



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

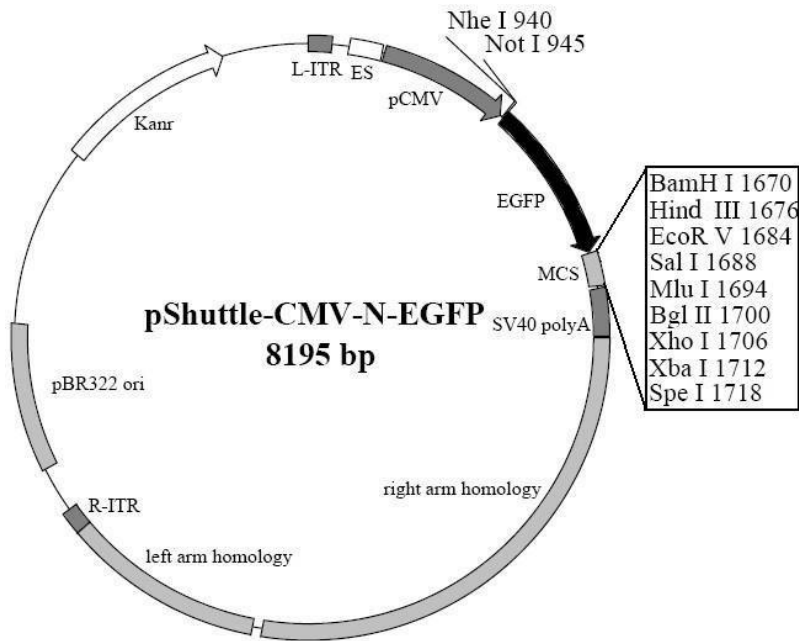
pShuttle-CMV-N-EGFP(腺病毒质粒, 绿色荧光)

产品编号	产品名称	包装
D8129-1 μ g	pShuttle-CMV-N-EGFP(腺病毒质粒, 绿色荧光)	1 μ g
D8129-100 μ g	pShuttle-CMV-N-EGFP(腺病毒质粒, 绿色荧光)	100 μ g

产品简介:

- pShuttle-CMV-N-EGFP (腺病毒质粒, 绿色荧光)是碧云天自行研发的用于构建表达N端EGFP(绿色荧光蛋白)融合蛋白的重组腺病毒包装用的穿梭质粒。本穿梭质粒构建后, 需要和预转染了pAdEasy-1质粒的BJ5183菌株(D8107)以及重组腺病毒包装细胞配合使用才能完成重组腺病毒的包装。
- pShuttle-CMV-N-EGFP质粒可以用于在包装成腺病毒后表达N端含EGFP(Enhanced GreenFluorescent Protein, 增强绿色荧光蛋白)标签的融合蛋白。该质粒含有CMV启动子, 可以高效启动目的蛋白在细胞中的表达。在多克隆位点的前面有一个EGFP的完整编码序列, 因此在多克隆位点根据阅读框插入目的基因就可以表达N端含有EGFP标签的融合蛋白。利用EGFP的荧光特性可以比较容易地观察融合蛋白的表达水平和细胞内定位, 也可以利用GFP抗体来检测或免疫沉淀融合蛋白。
- 本质粒为卡那霉素抗性。
- 重组腺病毒(Recombinant adenoviruses)是一种常见的用于在培养细胞或动物体内表达外源基因的重要工具。重组腺病毒具有感染宿主细胞范围广、感染不依赖细胞分裂、高滴度及目的基因表达水平高等特性。最常用的腺病毒载体是人类血清5型腺病毒。改造后的人类血清5型腺病毒, 删除了在病毒装配过程中起关键作用的E1基因和非必须的能表达逃避宿主免疫的E3基因, E1和E3基因的删除使得重组腺病毒不能自我复制, 同时给外源基因的插入提供了空间, 最长可插入7.5kb的外源基因。从而提高了重组腺病毒的安全性和可操作性。重组腺病毒的包装细胞, 例如AD-293、293A、HEK293等细胞中, 表达E1基因, 这样就可以在这些包装细胞中正常装配重组腺病毒了。
- pShuttle系列的穿梭质粒携带外源目的基因, 经过Pme I线性化, 随后与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1(D8106)共转染到大肠杆菌BJ5183中, 或者转染到已经预转染了pAdEasy-1质粒的BJ5183菌株(D8107)中同源重组。BJ5183菌株表达recET基因, 具有很高的基因同源重组(homologous recombination)活性, 使带有目的基因的穿梭质粒与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1通过末端反向重复序列同源重组, 实现外源基因与腺病毒基因组的整合。将重组的携带外源基因的腺病毒质粒用Pac I线性化后转染到AD-293、293A、HEK293等重组腺病毒包装细胞中进行包装。从而制备获得高滴度、自我复制缺陷并且带有目的基因的重组腺病毒。
- 目的基因引入时不能含有Pme I及Pac I这两个酶切位点, 如果含有该两个酶切位点的目的基因, 需要对该位点进行突变方可进行基因操作。
- pShuttle-CMV-N-EGFP 主要信息如下:

