**人膜蛋白cDNA质粒库pENTER载体信息及使用说明**

1. pENTER载体图谱

****

1. 载体序列及主要元件注释

TTCGAATTTAAATTAATTAACATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACTGAATAAGAGGAAGTGAAATCTGAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCG**TAATACTGTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC**CGCTAG**TAATACGACTCACTATA**GGGAGAGGATCC**GGTACC**GAGGAGATCTGCCGCC**GCGATCGCC**GGCGCGCCAGATCTCAAGCTTAACTAGCTAGCGGACCG**ACGCGT**ACGCGGCCGCTC**GAGGATTATAAGGATGACGACGATAAATTCGTCGAGCACCACCACCACCACCAC**TAATAAGGTTTATCCGATCCACCGGATCTAGATAAGATATCCGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAACGCGGATCTGGGCGTGGTTAAGGGTGGGAAAGAATATATAAGGTGGGGGTCTTATGTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAGCCGCCGCCGCCATGAGCACCAACTCGTTTGATGGAAGCATTGTGAGCTCATATTTGACAACGCGCATGCCCCCATGGGCCGGGGTGCGTCAGAATGTGATGGGCTCCAGCATTGATGGTCGCCCCGTCCTGCCCGCAAACTCTACTACCTTGACCTACGAGACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACTGCAGCCTCCGCCGCCGCTTCAGCCGCTGCAGCCACCGCCCGCGGGATTGTGACTGACTTTGCTTTCCTGAGCCCGCTTGCAAGCAGTGCAGCTTCCCGTTCATCCGCCCGCGATGACAAGTTGACGGCTCTTTTGGCACAATTGGATTCTTTGACCCGGGAACTTAATGTCGTTTCTCAGCAGCTGTTGGATCTGCGCCAGCAGGTTTCTGCCCTGAAGGCTTCCTCCCCTCCCAATGCGGTTTAAAACATAAATAAAAAACCAGACTCTGTTTGGATTTGGATCAAGCAAGTGTCTTGCTGTCTTTATTTAGGGGTTTTGCGCGCGCGGTAGGCCCGGGACCAGCGGTCTCGGTCGTTGAGGGTCCTGTGTATTTTTTCCAGGACGTGGTAAAGGTGACTCTGGATGTTCAGATACATGGGCATAAGCCCGTCTCTGGGGTGGAGGTAGCACCACTGCAGAGCTTCATGCTGCGGGGTGGTGTTGTAGATGATCCAGTCGTAGCAGGAGCGCTGGGCGTGGTGCCTAAAAATGTCTTTCAGTAGCAAGCTGATTGCCAGGGGCAGGCCCTTGGTGTAAGTGTTTACAAAGCGGTTAAGCTGGGATGGGTGCATACGTGTTTAAACTAGGGATAACAGGGTAATCGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACACGTACGACC**ATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCCGGGCAGTACGCACCCTCGCCGCCGCGTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGATCCAGACCGCCACATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGAGCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGA**CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGTAGGGATAACAGGGTAATGTTTAAACTATAAAATGCAAGGTGCTGCTCAAAAAATCAGGCAAAGCCTCGCGCAAAAAAGAAAGCACATCGTAGTCATGCTCATGCAGATAAAGGCAGGTAAGCTCCGGAACCACCACAGAAAAAGACACCATTTTTCTCTCAAACATGTCTGCGGGTTTCTGCATAAACACAAAATAAAATAACAAAAAAACATTTAAACATTAGAAGCCTGTCTTACAACAGGAAAAACAACCCTTATAAGCATAAGACGGACTACGGCCATGCCGGCGTGACCGTAAAAAAACTGGTCACCGTGATTAAAAAGCACCACCGACAGCTCCTCGGTCATGTCCGGAGTCATAATGTAAGACTCGGTAAACACATCAGGTTGATTCACATCGGTCAGTGCTAAAAAGCGACCGAAATAGCCCGGGGGAATACATACCCGCAGGCGTAGAGACAACATTACAGCCCCCATAGGAGGTATAACAAAATTAATAGGAGAGAAAAACACATAAACACCTGAAAAACCCTCCTGCCTAGGCAAAATAGCACCCTCCCGCTCCAGAACAACATACAGCGCTTCCACAGCGGCAGCCATAACAGTCAGCCTTACCAGTAAAAAAGAAAACCTATTAAAAAAACACCACTCGACACGGCACCAGCTCAATCAGTCACAGTGTAAAAAAGGGCCAAGTGCAGAGCGAGTATATATAGGACTAAAAAATGACGTAACGGTTAAAGTCCACAAAAAACACCCAGAAAACCGCACGCGAACCTACGCCCAGAAACGAAAGCCAAAAAACCCACAACTTCCTCAAATCGTCACTTCCGTTTTCCCACGTTACGTCACTTCCCATTTTAAGAAAACTACAATTCCCAACACATACAAGTTACTCCGCCCTAAAACCTACGTCACCCGCCCCGTTCCCACGCCCCGCGCCACGTCACAAACTCCACCCCCTCATTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGATGTTAATTAATTTAAATTCGAACATGCATGGATCCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGCCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCCGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTTTGTTAAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGATCGAATTAATTC

**备注**：

1. 该pENTER-ORF重组载体，一般是通过AsiSI-MluI将人源基因克隆至pENTER载体，可通过酶切进行验证。
2. 该pENTER载体是一个低拷贝载体，质粒小提之后的浓度要比高拷贝质粒的浓度低一些，一般小提之后的浓度在100-200 ng/uL。
3. 插入的目的基因没有终止密码子，目的是与载体上的Flag & His tag融合。
4. 该pENTER-ORF重组载体，主要的目的是快速获得目的基因，不保证该基因的蛋白表达情况，因为蛋白表达的情况受很多因素影响，比如基因本身的性质（基因含有稀有密码子、基因不稳定、基因有毒性等）。不过，该pENTER-ORF重组载体可以用于直接转染细胞进行蛋白表达检测， 90%以上的基因都可以在293细胞中检测到蛋白表达。
5. 使用时建议进行划板挑克隆操作。
6. 扩增菌液抽提质粒时建议培养基中Kan的终浓度为30 ug/mL。
7. 测序引物序列如下：

F：GCACCAAAATCAACGGGACTTTCC

R：CCTCTACAAATGTGGTATGGC

F为CMV启动子的测序引物序列，一般公司都有通用引物序列；R是针对pENTER载体设计的，可以测到目的基因3’端的Flag和His tag。