

## pCMV-mCherry-p65

产品编号	产品名称	包装
D2821-1μg	pCMV-mCherry-p65	1μg
D2821-100μg	pCMV-mCherry-p65	100μg

### 产品简介:

- pCMV-mCherry-p65是碧云天自行研发生产的在哺乳动物细胞中表达mCherry标签的p65融合蛋白的质粒。该质粒含有CMV启动子, 带有卡那霉素(Kanamycin)抗性, 可以使用G418 (ST081)筛选稳定表达融合蛋白的细胞株, 是研究NF-κB信号通路的激活和抑制的有效工具。本产品主要适用于通过荧光显微镜等活细胞观察NF-κB的核转运激活。
- NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), 中文名为激活的B细胞核因子kappa-轻链增强子, 是细胞内重要的核转录因子, 参与细胞对外界刺激的响应、炎症反应、免疫应答等过程, 几乎存在于所有类型的动物细胞中。NF-κB作为转录因子蛋白家族, 包括5个亚单位: p50 (NF-κB1)、p52 (NF-κB2)、p65 (REL-associated protein, Rel-A)、Rel-B和c-Rel, 它们的N端都具有高度保守的RHD (REL homology domain); 5个亚单位根据C端结构域的不同被分为两类, 第一类为p50、p52, 其C端具有ankyrin重复结构域具有转录抑制活性(Transrepression activity)和招募IKK (Inhibitory κB kinase)的致死结构域(Dead domain); 第二类为p65、Rel-B和c-Rel, 其C端具有转录所必需的转录激活结构域(Transactivation domain, TAD)[1]。
- NF-κB在静息状态或失活状态(Resting state or inactive state)下, 其高度保守的RHD中的核定位信号(Nuclear localization sequence, NLS)与抑制因子IκB (Inhibitor of NF-κB)结合形成非活性复合物, NF-κB以失活状态存在于细胞质中。虽然IκB蛋白掩盖了p65的NLS信号, 但没有掩盖p50的NLS信号, 因此静息状态下NF-κB可以持续在细胞核和细胞质之间穿梭(Shuttle)维持很低水平的活性[2]。
- NF-κB的激活存在两条途径, 即经典途径和非经典途径。**经典途径:** 在受到促炎信号(如炎症细胞因子TNF-α、IL-1、病原体和病毒双链RNA等)的刺激后, 使细胞中的IKK复合物被招募并激活, IKK复合物由IKKα和/或IKKβ催化亚基以和NEMO (NF-κB Essential Modulator, 亦称IKKγ)组成, IKK复合物使IκB被磷酸化, 磷酸化的IκB随后发生泛素化被蛋白酶体降解, 使得NF-κB的核定位信号暴露从而进入细胞核激活靶基因; **非经典途径:** 该途径由NF-κB抑制激酶NIK (NF-κB inhibitory kinase)介导, NIK磷酸化并激活IKK的亚基IKKα, 磷酸化的IKKα再使p100磷酸化, 导致加工和释放有活性的p52和RelB异源二聚体转移至细胞核并激活靶标基因, 这一过程发生在淋巴器官发育期间, 淋巴器官负责产生B淋巴细胞和T淋巴细胞[2]。
- pCMV-mCherry-p65转染细胞后通过荧光显微镜观察, 静息状态下mCherry-p65均匀的分布在细胞质中, NF-κB被激活后mCherry-p65转移到细胞核内。本产品转染HEK293T细胞的效果如图1所示。

