



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo (Avi标签质粒)

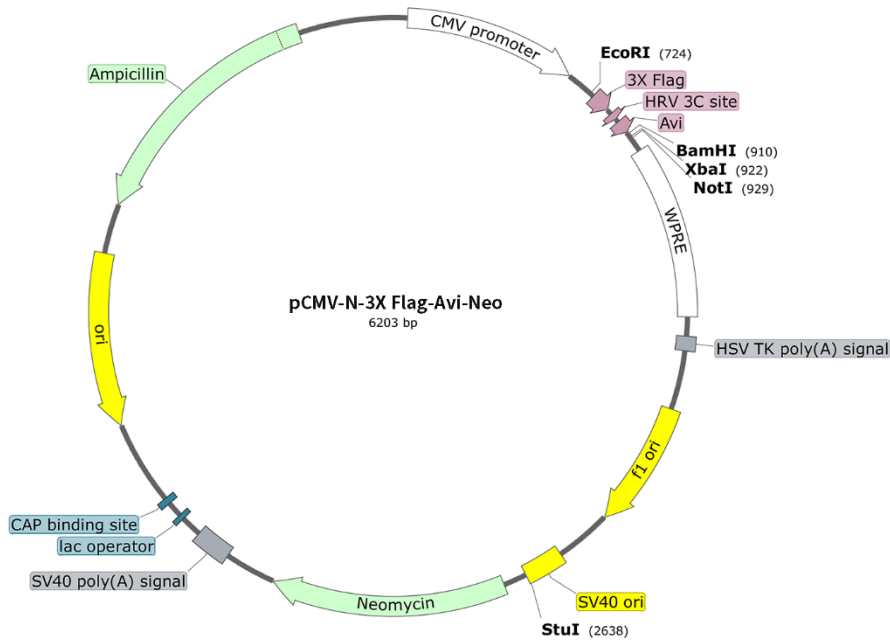
产品编号	产品名称	包装
D2973-1μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo (Avi标签质粒)	1μg
D2973-100μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo (Avi标签质粒)	100μg

### 产品简介:

- pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo是碧云天自行研发的用于在哺乳动物细胞中表达可被生物素标记的目的蛋白的质粒。该质粒由CMV启动子驱动带有3X Flag tag和Avi tag (Avi标签)的目的蛋白。在ATP和生物素(Biotin)存在的条件下,生物素连接酶(biotin ligase) BirA可以催化Biotin共价结合到目的蛋白N端的Avi标签上,从而在体内或体外对目的蛋白进行生物素标记。在多克隆位点的5'端还含有一个编码3XFlag标签的序列,这样可以表达同时含有Flag标签和Avi标签的融合蛋白,在可以进行生物素标记的同时,也可以方便地使用Flag标签抗体来识别目的蛋白,从而便于目的蛋白检测和分离纯化。
- Avi标签(Avi-tag)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,生物素连接酶BirA可以在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。
- 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)的亲合力高,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。
- pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo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Neomycin效果一致,但G418的细胞毒性更低。
- 本质粒在N端3X Flag标签与Avi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。HRV 3C蛋白酶酶切发生在八肽序列的Gln和Gly之间,因此在酶切去除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-Avi-Neo质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV promoter	50-633
3X Flag tag	739-804
HRV 3C site	823-846
Avi tag	859-903
Multiple cloning site	910-929
WPRE	979-1567
HSV-thymidine Kinase(TK) polyA signal	1633-1681
f1 origin	1883-2311
SV40 ori	2505-2640
Neomycin	2721-3515
SV40 poly(A) signal	3691-3812
lac operator	3885-3901
CAP binding site	3954-3975
ori	4263-4851
Ampicillin	5022-5882

- pCMV-3X Flag-Avi-MCS质粒(6203bp)的图谱如下:



