

## pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)

产品编号	产品名称	包装
D2909-1μg	pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)	1μg
D2909-100μg	pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)	100μg

### 产品简介:

- pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)是碧云天研发的一种用于在细菌中表达ATP荧光探针QUEEN2m或QUEEN7μ时, 作为对照的原核工具质粒, 可以用于活体实时检测单个细菌内ATP水平时的对照, 也可以用于QUEEN NA的原核表达纯化。
- 通常本产品用作D2906 pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)或D2907 pET-N-His-TEV-QUEEN7μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)的阴性对照使用。
- 本质粒N端His标签后含有TEV酶切位点, 可通过TEV Protease (P2307/P2308)切除N端的His标签。
- QUEEN (Quantitative Evaluator of Cellular Energy)是一个单一的环状排列的荧光蛋白(circularly-permuted fluorescent protein)和细菌ATP结合蛋白融合表达而成。QUEEN对细菌生长速率的改变不敏感(Insensitive to bacteria growth changes)。许多细菌细胞内根据QUEEN的荧光所计算的胞内ATP浓度与根据萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)方法检测所计算得出的胞内ATP浓度几乎完全一致, 因此QUEEN适合于定量检测细菌内的绝对ATP浓度。从很多单个细菌收集的QUEEN荧光信号进行分析时发现, 即使是遗传背景相同的大肠杆菌细胞, 在相同培养条件下, 细胞内的绝对ATP浓度也是不同的。
- 基因编码的ATP荧光探针QUEEN7μ荧光蛋白, 由环型排列的增强型绿色荧光蛋白cpEGFP (circularly-permuted enhanced green fluorescent protein)插入到嗜热芽孢杆菌(thermophilic *Bacillus*) PS3的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基的两个α螺旋之间组成, 在接头处分别由两个氨基酸的接头(TR和LG)进行连接。当ATP结合于FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基的时候, 会引起整个蛋白发生构象变化。激发波长400nm/发射波长513nm的荧光强度与激发波长494nm/发射波长513nm的荧光强度的比值对ATP的浓度变化做出响应。QUEEN7μ是一个高亲和力的ATP荧光探针(K<sub>d</sub>~7μM at 25°C), 但对ADP没有亲和力。对于正常的活细菌而言, QUEEN7μ对ATP的亲和力可能过高, 而较难检测出较高浓度ATP水平的变化。但对于特定条件导致的细菌内低ATP水平时, 比较适合使用QUEEN7μ进行ATP的荧光检测。也可以使用表达纯化的QUEEN7μ进行体外体系的ATP实时浓度检测。
- 基因编码的ATP荧光探针QUEEN2m荧光蛋白, 是QUEEN7μ的突变体, 通过用源自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基的1-107aa取代QUEEN7μ中的源自嗜热芽孢杆菌(thermophilic *Bacillus*) PS3的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶ε亚基的1-107aa。仍然以激发波长400nm/发射波长513nm的荧光强度与激发波长494nm/发射波长513nm的荧光强度的比值对ATP的浓度变化做出响应。但QUEEN2m是一个低亲和力的ATP荧光探针, 更适合检测ATP的生理浓度(K<sub>d</sub>~4.5mM at 25°C)。高浓度的ADP会对QUEEN2m信号产生负面影响, 但效果相对较小(在生理ADP浓度下约为10%或更少)。此外QUEEN2m信号在pH7.3-8.8和生理Mg<sup>2+</sup>浓度(1-2mM)范围内几乎不受影响。
- 基因编码的ATP探针QUEEN NA荧光蛋白, 是QUEEN2m的突变体, 使用源自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶的ε亚基的110-132aa取代QUEEN2m中的源自嗜热芽孢杆菌(thermophilic *Bacillus*) PS3的FoF<sub>1</sub>-ATP合成酶ε亚基的110-133aa, 并突变了两个位点(R122K/R126K), 使QUEEN-NA失去了对ATP的亲合作用。因此QUEEN NA可用作QUEEN2m或QUEEN 7μ的阴性对照。