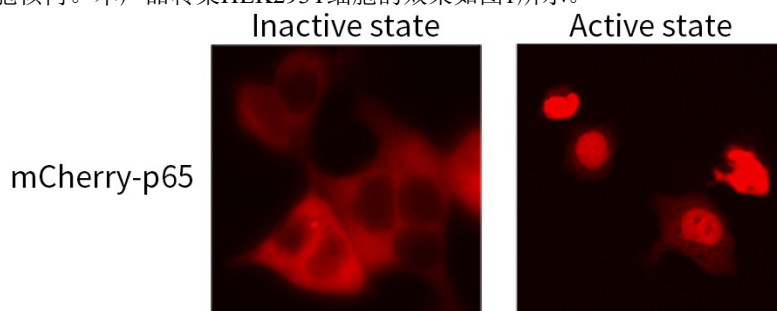


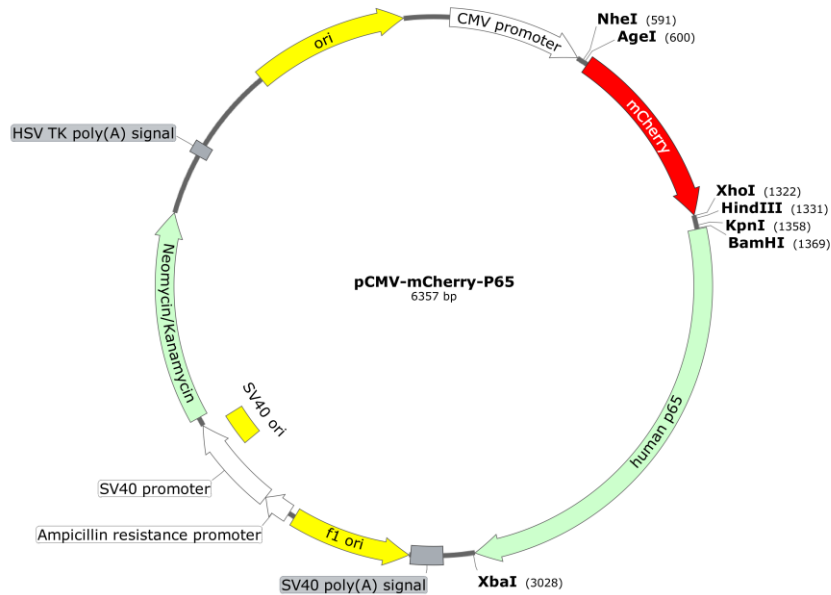
图1. 碧云天pCMV-mCherry-p65质粒转染HEK293T细胞效果图。pCMV-mCherry-p65质粒转染HEK293T细胞48小时后, 经荧光显微镜观察, 静息状态(Inactive state)下, mCherry-p65均匀分布在细胞质中。加入TNF-α (P6231)刺激HEK293T细胞后, 激活状态(Active state)下, mCherry-p65进入细胞核内。实际荧光强度会因实验仪器、检测条件的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- pCMV-mCherry-p65质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV promoter	61-568
mCherry	613-1320
human p65	1375-3024
SV40 poly(A) signal	3145-3266

f1 ori	3273-3728
Ampicillin resistance promoter	3755-3859
SV40 promoter	3861-4218
SV40 ori	4069-4204
Neomycin/Kanamycin resistance gene	4253-5047

➤ pCMV-mCherry-p65质粒(6357bp)的图谱如下:



➤ pCMV-mCherry-p65质粒的详细图谱如下:

CMV promoter

501	ACAACTCCGC	CCCATTGACG	CAAATGGGCG	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG
	TGTTGAGGCG	GGGTAAGTGC	GTTTACCCGC	CATCCGCACA	TGCCACCCTC
				NheI	
551	GTCTATATAA	GCAGAGCTGG	TTTAGTGAAC	CGTCAGATCC	GCTAGCGCTA
	CAGATATATT	CGTCTCGACC	AAATCACTTG	GCAGTCTAGG	CGATCGCGAT
	AgeI	mCherry			
601	CCGGTCGCCA	CCATGGTGAG	CAAGGGCGAG	GAGGATAACA	TGGCCATCAT
	GGCCAGCGGT	GGTACCACCTC	GTTCCCGCTC	CTCCTATTGT	ACCGGTAGTA
651	CAAGGAGTTC	ATGCGCTTCA	AGGTGCACAT	GGAGGGCTCC	GTGAACGGCC
	GTTCCCTCAAG	TACGCGAAGT	TCCACGTGTA	CCTCCCGAGG	CACTTGCCGG
701	ACGAGTTCGA	GATCGAGGGC	GAGGGCGAGG	GCCGCCCTTA	CGAGGGCACC
	TGCTCAAGCT	CTAGCTCCCG	CTCCCGCTCC	CGGCGGGGAT	GCTCCCGTGG
751	CAGACCGCCA	AGCTGAAGGT	GACCAAGGGT	GGCCCCCTGC	CCTTCGCCTG
	GTCTGGCGGT	TCGACTTCCA	CTGGTTCCCA	CCGGGGGACG	GGAAGCGGAC
801	GGACATCCTG	TCCCCTCAGT	TCATGTACGG	CTCCAAGGCC	TACGTGAAGC
	CCTGTAGGAC	AGGGGAGTCA	AGTACATGCC	GAGGTTCCGG	ATGCACTTCG
851	ACCCCGCCGA	CATCCCGCAC	TACTTGAAGC	TGTCCTTCCC	CGAGGGCTTC
	TGGGGCGGCT	GTAGGGGCTG	ATGAACTTCG	ACAGGAAGGG	GCTCCCGAAG
901	AAGTGGGAGC	GCGTGATGAA	CTTCGAGGAC	GGCGGCGTGG	TGACCGTGAC
	TTCACCCTCG	CGCACTACTT	GAAGCTCCTG	CCGCCGCACC	ACTGGCACTG
951	CCAGGACTCC	TCCCTGCAGG	ACGGCGAGTT	CATCTACAAG	GTGAAGCTGC
	GGTCCTGAGG	AGGGACGTCC	TGCCGCTCAA	GTAGATGTTT	CACTTCGACG
1001	GCGGCACCAA	CTTCCCTCCT	GACGGCCCCG	TAATGCAGAA	GAAGACCATG
	CGCCGTGGTT	GAAGGGGAGG	CTGCCGGGGC	ATTACGTCTT	CTTCTGGTAC
1051	GGCTGGGAGG	CCTCCTCCGA	GCGGATGTAC	CCCGAGGACG	GCGCCCTGAA
	CCGACCCTCC	GGAGGAGGCT	CGCCTACATG	GGGCTCCTGC	CGCGGGACTT
1101	GGGCGAGATC	AAGCAGAGGC	TGAAGCTGAA	GGACGGCGGC	CACTACGACG

