

pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi-IRES-BirA (生物素标记质粒)

产品编号	产品名称	包装
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

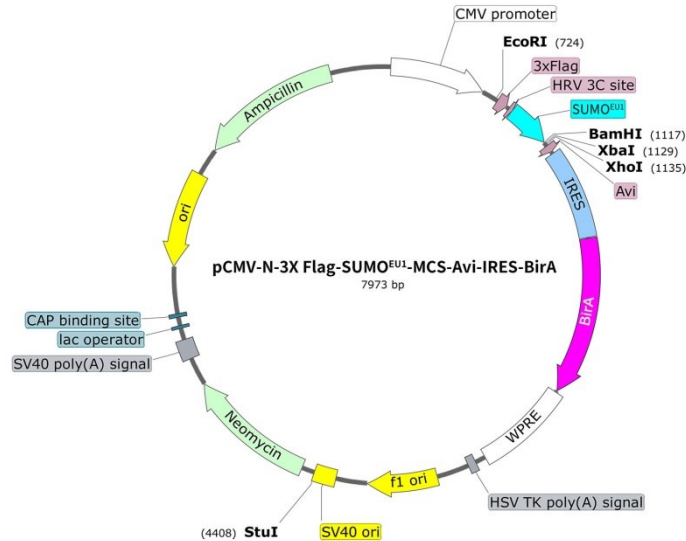
产品简介:

- pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi-IRES-BirA是碧云天自行研发的用于在哺乳动物细胞中表达生物素标记蛋白的质粒。该质粒由CMV启动子驱动带有3X Flag标签(3X Falg tag)、SUMO^{EU1}标签(SUMO^{EU1} tag)及Avi标签(Avi tag)的目的蛋白以及生物素连接酶(Biotin ligase) BirA通过IRES序列共表达。在ATP和生物素(Biotin)存在的条件下, 细胞内表达的生物素连接酶BirA催化生物素共价结合到目的蛋白C端的Avi标签上, 从而可以在表达目的蛋白的同时进行生物素标记。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)的亲和力高, 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于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/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-IRES-BirA质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV promoter	50-633
3xFlag tag	739-804
HRV 3C site	823-846
SUMO ^{EU1} tag	847-1119
Multiple cloning site	1117-1146
Avi tag	1147-1191
IRES	1206-1762
BirA	1769-2737
WPPE	2749-3337
HSV-thymidine Kinase (TK) poly(A) signal	3403-3451

f1 ori	3653-4081
SV40 ori	4725-4410
Neomycin	4491-5285
SV40 poly(A) signal	5461-5582
lac operator	5655-5671
CAP binding site	5724-5745
ori	6033-6621
Ampicillin	6792-7652

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi-IRES-BirA (7973bp)的图谱如下:



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

```

CMV promoter
551 TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG
AAGGTTTTAC AGCATTGTTG AGGCGGGGTA ACTGCGTTTA CCCGCCATCC

601 CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GTCGTTTTAG 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 GATGTTCTTG

751 CACGACGGCG ACTACAAGGA CCACGACATC GACTACAAGG ACGACGACGA
GTGCTGCCGC TGATGTTTCT GGTGCTGTAG CTGATGTTCC TGCTGCTGCT
HRV 3C site SUMOEU1 tag
801 CAAGGGCGGC AGCGGCGGCA GCCTGGAGGT GCTGTTCAG GGCCCCGAAG
GTTCCCGCCG TCGCCCGCGT CGGACCTCCA CGACAAGTC CCGGGGCTTC

851 AGGACAAAAA GCCAGCTGGT GGTGAAGGTG GTGGTGCTCA TATTAAGTGG
TCCTGTTTTT CGGTCGACCA CCACTTCCAC CACCAGAGT ATAATTGAAC

901 AAGGTCAAGG GTC AAGACGG TAACGAGGTG TTCTTCAGAA TCAAGAGATC
TTCCAGTTCC CAGTTCTGCC ATGCTCCAC AAGAAGTCTT AGTTCTCTAG

951 CACTCAGCTG AAGAACTGA TGAACGCCTA CTCCGACAGA CAGTCCGTTG
GTGAGTCGAC TTCTTTGACT ACTTGC GGAT GAGGCTGTCT GTCAGGCAAC

1001 ACATGAAGGC TATCGCTTTC TTGTTCAAGG GTAGAAGATT GAGAGCCGAG
TGTACTTCCG ATAGCGAAAG AACAAGTCC CATCTTCTAA CTCTCGGCTC

1051 AGAACTCCAG ACGAGTTGGA AATGGAAGAT GGTGACGAGA TCGACGCCAT
TCTTGAGGTC TGCTCAACCT TTACCTTCTA CCACTGCTCT AGCTGCGGTA
BamHI XbaI XhoI AAV tag
1101 GTTGCATCAA ACTGGTGGAT CCACTAGTTC TAGACTCGAG GGTTCTGGCC
CAACGTAGTT TGACCACCTA GGTGATCAAG ATCTGAGCTC CCAAGACCGG