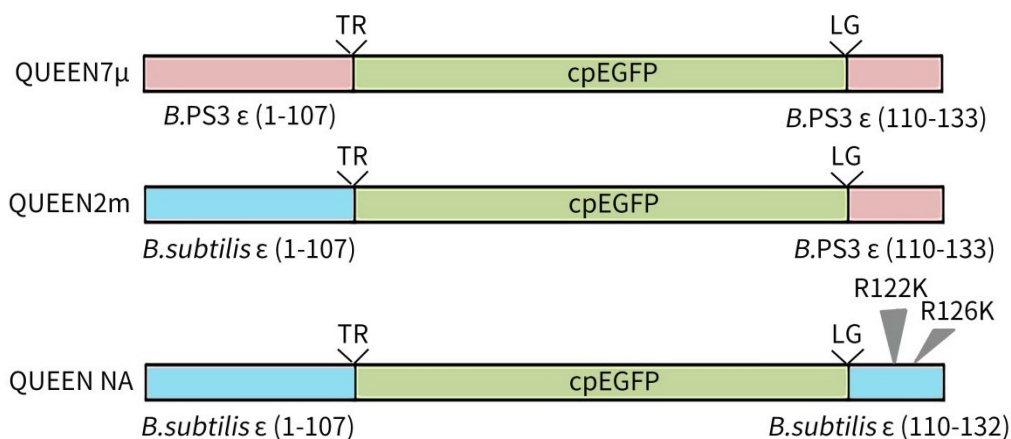
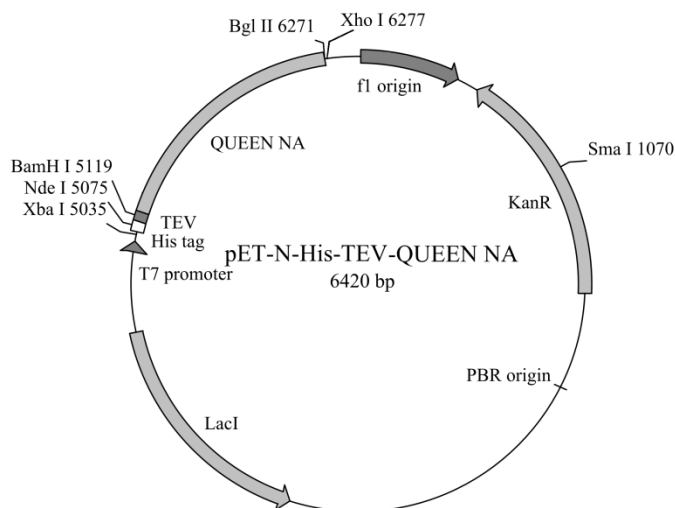


图1. QUEEN7μ、QUEEN2m和QUEEN NA的蛋白结构图。

- 本质粒含有T7启动子/*lac*操纵子，可以在异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)的诱导下高效启动目的蛋白表达。在多克隆位点的前面，带有一个His标签的编码序列，含有6个组氨酸(6X His)。
- 本载体在N端His标签与多克隆位点之间含有TEV蛋白酶(TEV Protease)识别的七肽序列ENLYFQG，对应的核酸序列为GAGAACCTGTACTTCCAAGGG，因此可在QUEEN NA蛋白纯化后用TEV蛋白酶切除N端His标签。TEV蛋白酶酶切发生在七肽序列的Q和G之间，因此在酶切去除His标签的时候目的蛋白的N端会留下一个额外的氨基酸残基G。
- 通常可以采用如BeyoGold™ His-tag Purification Resin (P2210/P2218/P2220)或His标签蛋白纯化试剂盒(P2226)等纯化His标签的QUEEN NA，也可以使用His-tag抗体(AH367)检测和少量地分离纯化QUEEN NA。
- 本质粒为卡那霉素抗性。
- pET-N-His-TEV-QUEEN NA质粒的主要信息如下：

Feature	Nucleotide	Position
f1 origin		12-467
Kanamycin resistance ORF		563-1645
PBR 322 origin		2084
LacI coding sequence		3518-4597
T7 promoter		4988-5004
His tag coding sequence		5079-5096
TEV Protease recognition site sequence		5097-5117
QUEEN NA		5124-6269
T7 Terminator		6367-6413