CCCGCTCTAG TTCGTCTCCG ACTTCGACTT CCTGCCGCCG GTGATGCTGC  
 1151 CTGAGGTCAA GACCACCTAC AAGGCCAAGA AGCCCGTGCA GCTGCCCGGC  
 GACTCCAGTT CTGGTGGATG TTCCGGTTCT TCGGGCACGT CGACGGGCCG  
 1201 GCCTACAACG TCAACATCAA GTTGGACATC ACCTCCCACA ACGAGGACTA  
 CGGATGTTGC AGTTGTAGTT CAACCTGTAG TGGAGGGTGT TGCTCCTGAT  
 1251 CACCATCGTG GAACAGTACG AACGCGCCGA GGGCCGCCAC TCCACCGGCG  
 GTGGTAGCAC CTTGTTCATGC TTGCGCGGCT CCCGGCGGTG AGGTGGCCGC  
 XhoI HindIII  
 1301 GCATGGACGA GCTGTACAAG TCTCGAGCTC AAGCTTCGAA TTCTGCAGTC  
 CGTACCTGCT CGACATGTTT AGAGCTCGAG TTCGAAGCTT AAGACGTCAG  
 KpnI BamHI Human p65  
 1351 GACGGTACCG CGGGCCCCGG ATCCGACGAA CTGTTCCCCC TCATCTTCCC  
 CTGCCATGGC GCCCCGGGCC TAGGCTGCTT GACAAGGGGG AGTAGAAGGG  
 1401 GGCAGAGCCA GCCCAGGCCT CTGGCCCCTA TGTGGAGATC ATTGAGCAGC  
 CCGTCTCGGT CGGGTCCGGA GACCGGGGAT ACACCTCTAG TAACTCGTCG  
 1451 CCAAGCAGCG GGGCATGCGC TTCCGCTACA AGTGCAGAGG GCGCTCCGCG  
 GGTTCTCGCG CCCGTACGCG AAGGCGATGT TCACGCTCCC CGCGAGGCCG  
 1501 GGCAGCATCC CAGGCGAGAG GAGCACAGAT ACCACCAAGA CCCACCCAC  
 CCGTCTGATG GTCCGCTCTC CTCGTGTCTA TGGTGGTTCT GGGTGGGGTG  
 1551 CATCAAGATC AATGGCTACA CAGGACCAGG GACAGTGCGC ATCTCCCTGG  
 GTAGTTCTAG TTACCGATGT GTCCTGGTCC CTGTACGCG TAGAGGGACC  
 1601 TCACCAAGGA CCCTCCTCAC CGGCCTCACC CCCACGAGCT TGTAGGAAAG  
 AGTGGTTTCT GGGAGGAGTG GCCGAGTGG GGGTGCTCGA ACATCCTTTC  
 1651 GACTGCCGGG ATGGCTTCTA TGAGGCTGAG CTCTGCCCGG ACCGCTGCAT  
 CTGACGGCCC TACCGAAGAT ACTCCGACTC GAGACGGGCC TGGCGACGTA  
 1701 CCACAGTTTC CAGAACCTGG GAATCCAGTG TGTGAAGAAG CGGGACCTGG  
 GGTGTCAAAG GTCTTGGACC CTTAGGTCAC AACTTCTTC GCCCTGGACC  
 1751 AGCAGGCTAT CAGTCAGCGC ATCCAGACCA ACAACAACCC CTTCCAAGTT  
 TCGTCCGATA GTCAGTCGCG TAGGTCTGGT TGTGTTGGG GAAGGTCAA  
 1801 CCTATAGAAG AGCAGCGTGG GGAATACGAC CTGAATGCTG TGCGGCTCTG  
 GGATATCTTC TCGTGCACCC CTTGATGCTG GACTTACGAC ACGCCGAGAC  
 1851 CTTCAGGTG ACAGTGCGGG ACCCATCAGG CAGGCCCTC CGCCTGCCGC  
 GAAGGTCCAC TGTCACGCC TGGGTAGTCC GTCCGGGGAG GCGGACGGCG  
 1901 CTGTCCTTTC TCATCCCATC TTTGACAATC GTGCCCCAA CACTGCCGAG  
 GACAGGAAAG AGTAGGGTAG AACTGTAG CACGGGGTT GTGACGGCTC  
 1951 CTCAAGATCT GCCGAGTGAA CCGAAACTCT GGCAGCTGCC TCGGTGGGGA  
 GAGTTCTAGA CGGCTCACTT GGCTTTGAGA CCGTCGACGG AGCCACCCCT  
 2001 TGAGATCTTC CTAATGTGTG ACAAGGTGCA GAAAGAGGAC ATTGAGGTGT  
 ACTCTAGAAG GATGACACAC TGTTCACGT CTTTCTCTG TAACTCCACA  
 2051 ATTCACGGG ACCAGGCTGG GAGGCCGAG GCTCCTTTC GCAAGCTGAT  
 TAAAGTGCC TGGTCCGACC CTCGGGCTC CGAGGAAAAG CGTTCGACTA  
 2101 GTGCACCGAC AAGTGGCCAT TGTGTTCCGG ACCCCTCCCT ACGCAGACCC  
 CACGTGGCTG TTCACCGGTA ACACAAGGCC TGGGGAGGGA TGCGTCTGGG  
 2151 CAGCCTGCAG GTCCTGTGTC GTGTCTCCAT GCAGCTGCGG CGGCCTTCCG  
 GTCGGACGTC CGAGGACACG CACAGAGGTA CGTCGACGCC GCCGGAAGGC  
 2201 ACCGGGAGCT CAGTGAGCCC ATGGAATTCC AGTACCTGCC AGATACAGAC  
 TGCCCTCGA GTCACTCGGG TACCTTAAGG TCATGGACGG TCTATGTCTG  
 2251 GATCGTCACC GGATTGAGGA GAAACGTAAA AGGACATATG AGACCTTCAA

