

## pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)

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

### 产品简介:

- pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核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核中表达带有核定位信号(Nuclear localization signal, NLS)的AT1.03蛋白以作为细胞核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-NLS-AT1.03质粒在转染哺乳动物细胞后, AT1.03蛋白由于带有核定位信号主要分布在细胞核中, 适合用于实时监控细胞核内的ATP浓度变化。
- pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)也可以用作细胞核荧光探针, 在活细胞中或细胞固定后标记细胞核的位置和形态。
- 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。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)。带有核定位信号的AT1.03蛋白和不带有核定位信号的AT1.03蛋白相比, 完全保留了AT1.03蛋白的以FRET为基础的ATP荧光探针的功能。



图1. NLS-AT1.03蛋白结构图, N端融合了核定位靶向信号(SV40大T抗原三联体)。SV x3为细胞核定位信号。

- pCMV-NLS-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。

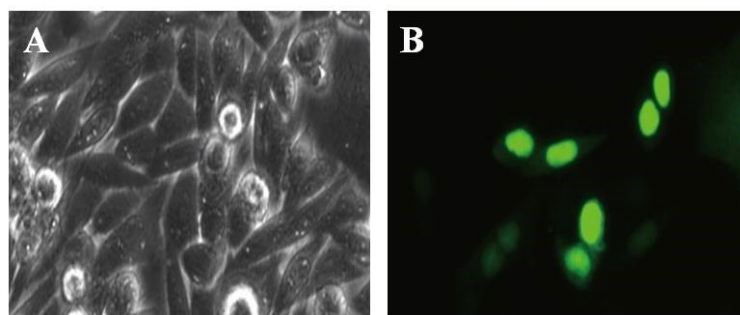


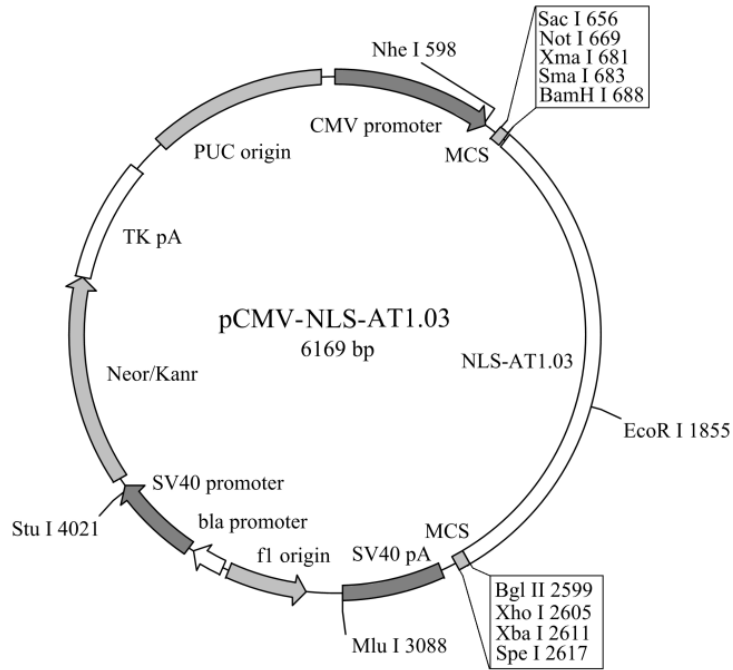
图2. pCMV-NLS-AT1.03质粒转染Hela细胞后的ATP荧光探针表达效果图。A图为明场照片, B图为荧光照片。

- 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<sub>on</sub>为1.7X10<sup>-2</sup>mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, ATP的解离常数K<sub>off</sub>为9.8X10<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 因此AT1.03可用于监控细胞内高达0.1s<sup>-1</sup> ATP的动态变化, 特别适合用于实时监控超短时间内的ATP浓度变化。带有核定位信号的AT1.03蛋白和不带有核定位信号的AT1.03蛋白相比, pH稳定性、结合常数、解离常数等性能基本一致。
- 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-NLS-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
NLS-AT1.03	699–2597
multiple cloning site	651–692/2598–2621
T7 promoter and T7 primer binding site	2644–2692
SV40 polyA signal	2704–3087
f1 origin of ss-DNA replication	3225–3529
bla promoter	3554–3678
SV40 promoter	3698–4036
neomycin/kanamycin resistance ORF	4071–4862
HSV-thymidine kinase (TK) polyA signal	4863–5321
pUC origin	5450–6117