```

1151 TGAACGATAT TTTTGAAGCG CAGAAAATTG AATGGCATGA AGGCGGCGCG
 ACTTGCTATA AAAACTTCGC GTCTTTTAAAC TTACCGTACT TCCGCCGCGC
 IRES
 1201 GCCGCCCCCC CCCCTAACGT TACTGGCCGA AGCCGCTTGG AATAAGGCCG
 CGGCGGGGGG GGGGATTGCA ATGACCGGCT TCGGCGAACC TTATTCCGGC
 1251 GTGTGCGTTT GTCTATATGT TATTTTCCAC CATATTGCCG TCTTTTGGCA
 CACACGCAA CAGATATAACA ATAAAAGGTG GTATAACGGC AGAAAACCGT
 1301 ATGTGAGGGC CCGGAAACCT GGCCCTGTCT TCTTGACGAG CATTCCCTAGG
 TACTACTCCCG GGCCTTTGGA CCGGGACAGA AGAACTGCTC GTAAGGATCC

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

AbsI	AfeI	AflII	AgeI	AleI	Aor51HI	AscI
AsiGI	AsiSI	AsuII	AsuNHI	BaeI	BarI	BfrI
BlpI	BmtI	BoxI	Bpu14I	Bpu1102I	BsgI	BshTI
BsiWI	Bsp119I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspOI	BspTI	BspT104I
BsrGI	Bst98I	BstAFI	BstAUI	BstBI	BstEII	BstHPI
BstPI	BstPAI	CellI	Csp45I	CspAI	Eco47III	Eco91I
EcoO65I	FseI	FspAI	HpaI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI
KflI	KspAI	MauBI	MreI	MspCI	MssI	NheI
NspV	OliI	PacI	PalAI	Pfl123II	PI-PspI	PI-SceI
PinAI	PmeI	PpuMI	PshAI	Psp5II	PspEI	PspLI
PspPPI	PsrI	RgaI	RigI	SanDI	SfaAI	SfiI
SfuI	SgfI	SgrAI	SgsI	SmiI	SrfI	SspBI
SwaI	TstI	Vha464I				

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

Acc65I	G`GTAC,C	1635	NotI	GC`GGCC,GC	1199
BamHI	G`GATC,C	1117	PaeR7I	C`TCGA,G	1135
BbvCI	CC`TCA,GC	2252	PflFI	GACN`N,NGTC	4737
BmgBI	CAC GTC	1737	PmlI	CAC GTG	1510
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	654	PspXI	VC`TCGA,GB	1135
BspDI	AT`CG,AT	2646	PvuI	CG,AT`CG	7235
BspEI	T`CCGG,A	716	RsrII	CG`GWC,CG	5135
BssHII	G`CGCG,C	5016	SacI	G,AGCT`C	633
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	2000	SacII	CC,GC`GG	3252
BstZ17I	GTA TAC	5593	SbfI	CC,TGCA`GG	2451
Bsu36I	CC`TNA,GG	2717	ScaI	AGT ACT	7345
ClaI	AT`CG,AT	2646	SexAI	A`CCWGG,T	4176
Eco53kI	GAG CTC	631	SgrDI	CG`TCGA,CG	7786
EcoNI	CCTNN`N,NNAGG	2450	SmaI	CCC GGG	4432
EcoRI	G`AATT,C	724	SnaBI	TAC GTA	405
EcoRV	GAT ATC	2740	SspI	AAT ATT	7669
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	654	StuI	AGG CCT	4408
HindIII	A`AGCT,T	1418	TspMI	C`CCGG,G	4430
KpnI	G`GCGC,C	1639	Tth111I	GACN`N,NGTC	4737
MfeI	C`AATT,G	7949	XbaI	T`CTAG,A	1129
MluI	A`CGCG,T	43	XhoI	C`TCGA,G	1135
NdeI	CA`TA,TG	299	XmaI	C`CCGG,G	4430

➤ pCMV-N-3X Flag-SUMO^{EU1}-MCS-Avi-IRES-BirA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-IRES-BirA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
D2981-1μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi-IRES-BirA	1μg
D2981-100μg	pCMV-N-3X Flag-SUMO ^{EU1} -MCS-Avi-IRES-BirA	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 2022.02.18