

## pDC315 质粒说明书

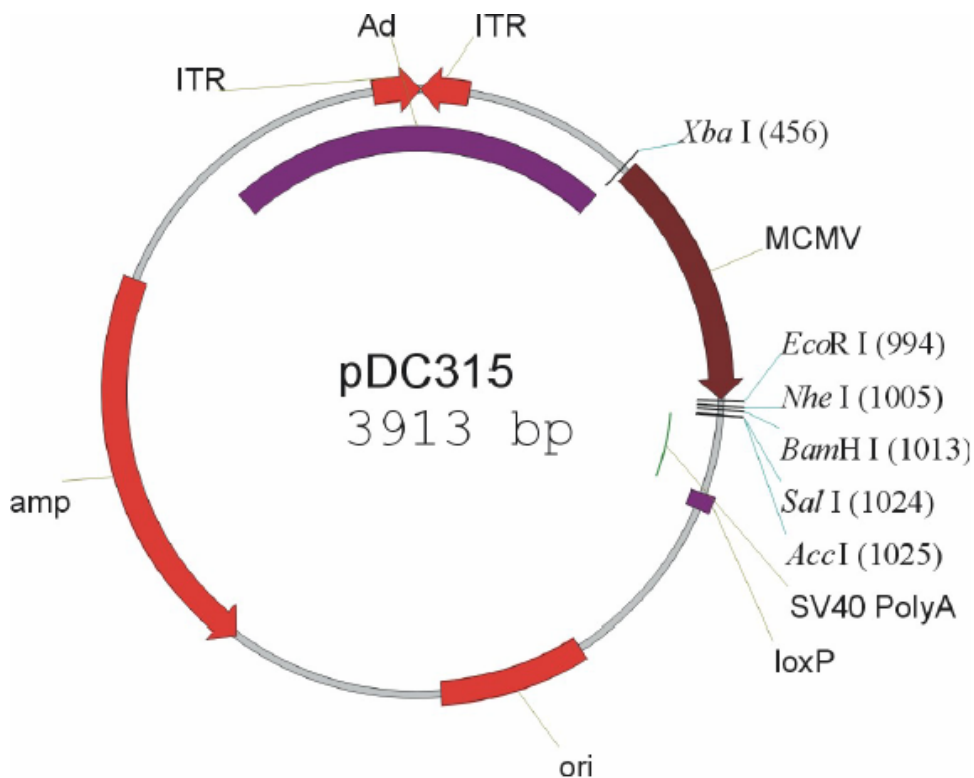
### 一、描述：

下图是 pDC315 质粒图谱。

pDC315 含有以下元件：

1. Amp<sup>r</sup>: 为质粒在 E.coli (如 DH5 $\alpha$ ) 中扩增提供氨苄抗性 (终浓度 100 $\mu$ g/ml)。
2. ori: 质粒在 E.coli 中的复制起点。
3. Ad: Ad 序列, 主要由 Ad 可以与 Ad 基因组质粒发生同源重组。
4. ITR: Ad 反向末端重复序列, 是 Ad 基因组的包装识别信号。
5. MCMV: 来自小鼠 CMV 病毒的立早启动子。
6. SV40 polyA: 来自 SV40 病毒 T 抗原的 mRNA 加尾信号。
7. loxP: 真核重组酶 (Cre) 的重组识别序列。

### 二、图谱：



多克隆位点附近序列：

Gtcttcggtctgaccaccgtagaacgcagatcgaattcaagctgctagcaaggatccagcttgcgacttcgagcaactgttt  
MCMV promoter → EcoRI NheI BamHI SalI AccI

attgcagcttataatg

SV40 polyA →

主要元件位置：

2~102: ITR

469~991: MCMV promoter (short)

1029~1188: SV40 polyA

1190~1223: loxP

1603~1903: ori

2353~3169: amp

3454~453: Ad element

3823~1: ITR

### 三、主要酶切位点：

*Xba* I : 455

*Eco*RI : 994

*Nhe* I : 1005

*Bam*HI : 1013

*Sal* I : 1024

*Acc* I : 1025

### 四、本公司推荐的测序引物序列

pDC315F: 5' acg tgg gta taa gag gcg 3' 上游离 MCS 约 70bp

pDC315R: 5' cga tgc tag acg atc cag 3' 下游离 MCS 约 110bp

### 五、使用说明

1. 质粒 pDC315 是一种真核表达质粒载体，将目的基因插入多克隆位点，转染细胞即可进行表达。
2. 带有目的基因的 pDC315 可以通过插入位点两侧的酶切位点以及目的基因内部的特异酶切位点进行鉴定。