- pET-N-His-TEV-QUEEN NA质粒(6420bp)的图谱如下：



- pET-N-His-TEV-QUEEN NA的详细图谱如下：

```

                    His tag          TEV
                    |                |
5061  GAAGGAGATA TACATATGCA CCATCATCAT CATCATGAGA ACCTGTACTT
      CTTCCTCTAT ATGTATACGT GGTAGTAGTA GTAGTACTCT TGGACATGAA
      |         |
      |         | BamHI  QUEEN NA
      |         |
5111  CCAAGGGGGA TCCATGAAAA CTGTGAAAGT GAATATAACA ACCCCTGATG
      GGTCCCCCCT AGGTACTTTT GACACTTTCA CTTATATTGT TGGGGACTAC

5161  GGCCAGTCTA CGACGCTGAT ATCGAGATGG TGTCCGTGCG GGCCGAGAGT
      CCGGTCAGAT GCTGCGACTA TAGCTCTACC ACAGGCACGC CCGGCTCTCA

5211  GGTGATCTCG GCATCCTCCC CGGTACATT CCCACAAAGG CCCCACTGAA
      CCACTAGAGC CGTAGGAGGG GCCAGTGTA GGGTGTTC GGGGTGACTT

5261  GATCGGAGCT GTGCGGCTGA AGAAGGACGG CCAAACCGAG ATGGTTCGCAG
      CTAGCCTCGA CACGCCGACT TCTTCCTGCC GGTTTGGCTC TACCAGCGTC

5311  TCTCAGGCGG CACTGTTGAA GTGCGGCCTG ACCACGTTAC CATTAATGCT
  
```

AGAGTCCGCC GTGACAACTT CACGCCGGAC TGGTGCAATG GTAATTACGA  
 5361 CAAGCCGCTG AAACAGCCGA AGGAATCGAC AAAGAGAGAG CAGAAGCCGC  
 GTTCGGCGAC TTTGTCTGGCT TCCTTAGCTG TTTCTCTCTC GTCTTCGGCG  
 5411 AAGACAGAGG GCCCAGGAGC GGCTGAACTC TCAAACCCGT TACAACAGCC  
 TTCTGTCTCC CGGGTCCTCG CCGACTGAG AGTTTGGGCA ATGTTGTCTGG  
 5461 ACAACGTCTA TATCATGGCC GACAAGCAGA AGAACGGCAT CAAGGTGAAC  
 TGTTCGAGAT ATAGTACCGG CTGTTCTGTCT TCTTGCCGTA GTTCCACTTG  
 5511 TTCAAGATCC GCCACAACAT CGAGGACGGC AGCGTGCAGC TCGCCGACCA  
 AAGTTCTAGG CGGTGTTGTA GCTCCTGCCG TCGCACGTCG AGCGGCTGGT  
 5561 CTACCAGCAG AACACCCCCA TCGGCGACGG CCCCGTGCTG CTGCCCGACA  
 GATGGTCGTC TTGTGGGGGT AGCCGCTGCC GGGGCACGAC GACGGGCTGT  
 5611 ACCACTACCT GAGCACCCAG TCCAAGCTGA GCAAAGACCC CAACGAGAAG  
 TGGTGATGGA CTCGTGGGTC AGGTTCGACT CGTTTCTGGG GTTGCTCTTC  
 5661 CGCGATCACA TGGTCTTGCT GGAGTTCGTG ACCGCCGCCG GGATCACTCT  
 GCGCTAGTGT ACCAGGACGA CCTCAAGCAC TGGCGGCGGC CCTAGTGAGA  
 5711 CGGCATGGAC GAGCTGTACA AGGGTGGCAC CGGAGGGAGC ATGGTGAGCA  
 GCCGTACCTG CTCGACATGT TCCCACCGTG GCCTCCCTCG TACCCTCGT  
 5761 AGGGCGAGGA GCTGTTACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC  
 TCCCGCTCCT CGACAAGTGG CCCACCACG GGTAGGACCA GCTCGACCTG  
 5811 GCGCAGCTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA  
 CCGCTGCATT TGCCGGTGTT CAAGTCGCAC AGGCCGCTCC CGTCCCCT  
 5861 TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC  
 ACGGTGGATG CCGTTCGACT GGGACTTCAA GTAGACGTGG TGGCCGTTCG  
 5911 TGCCCGTGCC CTGGCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG  
 ACGGGCACGG GACCGGGTGG GAGCACTGGT GGGACTGGAT GCCGCACGTC  
 5961 TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT TCTTCAAGTC  
 ACGAAGTCGG CGATGGGGCT GGTGTACTTC GTCGTGCTGA AGAAGTTCAG  
 6011 CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG  
 GCGGTACGGG CTTCCGATGC AGGTCTCTCG GTGGTAGAAG AAGTTCCTGC  
 6061 ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG  
 TGCCGTTGAT GTTCTGGGCG CGGCTCCACT TCAAGCTCCC GCTGTGGGAC  
 6111 GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT  
 CACTTGGCGT AGCTCGACTT CCCGTAGCTG AAGTTCCTCC TGCCGTTGTA  
 6161 CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACCTGGG TGACACCGAT ATTCGCCGGG  
 GGACCCCGTG TTCGACCTCA TGTGAGACC ACTGTGGCTA TAAGCGGCC  
 6211 CCGAGCTGGC ACTGCAGAAG GCCCTGAACA AGCTGGACGT GGCTGGGAAG  
 GGCTCGACCG TGACGTCTTC CGGGACTTGT TCGACCTGCA CCGACCCTTC

