

pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg

产品编号	产品名称	包装
D2795-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg	1μg
D2795-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg	100μg

产品简介:

- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg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、红色荧光蛋白mCherry和潮霉素B (Hygromycin B)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共表达红色荧光蛋白mCherry，便于通过mCherry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。

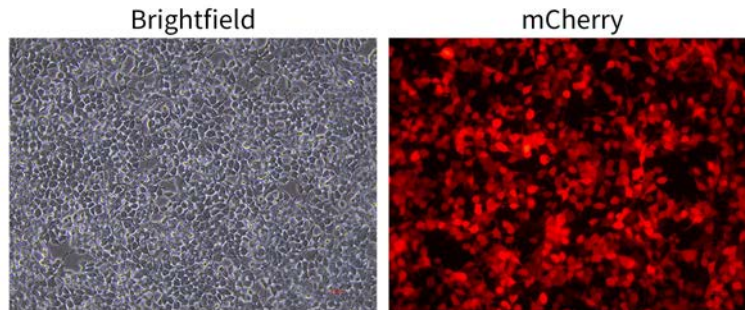
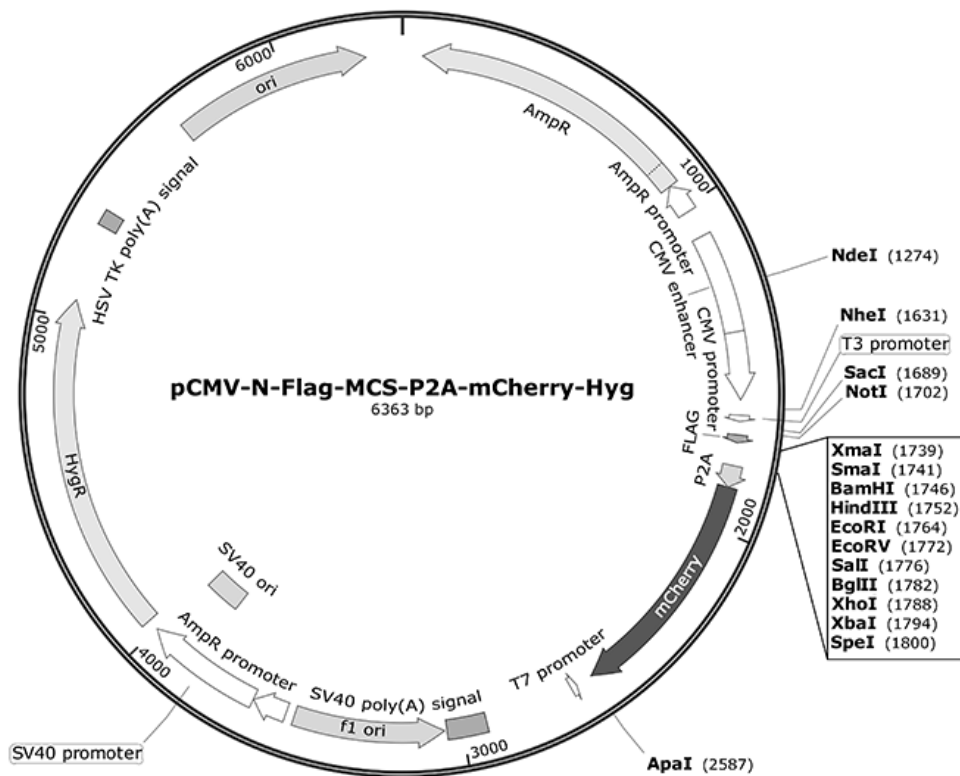


图1. 碧云天pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。本图仅供参考，实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 本质粒在多克隆位点和mCherry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]。
- 本质粒为氨苄青霉素(Ampicillin)和潮霉素B (Hygromycin B)抗性。可利用其氨苄青霉素抗性，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Hygromycin B (ST1389)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg质粒的主要信息如下：