➤ pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo表达基因的详细图谱如下：

CMV promoter

```

401 TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC
AGATGCATAA TCAGTAGCGA TAATGGTACC ACTACGCCAA AACCGTCATG

451 ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA
TAGTTACCCG CACCTATCGC CAAACTGAGT GCCCCTAAAG GTTCAGAGGT

501 CCCCATTTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT
GGGGTAACTG CAGTTACCCT CAAACAAAAC CGTGGTTTTA GTTGCCCTGA

551 TTCCAAAATG TCGTAAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG
AAGGTTTTTAC AGCATTGTTG AGGCGGGGTA ACTGCGTTTA CCCGCCATCC

601 CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCGTTTAC TGAACCGTCA
GCACATGCCA CCCTCCAGAT ATATTCGTCT CGAGCAAATC ACTTGGCAGT

651 GATCGCCTGG AGACGCCATC CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC
CTAGCGGACC TCTGCGGTAG GTGCGACAAA ACTGGAGGTA TCTTCTGTGG

701 GGGACCGATC CAGCCTCCGG ACTGAATTCG CCACCATGGA CTACAAGGAC
CCCTGGCTAG GTCGGAGGCC TGACTTAAGC GGTGGTACCT GATGTTCTCTG
EcoRI 3X Flag

751 CACGACGGCG ACTACAAGGA CCACGACATC GACTACAAGG ACGACGACGA
GTGCTGCCGC TGATGTTTCT GGTGCTGTAG CTGATGTTCC TGCTGCTGCT
HRV 3C site

801 CAAGGGCGGC AGCGGCGGCA GCCTGGAGGT GCTGTTCAG GGCCCCCTCG
GTTCCCGCCG TCGCCGCCGT CGGACCTCCA CGACAAGGTC CCGGGGGAGC
Avi

851 AGGGTTCCTGG CCTGAACGAT ATTTTTGAAG CGCAGAAAAT TGAATGGCAT
TCCCAAGACC GGACTTGCTA TAAAAACTTC GCGTCTTTTA ACTTACCGTA
BamHI XbaI NotI

901 GAAGGCGGCG GATCCACTAG TTCTAGAGCG GCCGCTGTCG AGAAGTACTA
CTTCCGCCGC CTAGGTGATC AAGATCTCGC CGGCGACAGC TCTTCATGAT
WPRE

951 GAGGATCATA ATCAGCCGAT ATCTCGACAA TCAACCTCTG GATTACAAAA
CTCCTAGTAT TAGTCGGCTA TAGAGCTGTT AGTTGGAGAC CTAATGTTTT

1001 TTTGTGAAAAG ATTGACTGGT ATTCTTAACT ATGTTGCTCC TTTTACGCTA
AAACACTTTC TAACTGACCA TAAGAATTGA TACAACGAGG AAAATGCGAT

1051 TGTGGATACG CTGCTTTAAT GCCTTTGTAT CATGCTATTG CTTCCCGTAT
ACACCTATGC GACGAAATTA CGGAAACATA GTACGATAAC GAAGGGCATA

```

1101GGCTTTTCATT TTCTCCTCCT TGTATAAATC CTGGTTGCTG TCTCTTTATG  
CCGAAAGTAA AAGAGGAGGA ACATATTTAG GACCAACGAC AGAGAAATAC

1151AGGAGTTGTG GCCCGTTGTC AGGCAACGTG GCGTGGTGTG CACTGTGTTT  
TCCTCAACAC CGGGCAACAG TCCGTTGCAC CGCACCACAC GTGACACAAA

➤ pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo中没有的酶切位点包括:

