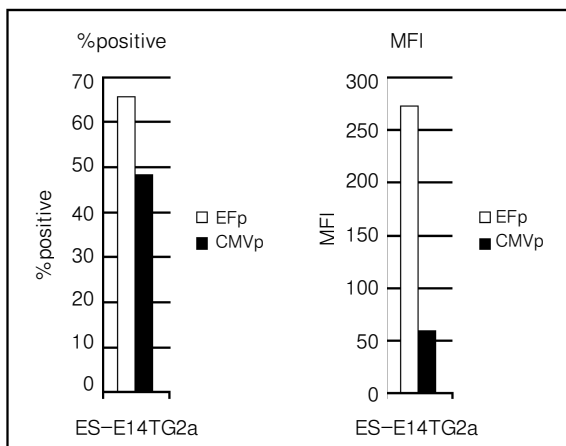
图 1. 荧光显微镜观察结果：  
pBApo-EF1αNeo/AcGFP1 转染 24 小时后

## 2. 小鼠ES细胞中使用EF1α启动子和CMV-IE启动子的基因表达比较

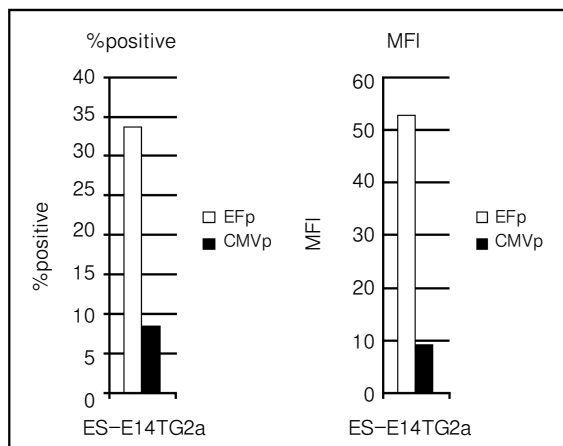
- 1) 使用转染试剂Xfect mESC Transfection Reagent (Code No. 631320)向小鼠ES E14TG2a细胞中导入含AcGFP1基因的质粒 (pBApo-EF1αNeo DNA或pBApo-CMV Neo DNA)。
- 2) 48小时后回收细胞，通过流式细胞仪测定AcGFP1的表达情况 (下图瞬时表达)。
- 3) 使用添加250 μg/ml G418的培养液筛选转染细胞，通过流式细胞仪测定AcGFP1的表达情况 (下图稳定表达)。

实验结果：在小鼠ES细胞中进行瞬时和稳定表达结果说明，使用EF1α启动子时，cGFP1阳性细胞的比率高，表达能力强。

### 瞬时表达



### 稳定表达



## ● 关联产品

- pBApo-CMV Vector Series (Code No. 3240~3242)
- DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023)
- E.coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052)
- Xfect™ Transfection Reagent (Code No. 631317)
- Xfect™ mESC Transfection Reagent (Code No. 631320)
- pAcGFP1-C1 Vector (Code No. 632470)
- G418 (Code No. 631307、631308)
- Puromycin (Code No. 631305、631306)

Xfect is a trademark of Takara Bio USA, Inc.

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <http://www.takara.com.cn>