

pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)

产品编号	产品名称	包装
D2907-1 μ g	pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)	1 μ g
D2907-100 μ g	pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)	100 μ g

产品简介:

- pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ (高灵敏度细菌ATP荧光探针)是碧云天研发的一种用于在细菌中表达N端含有His标签(His tag)的QUEEN7 μ 融合蛋白以作为ATP荧光探针的原核工具质粒。可以用于活体实时检测单个细菌内ATP水平或QUEEN2m的原核表达纯化。
- 使用本产品时推荐同时使用D2909 pET-N-His-TEV-QUEEN NA (ATP荧光探针对照质粒)作为对照。
- 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)检测方法所计算得出的胞内ATP浓度几乎完全一致, 因此QUEEN适合用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QUEEN7 μ 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FoF₁-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FoF₁-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。QUEEN7 μ 是一个高亲和力的ATP荧光探针(Kd~7 μ M at 25°C), 但对ADP没有亲和力。对于正常的活细菌而言, QUEEN7 μ 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QUEEN7 μ 进行ATP的荧光检测。也可以使用表达纯化的QUEEN7 μ 进行体外体系的ATP实时浓度检测。pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)更适合用于检测生理浓度的ATP。

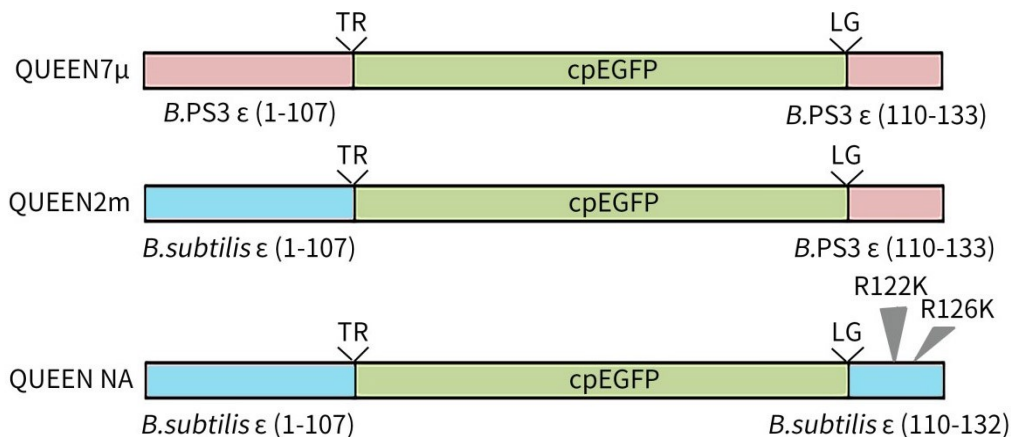


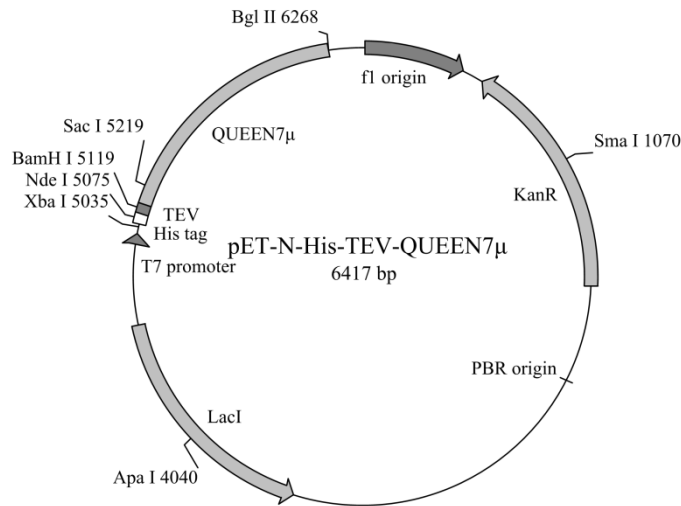
图1. QUEEN7 μ 、QUEEN2m和QUEEN NA的蛋白结构图。

- 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QUEEN7 μ 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QUEEN7 μ , 并可以使用His-tag抗体(AH367)检测和少量地分离纯化QUEEN7 μ 。
- 本质粒为卡那霉素抗性。
- pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ 质粒的主要信息如下:

Feature	Nucleotide	Position
---------	------------	----------

fl 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
QUEEN7 μ	5124-6266
T7 Terminator	6364-6410

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ 质粒(6417bp)的图谱如下:



➤ pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ 的详细图谱如下:

		His tag		TEV		
5061	GAAGGAGATA	TACATATGCA	CCATCATCAT	CATCATGAGA	ACCTGTA	CTT
	CTTCC	TCTAT	ATGTATACGT	GGTAGTAGTA	GTAGTACTCT	TGGACATGAA
		↓	BamHI	QUEEN7 μ		
5111	CCAAGGGGGA	TCCATGAAAA	CGATCCACGT	GAGCGTCACT	ACTCCTGATG	
	GGTCCCCCT	AGGTACTTTT	GCTAGGTGCA	CTCGCAGTGA	TGAGGACTAC	
5161	GCCCGGTGTA	CGAAGACGAT	GTTGAAATGG	TCAGCGTCAA	AGCGAAAAGC	
	CGGGCCACAT	GCTTCTGCTA	CAACTTTACC	AGTCGCAGTT	TCGCTTTTCG	
5211	GGCGAGCTCG	GCATTTTGCC	GGGGCACATT	CCGCTTAAGG	CCCCGCTCGA	
	CCGCTCGAGC	CGTAAAACGG	CCCCGTGTAA	GGCGAATTCC	GGGGCGAGCT	
5261	GATCAGCGCG	GCCCGGCTGA	AAAAAGGCGG	CAAAACGCAA	TACATTGCCG	
	CTAGTCGCGC	CGGGCCGACT	TTTTTCCGCC	GTTTTGCGTT	ATGTAACGGC	
5311	TCAGCGGCGG	CAATTTGGAA	GTCCGCCCCG	ACAAAGTGAC	GATTAACGCT	
	AGTCGCCGCC	GTTAAACCTT	CAGGCGGGCC	TGTTTCACTG	CTAATTGCGA	
5361	CAAGTGCTG	AACGGGCGGA	GGACATTGAC	GTCCTCCGCG	CCAAAGCGGC	
	GTTTCGACGAC	TTGCCCGCCT	CCTGTA	ACTG	CAGGAGGCGC	GGTTTCGCCG
5411	GAAAGAGCGG	GCGGAGCGCC	GCCTGCAAAG	CCAGACCCGT	TACAACAGCC	
	CTTTCTCGCC	CGCCTCGCGG	CGGACGTTT	GGTCTGGGCA	ATGTTGTCGG	
5461	ACAACGTCTA	TATCATGGCC	GACAAGCAGA	AGAACGGCAT	CAAGGTGAAC	
	TGTTGCAGAT	ATAGTACCGG	CTGTTCGTCT	TCTTGCCGTA	GTTCCACTTG	

5511 TTCAAGATCC GCCACAACAT CGAGGACGGC AGCGTGCAGC TCGCCGACCA
AAGTTCTAGG CGGTGTGTGA GCTCCTGCCG TCGCACGTCG AGCGGCTGGT

5561 CTACCAGCAG AACACCCCCA TCGGCGACGG CCCCCTGCTG CTGCCCCACA
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 TACCACTCGT

5761 AGGGCGAGGA GCTGTTACCC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC
TCCCCTCTCT CGACAAGTGG CCCACCACG GGTAGGACCA GCTCGACCTG

5811 GGCACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA
CCGCTGCATT TGCCGGTGTT CAAGTCGCAC AGGCCGCTCC CGTCCCCTG

5861 TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC
ACGGTGGATG CCGTTCGACT GGGACTTCAA GTAGACGTGG TGGCCGTTCCG

5911 TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGACG
ACGGGCACGG GACCGGGTGG GAGCACTGGT GGGACTGGAT GCCGCACGTC

5961 TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT TCTTCAAGTC
ACGAAGTCGG CGATGGGGCT GGTGTACTTC GTCGTGCTGA AGAAGTTCAG