CTAGCAGTGG CCTAACTCCT CTTTGCATTT TCCTGTATAC TCTGGAAGTT

2301 GAGCATCATG AAGAAGAGTC CTTTCAGCGG ACCCACCACGAC CCCCAGCCTC  
CTCGTAGTAC TTCTTCTCAG GAAAGTCGCC TGGGTGGCTG GGGGCCGGAG

2351 CACCTCGACG CATTGCTGTG CCTTCCCGCA GCTCAGCTTC TGTCCCAAG  
GTGGAGCTGC GTAACGACAC GGAAGGGCGT CGAGTCGAAG ACAGGGGTTTC

2401 CCAGCACCCC AGCCCTATCC CTTTACGTCA TCCCTGAGCA CCATCAACTA  
GGTCGTGGGG TCGGGATAGG GAAATGCAGT AGGGACTCGT GGTAGTTGAT

2451 TGATGAGTTT CCCACCATGG TGTTTCCTTC TGGGCAGATC AGCCAGGCCT  
ACTACTCAAA GGGTGGTACC ACAAAGGAAG ACCCGTCTAG TCGGTCCGGA

2501 CGGCCTTGGC CCCGGCCCCT CCCCAAGTCC TGCCCCAGGC TCCAGCCCCT  
GCCGGAACCG GGGCCGGGGA GGGGTTTCAGG ACGGGGTCCG AGGTCGGGGA

2551 GCCCCTGCTC CAGCCATGGT ATCAGCTCTG GCCCAGGCC CAGCCCCTGT  
CGGGGACGAG GTCGGTACCA TAGTCGAGAC CGGGTCCGGG GTCGGGGACA

2601 CCCAGTCCTA GCCCAGGCC CTCCTCAGGC TGTGGCCCCA CCTGCCCCCA  
GGTTCAGGAT CGGGGTCCGG GAGGAGTCCG ACACCGGGGT GGACGGGGGT

2651 AGCCACCCA GGCTGGGGAA GGAACGCTGT CAGAGGCCCT GCTGCAGCTG  
TCGGGTGGGT CCGACCCCTT CTTGCGACA GTCTCCGGGA CGACGTCGAC

2701 CAGTTTGATG ATGAAGACCT GGGGGCCTTG CTTGGCAACA GCACAGACCC  
GTCAAACCTAC TACTTCTGGA CCCCCGGAAC GAACCGTTGT CGTGTCTGGG

2751 AGCTGTGTTT ACAGACCTGG CATCCGTCGA CAACTCCGAG TTTAGCAGC  
TCGACACAAG TGTCTGGACC GTAGGCAGCT GTTGAGGCTC AAAGTCGTCG

2801 TGCTGAACCA GGGCATACTT GTGGCCCCC ACACAACCTGA GCCCATGCTG  
ACGACTTGGT CCCGTATGGA CACCGGGGGG TGTGTTGACT CGGGTACGAC

2851 ATGGAGTACC CTGAGGCTAT AACTCGCCTA GTGACAGGGG CCCAGAGGCC  
TACCTCATGG GACTCCGATA TTGAGCGGAT CACTGTCCCC GGGTCTCCGG

2901 CCCCAGCCCA GTCCTGCTC CACTGGGGGC CCCGGGGCTC CCCAATGGCC  
GGGGCTGGGT CGAGGACGAG GTGACCCCCG GGGCCCCGAG GGGTTACCGG

2951 TCCTTTTCAGG AGATGAAGAC TTCTCCTCCA TTGCGGACAT GGACTTCTCA  
AGGAAAAGTCC TCTACTTCTG AAGAGGAGGT AACGCCTGTA CCTGAAGAGT

XbaI

3001 GCCCTGCTGA GTCAGATCAG CTCCTAATCT AGATAACTGA TCATAATCAG  
CGGGACGACT CAGTCTAGTC GAGGATTAGA TCTATTGACT AGTATTAGTC

3051 CCATACCACA TTTGTAGAGG TTTTACTTGC TTTAAAAAAC CTCCCACACC  
GGTATGGTGT AAACATCTCC AAAATGAACG AAATTTTTTG GAGGGTGTGG

➤ pCMV-mCherry-p65中没有的酶切位点包括:

AbsI	Acc113I	AclI	AcvI	AhlI	AjiI	AjuI
AscI	AsiSI	Asp700I	BaeI	BarI	BbrPI	BcuI
BmcAI	BmgBI	BsePI	BsiWI	BsmBI	Bsp68I	BssHII
BssNAI	Bst1107I	BstZ17I	BtrI	BtuMI	CciNI	Eco32I
Eco72I	EcoRV	Esp3I	FseI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI
MauBI	MluI	MreI	MroXI	MssI	NotI	NruI
PacI	PalAI	PauI	PdmI	Pfl123II	PI-PspI	PI-SceI
PmaCI	PmeI	PmlI	Psp1406I	PspCI	PspLI	PspXI
PsrI	PteI	RgaI	RigI	RruI	ScaI	SfaAI
SgfI	SgrDI	SgsI	SmiI	SpeI	SrfI	SwaI
TstI	XmnI	ZrmI				

➤ pCMV-mCherry-p65中的单酶切位点包括:

AseI	AT`TA,AT	7	PshAI	GACNN NNGTC	2252
SnaBI	TAC GTA	340	PvuI	CG,AT`CG	2253

NheI	G`CTAG,C	591	AarI	CACCTGC(N) <sub>4</sub> (N) <sub>4</sub> ,	2649
BmtI	G,CTAG`C	595	XbaI	T`CTAG,A	3028
AfeI	AGC GCT	596	BclI	T`GATC,A	3038
AgeI	A`CCGG,T	600	MfeI	C`AATT,G	3131
AhdI	GACNN,N`NNGTC	807	HpaI	GTT AAC	3144
BbvCI	CC`TCA,GC	1151	AflII	A`CRYG,T	3263
SgrAI	CR`CCGG,YG	1294	DraIII	CAC,NNN`GTG	3497
BsrGI	T`GTAC,A	1313	SexAI	A`CCWGG,T	3970
PaeR7I	C`TCGA,G	1322	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	4156
XhoI	C`TCGA,G	1322	BspDI	AT`CG,AT	4221
HindIII	A`AGCT,T	1331	ClaI	AT`CG,AT	4221
Acc65I	G`GTAC,C	1354	EagI	C`GGCC,G	4287
KpnI	G,GTAC`C	1358	PflFI	GACN`N,NGTC	4499
BamHI	G`GATC,C	1369	Tth111I	GACN`N,NGTC	4499
FspAI	RTGC GCAY	1588	PfoI	T`CCNGG,A	5156
KflI	GG`GWC,CC	1869	AflIII	A`CRYG,T	6299
BspEI	T`CCGG,A	2126	PciI	A`CATG,T	6299

- pCMV-mCherry-p65质粒中推荐使用的测序引物序列如下：  
 CMV-F primer (519-539): 5' -CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'  
 mCherry-C-5 primer (1201-1221): 5' -GCCTACAACGTCAACATCAAG-3'  
 SV40pA-R primer (3201-3182): 5' -GAAATTTGTGATGCTATTGC-3'
- pCMV-mCherry-p65的全序列信息请参考碧云天网站上该质粒的信息。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D2821-1μg	pCMV-mCherry-p65	1μg
D2821-100μg	pCMV-mCherry-p65	100μg
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20℃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1μg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. 100μg包装的本产品质粒浓度为0.1μg/μl，共1ml。可以直接用于转染细胞。

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C4003-100μl	Lenti-CMV-EGFP-p65-EF1α-Puro (10 <sup>9</sup> TU/ml)	100μl
C4005-100μl	Lenti-CMV-mCherry-p65-EF1α-Puro (10 <sup>9</sup> TU/ml)	100μl
D2820-1μg	pCMV-EGFP-p65	1μg
D2820-100μg	pCMV-EGFP-p65	100μg
D2821-1μg	pCMV-mCherry-p65	1μg
D2821-100μg	pCMV-mCherry-p65	100μg
SN368	NF-κB激活—核转运检测试剂盒(兔多抗)	>50次
SN371	NF-κB激活—核转运检测试剂盒(小鼠单抗)	>50次

Version 2021.01.21