

## pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)

产品编号	产品名称	包装
D2606-1μg	pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)	1μg
D2606-100μg	pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)	100μg

### 产品简介：

- pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)是碧云天自行研发的含有CMV启动子用于在哺乳动物线粒体中表达带有线粒体定位信号(Mitochondrial localization signal, MLS)的AT1.03蛋白以作为细胞线粒体ATP荧光探针的工具质粒。本质粒表达的ATP荧光探针被称为ATeam，即基于FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶ε亚基的ATP指示剂(Adenosine 5'-Triphosphate indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurements)。AT1.03是一种低亲和力的ATeam (Kd=3.3mM at 37°C)，可以检测毫摩尔级的ATP水平。pCMV-Mito-AT1.03质粒在转染哺乳动物细胞后，AT1.03蛋白由于带有线粒体定位信号主要分布在线粒体中，适合用于实时监控线粒体内的ATP浓度变化。
- pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)也可以用作线粒体荧光探针，在活细胞中或细胞固定后标记线粒体的位置和形态。
- AT1.03蛋白是以荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)为基础的实时监测单个活细胞内的ATP水平及其实时变化的ATP荧光探针。带有线粒体定位信号的该荧光探针由N端的青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein) mseCFP ΔC11 (激发光波长435nm, 发射光波长475nm)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基以及C端的黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein) cp173-mVenus (激发光波长515nm, 发射光波长527nm)融合而成(参考图1)。枯草芽孢杆菌的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基是几乎最小的ATP结合蛋白(14kDa)，它由一个N端β桶状结构域和两个C端α螺旋结构域组成。作为基于FRET的ATP荧光探针，FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基具有几个突出优点：ε亚基与ATP结合，但不水解ATP；结合ATP，但不结合ADP、GTP、CTP以及UTP；当ATP结合时，ε亚基发生很大的构象变化形成一个折叠的构象(folded form)，从而使N端的青色荧光蛋白以及C端的黄色荧光蛋白得以在空间上接近，而发生荧光共振能量转移(激发光波长435nm, 发射光波长527nm)。带有线粒体定位信号的AT1.03蛋白和不带有线粒体定位信号的AT1.03蛋白相比，完全保留了AT1.03蛋白的以FRET为基础的ATP荧光探针的功能。