## 附件 1 :

### 通过 pDC315 构建重组腺病毒的用户须知

1. 用户需向 Microbix Biosystems, Inc. 公司购买 pDC315 质粒 ,并与 Microbix Biosystems, Inc. 公司签订 MTA。手续由本元正阳公司代理。
2. 用户收到质粒 pDC315 后, 将自己的目的基因插入 pDC315 的多克隆位点, 构建成带有目的基因的 pDC315, 并将其寄至或送至本元正阳基因公司, 即可进行重组腺病毒的包装。
3. 用户插入的目的基因及其表达产物不能有致癌性或含对人体及环境有害的成分。
4. 用户自行更换 DNA 元件需向我公司做出说明。
5. 为了确保病毒包装的目的基因能够正确表达, 用户需对自己构建的带有目的基因的 pDC315 进行酶切鉴定, 并建议进行测序验证, 保证克隆的基因正确。并向我公司提供该鉴定方法及酶切鉴定结果。我公司将据此进行复检。
6. 由于 pDC315 本身是一种真核表达载体, 转染细胞即可介导目的基因的表达, 因此建议有条件的用户在完成质粒构建后, 将其转染细胞, 通过 ELISA、免疫组化或 Western 的方法来检测目的基因的表达, 以及检测目的基因表达后的生理活性。这样可以进一步增加实验成功的把握。
7. 为了提高包装的重组腺病毒的质量、滴度, 降低病毒空壳所占的比例, 建议用户提供 **50 $\mu$ g 高质量的质粒**, 浓度在 1 $\mu$ g/ $\mu$ l 以上, 260/280 在 1.7~2.0 之间, RNA 含量极低 (电泳检测未见 RNA 条带), 因此用户最好提供 Qiagen 等公司大提试剂盒提取的质粒。
8. 用户应采用速递或其他快捷方式递送质粒, 建议使用冰袋运输, 以防止质粒在运送过程中发生降解。
9. 用户递送质粒的同时, 将附件 2 表格填写好一并寄回本公司 (成品需进行 PCR 鉴定的用户请同时提供引物)。

附件 2 :

客户自构建质粒信息表

为使我们为您提供服务更加优质顺畅,请在进行质粒构建时认真阅读质粒说明书,切实履行用户须知中各项要求,填写好信息表,我公司郑重承诺对您所提供的信息严格保密,感谢您的合作!

目的基因信息		质粒信息	
目的基因名称		质粒名称	
主要生理功能		质粒量	体积_____μl; 浓度_____μg/μl
有无细胞毒性		质粒中 RNA 含量	A、较多( ); B、较少( ); C、极少( )
有无特殊说明		260/280 比值	
目的基因及其表达产物有无致癌性或含对人体及环境有害的成分		A. 有 ( ) B. 无 ( )	
质粒鉴定信息			
插入片段大小及插入方法			
鉴定方法说明:(本公司将根据此进行复检)		A、酶切: B、PCR(包括扩增程序及产物大小):	
酶切鉴定图谱	PCR 鉴定图谱	构建质粒最终图谱	
测序结果(推荐)		A、正确( ); B、不正确( ), 具体说明: _____	
是否对 pDC315 质粒做过改动		A、否( ); B、是( ), 具体说明: _____	
备注			

填表人: \_\_\_\_\_

日期: \_\_\_\_\_

### 附件 3 : pDC315 质粒序列

LOCUS pDC315 3913 bp dsDNA Circular

DEFINITION Puc based lox HCMV shuttle plasmid for Cre-based Ad vector rescue Cummings & Graham, unpublished

COMMENT This file is best viewed with a free Vector NTI Viewer:

COMMENT <http://www.informaxinc.com/view/viewer.html>

COMMENT VNTREPLTYPE|Plasmid|

COMMENT VNTEXTCHREPL|Bacteria|

FEATURES Location/Qualifiers

promoter 469..991  
/note="MCMV promoter - Short"  
/label=MCMV

misc\_feature 1190..1223  
/label=loxP

polyA\_signal 1029..1188  
/label=SV40\PolyA

rep\_origin 1603..1903  
/label=ori

CDS complement(2353..3169)  
/label=amp

misc\_feature 3454..453  
/label=Ad

CDS 3823..1  
/label=ITR

CDS complement(2..102)

