

## pCMV-Cre-EGFP

产品编号	产品名称	包装
D2608-1μg	pCMV-Cre-EGFP	1μg
D2608-100μg	pCMV-Cre-EGFP	100μg

### 产品简介:

- pCMV-Cre-EGFP是碧云天自行研发的含有CMV启动子的用于在哺乳动物细胞中表达带有EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, 增强绿色荧光蛋白)标签的Cre Recombinase (Cre重组酶)的表达质粒。来自条件性基因敲除(Conditional gene knockout)小鼠等含有预先插入 $loxP$ 位点的细胞在转染本质粒后, 本质粒表达的Cre Recombinase可以导致两个 $loxP$ 位点间的基因删除, 从而实现条件性基因敲除。
- Cre重组酶是来源于大肠杆菌噬菌体P1的一种类型I的拓扑异构酶(Type I topoisomerase), 也是一种酪氨酸重组酶(tyrosine recombinase), 它可识别34bp的 $loxP$ 位点(两端为两个13bp的反向重复序列(inverted repeats), 中间是8bp的间隔区(图1)并催化 $loxP$ 位点之间的DNA发生重组; 重组产物根据 $loxP$ 位点的位置和相对方向的不同而不同, 两个含单 $loxP$ 位点的DNA将发生融合: 两个正向重复的 $loxP$ 位点间的DNA将以环状形式被切割, 而两个反向 $loxP$ 位点间的DNA序列将被翻转(图2)。



图1.  $loxP$ 位点序列图。Cre重组酶与两端13bp反向重复序列(小写字母)结合, 中间是8bp不对称中心间隔区(大写字母), 箭头所示为Cre重组酶的酶切位点。