图1. Mito-AT1.03蛋白结构图，N端融合了线粒体靶向信号(细胞色素c氧化酶VIII双链体)。Cox x2为线粒体定位信号。

- pCMV-Mito-AT1.03质粒转染Hela细胞后的ATP荧光探针表达效果请参考图2。

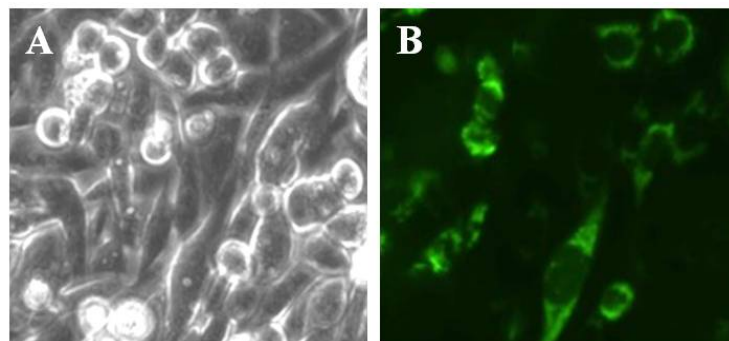


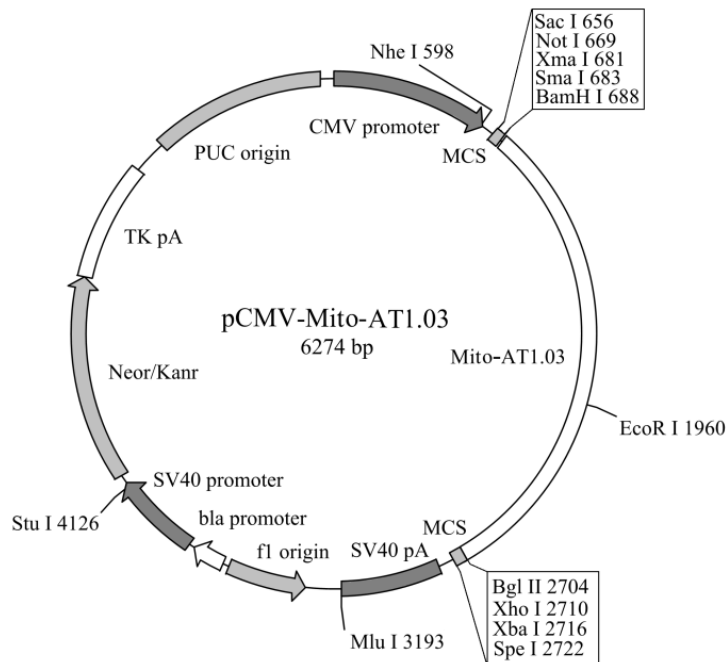
图2. pCMV-Mito-AT1.03质粒转染Hela细胞后的ATP荧光探针表达效果图。A图为明场照片，B图为荧光照片。

- AT1.03的荧光信号在pH7.1-8.5之间非常稳定，这样AT1.03的荧光信号在正常细胞质内(pH7.3左右)几乎不会发生波动。ATP的结合常数K<sub>on</sub>为1.7X10<sup>-2</sup>mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>，ATP的解离常数K<sub>off</sub>为9.8X10<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>，因此AT1.03可用于监控细胞内高达0.1s<sup>-1</sup> ATP的动态变化，特别适合用于实时监控超短时间内的ATP浓度变化。带有线粒体定位信号的AT1.03蛋白和不带有线粒体定位信号的AT1.03蛋白相比，pH稳定性、结合常数、解离常数等性能基本一致。
- 本质粒为卡那霉素抗性，转染细胞后，可使用G418筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-Mito-AT1.03质粒的主要信息如下：

Feature	Nucleotide	Position
---------	------------	----------

CMV promoter	1-602
T3 promoter and T3 primer binding site	620-639
Mito-AT1.03	699-2702
multiple cloning site	651-692/2703-272
T7 promoter and T7 primer binding site	2749-2797
SV40 polyA signal	2809-3192
f1 origin of ss-DNA replication	3330-3634
bla promoter	3659-3783
SV40 promoter	3803-4141
neomycin/kanamycin resistance ORF	4176-4967
HSV-thymidine kinase (TK) polyA signal	4968-5426
pUC origin	5555-6222

➤ pCMV-Mito-AT1.03质粒(6274bp)的图谱如下:



➤ pCMV-Mito-AT1.03的详细图谱如下:

	SacI	NotI	XmaI	BamHI	Mito-AT1.03
651	GAGCTCCACC	GCGGTGGCGG	CCGCTCTAGC	CCGGGCGGAT	CCGCCACCAT
	CTCGAGGTGG	CGCCACCGCC	GGCGAGATCG	GGCCCGCCTA	GGCGGTGGTA
	Mito localization sequence				
	S V L T P L L L R G L T G S A R				
701	GTCCGTCTTG	ACGCCGTGC	TGCTGCGGGG	CTTGACAGGC	TCCGCCCGGC
	CAGGCAGGAC	TGCGGCGACG	ACGACGCCCC	GAAGTGTCCG	AGCCGGGCCG
	R L P V	P R A	K I H	S L S V	L T P
751	GGCTCCAGT	GCCGCGGCC	AAGATCCATT	CGTTGTCCGT	CCTGACGCCG
	CCGAGGGTCA	CGGCGCGCGG	TTCTAGGTAA	GCAACAGGCA	GGAAGTGC
	L L L	R G L T	G S A	R R L	P V P R
801	CTGCTGCTGC	GGGGCTTGAC	AGGCTCGGCC	CGGCGGCTCC	CAGTGCCGCG
	GACGACGACG	CCCCGAAGT	TCCGAGCCGG	GCCGCCGAGG	GTCACGGCGC
	A K I	H S L			
851	CGCCAAGATC	CATTCGTTGG	TGAGCAAGGG	CGAGGAGCTG	TTCACCGGGG
	GCGGTTCTAG	GTAAGCAACC	ACTCGTTCCC	GCTCCTCGAC	AAGTGGCCCC
901	TGGTGCCCAT	CCTGGTTCGAG	CTGGACGGCG	ACGTAAACGG	CCACAGGTTT
	ACCACGGGTA	GGACCAGCTC	GACCTGCCGC	TGCATTTGCC	GGTGTCCAAG