BglIII XhoI  
 6261 GCAAAGTGA GATCTCTCGA GTGAGATCCG  
 CGTTTGA CTT CTAGAGAGCT CACTCTAGGC

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN NA中没有的酶切位点(Restriction enzymes that do not cut pET-N-His-TEV-QUEEN NA)包括:

AatII	Acc65I	AflIII	AgeI	AhdI	AscI	AvrII
BaeI	BbvCI	BfuAI	BmtI	BsaI	BsiWI	BspMI
BstBI	Bsu36I	CspCI	DraI	EagI	Eco53kI	EcoRI
FseI	HindIII	KpnI	MfeI	MscI	NcoI	NheI
NotI	PacI	PmeI	PmlI	PspXI	RsrII	SacI
SacII	SalI	SbfI	ScaI	SexAI	SfiI	SnaBI
SpeI	SrfI	StuI	SwaI	ZraI		

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN NA中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pET-N-His-TEV-QUEEN NA)包括:

AlwNI	CAG, NNN`CTG	1729	NdeI	CA`TA, TG	5074
AsiSI	GCG, AT`CGC	943	NruI	TCG CGA	1286
BamHI	G`GATC, C	5118	PaeR7I	C`TCGA, G	6276
BclI	T`GATC, A	4228	PciI	A`CATG, T	2141
BglII	A`GATC, T	6270	PflFI	GACN`N, NGTC	2399
BmgBI	CAC GTC	6248	PpuMI	RG`GWC, CY	3136
BseRI	GAGGAG (N) <sub>8</sub> , NN`	5779	PshAI	GACNN NNGTC	3401
BspQI	GCTCTTCN`NNN,	2258	PsiI	TTA TAA	370
BsrGI	T`GTAC, A	5725	PstI	C, TGCA`G	6222
BssHII	G`CGCG, C	3831	PvuI	CG, AT`CG	943
BstAPI	GCAN, NNN`NTGC	4563	SapI	GCTCTTCN`NNN,	2258
BstEII	G`GTNAC, C	4060	SgrAI	CR`CCGG, YG	4923
BstZ17I	GTA TAC	2374	SmaI	CCC GGG	1069
DraIII	CAC, NNN`GTG	242	SphI	G, CATG`C	4771
EcoRV	GAT ATC	5180	TspMI	C`CCGG, G	1067
FspI	TGC GCA	3164	Tth111I	GACN`N, NGTC	2399
HincII	GTY CAC	3740	XbaI	T`CTAG, A	5034
HpaI	GTT AAC	3740	XhoI	C`TCGA, G	6276
MluI	A`CGCG, T	4242	XmaI	C`CCGG, G	1067

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN NA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
D2909-1μg	pET-N-His-TEV-QUEEN NA	1μg
D2909-100μg	pET-N-His-TEV-QUEEN NA	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。

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D2604-1μg	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	1μg
D2604-100μg	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	100μg

D2605-1μg	pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)	1μg
D2605-100μg	pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)	100μg
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
D2906-1μg	pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)	1μg
D2906-100μg	pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)	100μg
D2907-1μg	pET-N-His-TEV-QUEEN7μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)	1μg
D2907-100μg	pET-N-His-TEV-QUEEN7μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)	100μg

Version 2020.12.02