

## pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)

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

### 产品简介:

- pCMV-AT1.03 (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细胞中表达AT1.03蛋白以作为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 (K<sub>d</sub>=3.3mM at 37°C)，可以检测毫摩尔级的ATP水平。pCMV-AT1.03质粒在转染哺乳动物细胞后，AT1.03蛋白主要分布在细胞质中，适用于实时监控细胞质内的ATP浓度变化。
- 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。该荧光探针由N端的青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein) mseCFPΔC11 (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)。

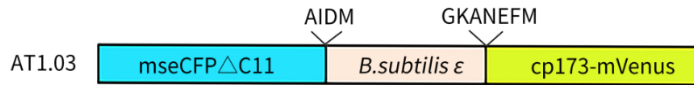


图1. AT1.03蛋白结构图。

- pCMV-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。

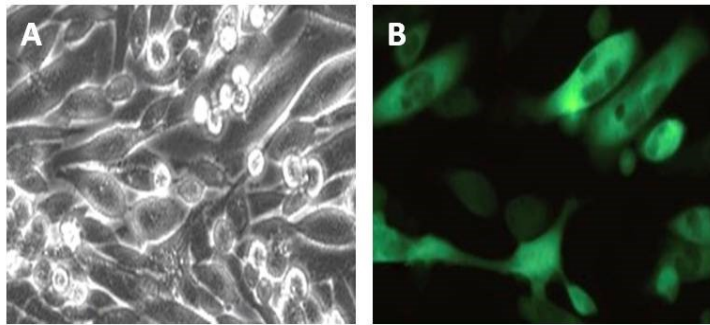


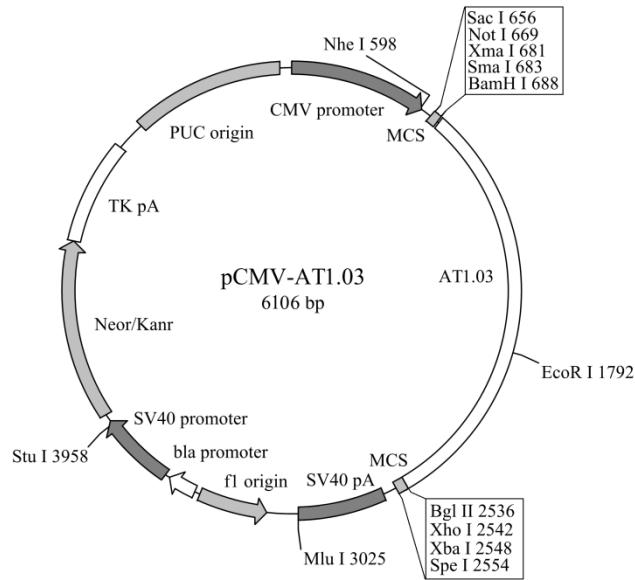
图2. pCMV-AT1.03质粒转染Hela细胞后的ATP荧光探针表达效果图。A图为明场照片，B图为荧光照片。

- 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 $K_{on}$ 为 $1.7 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，ATP的解离常数 $K_{off}$ 为 $9.8 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ ，因此AT1.03可用于监控细胞内高达 $0.1 \text{ s}^{-1}$  ATP的动态变化，特别适用于实时监控超短时间内的ATP浓度变化。
- 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-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
AT1.03	699-2534
multiple cloning site	651-692/2535-2558

T7 promoter and T7 primer binding site	2581-2629
SV40 polyA signal	2641-3024
f1 origin of ss-DNA replication	3162-3466
bla promoter	3491-3615
SV40 promoter	3635-3973
neomycin/kanamycin resistance ORF	4008-4799
HSV-thymidine kinase (TK) polyA signal	4800-5258
pUC origin	5387-6054

➤ pCMV-AT1.03质粒(6106bp)的图谱如下:



➤ pCMV-AT1.03的详细图谱如下:

	Sac I	Not I	Xma I	BamHI	AT1.03
651	GAGCTCCACC	GCGGTGGCGG	CCGCTCTAGC	CCGGGCGGAT	CCGCCACCAT
	CTCGAGGTGG	CGCCACCGCC	GGCGAGATCG	GGCCCCGCTA	GGCGGTGGTA
701	GGTGAGCAAG	GGCGAGGAGC	TGTTACCGG	GGTGGTGCCC	ATCCTGGTGC
	CCACTCGTTC	CCGCTCCTCG	ACAAGTGGCC	CCACCACGGG	TAGGACCAGC
751	AGCTGGACGG	CGACGTAAAC	GGCCACAGGT	TCAGCGTGTC	CGGCGAGGGC
	TCGACCTGCC	GCTGCATTTG	CCGGTGTCCA	AGTCGCACAG	GCCGCTCCCG
801	GAGGGCGATG	CCACCTACGG	CAAGCTGACC	CTGAAGTTCA	TCTGCACCAC
	CTCCCCTAC	GGTGGATGCC	GTTCGACTGG	GACTTCAAGT	AGACGTGGTG
851	CGGCAAGCTG	CCCCTGCCCT	GGCCCACCCT	CGTGACCACC	CTGACCTGGG
	GCCGTTCGAC	GGGCACGGGA	CCGGGTGGGA	GCACTGGTGG	GACTGGACCC
901	GCGTGCAGTG	CTTCGCCC GC	TACCCCGACC	ACATGAAGCA	GCACGACTTC
	CGCACGTCAC	GAAGCGGGCG	ATGGGGCTGG	TGTACTTCGT	CGTGCTGAAG
951	TTCAAGTCCG	CCATGCCCGA	AGGCTACGTC	CAGGAGCGTA	CCATCTTCTT
	AAGTTCAGGC	GGTACGGGCT	TCCGATGCAG	GTCCTCGCAT	GGTAGAAGAA
1001	CAAGGACGAC	GGCAACTACA	AGACCCGCGC	CGAGGTGAAG	TTCGAGGGCG
	GTTCCCTGCTG	CCGTTGATGT	TCTGGGCGCG	GCTCCACTTC	AAGCTCCCGC
1051	ACACCCTGGT	GAACCGCATC	GAGCTGAAGG	GCATCGACTT	CAAGGAGGAC

TGTGGGACCA CTTGGCGTAG CTCGACTTCC CGTAGCTGAA GTTCCTCCTG

1101 GGCAACATCC TGGGGCACAA GCTGGAGTAC AACTACATCA GCCACAACGT  
CCGTTGTAGG ACCCCGTGTT CGACCTCATG TTGATGTAGT CGGTGTGCA

1151 CTATATCACC GCCGACAAGC AGAAGAACGG CATCAAGGCC CACTTCAAGA  
GATATAGTGG CGGCTGTTCG TCTTCTTGCC GTAGTTCCGG GTGAAGTTCT

1201 TCCGCCACAA CATCGAGGAC GGC GGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG  
AGGCGGTGTT GTAGCTCCTG CCGCCGCACG TCGAGCGGCT GGTGATGGT