➤ pCMV-NLS-AT1.03质粒(6169bp)的图谱如下:



➤ pCMV-NLS-AT1.03的详细图谱如下:

	SacI	NotI	XmaI	BamHI	NLS-AT1.03
651	GAGCTCCACC	GCGGTGGCGG	CCGCTCTAGC	CCGGGCGGAT	CCGCCACCAT
	CTCGAGGTGG	CGCCACCGCC	GGCGAGATCG	GGCCCGCCTA	GGCGGTGGTA
	NLS sequence				
	P K K K R K V P K K K R K V P K				
701	GCCGAAAAA	AAACGCAAAG	TGCCGAAAAA	AAAACGCAA	GTGCCGAAAA
	CGGCTTTTTT	TTTGC GTTTC	ACGGCTTTTT	TTTTGC GTTT	CACGGCTTTT
	K K R K V				
751	AAAAACGCAA	AGTGGTGAGC	AAGGGCGAGG	AGCTGTTCAC	CGGGGTGGTG
	TTTTTGC GTT	TCACCACTCG	TTCCCGCTCC	TCGACAAGTG	GCCCCACCAC
801	CCCATCCTGG	TCGAGCTGGA	CGGCGACGTA	AACGGCCACA	GGTTCAGCGT
	GGGTAGGACC	AGCTCGACCT	GCCGCTGCAT	TTGCCGGTGT	CCAAGTCGCA
851	GTCCGGCGAG	GGCGAGGGCG	ATGCCACCTA	CGGCAAGCTG	ACCCTGAAGT
	CAGGCCGCTC	CCGCTCCCGC	TACGGTGGAT	GCCGTTTCGAC	TGGGACTTCA
901	TCATCTGCAC	CACCGGCAAG	CTGCCCGTGC	CCTGGCCAC	CCTCGTGACC
	AGTAGACGTG	GTGGCCGTTC	GACGGGCACG	GGACCGGGTG	GGAGCACTGG
951	ACCCTGACCT	GGGGCGTGCA	GTGCTTCGCC	CGCTACCCCG	ACCACATGAA

