

## pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo

产品编号	产品名称	包装
D2738-1μg	pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg
D2738-100μg	pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo	100μg

### 产品简介:

- pCMV-N-His-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His标签(His tag, HHHHHH)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His标签的抗体(AF5060/AH367)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。

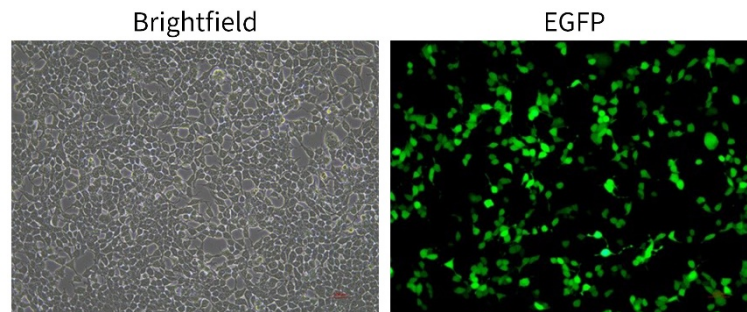


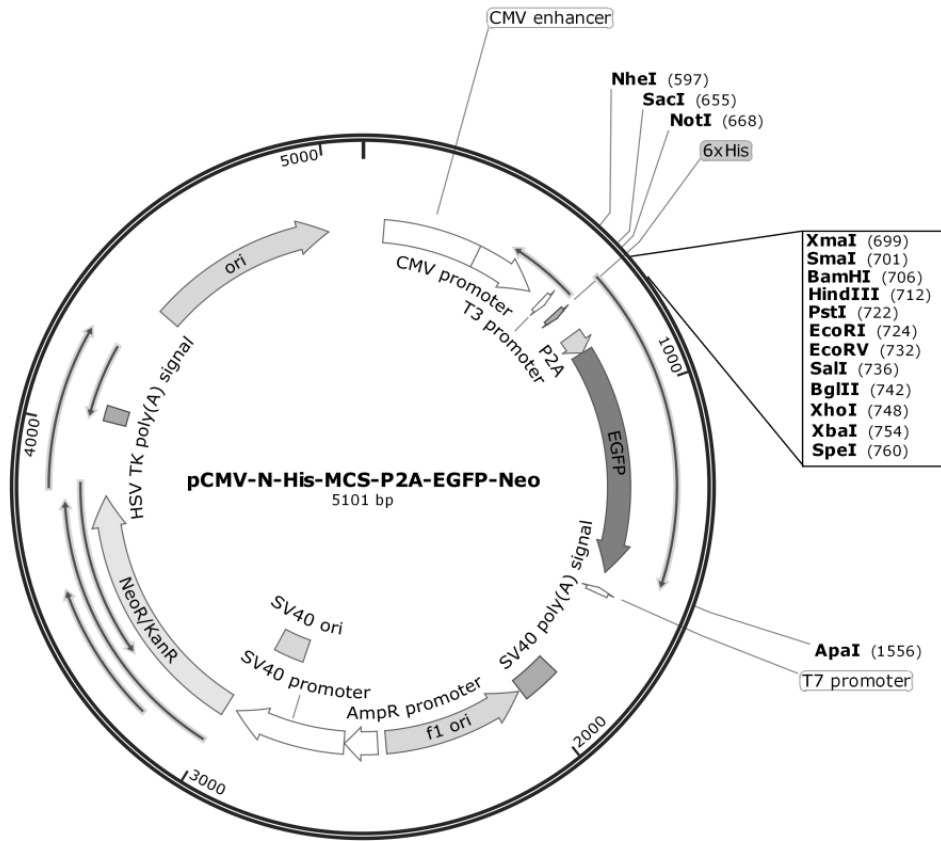
图1. 碧云天pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片, 右侧为荧光照片。本图仅供参考, 实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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-His-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
6xHis	679-696
P2A	766-831
EGFP	832-1551
T7 promoter	1603-1621
SV40 poly(A) signal	1895-2016
f1 ori	2023-2478
AmpR promoter	2505-2609
SV40 promoter	2611-2968
SV40 ori	2819-2954
NeoR/KanR	3003-3797
HSV TK poly(A) signal	4029-4076
ori	4405-4993

- pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo质粒(5101bp)的图谱如下:



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

			His tag								
	SacI					H H H H H H		XmaI			
651	GAGCTCCACC	GCGGTGGCGG	CCGCCATGCA	TCATCACCAT	CACCATAGCC			SmaI			
	CTCGAGGTGG	CGCCACCGCC	GGCGGTACGT	AGTAGTGGTA	GTGGTATCGG						
			P2A sequence								
			A	T	N	F	S	L	L	K	Q
751	GAGTCTAGAA	CTAGTGGAAAG	CGGAGCTACT	AACTTCAGCC	TGCTGAAGCA						
	CTCAGATCTT	GATCACCTTC	GCCTCGATGA	TTGAAGTCGG	ACGACTTCGT						
			EGFP sequence								
801	GGCTGGAGAC	GTGGAGGAGA	ACCCTGGACC	TATGGTGAGC	AAGGGCGAGG						
	CCGACCTCTG	CACCTCCTCT	TGGGACCTGG	ATACCACTCG	TTCCCGCTCC						
851	AGCTGTTTAC	CGGGGTGGTG	CCCATCCTGG	TCGAGCTGGA	CGGCGACGTA						
	TCGACAAGTG	GCCCCACCAC	GGGTAGGACC	AGCTCGACCT	GCCGCTGCAT						
901	AACGGCCACA	AGTTCAGCGT	GTCCGGCGAG	GGCGAGGGCG	ATGCCACCTA						
	TTGCCGGTGT	TCAAGTCGCA	CAGGCCGCTC	CCGCTCCCGC	TACGGTGGAT						
951	CGGCAAGCTG	ACCCTGAAGT	TCATCTGCAC	CACCGGCAAG	CTGCCCCTGC						
	GCCGTTTCGAC	TGGGACTTCA	AGTAGACGTG	GTGGCCGTTC	GACGGGCACG						
1001	CCTGGCCCAC	CCTCGTGACC	ACCCTGACCT	ACGGCGTGCA	GTGCTTCAGC						
	GGACCGGGTG	GGAGCACTGG	TGGGACTGGA	TGCCGCACGT	CACGAAGTCG						

1051 CGCTACCCCG ACCACATGAA GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC  
GCGATGGGGC TGGTGTACTT CGTCGTGCTG AAGAAGTTCA GGCGGTACGG

1101 CGAAGGCTAC GTCCAGGAGC GCACCATCTT CTTCAAGGAC GACGGCAACT  
GCTTCCGATG CAGGTCCTCG CGTGGTAGAA GAAGTTCCTG CTGCCGTTGA

1151 ACAAGACCCG CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCGC  
TGTTCTGGGC GCGGCTCCAC TTCAAGCTCC CGCTGTGGGA CCACTTGCGC

1201 ATCGAGCTGA AGGGCATCGA CTTCAAGGAG GACGGCAACA TCCTGGGGCA  
TAGCTCGACT TCCCGTAGCT GAAGTTCCTC CTGCCGTTGT AGGACCCCGT

1251 CAAGCTGGAG TACAAC TACA ACAGCCACAA CGTCTATATC ATGGCCGACA  
GTTTCGACCTC ATGTTGATGT TGTCGGTGTT GCAGATATAG TACCGGCTGT

1301 AGCAGAAGAA CGGCATCAAG GTGAACTTCA AGATCCGCCA CAACATCGAG  
TCGTCTTCTT GCCGTAGTTC CACTTGAAGT TCTAGGCGGT GTTGTAGCTC

1351 GACGGCAGCG TGCAGCTCGC CGACCACTAC CAGCAGAACA CCCCATCGG  
CTGCCGTCGC ACGTCGAGCG GCTGGTGATG GTCGTCTTGT GGGGGTAGCC

1401 CGACGGCCCC GTGCTGCTGC CCGACAACCA CTACCTGAGC ACCCAGTCCG  
GCTGCCGGGG CACGACGACG GGCTGTTGGT GATGGACTCG TGGGTCAGGC

1451 CCCTGAGCAA AGACCCCAAC GAGAAGCGCG ATCACATGGT CCTGCTGGAG  
GGGACTCGTT TCTGGGGTTG CTCTTCGCGC TAGTGTACCA GGACGACCTC

1501 TTCGTGACCG CCGCCGGGAT CACTCTCGGC ATGGACGAGC TGTACAAGTA  
AAGCACTGGC GGCGGCCCTA GTGAGAGCCG TACCTGCTCG ACATGTTTCAT  
ApaI