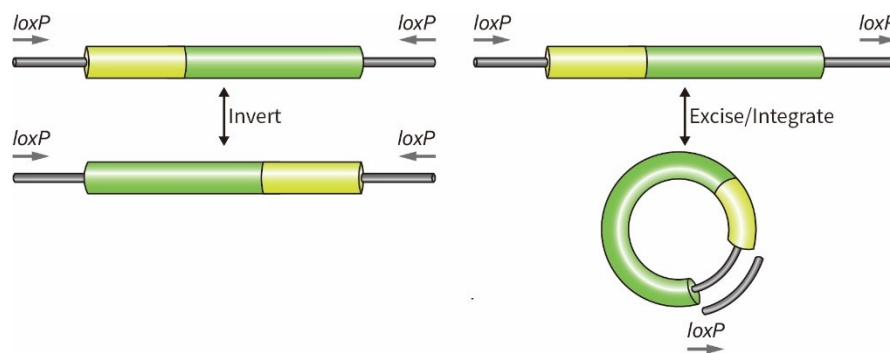


图2. Cre- $loxP$ 位点特异性重组示意图。

- pCMV-Cre-EGFP质粒转染HeLa细胞后的荧光表达效果, 可以看到EGFP标签的Cre重组酶主要分布在细胞核中(图3)。

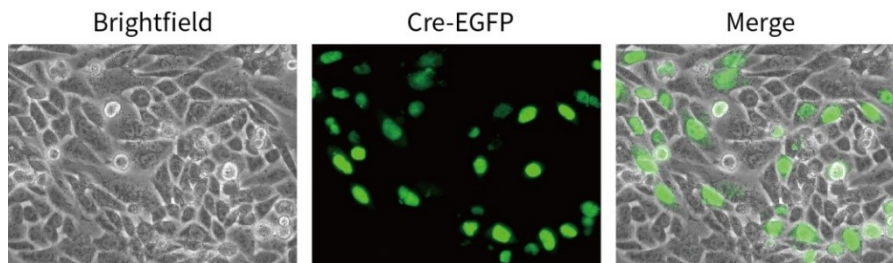


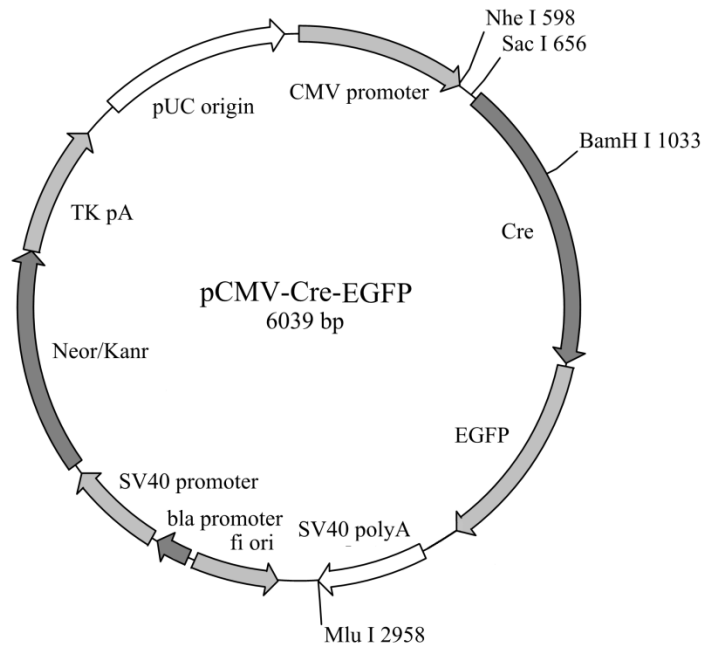
图3. pCMV-Cre-EGFP质粒转染HeLa细胞后的表达效果图。左图为明场照片, 中图为荧光照片, 右图为叠加照片。

- 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-Cre-EGFP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
Cre recombinase		677-1705

EGFP	1718-2437
multiple cloning site	2349-2497
T7 promoter and T7 primer binding site	2541-2562
SV40 polyA signal	2574-2957
f1 origin of ss-DNA replication	3095-3399
bla promoter	3424-3548
SV40 promoter	3568-3906
neomycin/kanamycin resistance ORF	3941-4732
HSV-thymidine kinase (TK) polyA signal	4733-5191
pUC origin	5320-5987

➤ pCMV-Cre-EGFP质粒(6039bp)的图谱如下:



➤ pCMV-Cre-EGFP的详细图谱如下:

Cre recombinase

```

651   GAGCTCTAGC GCTACCGGTC GCCACCATGT CCAATTTACT GACCGTACAC
      CTCGAGATCG CGATGGCCAG CGGTGGTACA GGTAAATGA CTGGCATGTG

701   CAAAATTTGC CTGCATTACC GGTTCGATGCA ACGAGTGATG AGGTTTCGCAA
      GTTTTAAACG GACGTAATGG CCAGCTACGT TGCTCACTAC TCCAAGCGTT

751   GAACCTGATG GACATGTTCA GGGATCGCCA GGCCTTTTCT GAGCATACTT
      CTTGGACTAC CTGTACAAGT CCCTAGCGGT CCGCAAAGA CTCGTATGGA

801   GGAAAATGCT TCTGTCCGTT TGCCGGTCGT GGGCGGCATG GTGCAAGTTG
      CCTTTTACGA AGACAGGCAA ACGGCCAGCA CCCGCCGTAC CACGTTCAAC

851   AATAACCGGA AATGGTTTCC CGCAGAACCT GAAGATGTTT GCGATTATCT
      TTATTGGCCT TTACCAAAGG GCGTCTTGGA CTTCTACAAG CGCTAATAGA

901   TCTATATCTT CAGGCGCGCG GTCTGGCAGT AAAAACTATC CAGCAACATT
      AGATATAGAA GTCCGCGCGC CAGACCGTCA TTTTGTATAG GTCGTGTGAA

951   TGGGCCAGCT AAACATGCTT CATCGTCGGT CCGGGCTGCC ACGACCAAGT
      ACCCGGTCGA TTTGTACGAA GTAGCAGCCA GGCCCCGACG TGCTGGTTCA

1001  GACAGCAATG CTGTTTCACT GGTATGCGG CGGATCCGAA AAGAAAACGT