Feature Nucleotide	Position
AmpR	63-923
AmpR promoter	924-1016
CMV enhancer	1101-1404
CMV promoter	1405-1608
T3 promoter	1654-1672
FLAG	1713-1736
P2A	1806-1871
mCherry	1872-2582
T7 promoter	2634-2652
SV40 poly(A) signal	2926-3047
f1 ori	3054-3509
AmpR promoter	3536-3640
SV40 promoter	3642-3999
SV40 ori	3850-3985
Hygromycin resistance	4034-5059

pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg质粒(6363bp)的图谱如下:



pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg的多克隆位点的详细图谱如下:

```

                                Flag tag
                                |D Y K D D D D K
SacI                               NotI
1885  GAGCTCCACC GCGGTGCCGG CCGCCATGGA TTACAAGGAT GACGACGATA
      CTGAGGTGG  CGCCACGCC  GGCGGTACCT AATGTTCTTA CTGCTGCTAT
      XmaI
      | SmaI  BamHI HindIII      EcoRI EcoRV SalI BglII
1735  AGAGCCCGGG CGGATCCAAG CTTCTGCAGG AATTCGATAT CGTCGACAGA
      TCTCGGGCCC GCCTAGGTTC GAAGACGTCC TTAAGCTATA GCAGCTGTCT
                                P2A sequence
                                |A T N F S L L
      XhoI XbaI SpeI  G S G  |GCTACTAACT TCAGCCTGCT
1785  TCTCTCGAGT CTAGAACTAG TGAAGCGGA GCTACTAACT TCAGCCTGCT
      AGAGAGCTCA GATCTTGATC ACCTTCGCCT CGATGATTGA AGTCGGACGA

      K Q A G D V E E N P G P |mCherry sequence
1835  GAAGCAGGCT GGAGACGTGG AGGAGAACCC TGGACCTATG GTGAGCAAGG
      CTTCGTCCGA CCTCTGCACC TCCTCTTGGG ACCTGGATAC CACTCGTTCC

1885  GCGAGGAGGA TAACATGGCC ATCATCAAGG AGTTCATGCG CTTCAAGGTG
      CGCTCCTCCT ATTGTACCGG TAGTAGTTCC TCAAGTACGC GAAGTTCCAC

1935  CACATGGAGG GCTCCGTGAA CGGCCACGAG TTCGAGATCG AGGGCGAGGG
      GTGTACCTCC CGAGGCACTT GCCGGTGCTC AAGCTCTAGC TCCCGCTCCC

1985  CGAGGGCCGC CCCTACGAGG GCACCCAGAC CGCCAAGCTG AAGGTGACCA
      GCTCCGGCG  GGGATGCTCC CGTGGGTCTG GCGGTTCGAC TTCCACTGGT

2035  AGGGTGGCCC CCTGCCCTTC GCCTGGGACA TCCTGTCCCC TCAGTTCATG
      TCCCACCGGG GGACGGGAAG CGGACCCTGT AGGACAGGGG AGTCAAGTAC

