

pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi (Avi标签质粒)

产品编号	产品名称	包装
D2979-1μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi (Avi标签质粒)	1μg
D2979-100μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi (Avi标签质粒)	100μg

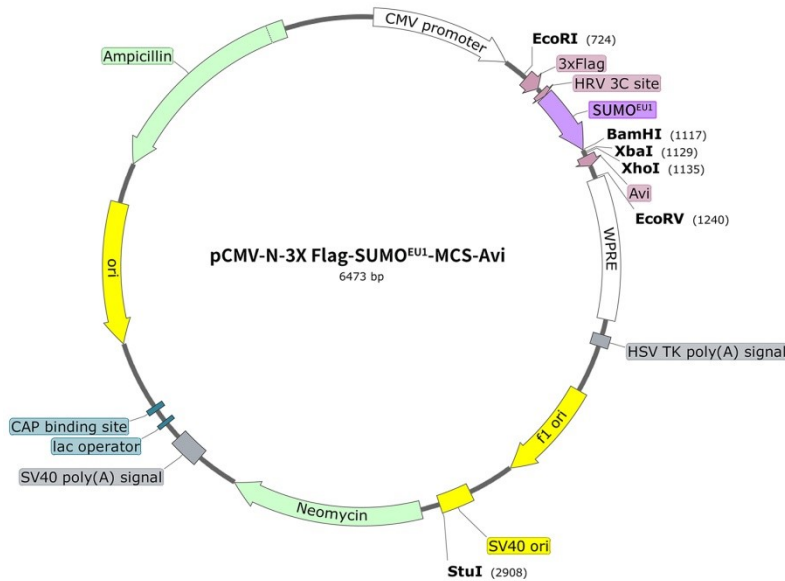
产品简介:

- pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi是碧云天自行研发的用于在哺乳动物细胞中表达可被生物素标记的目的蛋白的质粒。该质粒由CMV启动子驱动带有3X Flag标签(3X Flag tag)、SUMO^{EU1}标签(SUMO^{EU1} tag)及Avi标签(Avi tag)的目的蛋白。在生物素连接酶(Biotin ligase) BirA、ATP和生物素(Biotin)存在的体外条件下, BirA催化生物素共价结合到目的蛋白的Avi标签上, 从而对目的蛋白进行生物素标记。同时, 本质粒带有SUMO^{EU1}标签, 可被rSENP^{EUH}蛋白酶特异性的识别并切割, 从而实现相应标签蛋白与目的蛋白的高效分离。
- Avi标签是由15个氨基酸(GLNDIFEAQKIEWHE)组成的短肽标签, 在ATP和生物素存在的条件下, BirA在Avi标签的赖氨酸残基上连接一个生物素, 从而实现目的蛋白的生物素标记[1]。
- 生物素连接酶BirA特异性生物素标记Avi-tag有多方面的优点。Avi标签小且对融合蛋白的影响非常小, 只针对Avi标签上的Lys残基进行特定位置的生物素标记, 生物素标记效率高, 可重复性好; 体内或体外均可进行标记, 标记后的蛋白与链霉亲和素(Streptavidin)的亲合力高, 从而使Avi-tag技术可以应用于目的蛋白的固定吸附、纯化和检测等; 相比于传统生物素化学标记的非特异性位点的标记, BirA催化的反应条件更温和, 对被标记蛋白活力影响小, 酶活效率高, 标记特异性强[1]。
- 类泛素蛋白修饰分子(Small ubiquitin-like modifier, SUMO), 也被称为泛素样修饰因子小蛋白、泛素样小分子修饰因子或小泛素相关修饰物, 是广泛存在于真核生物的蛋白家族。和泛素化(Ubiquitination)类似, 类泛素蛋白修饰分子通过类泛素蛋白(Ubiquitin-like proteins, Ubls)活化酶(Ubl activating enzyme, E1)、结合酶(Ubl conjugating enzyme, E2)和连接酶(Ubl protein ligase, E3)共价连接到特定蛋白的赖氨酸上, 这一过程被称为SUMO化修饰(SUMOylation)。SUMO化修饰是一种翻译后修饰, 参与细胞的调控, 如细胞核到细胞膜的运输、转录调控、细胞凋亡、蛋白质的稳定、压力应激和细胞周期的调控等[2]。
- SUMO^{EU1}标签作为SUMO的突变体, 在真核细胞中可以提高目的蛋白的可溶性和稳定性, 但是SUMO^{EU1}标签融合的目的蛋白不参予SUMO相关的细胞调控, 也不会被内源性的去泛素化酶切割。SUMO^{EU1}标签在体外可以被rSENP^{EUH}蛋白酶特异性的识别并切割, 从而实现3X Flag标签、SUMO^{EU1}标签与目的蛋白的高效分离, 切割后的目的蛋白不带有任何相应标签氨基酸的残留, 因此SUMO^{EU1}标签适用于真核细胞重组蛋白的表达和纯化[3]。
- 内部核糖体进入位点序列(Internal ribosome entry site, IRES)是一段茎环结构序列, 在上游启动子的控制下IRES连接的两个基因转录成为一条mRNA, 在翻译时IRES可以单独招募核糖体, 实现IRES上、下游两个不同基因的共表达。通常下游基因的表达要相对弱一些。
- 本质粒为氨苄青霉素(Ampicillin)抗性和新霉素(Neomycin)抗性, 可利用其氨苄青霉素抗性转化大肠杆菌后筛选阳性菌。而在转染哺乳动物细胞后, 可使用G418 (ST081)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。G418和新霉素效果一致, 但G418的细胞毒性更低。
- 本质粒在N端3X Flag标签与SUMO^{EU1}标签之间含有HRV 3C蛋白酶识别的八肽序列Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, 因此可在目的蛋白纯化后用HRV 3C蛋白酶切除N端的3X Flag标签。由于HRV 3C蛋白酶酶切发生在八肽序列的Gln和Gly之间, 所以在酶切去除3X Flag标签的时候目的蛋白的N端会留下两个额外的氨基酸残基Gly和Pro。
- pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV promoter	50-633
3X Flag tag	739-804
HRV 3C site	823-846
SUMO ^{EU1} tag	847-1119
Multiple cloning site	1117-1146
Avi tag	1147-1191
WPRE	1249-1837
HSV-thymidine Kinase (TK) poly(A) signal	1903-1951
fl ori	2153-2581
SV40 ori	2775-2910
Neomycin	2991-3785
SV40 poly(A) signal	3961-4082

