

pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo

产品编号	产品名称	包装
D2723-1 μ g	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo	1 μ g
D2723-100 μ g	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo	100 μ g

产品简介:

- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo是碧云天研发的用于在哺乳动物细胞中同时表达N端带有Flag标签(Flag Tag, DYKDDDDK)的目的蛋白、增强绿色荧光蛋白EGFP和新霉素(Neomycin)抗性基因的表达表达质粒。
- 本质粒含有的CMV启动子可以高效启动目的基因的表达; 可以方便地使用抗Flag标签的抗体(AF0036/AF5051/AF519)来检测目的蛋白; 同时可以通过P2A共表达增强绿色荧光蛋白EGFP, 便于通过EGFP的荧光特性监测目的蛋白的表达情况。本质粒的表达效果可以参考图1。

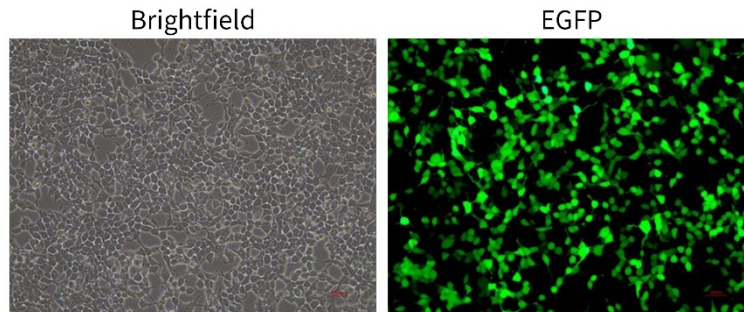
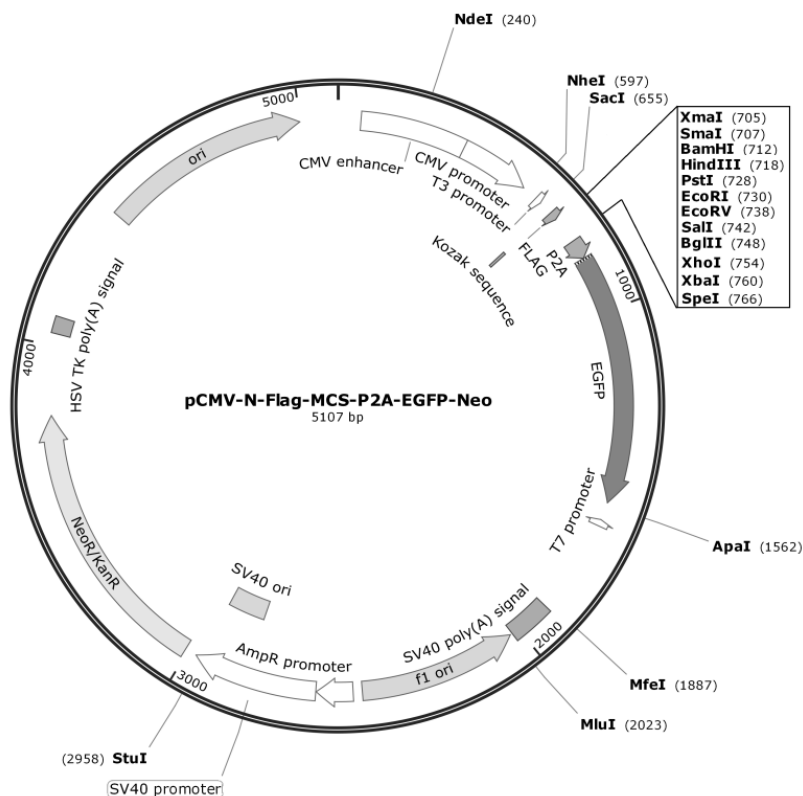