Feature	Nucleotide	Position
left inverted terminal repeat		1-103
encapsidation signal (ES)		183-331
CMV promoter		341-933
EGFP tag		947-1668
multiple cloning site		1670-1718
SV40 polyA		1730-1941
Ad5 right arm homology		1946-4201
Ad5 left arm homology		4248-5131
right inverted terminal repeat		5132-5234
pBR322 origin		5442-6109
kanamycin resistance ORF		6918-7709
- pShuttle-CMV-N-EGFP 质粒(8195bp)的图谱如下:



➤ pShuttle-CMV-N-EGFP 详细图谱如下:

```

                                     NotI
                                     NheI   Kozak 序列
901  AGAGCTGGTT TAGTGAACCG TCAGATCCGC TAGAGATCGC TAGCGG CCGC
    TCTCGACCAA ATCACTTGGC AGTCTAGGCG ATCTCTAGCG ATCGCC GGCG
                                     EGFP
951  CATG GTGAGC AAGGGCGAGG AGCTGTTTAC CGGGGTGGTG CCCATCCTGG
    GTAC CACTCG TTCCCGCTCC TCGACAAGTG GCCCCACCAC GGGTAGGACC

1001 TCGAGCTGGA CGGCGACGTA AACGGCCACA AGTTCAGCGT GTCCGGCGAG
    AGCTCGACCT GCCGCTGCAT TTGCCGGTGT TCAAGTCGCA CAGGCCGCTC

1051 GCGGAGGGCG ATGCCACCTA CGGCAAGCTG ACCCTGAAGT TCATCTGCAC
    CCGCTCCCGC TACGGTGGAT GCCGTTCGAC TGGGACTTCA AGTAGACGTG

1101 CACCGGCAAG CTGCCCGTGC CCTGGCCCAC CCTCGTGACC ACCCTGACCT
    GTGGCCGTTT GACGGGCACG GGACCGGGTG GGAGCACTGG TGGGACTGGA

1151 ACGGCGTGCA GTGCTTCAGC CGTACCCCG ACCACATGAA GCAGCACGAC
    TGCCGCACGT CACGAAGTCG GCGATGGGGC TGGTGTACTT CGTCGTGCTG

1201 TTCTTCAAGT CCGCCATGCC CGAAGGCTAC GTCCAGGAGC GCACCATCTT
    AAGAAGTTCA GCGGTACGG GCTTCCGATG CAGGTCCTCG CGTGGTAGAA

1251 CTTCAAGGAC GACGGCAACT ACAAGACCCG CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG
    GAAGTTCCTG CTGCCGTTGA TGTTCGGGC GCGGCTCCAC TTCAAGCTCC

1301 GCGACACCCT GGTGAACCGC ATCGAGCTGA AGGGCATCGA CTTCAAGGAG
    CGCTGTGGGA CCACTTGCGC TAGCTCGACT TCCCGTAGCT GAAGTTCCTC

1351 GACGGCAACA TCCTGGGGCA CAAGCTGGAG TACAAC TACA ACAGCCACAA
    CTGCCGTTGT AGGACCCCGT GTTCGACCTC ATGTTGATGT TGTCCGGTGT
  
```

1401 CGTCTATATC ATGGCCGACA AGCAGAAGAA CGGCATCAAG GTGAACTTCA
CGAGATATAG TACCGGCTGT TCGTCTTCTT GCCGTAGTTC CACTTGAAGT

1451 AGATCCGCCA CAACATCGAG GACGGCAGCG TGCAGCTCGC CGACCACTAC
TCTAGGCGGT GTTGTAGCTC CTGCCGTCGC ACGTCGAGCG GCTGGTGATG

1501 CAGCAGAACA CCCCATCGG CGACGGCCCC GTGCTGCTGC CCGACAACCA
GTCGTCTTGT GGGGGTAGCC GCTGCCGGGG CACGACGACG GGCTGTTGGT

1551 CTACCTGAGC ACCCAGTCCG CCCTGAGCAA AGACCCCAAC GAGAAGCGCG
GATGGACTCG TGGGTCAGGC GGGACTCGTT TCTGGGGTTG CTCTTCGCGC

1601 ATCACATGGT CCTGCTGGAG TTCGTGACCG CCGCCGGGAT CACTCTCGGC
TAGTGTACCA GGACGACCTC AAGCACTGGC GCGGCCCTA GTGAGAGCCG

HindIII

BamHI EcoRV Sali MluI BglII

1651 ATGGACGAGC TGTACAAGGG ATCCAAGCTT GATATCGTCG ACACGCGTAG
TACCTGCTCG ACATGTTCCC TAGGTTCGAA CTATAGCAGC TGTGCGCATC
XhoI XbaI SpeI

1701 ATCTCTCGAG TCTAGAATA GTACTAGATA ACTGATCATA ATCAGCCATA
TAGAGAGCTC AGATCTTGAT CATGATCTAT TGACTAGTAT TAGTCGGTAT

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

Acc65I	AflII	AgeI	AscI	Asp718
BlpI	BsiCI	BsiWI	BstBI	Bsu36I
ClaI	Eco72I	EcoNI	EspI	FseI
KpnI	NruI	PmlI	PvuI	SfiI