lac operator	4155-4171
CAP binding site	4224-4245
ori	4533-5121
Ampicillin	5292-6152

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi质粒(6473bp)的图谱如下:



➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi表达基因的详细图谱如下:

```

CMV promoter
601 CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA
GCACATGCCA CCCTCCAGAT ATATTCGTCT CGAGCAAATC ACTTGGCAGT

651 GATCGCCTGG AGACGCCATC CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC
CTAGCGGACC TCTGCGGTAG GTGCGACAAA ACTGGAGGTA TCTTCTGTGG

EcoRI 3x Flag tag
701 GGGACCGATC CAGCCTCCGG ACTGAATTCG CCACCATGGA CTACAAGGAC
CCCTGGCTAG GTCGGAGGCC TGACTTAAGC GGTGGTACCT GATGTTCCCTG

751 CACGACGGCG ACTACAAGGA CCACGACATC GACTACAAGG ACGACGACGA
GTGCTGCCGC TGATGTTTCT GGTGCTGTAG CTGATGTTCC TGCTGTCTGCT

HRV 3C site SUMOEU1 tag
801 CAAGGGCGGC AGCGCGGCA GCCTGGAGGT GCTGTTCCAG GGCCCCGAAG
GTTCCCGCCG TCGCCGCCGT CGGACCTCCA CGACAAGGC CCGGGGCTTC

851 AGGACAAAAA GCCAGCTGGT GGTGAAGGTG GTGGTGCTCA TATTAAGTGG
TCCTGTTTTT CGGTCGACCA CCACTTCCAC CACCAGAGT ATAATTGAAC

901 AAGGTCAAGG GTCAAGACGG TAACGAGGTG TTCTTCAGAA TCAAGAGATC
TTCCAGTTCC CAGTTCTGCC ATTGCTCCAC AAGAAGTCTT AGTTCTCTAG

951 CACTCAGCTG AAGAACTGA TGAACGCCTA CTCCGACAGA CAGTCCGTTG
GTGAGTCGAC TTCTTTGACT ACTTGCGGAT GAGGCTGTCT GTCAGGCAAC

1001 ACATGAAGGC TATCGCTTTC TTGTTCAAGG GTAGAAGATT GAGAGCCGAG
TGTACTTCCG ATAGCGAAAG AACAAGTTC CATCTTCTAA CTCTCGGCTC

1051 AGAACTCCAG ACGAGTTGGA AATGGAAGAT GGTGACGAGA TCGACGCCAT
TCTTGAGGTC TGCTCAACCT TTACCTTCTA CCACTGCTCT AGCTGCGGTA

BamHI XbaI XhoI Avi tag
1101 GTTGCATCAA ACTGGTGGAT CCACTAGTTC TAGACTCGAG GGTTCTGGCC
CAACGTAGTT TGACCACCTA GGTGATCAAG ATCTGAGCTC CCAAGACCGG

1151 TGAACGATAT TTTTGAAGCG CAGAAAATTG AATGGCATGA AGGCGGCGCG
ACTTGCTATA AAAACTTCGC GTCTTTTAAAC TTACCGTACT TCCGCCGCGC

EcoRV WPRE
1201 GCCGCTGTGC AGAAGTACTA GAGGATCATA ATCAGCCGAT ATCTCGACAA
CGGCGACAGC TCTTCATGAT CTCCTAGTAT TAGTCGGCTA TAGAGCTGTT

1251 TCAACCTCTG GATTACAAAA TTTGTGAAAG ATTGACTGGT ATTCTTAACT