图1. 碧云天pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片, 右侧为荧光照片。本图仅供参考, 实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 本质粒在多克隆位点和EGFP的编码序列之间含有P2A肽序列。P2A是一个可以被理解为含有19个氨基酸残基(ATNFSLLKQAGDVEENPGP)的“自剪切”小肽。但实际的过程并不是发生自剪切, 而是使核糖体跳过P2A等2A元件C端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用, 最终导致2A序列末端和下游产物分离。上游目的基因表达蛋白的C端将会添加一些额外的P2A残基(GSGATNFSLLKQAGDVEENPG), 而下游蛋白的N端将会有额外的脯氨酸。在P2A肽的N端加入GSG序列, 可提高剪切效率 [1,2]。
- 本质粒为卡那霉素(Kanamycin)和新霉素(Neomycin)抗性。可利用其卡那霉素抗性, 转化大肠杆菌后筛选阳性克隆。转染哺乳动物细胞后, 可使用G-418 (ST081/ST082)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV enhancer	67-370
CMV promoter	371-574
T3 promoter	620-638
FLAG	679-702
P2A	781-837
EGFP	838-1557
T7 promoter	1609-1627
SV40 poly(A) signal	1901-2022
f1 ori	2029-2484
AmpR promoter	2511-2615
SV40 promoter	2617-2974
SV40 ori	2825-2960
NeoR/KanR	3009-3803
HSV TK poly(A) signal	4035-4082
Ori	4411-4999

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EI



➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo的多克隆位点的详细图谱如下:

```

                                Flag tag
                                D Y K D D D D K
SacI
651 GAGCTCCACC GCGGTGGCGG CCGCCATGGA TTACAAGGAT GACGACGATA
    CTCGAGGTGG CGCCACCGCC GGCGGTACCT AATGTTCCCTA CTGCTGCTAT
    XmaI                PstI
    SmaI   BamHI HindIII   EcoRI EcoRV SalI BglII
701 AGAGCCCGGG CGGATCCAAG CTTCTGCAGG AATTCGATAT CGTCGACAGA
    TCTCGGGCCC GCCTAGGTTC GAAGACGTCC TTAAGCTATA GCAGCTGTCT
                                P2A sequence
    XhoI XbaI SpeI   G S G   A T N F S L L
751 TCTCTCGAGT CTAGAACTAG TGGAAGCGGA GCTACTAACT TCAGCCTGCT
    AGAGAGCTCA GATCTTGATC ACCTTCGCTT CGATGATTGA AGTCGGACGA

    K Q A G D V E E N P G P EGFP sequence
801 GAAGCAGGCT GGAGACGTGG AGGAGAACCC TGGACCTATG GTGAGCAAGG
    CTTCGTCCGA CCTCTGCACC TCCTCTTGGG ACCTGGATAC CACTCGTTCC

851 GCGAGGAGCT GTTCACCGGG GTGGTGCCCA TCCTGGTCGA GCTGGACGGC
    CGCTCCTCGA CAAGTGGCCC CACCACGGGT AGGACCAGCT CGACCTGCCG

901 GACGTAAACG GCCACAAGTT CAGCGTGTCC GGCGAGGGCG AGGGCGATGC
    CTGCATTTGC CGGTGTTCAA GTGCACACAGG CCGCTCCCGC TCCCCTACG

951 CACCTACGGC AAGCTGACCC TGAAGTTCAT CTGCACCACC GGCAAGCTGC
    GTGGATGCCG TTCGACTGGG ACTTCAAGTA GACGTGGTGG CCGTTCGACG

1001 CCGTGCCCTG GCCCACCTC GTGACCACCC TGACCTACGG CGTGCAGTGC
    GGCACGGGAC CGGTGGGAG CACTGGTGGG ACTGGATGCC GCACGTACG

1051 TTCAGCCGCT ACCCCGACCA CATGAAGCAG CACGACTTCT TCAAGTCCGC
    
```