TGGGACTGGA CCCCACACGT CACGAAGCGG GCGATGGGGC TGGTGTACTT  
 1001 GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC CGAAGGCTAC GTCCAGGAGC  
 CGTCGTGCTG AAGAAGTTCA GCGGGTACGG GCTTCCGATG CAGGTCTCTG  
 1051 GTACCATCTT CTTCAAGGAC GACGGCAACT ACAAGACCCG CGCCGAGGTG  
 CATGGTAGAA GAAGTTCCTG CTGCCGTTGA TGTTCCTGGC GCGGCTCCAC  
 1101 AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCGC ATCGAGCTGA AGGGCATCGA  
 TTCAAGCTCC CGCTGTGGGA CCACTTGGCG TAGCTCGACT TCCCGTAGCT  
 1151 CTTCAAGGAG GACGGCAACA TCCTGGGGCA CAAGCTGGAG TACAACCTACA  
 GAAGTTCCTC CTGCCGTTGT AGGACCCCGT GTTCGACCTC ATGTTGATGT  
 1201 TCAGCCACAA CGTCTATATC ACCGCCGACA AGCAGAAGAA CGGCATCAAG  
 AGTCGGTGTG GCAGATATAG TGGCGGCTGT TCGTCTTCTT GCCGTAGTTC  
 1251 GCCCACTTCA AGATCCGCCA CAACATCGAG GACGGCGGCG TGCAGCTCGC  
 CGGGTGAAGT TCTAGGCGGT GTTGTAGCTC CTGCCGCCGC ACGTCGAGCG  
 1301 CGACCACTAC CAGCAGAACA CCCCATCGG CGACGGCCCC GTGCTGCTGC  
 GCTGGTGATG GTCGTCTTGT GGGGGTAGCC GCTGCCGGGG CACGACGACG  
 1351 CCGACAACCA CTACCTGAGC ACCCAGTCCG CCCTGAGCAA AGACCCCAAC  
 GGCTGTTGGT GATGGACTCG TGGGTCAGGC GGGACTCGTT TCTGGGGTTG  
 1401 GAGAAGCGCG ATCACATGGT CCTGCTGGAG TTCGTGACCG CCGCCATCGA  
 CTCTTCGCGC TAGTGTACCA GGACGACCTC AAGCACTGGC GGCGGTAGCT  
 1451 TATGAAAAC TGTAAAGTGA ATATAACAAC CCCTGATGGG CCAGTCTACG  
 ATACTTTTGA CACTTTCACT TATATTGTTG GGGACTACCC GGTCAGATGC  
 1501 ACGCTGATAT CGAGATGGTG TCCGTGCGGG CCGAGAGTGG TGATCTCGGC  
 TGCGACTATA GCTCTACCAC AGGCACGCC GGCTCTCACC ACTAGAGCCG  
 1551 ATCCTCCCCG GTCACATTCC CACAAAGGCC CCACTGAAGA TCGGAGCTGT  
 TAGGAGGGGC CAGTGTAAGG GTGTTTCCGG GGTGACTTCT AGCCTCGACA  
 1601 GCGGCTGAAG AAGGACGGCC AAACCGAGAT GGTCGCAGTC TCAGGCGGCA  
 CGCCGACTTC TTCCTGCCGG TTTGGCTCTA CCAGCGTCAG AGTCCGCCGT  
 1651 CTGTTGAAGT GCGGCCTGAC CACGTTACCA TTAATGCTCA AGCCGCTGAA  
 GACAACCTCA CGCCGACTG GTGCAATGGT AATTACGAGT TCGGCGACTT  
 1701 ACAGCCGAAG GAATCGACAA AGAGAGAGCA GAAGCCGCAA GACAGAGGGC  
 TGTCGGCTTC CTTAGCTGTT TCTCTCTCGT CTTCGGCGTT CTGTCTCCCG  
 1751 CCAGGAGCGG CTGAACTCTC AATCCGATGA CACCGATATT CGCCGGGCCG  
 GGTCTCTGCC GACTTGAGAG TTAGGCTACT GTGGCTATAA GCGGCCCGGC  
 1801 AGCTGGCACT GCAGAGGGCC CTGAACAGAC TGGACGTGGC TGGGAAGGCA  
 TCGACCGTGA CGTCTCCCGG GACTTGTCTG ACCTGCACCG ACCCTTCCGT  
 1851 AACGAATTCA TGGACGGCGG CGTGCAGCTC GCCGACCACT ACCAGCAGAA  
 TTGCTTAAGT ACCTGCCGCC GCACGTCGAG CGGCTGGTGA TGGTCGTCTT