951 AGCGTGTCCG GCGAGGGCGA GGGCGATGCC ACCTACGGCA AGCTGACCCT  
 TCGCACAGGC CGCTCCCGCT CCCGCTACGG TGGATGCCGT TCGACTGGGA  
  
 1001 GAAGTTCATC TGCACCACCG GCAAGCTGCC CGTGCCCTGG CCCACCCTCG  
 CTTCAAGTAG ACGTGGTGGC CGTTCGACGG GCACGGGACC GGGTGGGAGC  
  
 1051 TGACCACCCT GACCTGGGGC GTGCAGTGCT TCGCCCGCTA CCCCACCAC  
 ACTGGTGGGA CTGGACCCCG CACGTCACGA AGCGGGCGAT GGGGCTGGTG  
  
 1101 ATGAAGCAGC ACGACTTCTT CAAGTCCGCC ATGCCCGAAG GCTACGTCCA  
 TACTTCGTCTG TGCTGAAGAA GTTCAGGCGG TACGGGCTTC CGATGCAGGT  
  
 1151 GGAGCGTACC ATCTTCTTCA AGGACGACGG CAACTACAAG ACCCGCGCCG  
 CCTCGCATGG TAGAAGAAGT TCCTGCTGCC GTTGATGTTC TGGGCGCGGC  
  
 1201 AGGTGAAGTT CGAGGGCGAC ACCCTGGTGA ACCGCATCGA GCTGAAGGGC  
 TCCACTTCAA GCTCCCCTG TGGGACCACT TGGCGTAGCT CGACTTCCCG  
  
 1251 ATCGACTTCA AGGAGGACGG CAACATCCTG GGGCACAAGC TGGAGTACAA  
 TAGCTGAAGT TCCTCCTGCC GTTGTAGGAC CCCGTGTTCG ACCTCATGTT  
  
 1301 CTACATCAGC CACAACGTCT ATATCACCGC CGACAAGCAG AAGAACGGCA  
 GATGTAGTCG GTGTTGCAGA TATAGTGGCG GCTGTTCGTC TTCTTGCCGT  
  
 1351 TCAAGGCCCA CTTCAAGATC CGCCACAACA TCGAGGACGG CGGCGTGCAG  
 AGTTCGGGGT GAAGTTCTAG GCGGTGTTGT AGCTCCTGCC GCCGCACGTC  
  
 1401 CTCGCCGACC ACTACCAGCA GAACACCCCC ATCGGCGACG GCCCCGTGCT  
 GAGCGGCTGG TGATGGTCTG CTTGTGGGGG TAGCCGCTGC CGGGGCACGA  
  
 1451 GCTGCCCGAC AACCACTACC TGAGCACCCA GTCCGCCCTG AGCAAAGACC  
 CGACGGGCTG TTGGTGATGG ACTCGTGGGT CAGGCGGGAC TCGTTTCTGG  
  
 1501 CCAACGAGAA GCGCGATCAC ATGGTCTGTC TGGAGTTCGT GACCGCCGCC  
 GGTGCTCTT CGCGCTAGTG TACCAGGACG ACCTCAAGCA CTGGCGGCGG  
  
 1551 ATCGATATGA AAAGTGTGAA AGTGAATATA ACAACCCCTG ATGGGCCAGT  
 TAGCTATACT TTTGACACTT TCACTTATAT TGTGTTGGGAC TACCCGGTCA  
  
 1601 CTACGACGCT GATATCGAGA TGGTGTCCGT GCGGGCCGAG AGTGGTGATC  
 GATGCTGCGA CTATAGCTCT ACCACAGGCA CGCCCGGCTC TCACCACTAG  
  
 1651 TCGGCATCCT CCCCAGTAC ATTCCACAA AGGCCCCACT GAAGATCGGA  
 AGCCGTAGGA GGGGCCAGTG TAAGGGTGT TCCGGGTGA CTTCTAGCCT  
  
 1701 GCTGTGCGGC TGAAGAAGGA CGGCCAAACC GAGATGGTCG CAGTCTCAGG  
 CGACACGCCG ACTTCTTCCT GCCGGTTTGG CTCTACCAGC GTCAGAGTCC  
  
 1751 CGGCACTGTT GAAGTGCAGC CTGACCACGT TACCATTAAT GCTCAAGCCG  
 GCCGTGACAA CTTACGCCG GACTGGTGCA ATGGTAATTA CGAGTTCGGC  
  
 1801 CTGAAACAGC CGAAGGAATC GACAAAGAGA GAGCAGAAGC CGCAAGACAG

GACTTTGTCTG GCTTCCTTAG CTGTTTCTCT CTCGTCTTCG GCGTTCTGTC  
 1851 AGGGCCAGG AGCGGCTGAA CTCTCAATCC GATGACACCG ATATTGCGCG  
 TCCCAGGTCC TCGCCGACTT GAGAGTTAGG CTA CTGTGGC TATAAGCGGC  