```

CTGTCGTTAC GACAAAGTGA CCAATACGCC GCCTAGGCTT TTCTTTTGCA  
 1051 TGATGCCGGT GAACGTGCAA AACAGGCTCT AGCGTTCGAA CGCACTGATT  
 ACTACGGCCA CTGACAGTT TTGTCCGAGA TCGCAAGCTT GCGTACTAA  
 1101 TCGACCAGGT TCGTTCCTC ATGGAAAATA GCGATCGCTG CCAGGATATA  
 AGCTGGTCCA AGCAAGTGAG TACCTTTTAT CGCTAGCGAC GGTCTATAT  
 1151 CGTAATCTGG CATTCTGGG GATTGCTTAT AACACCCTGT TACGTATAGC  
 GCATTAGACC GTAAAGACCC CTAACGAATA TTGTGGGACA ATGCATATCG  
 1201 CGAAATTGCC AGGATCAGGG TTAAAGATAT CTCACGACT GACGGTGGGA  
 GCTTTAACGG TCCTAGTCCC AATTCTATA GAGTGCATGA CTGCCACCT  
 1251 GAATGTTAAT CCATATTGGC AGAACGAAAA CGCTGGTTAG CACCGCAGGT  
 CTTACAATTA GGTATAACCG TCTTGCTTTT GCGACCAATC GTGGCGTCCA  
 1301 GTAGAGAAGG CACTTAGCCT GGGGGTAACT AACTGGTCG AGCGATGGAT  
 CATCTCTTCC GTGAATCGGA CCCCATTGA TTTGACCAGC TCGCTACCTA  
 1351 TTCCGTCTCT GGTGTAGCTG ATGATCCGAA TAACTACCTG TTTTGCCGGG  
 AAGGCAGAGA CCACATCGAC TACTAGGCTT ATTGATGGAC AAAACGGCCC  
 1401 TCAGAAAAAA TGGTGTGTC GCGCCATCTG CCACCAGCCA GCTATCAACT  
 AGTCTTTTTT ACCACAACGG CGCGGTAGAC GGTGGTCGGT CGATAGTTGA  
 1451 CGCGCCCTGG AAGGGATTTT TGAAGCAACT CATCGATTGA TTACGGCGC  
 GCGCGGGACC TTCCCTAAAA ACTTCGTTGA GTAGCTAACT AAATGCCGCG  
 1501 TAAGGATGAC TCTGGTCAGA GATACCTGGC CTGGTCTGGA CACAGTGCCC  
 ATTCTACTG AGACCAGTCT CTATGGACCG GACCAGACCT GTGTCACGGG  
 1551 GTGTCCGAGC CGCGCGAGAT ATGGCCCGCG CTGGAGTTTC AATACCGGAG  
 CACAGCCTCG GCGCGCTCTA TACCGGGCGC GACCTCAAAG TTATGGCCTC  
 1601 ATCATGCAAG CTGGTGGCTG GACCAATGTA AATATTGTCA TGA ACTATAT  
 TAGTACGTTT GACCACCGAC CTGGTTACAT TTATAACAGT ACTTGATATA  
 1651 CCGTAACCTG GATAGTAAA CAGGGGCAAT GGTGCGCCTG CTGGAAGATG  
 GGCATTGGAC CTATCACTTT GTCCCCGTTA CCACGCGGAC GACCTTCTAC  
 EGFP  
 1701 GCGATGGTAG TGGTAGTATG GTGAGCAAGG GCGAGGAGCT GTTCACCGGG  
 CGCTACCATC ACCATCATA CACTCGTTCC CGCTCCTCGA CAAGTGGCCC  
 1751 GTGGTGCCCA TCCTGGTCGA GCTGGACGGC GACGTAAACG GCCACAAGTT  
 CACCACGGGT AGGACCAGCT CGACCTGCCG CTGCATTTGC CGGTGTTCAA  
 1801 CAGCGTGTCC GCGGAGGGCG AGGGCGATGC CACCTACGGC AAGCTGACCC  
 GTCGCACAGG CCGCTCCCGC TCCCGCTACG GTGGATGCCG TTCGACTGGG  
 1851 TGAAGTTCAT CTGCACCACC GGCAAGCTGC CCGTGCCCTG GCCCACCTC  
 ACTTCAAGTA GACGTGGTGG CCGTTCGACG GGCACGGGAC CGGGTGGGAG  
 1901 GTGACCACCC TGACCTACGG CGTGCAGTGC TTCAGCCGCT ACCCCGACCA  
 CACTGGTGGG ACTGGATGCC GCACGTCACG AAGTCGGCGA TGGGGCTGGT