1551 AGGGCCCGGT ACCTTAATTA ATTAAGGTAC CAGGTAAGTG TACCCAATTC  
TCCCGGGCCA TGAATTAAT TAATTCATG GTCCATTAC ATGGGTTAAG

➤ pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc113I	AccB7I	AclI	AcvI
AfeI	AflIII	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	Kpn2I
Ksp632I	LguI	MauBI	MreI	MroI	MroXI	MspCI
MssI	NruI	PalAI	PauI	PciSI	PdmI	Pfl123II
PflMI	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmeI	PmlI
PpuMI	PshAI	Psp5II	Psp1406I	PspCI	PspEI	PspLI
PspPPI	PspXI	PsrI	RgaI	RigI	SanDI	SapI
SbfI	ScaI	SdaI	SfaAI	SgfI	SgrAI	SgrDI
SgsI	SmiI	Sse8387I	SwaI	Van91I	Vha464I	XagI
XcmI	XmnI	ZrmI				

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

AccI	GT`MK, AC	737	MscI	TGG CCA	3213
ApaI	G, GGCC`C	1556	NarI	GG`CG, CC	3131
ApaLI	G`TGCA, C	4735	NdeI	CA`TA, TG	240
BamHI	G`GATC, C	706	NheI	G`CTAG, C	597
BcgI	, NN` (N) <sub>10</sub> CGA(N) <sub>6</sub> TGC(N) <sub>10</sub> , NN`	922	NotI	GC`GGCC, GC	668
BclI	T`GATC, A	1788	Paer7I	C`TCGA, G	748
BglII	A`GATC, T	742	PciI	A`CATG, T	5049

BmgBI	CAC GTC	810	PflFI	GACN`N,NGTC	3249
BmtI	G,CTAG`C	601	PluTI	G,GCGC`C	3134
BsaI	GGTCTCN`NNNN,	4120	PspOMI	G`GGCC,C	1552
BsaXI	,NNN`(N) <sub>9</sub> ACNNNNNCTCC(N) <sub>7</sub> ,NNN`	2181	PstI	C,TGCA`G	722
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	800	PvuI	CG,AT`CG	1634
BspDI	AT`CG,AT	2971	RsrII	CG`GWC,CG	3647
BsrDI	GCAATG,NN`	3364	SacI	G,AGCT`C	655
BsrGI	T`GTAC,A	1541	SacII	CC,GC`GG	662
BstBI	TT`CG,AA	3813	SalI	G`TCGA,C	736
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	663	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	2906
Clal	AT`CG,AT	2971	SfoI	GGC GCC	3132
CspCI	,NN`(N) <sub>11</sub> CAANNNNNGTGG(N) <sub>10</sub> ,NN`	382	SmaI	CCC GGG	701
DraIII	CAC,NNN`GTG	2247	SnaBI	TAC GTA	346
Eco53kI	GAG CTC	653	SpeI	A`CTAG,T	760
EcoRI	G`AATT,C	724	SrfI	GCCC GGGC	701
EcoRV	GAT ATC	732	StuI	AGG CCT	2952
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	800	TspMI	C`CCGG,G	699
HindIII	A`AGCT,T	712	Tth111I	GACN`N,NGTC	3249
HpaI	GTT AAC	1894	XbaI	T`CTAG,A	754
KasI	G`GCGC,C	3130	XhoI	C`TCGA,G	748
MfeI	C`AATT,G	1881	XmaI	C`CCGG,G	699
MluI	A`CGCG,T	2017			

➤ pCMV-N-His-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 (834-850): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-His-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
D2738-1μg	pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg
D2738-100μg	pCMV-N-His-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-His-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
C0533-0.5ml	Lipo8000™转染试剂	0.5ml
C0533-1.5ml	Lipo8000™转染试剂	1.5ml
C0533-7.5ml	Lipo8000™转染试剂	7.5ml
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
D2723	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg/100μg
D2734	pCMV-N-HA-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 2022.03.21