/label=ITR

ORIGIN

1 ttcatcaata atatacctta ttttgattg aagccaatat gataatgagg gggaggagt  
61 tgtgacgtgg cgcggggcgt gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg  
121 atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagt acgttttgg  
181 tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat ttctgcgcgg ttttaggcgg atgtttagt  
241 aaatttgggc gtaaccgagt aagattggc cttttcgcg ggaaaactga ataagaggaa  
301 gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat attgtctag ggccgcgggg  
361 actttgaccg ttacgtgga gactcgcga ggtgttttc tcagggttt tccgcgttc  
421 gggcaaaagt tggcgttta ttattatag cagntctaga gatatactga gtcattaggg  
481 actttccaat gggtttggc cagtacataa ggtcaatagg ggtgaatcaa caggaaagtc  
541 ccattggagc cagtacact gagtcaatag ggactttcca ttgggtttg cccagtacaa  
601 aaggtaata ggggggtgagt caatgggtt ttccattat tggcacgtac ataaggtcaa  
661 taggggtgag tcattgggtt ttccagcca ttaattaa acgcatgta cttccacc  
721 attgacgtca atgggctatt gaaactatg caacgtgacc ttaaacggt actttccat  
781 agctgattaa tgggaaagta ccgtctcga gccaatcac gtcaatggga agtgaaaggg  
841 cagccaaaac gtaacaccg cccggtttc cctggaaat tcatattgg cactcattct  
901 attggctgag ctgcgttcta cgtgggtata agaggcgcga ccagcgtcgg taccgtcga  
961 gtcttcggtc tgaccaccg agaacgcaga tcgaattcaa gctgctagca aggatccagc  
1021 ttgtcgactt cgagcaactt gttattgca gttataatg gttacaaata aagcaatagc  
1081 atcaciaaatt tcaciaataa agcattttt tcaactgatt ctagttgtgg ttgtccaaa  
1141 ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc gtctagcacc gaagatccaa taacttcgta  
1201 tagcatacat tatacgaagt tataagtagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct

1261 gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt  
1321 aaagcctggg gtcctaatag agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc  
1381 gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaa gaatcggcca acgcgcgggg  
1441 agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg  
1501 gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca  
1561 gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac  
1621 cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac  
1681 aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataag ataccaggcg  
1741 tttcccctg gaagetccct cgtgcgctct cctgttccga cctgccgct taccggatac  
1801 ctgtccgct tctccctc gggaagcgtg gcgcttctc aatgctcag ctgtaggat  
1861 ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctcaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag  
1921 cccgaccgct gcgccttacc cggtactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac  
1981 ttatgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt  
2041 gctacagagt tctgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttgg  
2101 atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc  
2161 aaacaaacca ccgctgtag cgggtggttt ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga  
2221 aaaaaaggat ctaagaaga tctttgac tttctacgg ggtctgacgc tcaagtgaac  
2281 gaaaactcac gtaaggat tttggtcag agattatcaa aaaggatct cacctagatc  
2341 ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct  
2401 gacagttacc aatgcttaat cagtgggca cctatctcag cgatctgtct attcgttca  
2461 tccatagttg cctgactccc cgtcgttagc ataactacga tacgggaggg cttaccatct  
2521 ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga ttatcagca  
2581 ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgctcc  
2641 atccagtcta ttaattgtg ccgggaagct agagtaagta gttcggcagt taatagttg

2701 cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct  
2761 tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa  
2821 aaagcggta gtccttcgg tctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta  
2881 tcaactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc  
2941 ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg  
3001 agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat aataccgcg cacaatagcag aactttaaaa  
3061 gtgctcatca ttgaaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg  
3121 agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttacttc  
3181 accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg cgcacaaaaa ggaataagg  
3241 gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttctttttc aatattattg aagcatttat  
3301 cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta ttagaaaaa taaacaata  
3361 ggggttcgc gcacatttc cggaaaagt ccacctgacg tctaagaaac cattattatc  
3421 atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc actctaggca aatagcacc ctcccgtcc  
3481 agaacaacat acagcgcttc acagcggcag cctaacagtc agcctacca gtaaaaaaga  
3541 aaacctatta aaaaaacacc actcgacag gcaccagctc aatcagtcac agtgtaaaaa  
3601 agggccaagt gcagagcgag tatatatagg actaaaaat gacgtaacgg ttaaagtcca  
3661 caaaaaacac ccagaaaacc gcacggaac ctacgccag aaacgaaagc caaaaaacc  
3721 acaacttct caaatgta cttcgtttt cccacgttac gtaactccc attttaagaa  
3781 aactacaatt cccaacacat acaagtact cggcctaaa acctagtc cccgcccgt  
3841 tcccagccc cgcgccacgt cacaaactcc acccctcat tatcatattg gttcaatcc  
3901 aaaataaggt ata