1951 CATGAAGCAG CACGACTTCT TCAAGTCCGC CATGCCCGAA GGCTACGTCC  
GTACTTCGTC GTGCTGAAGA AGTTCAGGCG GTACGGGCTT CCGATGCAGG

2001 AGGAGCGCAC CATCTTCTTC AAGGACGACG GCAACTACAA GACCCGCGCC  
TCCTCGCGTG GTAGAAGAAG TTCCTGCTGC CGTTGATGTT CTGGGCGCGG

2051 GAGGTGAAGT TCGAGGGCGA CACCCTGGTG AACCGCATCG AGCTGAAGGG  
CTCCACTTCA AGCTCCCGCT GTGGGACCAC TTGGCGTAGC TCGACTTCCC

2101 CATCGACTTC AAGGAGGACG GCAACATCCT GGGGCACAAG CTGGAGTACA  
GTAGCTGAAG TTCCTCCTGC CGTTGTAGGA CCCCCTGTTC GACCTCATGT

2151 ACTACAACAG CCACAACGTC TATATCATGG CCGACAAGCA GAAGAACGGC  
TGATGTTGTC GGTGTTGCAG ATATAGTACC GGCTGTTTCGT CTTCTTGCCG

2201 ATCAAGGTGA ACTTCAAGAT CCGCCACAAC ATCGAGGACG GCAGCGTGCA  
TAGTTCCACT TGAAGTTCTA GCGGGTGTTC TAGCTCCTGC CGTCGCACGT

2251 GCTCGCCGAC CACTACCAGC AGAACACCCC CATCGGCGAC GGCCCGTGTC  
CGAGCGGCTG GTGATGGTCG TCTTGTGGGG GTAGCCGCTG CCGGGGCACG

2301 TGCTGCCCGA CAACCACTAC CTGAGCACCC AGTCCGCCCT GAGCAAAGAC  
ACGACGGGCT GTTGGTGATG GACTCGTGGG TCAGGCGGGA CTCGTTTCTG

2351 CCCAACGAGA AGCGCGATCA CATGGTCTCG CTGGAGTTCG TGACCGCCGC  
GGGTTGCTCT TCGCGCTAGT GTACCAGGAC GACCTCAAGC ACTGGCGGCG

HindIII PstI EcoRI

2401 CGGGATCACT CTCGGCATGG ACGAGCTGTA CAAGTAGAAG CTTCTGCAGG  
GCCCTAGTGA GAGCCGTACC TGCTCGACAT GTTCATCTTC GAAGACGTCC

SalI BglIII XhoI XbaI SpeI ApaI

2451 AATTCGATAT CGTCGACAGA TCTCTCGAGT CTAGAACTAG TGGGCCCGGT  
TTAAGCTATA GCAGCTGTCT AGAGAGCTCA GATCTTGATC ACCCGGGCCA

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

AflII	AhdI	AscI	BaeI	BbsI	BbvCI	BlpI
BmgBI	BsiWI	BspEI	BspQI	BstEII	BstXI	BstZ17I
EarI	EcoNI	FseI	NotI	PflMI	PmeI	PmlI
PpuMI	PspXI	SacII	SapI	SbfI	ScaI	SgrAI
SmaI	SrfI	SwaI	TspMI	XcmI	XmaI	

➤ pCMV-Cre-EGFP中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pCMV-Cre-EGFP)包括:

AccI	GT`MK, AC	2463	KasI	G`GCGC, C	4068
AclI	AA`CG, TT	1047	MfeI	C`AATT, G	2821
AfeI	AGC GCT	660	MluI	A`CGCG, T	2957
ApaI	G, GGCC`C	2492	MscI	TGG CCA	4151
ApaLI	G`TGCA, C	5673	NarI	GG`CG, CC	4069
AsiSI	GCG, AT`CGC	1133	NdeI	CA`TA, TG	240
AvaI	C`YCGR, G	2474	NheI	G`CTAG, C	597
BamHI	G`GATC, C	1032	NruI	TCG CGA	891
BclI	T`GATC, A	2728	PaeR7I	C`TCGA, G	2474
BglIII	A`GATC, T	2468	PaqCI	CACCTGCNNNN`NNNN,	1286
BmtI	G, CTAG`C	597	PflFI	GACN`N, NGTC	4187
BsaI	GGTCTCN`NNN, N	5058	PluTI	G, GCGC`C	4068
BsaXI	, NNN` (N) <sub>9</sub> AC (N) <sub>5</sub> CTCC (N) <sub>7</sub> , NNN`	3118	PshAI	GACNN NNGTC	1512
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1360	PspOMI	G`GGCC, C	2492
BsoBI	C`YCGR, G	2474	PstI	C, TGCA`G	2444
BsrGI	T`GTAC, A	2427	SacI	G, AGCT`C	651
BssHII	G`CGCG, C	914	SalI	G`TCGA, C	2462
CspCI	, NN` (N) <sub>11</sub> CAA (N) <sub>5</sub> GTGG (N) <sub>10</sub> , NN`	382	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	3841

DraIII	CAC, NNN`GTG	3184	SfoI	GGC GCC	4070
EagI	C`GGCC, G	3975	SpeI	A`CTAG, T	2486
Eco53kI	GAG CTC	653	StuI	AGG CCT	3890
EcoRI	G`AATT, C	2450	Tth111I	GACN`N, NGTC	4187
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1360	XbaI	T`CTAG, A	2480
HindIII	A`AGCT, T	2438	XhoI	C`TCGA, G	2474
HpaI	GTT AAC	2834	XmnI	GAANN NNTTC	885

➤ 如需对pCMV-Cre-EGFP质粒中插入片段Cre-EGFP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 (2541-2562): 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

➤ pCMV-Cre-EGFP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
D2608-1μg	pCMV-Cre-EGFP	1μg
D2608-100μg	pCMV-Cre-EGFP	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。

Version 2021.05.15