```

AGTTGGAGAC CTAATGTTTT AACACTTTC TAACTGACCA TAAGAATTGA

1301 ATGTTGCTCC TTTTACGCTA TGTGGATACG CTGCTTTAAT GCCTTTGTAT
TACAACGAGG AAAATGCGAT ACACCTATGC GACGAAATTA CGGAAACATA

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	Acc65I	AcvI	AfeI	AflII	AgeI
AjiI	AjuI	AleI	Aor51HI	AscI	AsiGI	AsiSI
Asp718I	AsuII	AsuNHI	AxyI	BaeI	BanIII	BarI
BbrPI	BbvCI	BfrI	BlpI	BmgBI	BmtI	BoxI
Bpu14I	Bpu1102I	Bsa29I	Bse21I	BseCI	BsgI	BshVI
BshTI	BsiWI	Bsp119I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspDI	BspOI
BspTI	BspT104I	BspXI	BsrGI	Bst98I	BstAFI	BstAUI
BstBI	BstEII	BstENI	BstHPI	BstPI	BstPAI	BstXI
Bsu15I	Bsu36I	BsuTUI	BtrI	CelII	ClaI	Csp45I
CspAI	Eco47III	Eco72I	Eco81I	Eco91I	EcoNI	EcoO65I
FseI	FspAI	HindIII	HpaI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI
KflI	KpnI	KspAI	MauBI	MreI	MspCI	MssI
Nb.BbvCI	NheI	NspV	Nt.BbvCI	OliI	PacI	PalAI
Pfl23II	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmeI	PmlI
PpuMI	PshAI	Psp5II	PspCI	PspEI	PspLI	PspPPI
PsrI	RgaI	RigI	SanDI	SbfI	SdaI	SfaAI
SfiI	SfuI	SgfI	SgrAI	SgsI	SmiI	SrfI
Sse8387I	SspBI	SwaI	TstI	Vha464I	XagI	XcmI

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi中的单酶切位点包括:

ApaI	G, GGCC`C	844	PciI	A`CATG, T	4472
AvrII	C`CTAG, G	2909	PflFI	GACN`N, NGTC	3237
BamHI	G`GATC, C	1117	PluTI	G, GCGC`C	3122
BclI	T`GATC, A	2960	PspOMI	G`GGCC, C	840
Bpu10I	CC`TNA, GC	6468	PspXI	VC`TCGA, GB	1135
BsmI	GAATG, CN`	4041	PstI	C, TGCA`G	3172
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	654	PvuI	CG, AT`CG	5735
BspEI	T`CCGG, A	716	RsrII	CG`GWC, CG	3635
BssHII	G`CGCG, C	3516	SacI	G, AGCT`C	633
BstZ17I	GTA TAC	4093	SacII	CC, GC`GG	1752
DraIII	CAC, NNN`GTG	2386	SexAI	A`CCWGG, T	2676
Eco53kI	GAG CTC	631	SfoI	GGC GCC	3120
EcoRI	G`AATT, C	724	SgrDI	CG`TCGA, CG	6286
EcoRV	GAT ATC	1240	SmaI	CCC GGG	2932
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	654	SnaBI	TAC GTA	405
KasI	G`GCGC, C	3118	SspI	AAT ATT	6169
MfeI	C`AATT, G	6449	StuI	AGG CCT	2908
MluI	A`CGCG, T	43	TspMI	C`CCGG, G	2930
MscI	TGG CCA	3201	Tth111I	GACN`N, NGTC	3237
NarI	GG`CG, CC	3119	XbaI	T`CTAG, A	1129
NdeI	CA`TA, TG	299	XhoI	C`TCGA, G	1135
NotI	GC`GGCC, GC	1199	XmaI	C`CCGG, G	2930
PaeR7I	C`TCGA, G	1135			

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi质粒中推荐的测序引物序列如下:

CMV-F (584-603): 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGT-3'

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi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
D2979-1μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi	1μg
D2979-100μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi	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。可以直接用于酶切或者转染细胞。

参考文献：

1. Millard G.Cull, Peter J.Schatz. Methods in Enzymology. 2000. Volume 326:430-440.
2. Hay RT. Mol Cell. 2005. 18(1):1-12.
3. Vera Rodriguez A, Frey S and Gorlich D. J Cell Biol. 2019. 218(6):2006-2020.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D2971-1μg	pCMV-3X Flag-Avi-MCS-IRES-BirA (生物素标记质粒)	1μg
D2971-100μg	pCMV-3X Flag-Avi-MCS-IRES-BirA (生物素标记质粒)	100μg
D2973-1μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo (Avi标签质粒)	1μg
D2973-100μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo (Avi标签质粒)	100μg
D2975-1μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-SUMO ^{EU1} -Neo (Avi标签质粒)	1μg
D2975-100μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-SUMO ^{EU1} -Neo (Avi标签质粒)	100μg
D2977-1μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-SUMO ^{EU1} -MCS-IRES-BirA (生物素标记质粒)	1μg
D2977-100μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-SUMO ^{EU1} -MCS-IRES-BirA (生物素标记质粒)	100μg
D2979-1μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi (Avi标签质粒)	1μg
D2979-100μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi (Avi标签质粒)	100μg
D2981-1μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi-IRES-BirA (生物素标记质粒)	1μg
D2981-100μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi-IRES-BirA (生物素标记质粒)	100μg

Version 2021.11.30