```

2085 TACGGCTCCA AGGCCTACGT GAAGCACCCC GCCGACATCC CCGACTACTT
 ATGCCGAGGT TCCGGATGCA CTTCGTGGGG CGGCTGTAGG GGCTGATGAA

2135 GAAGCTGTCC TTCCCCGAGG GCTTCAAGTG GGAGCGCGTG ATGAACTTCG
 CTTCGACAGG AAGGGGCTCC CGAAGTTCAC CCTCGCGCAC TACTTGAAGC

2185 AGGACGGCGG CGTGGTGACC GTGACCCAGG ACTCCTCCCT GCAGGACGGC
 TCCTGCCGCC GCACCACTGG CACTGGGTCC TGAGGAGGGA CGTCCTGCCG

2235 GAGTTCATCT ACAAGGTGAA GCTGCGCGGC ACCAACTTCC CCTCCGACGG
 CTCAAGTAGA TGTTCACCTT CGACGCGCCG TGGTTGAAGG GGAGGCTGCC

2285 CCCCCTAATG CAGAAGAAGA CCATGGGCTG GGAGGCCTCC TCCGAGCGGA
 GGGGCATTAC GTCTTCTTCT GGTACCCGAC CCTCCGAGG AGGCTCGCCT

2335 TGTACCCCGA GGACGGCGCC CTGAAGGGCG AGATCAAGCA GAGGCTGAAG
 ACATGGGGCT CTGCGCGCGG GACTTCCCGC TCTAGTTCGT CTCCGACTTC

2385 CTGAAGGACG GCGGCCACTA CGACGCTGAG GTCAAGACCA CCTACAAGGC
 GACTTCCTGC CGCCGGTGAT GCTGCGACTC CAGTTCGGT GGATGTTCCG

2435 CAAGAAGCCC GTGCAGCTGC CCGGCGCCTA CAACGTCAAC ATCAAGTTGG
 GTTCTTCGGG CACGTCGACG GGCCGCGGAT GTTGCAGTTG TAGTTCAACC

2485 ACATCACCTC CCACAACGAG GACTACACCA TCGTGGAACA GTACGAACGC
 TGTAGTGGAG GGTGTTGCTC CTGATGTGGT AGCACCTTGT CATGCTTGCG

2535 GCCGAGGGCC GCCACTCCAC CGGCGGCATG GACGAGCTGT ACAAGTAGGG
 CGGCTCCCGG CGGTGAGGTG GCCGCCGTAC CTGCTCGACA TGTTTCATCCC

2585 GCCCAGTACC TTAATTAATT AAGGTACCAG
 CGGGCCATGG AATTAATTAA TTCCATGGTC

ApaI

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AcvI	AfeI	AflII	AgeI
Aor51HI	AscI	AsiGI	BaeI	BbrPI	BfrI
BlpI	Bpu1102I	BsePI	BshTI	BsiWI	Bsp68I
Bsp1720I	BspQI	BspTI	BssHII	BssNAI	Bst98I
Bst1107I	BstAFI	BstENI	BstZ17I	BtuMI	CelII
CspAI	Eco47III	Eco72I	EcoNI	FseI	FspAI
I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KflI	LguI	MauBI
MreI	MspCI	MssI	NruI	PalAI	PauI
PciSI	Pfl23II	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI
PmeI	PmlI	PpuMI	Psp5II	PspCI	PspLI
PspPPI	PspXI	PsrI	PteI	RigI	RruI
SanDI	SapI	SgrDI	SgsI	SmiI	SwaI
Vha464I	XagI				

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

AccI	GT`MK,AC	1777	MscI	TGG CCA	1902
ApaI	G,GGCC`C	2587	NdeI	CA`TA,TG	1274
AsiSI	GCG,AT`CGC	4398	NheI	G`CTAG,C	1631
BamHI	G`GATC,C	1746	NotI	GC`GGCC,GC	1702
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	2307	Paer7I	C`TCGA,G)	1788
BbvCI	CC`TCA,GC	2410	PciI	A`CATG,T	6311

BcgI	NN` (N) ₁₀ CGA(N) ₆ TGC(N) ₁₀ , NN`	641	PflFI	GACN`N, NGTC	4538
BclI	T`GATC, A	2819	PflMI	CCAN, NNN`NTGG	2311
BglII	A`GATC, T	1782	PshAI	GACNN NNGTC	4061
BmgBI	CAC GTC	1850	PspOMI	G`GGCC, C	2583
BmtI	G, CTAG`C	1635	RsrII	CG`GWC, CG	4442
Bpu10I	CC`TNA, GC	2410	SacI	G, AGCT`C	1689
BsgI	GTGCAGNNNNNNNNNNNNNN, NN`	2466	SacII	CC, GC`GG	1696
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1840	SalI	G`TCGA, C	1776
BspDI	AT`CG, AT	4002	SbfI	CC, TGCA`GG	2227
BsrGI	T`GTAC, A	2572	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	3937
BstBI	TT`CG, AA	5075	SgrAI	CR`CCGG, YG	2553
BstXI	CCAN, NNNN`NTGG	1697	SmaI	CCC GGG	1741
ClaI	AT`CG, AT	4002	SnaBI	TAC GTA	1380
CspCI	NN` (N) ₁₁ CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₀ , NN`	1416	SpeI	A`CTAG, T	1800
EarI	CTCTTCN`NNN,	931	SrfI	GCCC GGGC	1741
Eco53kI	GAG CTC	1687	TspMI	C`CCGG, G	1739
EcoRI	G`AATT, C	1764	Tth111I	GACN`N, NGTC	4538
EcoRV	GAT ATC	1772	XbaI	T`CTAG, A	1794
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1840	XcmI	CCANNNN, N`NNNNTGG	2558
HindIII	A`AGCT, T	1752	XhoI	C`TCGA, G	1788
HpaI	GTT AAC	2925	XmaI	C`CCGG, G	1739
MfeI	C`AATT, G	2912	XmnI	GAANN NNTTC	735
MluI	A`CGCG, T	3048			

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg质粒中对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mCherry primer的序列如下：

T3 primer (1654-1672): 5' AATTAACCCTCACTAAAGG 3'

mCherry primer (1874-1890): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D2795-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg	1μg
D2795-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Hyg	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-mCherry-Hyg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
ST1389-50mg	Hygromycin B (潮霉素B)	50mg

ST1389-250mg	Hygromycin B (潮霉素B)	250mg
ST1389-1g	Hygromycin B (潮霉素B)	1g
ST1389-5g	Hygromycin B (潮霉素B)	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
D2738	pCMV-N-His-MCS-P2A-EGFP-Neo	1μg/100μg
D2757	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-EGFP-Neo	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