1251 CAGAACACCC CCATCGGCGA CGGCCCGTG CTGCTGCCCC ACAACCACTA  
GTCTTGTGGG GGTAGCCGCT GCCGGGCAC GACGACGGGC TGTGGTGAT

1301 CCTGAGCACC CAGTCCGCC TGAGCAAAGA CCCAACGAG AAGCGGATC  
GGACTCGTGG GTCAGGCGGG ACTCGTTTCT GGGGTTGCTC TTCGCGCTAG

1351 ACATGGTCC TGTGGAGTTC GTGACCGCCG CCATCGATAT GAAAACGTG  
TGTACCAGGA CGACCTCAAG CACTGGCGGC GGTAGCTATA CTTTTGACAC

1401 AAAGTGAATA TAACAACCCC TGATGGGCCA GTCTACGACG CTGATATCGA  
TTTCACTTAT ATTGTTGGGG ACTACCCGGT CAGATGCTGC GACTATAGCT

1451 GATGGTGTCC GTGCGGGCCG AGAGTGGTGA TCTCGGCATC CTCCCCGGTC  
CTACCACAGG CACGCCCCGGC TCTCACCCT AGAGCCGTAG GAGGGGCCAG

1501 ACATTCCCAC AAAGGCCCCA CTGAAGATCG GAGCTGTGCG GCTGAAGAAG  
TGTAAGGGTG TTTCCGGGGT GACTTCTAGC CTCGACACGC CGACTTCTTC

1551 GACGGCCAAA CCGAGATGGT CGCAGTCTCA GGC GGCACTG TTGAAGTGCG  
CTGCCGTTT GGCTCTACCA GCGTCAGAGT CCGCCGTGAC AACTTCACGC

1601 GCCTGACCAC GTTACCATTA ATGCTCAAGC CGCTGAAACA GCCGAAGGAA  
CGGACTGGTG CAATGGTAAT TACGAGTTCG GCGACTTTGT CGGCTTCCTT

1651 TCGACAAAGA GAGAGCAGAA GCCGCAAGAC AGAGGGCCCA GGAGCGGCTG  
AGCTGTTTCT CTCTCGTCTT CGGCGTTCTG TCTCCCGGGT CCTCGCCGAC

1701 AACTTCAAT CCGATGACAC CGATATTCGC CGGGCCGAGC TGGCACTGCA  
TTGAGAGTTA GGCTACTGTG GCTATAAGCG GCCCGGCTCG ACCGTGACGT

1751 GAGGGCCCTG AACAGACTGG ACGTGGCTGG GAAGGCAAAC GAATTCATGG  
CTCCCGGGAC TTGTCTGACC TGCACCGACC CTTCCGTTT CTTAAGTACC

1801 ACGGCGCGCT GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC CCCATCGGC  
TGCCGCCGCA CGTCGAGCGG CTGGTGATGG TCGTCTTGTG GGGGTAGCCG

1851 GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCT ACCAGTCCGC  
CTGCCGGGGC ACGACGACGG GCTGTTGGTG ATGGACTCGA TGGTCAGGCG

1901 CCTGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT  
GGACTCGTTT CTGGGGTTGC TCTTCGCGCT AGTGTACCAG GACGACCTCA

1951 TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAGGGT  
AGCACTGGCG GCGGCCCTAG TGAGAGCCGT ACCTGCTCGA CATGTTCCCA