AAGTCGGCGA TGGGGCTGGT G TACTTCGTC GTGCTGAAGA AGTTCAGGCG

1101 CATGCCCGAA GGCTACGTCC AGGAGCGCAC CATCTTCTTC AAGGACGACG
GTACGGGCTT CCGATGCAGG TCCTCGCGTG GTAGAAGAAG TTCCTGCTGC

1151 GCAACTACAA GACCCGCGCC GAGGTGAAGT TCGAGGGCGA CACCCTGGTG
CGTTGATGTT CTGGGCGCGG CTCCACTTCA AGCTCCCGCT GTGGGACCAC

1201 AACC GCATCG AGCTGAAGGG CATCGACTTC AAGGAGGACG GCAACATCCT
TTGGCGTAGC TCGACTTCCC GTAGCTGAAG TTCCTCCTGC CGTTGTAGGA

1251 GGGGCACAAG CTGGAGTACA ACTACAACAG CCACAACGTC TATATCATGG
CCCCGTGTTT GACCTCATGT TGATGTTGTC GGTGTTGCAG ATATAGTACC

1301 CCGACAAGCA GAAGAACGGC ATCAAGGTGA ACTTCAAGAT CCGCCACAAC
GGCTGTTTCT CTTCTTGCCG TAGTTCCACT TGAAGTTCTA GGCGGTGTTG

1351 ATCGAGGACG GCAGCGTGCA GCTCGCCGAC CACTACCAGC AGAACACCCC
TAGCTCCTGC CGTCGCACGT CGAGCGGCTG GTGATGGTCG TCTTGTGGGG

1401 CATCGGCGAC GGCCCCGTGC TGCTGCCCGA CAACCACTAC CTGAGCACCC
GTAGCCGCTG CCGGGGCACG ACGACGGGCT GTTGGTGATG GACTCGTGGG

1451 AGTCCGCCCT GAGCAAAGAC CCCAACGAGA AGCGCGATCA CATGGTCCTG
TCAGGCGGGA CTCGTTTCTG GGGTTGCTCT TCGCGTAGT GTACCAGGAC

1501 CTGGAGTTCG TGACCGCCGC CGGGATCACT CTCGGCATGG ACGAGCTGTA
GACCTCAAGC ACTGGCGGCG GCCCTAGTGA GAGCCGTACC TGCTCGACAT

ApaI

1551 CAAGTAAAGG CCCGGTACCT TAATTAATTA AGGTACCAGG TAAGTGTACC
GTTTCATCCC GGGCCATGGA ATTAATTAAT TCCATGGTCC ATTCACATGG

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo中已有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc113I	AccB7I	AclI	AcvI
AfeI	AflII	AgeI	AhdI	Aor13HI	Aor51HI	AscI
AsiGI	AsiSI	Asp700I	AspEI	BaeI	BbrPI	BbsI
BbvCI	BfrI	BlpI	BmcAI	BmeRI	BoxI	BpiI
Bpu1102I	BpuAI	BseAI	BsePI	BshTI	BsiWI	Bsp13I
Bsp68I	Bsp1720I	BspEI	BspQI	BspTI	BssHII	BssNAI
Bst6I	Bst98I	Bst1107I	BstAFI	BstEII	BstENI	BstPI
BstPAI	BstV2I	BstZ17I	BtuMI	CelII	CspAI	DriI
Eam1104I	Eam1105I	EarI	Eco47III	Eco72I	Eco91I	EcoNI
EcoO65I	FseI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KflI
Kpn2I	Ksp632I	LguI	MauBI	MreI	MroI	MroXI
MspCI	MssI	Nb.BbvCI	NruI	Nt.BbvCI	Nt.BspQI	PalAI
PaqCI	PauI	PciSI	PdmI	Pfl123II	PflMI	PI-PspI
PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmeI	PmlI	PpuMI	PshAI
Psp5II	Psp1406I	PspCI	PspEI	PspLI	PspPPI	PspXI
PsrI	PteI	RgaI	RigI	RruI	SanDI	SapI
SbfI	ScaI	SdaI	SfaAI	SgfI	SgrAI	SgrDI
SgsI	SmiI	Sse8387I	SwaI	Van91I	Vha464I	XagI
XcmI	XmnI	ZrmI				

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo中的单酶切位点包括:

AccI	GT`MK,AC	743	MscI	TGG CCA	3219
ApaI	G,GGCC`C	1562	NarI	GG`CG,CC	3137
ApaLI	G`TGCA,C	4741	NdeI	CA`TA,TG	240
BamHI	G`GATC,C	712	NheI	G`CTAG,C	597
BcgI	,NN`(N) ₁₀ CGA(N) ₆ TGC(N) ₁₀ ,NN`	928	NotI	GC`GGCC,GC	668
BclI	T`GATC,A	1794	Paer7I	C`TCGA,G	754
BglII	A`GATC,T	748	PciI	A`CATG,T	5055
BmgBI	CAC GTC	816	PflFI	GACN`N,NGTC	3255