 1901 GGCCGAGCTG GCACTGCAGA GGGCCCTGAA CAGACTGGAC GTGGCTGGGA  
 CCGGCTCGAC CGTGACGTCT CCCGGGACTT GTCTGACCTG CACCGACCTT  
 1951 AGGCAAACGA ATTCATGGAC GGC GGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG  
 TCCGTTTGCT TAAGTACCTG CCGCCGCACG TCGAGCGGCT GGTGATGGTC  
 2001 CAGAACACCC CCATCGGCGA CGGCCCCGTG CTGCTGCCCCG ACAACCACTA  
 GTCTTGTGGG GGTAGCCGCT GCCGGGCAC GACGACGGC TGTGGTGAT  
 2051 CCTGAGCTAC CAGTCCGCC TTAGCAAAGA CCCCAACGAG AAGCGGATC  
 GGACTCGATG GTCAGCGGG ACTCGTTTCT GGGTTGCTC TTCGCGCTAG  
 2101 ACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGATCAC TCTCGGCATG  
 TGTACCAGGA CGACCTCAAG CACTGGCGGC GGCCCTAGTG AGAGCCGTAC  
 2151 GACGAGCTGT ACAAGGTGG CAGCGGTGGC ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA  
 CTGCTCGACA TGTCCCACC GTCGCCACCG TACCACTCGT TCCCCTCCT  
 2201 GCTGTTACC GGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GGCGACGTAA  
 CGACAAGTGG CCCACCACG GGTAGGACCA GCTCGACCTG CCGCTGCATT  
 2251 ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC  
 TGCCGGTGT CAAGTCGCAC AGGCCGCTCC CGCTCCCCT ACGGTGGATG  
 2301 GGCAAGCTGA CCCTGAAGCT GATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC  
 CCGTTCGACT GGGACTTCGA CTAGACGTGG TGGCCGTTTCG ACGGGCACGG  
 2351 CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGGGCTA CGGCCTGCAG TGCTTCGCCC  
 GACCGGGTGG GAGCACTGGT GGGACCCGAT GCCGGACGTC ACGAAGCGGG  
 2401 GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC  
 CGATGGGGCT GGTGTACTTC GTCGTGCTGA AGAAGTTCAG GCGGTACGGG  
 2451 GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA  
 CTTCCGATGC AGGTCTCTGC GTGGTAGAAG AAGTTCCTGC TGCCGTTGAT  
 2501 CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG GTGAACCGCA  
 GTTCTGGGCG CGGCTCCACT TCAAGCTCCC GCTGTGGGAC CACTTGGCGT  
 2551 TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC  
 AGCTCGACTT CCCGTAGCTG AAGTTCCTCC TGCCGTTGTA GGACCCCGTG  
 2601 AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA CCGCCGACAA  
 TTCGACCTCA TGTGATGTT GTCGGTGTG CAGATATAGT GGCGGCTGTT  
 2651 GCAGAAGAAC GGCATCAAGG CCAACTTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGT  
 CGTCTTCTTG CCGTAGTTC GGTGAAGTT CTAGGCGGTG TTGTAGCTCA

BglII XhoI XbaI SpeI  
 2701 AAAGATCTCT CGAGTCTAGA ACTAGTGGGC CCGGTACCTT  
 TTTCTAGAGA GCTCAGATCT TGATCACCCG GGCCATGGAA

➤ pCMV-Mito-AT1.03中没有的酶切位点(Restriction enzymes that do not cut pCMV-Mito-AT1.03)包括:

AclI	AfeI	AflII	AgeI	AhdI	AscI	AsiSI
BaeI	BbsI	BbvCI	BlpI	BsiWI	BsmBI	BspEI
BspQI	BstEII	BstZ17I	EarI	EcoNI	Esp3I	FseI
HindIII	NruI	PmeI	PmlI	PpuMI	PshAI	PspXI
SalI	SapI	SbfI	ScaI	SgrAI	SwaI	XcmI
XmnI						

➤ pCMV-Mito-AT1.03中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pCMV-Mito-AT1.03)包括:

AccI	GT`MK,AC	1600	NdeI	CA`TA,TG	240
ApaI	G`TGCA,C	5908	NheI	G`CTAG,C	597
BamHI	G`GATC,C	687	NotI	GC`GGCC,GC	668
BclI	T`GATC,A	2963	PaeR7I	C`TCGA,G	2709
BglII	A`GATC,T	2703	PciI	A`CATG,T	6222
BmgBI	CAC GTC	1940	PflFI	GACN`N,NGTC	4422
BmtI	G,CTAG`C	597	PflMI	CCAN,NNN`NTGG	863
BsaI	GGTCTCN`NNNN,	5293	PluTI	G,GCGC`C	4303
BsaXI	,NNN`(N) <sub>9</sub> AC(N) <sub>5</sub> CTCC(N) <sub>7</sub> ,NNN`	3353	PvuI	CG,AT`CG	2807
BsrDI	GCAATG,NN`	4535	RsrII	CG`GWC,CG	4820
BsrGI	T`GTAC,A	2158	SacI	G,AGCT`C	651
BstBI	TT`CG,AA	4986	SacII	CC,GC`GG	660
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	663	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	4076
CspCI	,NN`(N) <sub>11</sub> CAA(N) <sub>5</sub> GTGG(N) <sub>10</sub> ,NN`	380	SfoI	GGC GCC	4305
DraIII	CAC,NNN`GTG	3419	SmaI	CCC GGG	682
Eco53kI	GAG CTC	653	SnaBI	TAC GTA	346
EcoRI	G`AATT,C	1959	SpeI	A`CTAG,T	2721
EcoRV	GAT ATC	1613	SrfI	GCCC GGGC	682
HincII	GTY RAC	3069	StuI	AGG CCT	4125
HpaI	GTT AAC	3069	TspMI	C`CCGG,G	680
KasI	G`GCGC,C	4303	Tth111I	GACN`N,NGTC	4422
MfeI	C`AATT,G	3056	XbaI	T`CTAG,A	2715
MluI	A`CGCG,T	3192	XhoI	C`TCGA,G	2709
MscI	TGG CCA	4386	XmaI	C`CCGG,G	680
NarI	GG`CG,CC	4304			

➤ 如需对pCMV-Mito-AT1.03质粒中插入片段Mito-AT1.03进行测序时,推荐使用的正向测序引物T3和反向测序引物T7的序列如下:

T3 primer (620-639): 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'

T7 primer (2749-2797): 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

➤ pCMV-Mito-AT1.03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
D2606-1μg	pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)	1μg
D2606-100μg	pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)	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1 $\mu$ g包装的本产品时，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. 100 $\mu$ g包装的本产品质粒浓度为0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l，共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D2604-1 $\mu$ g	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	1 $\mu$ g
D2604-100 $\mu$ g	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	100 $\mu$ g
D2605-1 $\mu$ g	pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)	1 $\mu$ g
D2605-100 $\mu$ g	pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)	100 $\mu$ g
D2906-1 $\mu$ g	pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)	1 $\mu$ g
D2906-100 $\mu$ g	pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)	100 $\mu$ g
D2907-1 $\mu$ g	pET-N-His-TEV-QUEEN7 $\mu$ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)	1 $\mu$ g
D2907-100 $\mu$ g	pET-N-His-TEV-QUEEN7 $\mu$ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)	100 $\mu$ g
D2909-1 $\mu$ g	pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)	1 $\mu$ g
D2909-100 $\mu$ g	pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)	100 $\mu$ g

Version 2020.12.08