6011 CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG
GCGGTACGGG CTTCCGATGC AGGTCCCTCGC GTGGTAGAAG AAGTTCCTGC

6061 ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG
TGCCGTTGAT GTTCTGGGCG CGGCTCCACT TCAAGCTCCC GCTGTGGGAC

6111 GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT
CACTTGCGCT AGCTCGACTT CCCGTAGCTG AAGTTCCTCC TGCCGTTGTA

6161 CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACCTGGG TGACATCGAC TTCAAACGGG
GGACCCCGTG TTCGACCTCA TGTGGACCC ACTGTAGCTG AAGTTTGCCC

6211 CCGAACTGGC GTTAAAACGC GCCATGAACC GTTTGAGCGT TGCGGAAATG
GGCTTGACCG CAATTTTGCG CGGTACTTGG CAAACTCGCA ACGCCTTTAC

BglII

6261 AAGTGAAGAT CTCTCGAGT
TTCACCTCTA GAGAGCTCAC

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ 中没有的酶切位点(Restriction enzymes that do not cut pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ)包括:

Acc65I	AgeI	AhdI	AscI	AvrII	BaeI	BbvCI
BfuAI	BmgBI	BmtI	BsaI	BsiWI	BspMI	BstBI
Bsu36I	CspCI	DraI	EagI	EcoRI	EcoRV	FseI
HindIII	KpnI	MfeI	MscI	NcoI	NheI	NotI
PacI	PmeI	PspXI	PstI	RsrII	SacII	SalI

SbfI ScaI SexAI SfiI SnaBI SpeI SrfI
 StuI SwaI

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ 中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ)包括:

AatII	G, ACGT`C	5388	MluI	A`CGCG, T	4242
AccI	GT`MK, AC	2373	NdeI	CA`TA, TG	5074
AflIII	C`TTAA, G	5244	NruI	TCG CGA	1286
AlwNI	CAG, NNN`CTG	1729	PciI	A`CATG, T	2141
ApaI	G, GGCC`C	4035	PflFI	GACN`N, NGTC	2399
AsiSI	GCG, AT`CGC	943	PmlI	CAC GTG	5138
BamHI	G`GATC, C	5118	PpuMI	RG`GWC, CY	3136
BclI	T`GATC, A	4228	PshAI	GACNN NNGTC	3401
BglII	A`GATC, T	6267	PsiI	TTA TAA	370
BseRI	GAGGAG (N) ₈ , NN`	5779	PspOMI	G`GGCC, C	4035
BspQI	GCTCTTCN`NNN,	2258	PvuI	CG, AT`CG	943
BsrGI	T`GTAC, A	5725	SacI	G, AGCT`C	5214
BssHII	G`CGCG, C	3831	SapI	GCTCTTCN`NNN,	2258
BstAPI	GCAN, NNN`NTGC	4563	SgrAI	CR`CCGG, YG	4923
BstEII	G`GTNAC, C	4060	SmaI	CCC GGG	1069
BstZ17I	GTA TAC	2374	SphI	G, CATG`C	4771
DraIII	CAC, NNN`GTG	242	TspMI	C`CCGG, G	1067
Eco53kI	GAG CTC	5216	Tth111I	GACN`N, NGTC	2399
FspI	TGC GCA	3164	XbaI	T`CTAG, A	5034
HincII	GTY RAC	3740	XmaI	C`CCGG, G	1067
HpaI	GTT AAC	3740	ZraI	GAC GTC	5390

➤ pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ 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
D2907-1 μ g	pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ	1 μ g
D2907-100 μ g	pET-N-His-TEV-QUEEN7 μ	100 μ g
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ 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1 μ g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. 100 μ g包装的本产品质粒浓度为0.1 μ g/ μ l，共1ml。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D2604-1 μ g	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	1 μ g
D2604-100 μ g	pCMV-AT1.03 (ATP荧光探针)	100 μ g
D2605-1 μ g	pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)	1 μ g
D2605-100 μ g	pCMV-NLS-AT1.03 (细胞核ATP荧光探针)	100 μ g
D2606-1 μ g	pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)	1 μ g
D2606-100 μ g	pCMV-Mito-AT1.03 (线粒体ATP荧光探针)	100 μ g
D2906-1 μ g	pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)	1 μ g
D2906-100 μ g	pET-N-His-TEV-QUEEN2m (细菌ATP荧光探针)	100 μ g

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 2020.12.02