AarI	Acc65I	AcvI	AfeI	AflII	AgeI	AjiI
AjuI	AleI	Aor51HI	AscI	AsiGI	AsiSI	Asp718I
AsuII	AsuNHI	AxyI	BaeI	BanIII	BarI	BbrPI
BbvCI	BfrI	BlpI	BmgBI	BmtI	BoxI	Bpu14I
Bpu1102I	Bsa29I	Bse21I	BseCI	BsgI	BshVI	BshTI
BsiWI	Bsp119I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspDI	BspOI	BspTI
BspT104I	BspXI	BsrGI	Bst98I	BstAFI	BstAUI	BstBI
BstEII	BstENI	BstHPI	BstPI	BstPAI	BstXI	Bsu15I
Bsu36I	BsuTUI	BtrI	CelII	ClaI	Csp45I	CspAI
Eco47III	Eco72I	Eco81I	Eco91I	EcoNI	EcoO65I	FseI
FspAI	HindIII	HpaI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KpnI
KspAI	MauBI	MreI	MspCI	MssI	NheI	NspV
OliI	PacI	PalAI	Pfl23II	PI-PspI	PI-SceI	PinAI
PmaCI	PmeI	PmlI	PpuMI	PshAI	Psp5II	PspCI
PspEI	PspLI	PspPPI	PsrI	RgaI	RigI	SanDI
SbfI	SdaI	SfaAI	SfiI	SfuI	SgfI	SgrAI
SgsI	SmiI	SrfI	Sse8387I	SspBI	SwaI	TstI
Vha464I	XagI	XcmI				

➤ pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo中的单酶切位点包括:

AbsI	CC`TCGA,GG	847	PciI	A`CATG,T	4202
AhdI	GACNN,N`NNGTC	5095	PflFI	GACN`N,NGTC	2967
ApaI	G,GGCC`C	844	PflMI	CCAN,NNN`NTGG	1220
AvrII	C`CTAG,G	2639	PluTI	G,GCGC`C	2852
BamHI	G`GATC,C	910	PspOMI	G`GGCC,C	840
BclI	T`GATC,A	2690	PspXI	VC`TCGA,GB	847
Bpu10I	CC`TNA,GC	6198	PstI	C,TGCA`G	2902
BsmI	GAATG,CN`	3771	PvuI	CG,AT`CG	5465
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	654	RsrII	CG`GWC,CG	3365
BspEI	T`CCGG,A	716	SacI	G,AGCT`C	633
BssHII	G`CGCG,C	3246	SacII	CC,GC`GG	1482
BstZ17I	GTA TAC	3823	SexAI	A`CCWGG,T	2406
DraIII	CAC,NNN`GTG	2116	SfoI	GGC GCC	2850
Eco53kI	GAG CTC	631	SgrDI	CG`TCGA,CG	6016
EcoRI	G`AATT,C	724	SmaI	CCC GGG	2662
EcoRV	GAT ATC	970	SnaBI	TAC GTA	405
KasI	G`GCGC,C	2848	SspI	AAT ATT	5899
MfeI	C`AATT,G	6179	StuI	AGG CCT	2638
MluI	A`CGCG,T	43	TspMI	C`CCGG,G	2660
MscI	TGG CCA	2931	Tth111I	GACN`N,NGTC	2967
NarI	GG`CG,CC	2849	XbaI	T`CTAG,A	922
NdeI	CA`TA,TG	299	XhoI	C`TCGA,G	847
NotI	GC`GGCC,GC	929	XmaI	C`CCGG,G	2660
PaeR7I	C`TCGA,G	847			

➤ pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo质粒中推荐使用的测序引物序列如下:

CMV-F (583-603): 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGT-3'

➤ pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo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
D2973-1μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo	1μg
D2973-100μg	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo	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1 $\mu$ 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 $\mu$ g包装的本产品质粒浓度为0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l, 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
D2971-1 $\mu$ g	pCMV-3X Flag-Avi-MCS-IRES-BirA	1 $\mu$ g
D2971-100 $\mu$ g	pCMV-3X Flag-Avi-MCS-IRES-BirA	100 $\mu$ g
D2973-1 $\mu$ g	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo	1 $\mu$ g
D2973-100 $\mu$ g	pCMV-N-3X Flag-Avi-Neo	100 $\mu$ g

Version 2021.08.13