1901 CACCCCCATC GGCGACGGCC CCGTGCTGCT GCCCGACAAC CACTACCTGA  
GTGGGGGTAG CCGCTGCCGG GGCACGACGA CGGGCTGTTG GTGATGGACT

1951 GCTACCAGTC CGCCCTGAGC AAAGACCCCA ACGAGAAGCG CGATCACATG  
CGATGGTCAG GCGGGACTCG TTTCTGGGGT TGCTCTTCGC GCTAGTGTAC

2001 GTCCTGCTGG AGTTCGTGAC CGCCGCCGGG ATCACTCTCG GCATGGACGA  
CAGGACGACC TCAAGCACTG GCGGCGGCC TAGTGAGAGC CGTACCTGCT

2051 GCTGTACAAG GGTGGCAGCG GTGGCATGGT GAGCAAGGGC GAGGAGCTGT  
CGACATGTTT CCACCGTCGC CACCGTACCA CTCGTTCCCG CTCTCGACA

2101 TCACCGGGGT GGTGCCCATC CTGGTTCGAGC TGGACGGCGA CGTAAACGGC  
AGTGGCCCCA CCACGGGTAG GACCAGCTCG ACCTGCCGCT GCATTTGCCG

2151 CACAAGTTCA GCGTGTCCGG CGAGGGCGAG GGCGATGCCA CCTACGGCAA  
GTGTTCAAGT CGCACAGGCC GCTCCCCTC CCGTACGGT GGATGCCGTT

2201 GCTGACCCTG AAGCTGATCT GCACCACCGG CAAGCTGCC GTGCCCTGGC  
CGACTGGGAC TTCGACTAGA CGTGGTGGCC GTTCGACGGG CACGGGACCG

2251 CCACCCTCGT GACCACCCTG GGCTACGGCC TGCAGTGCTT CGCCCGCTAC  
GGTGGGAGCA CTGGTGGGAC CCGATGCCGG ACGTCACGAA GCGGGCGATG

2301 CCCGACCACA TGAAGCAGCA CGACTTCTTC AAGTCCGCCA TGCCCGAAGG  
GGGCTGGTGT ACTTCGTCGT GCTGAAGAAG TTCAGGCGGT ACGGGCTTCC

2351 CTACGTCCAG GAGCGCACCA TCTTCTTCAA GGACGACGGC AACTACAAGA  
GATGCAGGTC CTCGCGTGGT AGAAGAAGTT CCTGCTGCCG TTGATGTTCT

2401 CCCGCGCCGA GGTGAAGTTC GAGGGCGACA CCCTGGTGAA CCGCATCGAG  
GGGCGCGGCT CCACTTCAAG CTCCCCTGT GGGACCACTT GCGTAGCTC

2451 CTGAAGGGCA TCGACTTCAA GGAGGACGGC AACATCCTGG GGCACAAGCT  
GACTTCCCGT AGCTGAAGTT CCTCCTGCCG TTGTAGGACC CCGTGTTCGA

2501 GGAGTACAAC TACAACAGCC ACAACGTCTA TATCACCGCC GACAAGCAGA  
CCTCATGTTG ATGTTGTCGG TGTTGCAGAT ATAGTGGCGG CTGTTCGTCT

BglII

2551 AGAACGGCAT CAAGCCAAC TTCAAGATCC GCCACAACAT CGAGTAAAGA  
TCTTGCCGTA GTTCCGGTTG AAGTTCTAGG CGGTGTGTA GCTCATTCT

XhoI XbaI SpeI

2601 TCTCTCGAGT CTAGAACTAG TGGGCCCGGT ACCTTAATTA  
AGAGAGCTCA GATCTTGATC ACCCGGGCCA TGGAATTAAT

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

AclI	AfeI	AflII	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-NLS-AT1.03中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pCMV-NLS-AT1.03)包括:

AccI	GT`MK, AC	1495	NarI	GG`CG, CC	4199
------	-----------	------	------	-----------	------

ApaI	G`TGCA,C	5803	NdeI	CA`TA,TG	240
BamHI	G`GATC,C	687	NheI	G`CTAG,C	597
BclI	T`GATC,A	2858	NotI	GC`GGCC,GC	668
BglII	A`GATC,T	2598	PaeR7I	C`TCGA,G	2604
BmgBI	CAC GTC	1835	PciI	A`CATG,T	6117
BmtI	G,CTAG`C	597	PflFI	GACN`N,NGTC	4317
BsaI	GGTCTCN`NNNN,	5188	PluTI	G,GCGC`C	4198
BsaXI	,NNN`(N) <sub>9</sub> AC(N) <sub>5</sub> CTCC(N) <sub>7</sub> ,NNN`	3248	PvuI	CG,AT`CG	2702
BsrDI	GCAATG,NN`	4430	RsrII	CG`GWC,CG	4715
BsrGI	T`GTAC,A	2053	SacI	G,AGCT`C	651
BstBI	TT`CG,AA	4881	SacII	CC,GC`GG	660
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	659	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	3971
CspCI	,NN`(N) <sub>11</sub> CAA(N) <sub>5</sub> GTGG(N) <sub>10</sub> ,NN`	380	SfoI	GGC GCC	4200
DraIII	CAC,NNN`GTG	3314	SmaI	CCC GGG	682
Eco53kI	GAG CTC	653	SnaBI	TAC GTA	346
EcoRI	G`AATT,C	1854	SpeI	A`CTAG,T	2616
EcoRV	GAT ATC	1508	SrfI	GCCC GGGC	682
HincII	GTY RAC	2964	StuI	AGG CCT	4020
HpaI	GTT AAC	2964	TspMI	C`CCGG,G	680
KasI	G`GCGC,C	4198	Tth111I	GACN`N,NGTC	4317
MfeI	C`AATT,G	2951	XbaI	T`CTAG,A	2610
MluI	A`CGCG,T	3087	XhoI	C`TCGA,G	2604
MscI	TGG CCA	4218	XmaI	C`CCGG,G	680

➤ 如需对pCMV-NLS-AT1.03质粒中插入片段NLS-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' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'

T7 primer (2644-2692): 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

➤ pCMV-NLS-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
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
—	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。

#### 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
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