BmtI	G,CTAG`C	601	PluTI	G,GCGC`C	3140
BsaI	GGTCTCN`NNNN,	4126	PspOMI	G`GGCC,C	1558
BsaXI	,NNN`(N) ₉ ACNNNNNCTCC(N) ₇ ,NNN`	2187	PstI	C,TGCA`G	728
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	806	PvuI	CG,AT`CG	1640
BspDI	AT`CG,AT	2977	RsrII	CG`GWC,CG	3653
BsrDI	GCAATG,NN`	3370	SacI	G,AGCT`C	655
BsrGI	T`GTAC,A	1547	SacII	CC,GC`GG	662
BstBI	TT`CG,AA	3819	SalI	G`TCGA,C	742
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	663	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	2912
ClaI	AT`CG,AT	2977	SfoI	GGC GCC	3138
CspCI	,NN`(N) ₁₁ CAANNNNNGTGG(N) ₁₀ ,NN`	382	SmaI	CCC GGG	707
DraIII	CAC,NNN`GTG	2253	SnaBI	TAC GTA	346
Eco53kI	GAG CTC	653	SpeI	A`CTAG,T	766
EcoRI	G`AATT,C	730	SrfI	GCCC GGGC	707
EcoRV	GAT ATC	738	StuI	AGG CCT	2958
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	806	TspMI	C`CCGG,G	705
HindIII	A`AGCT,T	718	Tth111I	GACN`N,NGTC	3255
HpaI	GTT AAC	1900	XbaI	T`CTAG,A	760
KasI	G`GCGC,C	3136	XhoI	C`TCGA,G	754
MfeI	C`AATT,G	1887	XmaI	C`CCGG,G	705
MluI	A`CGCG,T	2023			

➢ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo质粒中对于插入片段进行测序时，推荐使用的正向测序引物T3和反向测序引物EGFP primer的序列如下：

T3 primer (620-639): 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'

EGFP primer (840-856): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➢ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo的全序列信息请参考碧云天网站上该质粒的信息。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D2723-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg
D2723-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-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. 100μg包装的本产品质粒浓度为0.1μg/μl，共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。
3. pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo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，需注意插入基因片段和tag之间的读码框要一致，即需要避免发生移码突变。构建的质粒可以用常规方法转染细胞。

参考文献：

1. Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, et al. PLoS One. 2011. 6(4):e18556.
2. Ryan MD, King AM, Thomas GP. J Gen Virol. 1991. 72(11):2727-32.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
ST081	G-418	1g
ST082	G-418	5g
D2633	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo	1μg/100μg
D2640	pCMV-MCS-P2A-EGFP-HA-Neo	1μg/100μg
D2673	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Myc-Neo	1μg/100μg
D2734	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg/100μg
D2738	pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg/100μg
D2757	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg/100μg

D2795	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg	1µg/100µg
D2796	pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg	1µg/100µg
D2797	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-mCherry-Hyg	1µg/100µg
D2798	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg	1µg/100µg
D2799	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur	1µg/100µg
D2801	pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur	1µg/100µg
D2803	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-mCherry-Pur	1µg/100µg
D2807	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla	1µg/100µg
D2808	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-EGFP-Bla	1µg/100µg
D2809	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Bla	1µg/100µg
D2810	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1µg/100µg
D2811	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1µg/100µg
D2812	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1µg/100µg
D2813	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Zeo	1µg/100µg
D2814	pCMV-MCS-P2A-EGFP-HA-Bla	1µg/100µg
D2819	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Myc-Bla	1µg/100µg
D2822	pCMV-MCS-P2A-mCherry-HA-Hyg	1µg/100µg
D2823	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Myc-Hyg	1µg/100µg
D2824	pCMV-MCS-P2A-mCherry-HA-Pur	1µg/100µg
D2825	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Myc-Pur	1µg/100µg
D2826	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur	1µg/100µg
D2827	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla	1µg/100µg
D2828	pCMV-MCS-P2A-EGFP-HA-Zeo	1µg/100µg
D2829	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Myc-Zeo	1µg/100µg

Version 2022.03.18