2001 GGCAGCGGTG GCATGGTGAG CAAGGGCGAG GAGCTGTTCA CCGGGGTGGT  
 CCGTCGCCAC CGTACCACTC GTTCCCCTC CTCGACAAGT GGCCCCACCA

2051 GCCCATCCTG GTCGAGCTGG ACGGCGACGT AAACGGCCAC AAGTTCAGCG  
 CGGGTAGGAC CAGCTCGACC TGCCGCTGCA TTTGCCGGTG TTCAAGTCGC

2101 TGTCGGCGA GGGCGAGGGC GATGCCACCT ACGGCAAGCT GACCCTGAAG  
 ACAGGCCGCT CCCGCTCCCG CTACGGTGA TGCCGTTCTGA CTGGGACTTC

2151 CTGATCTGCA CCACCGCAA GCTGCCCGTG CCCTGGCCCA CCTCGTGAC  
 GACTAGACGT GGTGGCCGTT CGACGGCAC GGGACCGGT GGGAGCACTG

2201 CACCTGGGC TACGGCCTGC AGTGCTTCGC CCGTACCCC GACCACATGA  
 GTGGGACCCG ATGCCGGACG TCACGAAGCG GGCGATGGGG CTGGTGTACT

2251 AGCAGCACGA CTTCTTCAAG TCCGCCATGC CCGAAGGCTA CGTCCAGGAG  
 TCGTCGTGCT GAAGAAGTTC AGGCGGTACG GGCTTCCGAT GCAGGTCCCTC

2301 CGCACCATCT TCTTCAAGGA CGACGGCAAC TACAAGACCC GCGCCGAGGT  
 GCGTGGTAGA AGAAGTTCCT GCTGCCGTTG ATGTTCTGGG CGCGGCTCCA

2351 GAAGTTCGAG GGCGACACCC TGGTGAACCG CATCGAGCTG AAGGGCATCG  
 CTTCAAGCTC CCGCTGTGGG ACCACTTGGC GTAGCTCGAC TTCCCGTAGC

2401 ACTTCAAGGA GGACGGCAAC ATCCTGGGGC ACAAGCTGGA GTACAACTAC  
 TGAAGTTCCT CCTGCCGTTG TAGGACCCCG TGTTTCGACCT CATGTTGATG

2451 AACAGCCACA ACGTCTATAT CACCGCCGAC AAGCAGAAGA ACGGCATCAA  
 TTGTCCGGTGT TGCAGATATA GTGGCGGCTG TTCGTCTTCT TGCCGTAGTT

2501 GGCCAACTTC AAGATCCGCC ACAACATCGA GTAAAGATCT CTCGAGTCTA  
 CCGGTTGAAG TTCTAGGCGG TGTGTAGCT CATTCTAGA GAGCTCAGAT  
 SpeI

2551 GAACTAGTGG GCCCGGTACC  
 CTTGATCACC CGGGCCATGG

BglII XhoI XbaI

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

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

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

AccI	GT`MK, AC	1432	NarI	GG`CG, CC	4136
ApaLI	G`TGCA, C	5740	NdeI	CA`TA, TG	240
BamHI	G`GATC, C	687	NheI	G`CTAG, C	597
BclI	T`GATC, A	2795	NotI	GC`GGCC, GC	672
BglII	A`GATC, T	2535	PaeR7I	C`TCGA, G	2541
BmgBI	CAC GTC	1772	PciI	A`CATG, T	6054
BmtI	G, CTAG`C	597	PflFI	GACN`N, NGTC	4254
BsaI	GGTCTCN`NNNN,	5125	PluTI	G, GCGC`C	4135
BsaXI	, NNN` (N) <sub>9</sub> AC (N) <sub>5</sub> CTCC (N) <sub>7</sub> , NNN`	3185	PvuI	CG, AT`CG	2639
BsrDI	GCAATG, NN`	4367	RsrII	CG`GWC, CG	4652

BsrGI	T`GTAC, A	1990	SacI	G, AGCT`C	651
BstBI	TT`CG, AA	4818	SacII	CC, GC`GG	660
BstXI	CCAN, NNNN`NTGG	663	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	3908
CspCI	, NN` (N) <sub>11</sub> CAA (N) <sub>5</sub> GTGG (N) <sub>10</sub> , NN`	380	SfoI	GGC GCC	4137
DraIII	CAC, NNN`GTG	3251	SmaI	CCC GGG	682
Eco53kI	GAG CTC	653	SnaBI	TAC GTA	346
EcoRI	G`AATT, C	1791	SpeI	A`CTAG, T	2553
EcoRV	GAT ATC	1445	SrfI	GCCC GGGC	682
HincII	GTY RAC	2901	StuI	AGG CCT	3957
HpaI	GTT AAC	2901	TspMI	C`CCGG, G	680
KasI	G`GCGC, C	4135	Tth111I	GACN`N, NGTC	4254
MfeI	C`AATT, G	2888	XbaI	T`CTAG, A	2547
MluI	A`CGCG, T	3024	XhoI	C`TCGA, G	2541
MscI	TGG CCA	4218	XmaI	C`CCGG, G	680

- 如需对pCMV-AT1.03质粒中插入片段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' AATTAACCCCTCACTAAAGGG 3'  
T7 primer (2581-2629): 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
- pCMV-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
D2604-1μg	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	1μg
D2604-100μg	pCMV-AT1.03 (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:

- 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。
- 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。

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
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
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

Version 2020.12.08