➤ pShuttle-CMV-N-EGFP 中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pShuttle-CMV-N-EGFP once)包括:

SnaBI	TAC GTA	679	PflMI	CCAN,NNN`NTGG	2618
NheI	G`CTAG,C	940	BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	3057
NotI	GC`GGCC,GC	945	BbsI	GAAGAC 8/12	3859
BamHI	G`GATC,C	1670	BbvII	GAAGAC 7/11	3860
HindIII	A`AGCT,T	1676	Bst1107I	GTA TAC	4213
EcoRV	GAT ATC	1684	XcaI	GTA TAC	4213
Sali	G`TCGA,C	1688	PmeI	CTTT AAAC	4234
MluI	A`CGCG,T	1694	EcoRI	G`AATT,C	4239
BglII	A`GATC,T	1700	AvrII	C`CTAG,G	4781
PaeR7I	C`TCGA,G	1706	BspHI	T`CATG,A	6177
XhoI	C`TCGA,G	1706	Psp1406I	AA`CG,TT	6576
XbaI	T`CTAG,A	1712	RsrII	CG`GWC,CG	7582
SpeI	A`CTAG,T	1718	DraIII	CAC,NNN`GTG	7929
ScaI	AGT ACT	1723	XmnI	GAANN NNTTC	8183
HpaI	GTT AAC	1840			

➤ pShuttle-CMV-N-EGFP 质粒中推荐使用的测序引物序列如下:

forward primer (888-907): 5'GGTCTATATAAGCAGAGCTG3'

Reverse primer (1732-1754): 5'GTGGTATGGCTGATTATGATCAG 3'

➤ pShuttle-CMV-N-EGFP 的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

➤ 腺病毒包装的具体方法和步骤可以参考如下网页:

<https://www.beyotime.com/support/pShuttle.htm>

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D8129-1μg	pShuttle-CMV-N-EGFP	1μg
D8129-100μg	pShuttle-CMV-N-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. pShuttle-CMV-N-EGFP质粒在其多克隆位点适当酶切后可以插入待表达的目的基因, 插入目的基因时注意与EGFP不能发生移码突变。携带目的基因的质粒经过Pme I线性化, 随后与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1(D8106)共转化到大肠杆菌BJ5183中, 或者转化到已经预转了pAdEasy-1质粒的BJ5183菌株(D8107)中进行同源重组。将重组的携带外源基因的腺病毒质粒用Pac I线性化后转染到AD-293、293A、HEK293等重组腺病毒包装细胞中进行包装。从而制备得高滴度、自我复制缺陷并且带有目的基因的重组腺病毒。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D8115-1μg	pShuttle-CMV-C-DsRed	1μg
D8115-100μg	pShuttle-CMV-C-DsRed	100μg
D8117-1μg	pShuttle-CMV-C-EGFP	1μg
D8117-100μg	pShuttle-CMV-C-EGFP	100μg
D8119-1μg	pShuttle-CMV-C-FLag	1μg
D8119-100μg	pShuttle-CMV-C-FLag	100μg
D8121-1μg	pShuttle-CMV-C-HA	1μg
D8121-100μg	pShuttle-CMV-C-HA	100μg
D8123-1μg	pShuttle-CMV-C-His	1μg
D8123-100μg	pShuttle-CMV-C-His	100μg
D8125-1μg	pShuttle-CMV-C-Myc	1μg
D8125-100μg	pShuttle-CMV-C-Myc	100μg
D8127-1μg	pShuttle-CMV-N-DsRed	1μg
D8127-100μg	pShuttle-CMV-N-DsRed	100μg
D8129-1μg	pShuttle-CMV-N-EGFP	1μg
D8129-100μg	pShuttle-CMV-N-EGFP	100μg
D8131-1μg	pShuttle-CMV-N-FLag	1μg
D8131-100μg	pShuttle-CMV-N-FLag	100μg
D8133-1μg	pShuttle-CMV-N-HA	1μg
D8133-100μg	pShuttle-CMV-N-HA	100μg
D8135-1μg	pShuttle-CMV-N-His	1μg
D8135-100μg	pShuttle-CMV-N-His	100μg
D8137-1μg	pShuttle-CMV-N-Myc	1μg
D8137-100μg	pShuttle-CMV-N-Myc	100μg
D8106-1μg	pAdEasy-1	1μg
D8106-100μg	pAdEasy-1	100μg
D8107	PAdEasy-1/BJ5183	200μl
D8202-1μg	pLenti-H1	1μg
D8202-100μg	pLenti-H1	100μg
D8215-1μg	pCMV-VSV-G (慢病毒包装用质粒)	1μg
D8215-100μg	pCMV-VSV-G (慢病毒包装用质粒)	100μg
D8216-1μg	pCAG-dR8.9(慢病毒包装用质粒)	1μg
D8216-100μg	pCAG-dR8.9(慢病毒包装用质粒)	100μg

Version 2020.05.14