

pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg

产品编号	产品名称	包装
D2798-1μg	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg	1μg
D2798-100μg	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg	100μg

产品简介:

- pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg是碧云天研发的用于在哺乳动物细胞中同时表达目的蛋白、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，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。

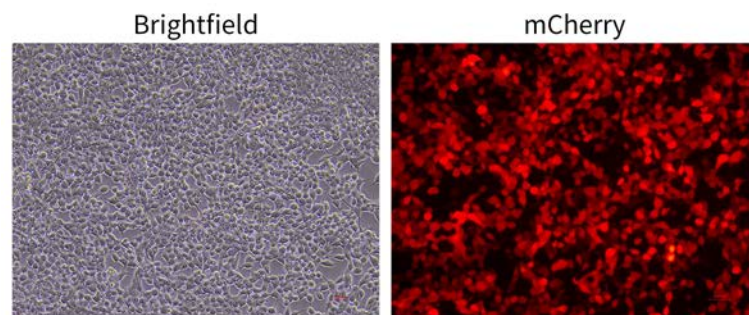
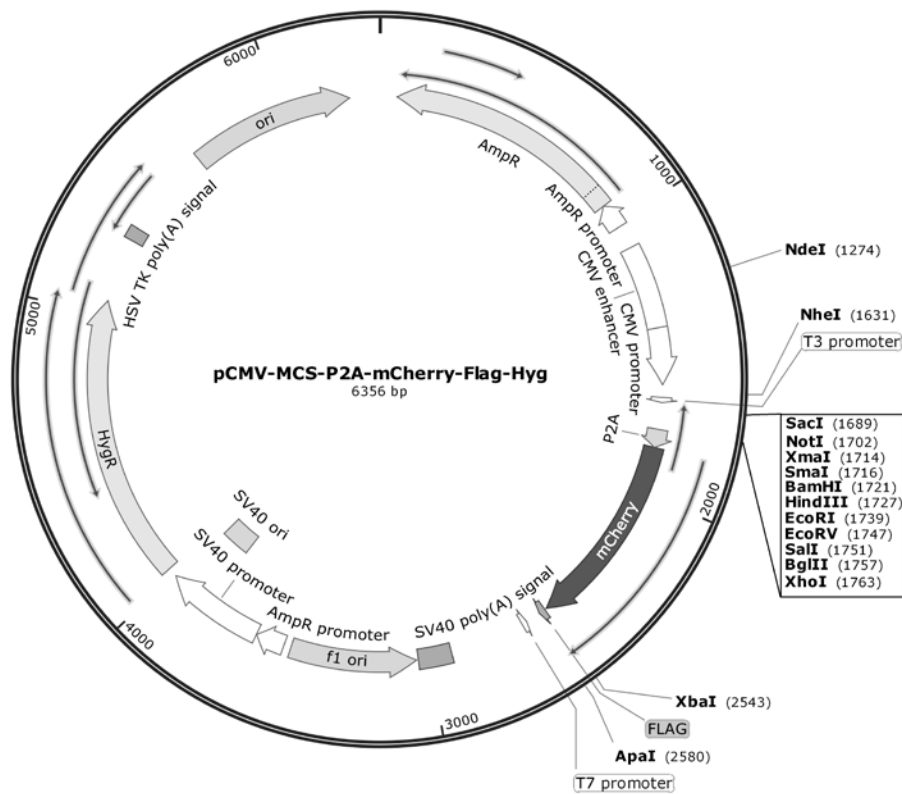


图1. 碧云天pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。本图仅供参考，实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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-MCS-P2A-mCherry-Flag-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
P2A	1769-1834
mCherry	1835-2542
FLAG	2549-2572
T7 promoter	2627-2645
SV40 poly(A) signal	2919-3040
f1 ori	3047-3502
AmpR promoter	3529-3633
SV40 promoter	3635-3992
SV40 ori	3843-3978
HygR	4027-5052
HSV TK poly(A) signal	5284-5331

➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg质粒(6356bp)的图谱如下:



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

SacI

1651 CGAAATTAAC CCTCACTAAA GGAACAAAA GCTGGAGCTC CACCGCGGTG
GCTTTAATTG GGAGTGATTT CCCTTGTTTT CGACCTCGAG GTGGCGCCAC

XmaI

NotI SmaI BamHI HindIII EcoRI EcoRV
1701 GCGGCCGCTC TAGCCCGGGC GGATCCAAGC TTCTGCAGGA ATTCGATATC
CGCCGGCGAG ATCGGGCCCG CCTAGGTTTC AAGACGTCCT TAAGCTATAG

P2A sequence

SalI BglII XhoI G S G A T N F S L L K
1751 GTCGACAGAT CTCTCGAGGG AAGCGGAGCT ACTAATTCA GCCTGCTGAA
CAGCTGTCTA GAGAGCTCCC TTCGCCTCGA TGATTGAAGT CGGACGACTT

Q A G D V E E N P G P mCherry sequence

1801 GCAGGCTGGA GACGTGGAGG AGAACCTGG ACCTATGGTG AGCAAGGGCG
CGTCCGACCT CTGCACCTCC TCTTGGGACC TGGATAACCAC TCGTTCCCGC

1851 AGGAGGATAA CATGGCCATC ATCAAGGAGT TCATGCGCTT CAAGGTGCAC
TCCTCCTATT GTACCGGTAG TAGTTCCTCA AGTACGCGAA GTTCCACGTG

1901 ATGGAGGGCT CCGTGAACGG CCACGAGTTC GAGATCGAGG GCGAGGGCGA
TACCTCCCGA GGCACCTGCC GGTGCTCAAG CTCTAGCTCC CGCTCCCGCT

1951 GGGCCGCCCC TACGAGGGCA CCCAGACCGC CAAGCTGAAG GTGACCAAGG
CCCGGCGGGG ATGCTCCCGT GGTCTGGCG GTTCGACTTC CACTGGTTCC

2001 GTGGCCCCCT GCCCTTCGCC TGGGACATCC TGTCCCCTCA GTTCATGTAC
CACCGGGGGA CGGGAAGCGG ACCCTGTAGG ACAGGGGAGT CAAGTACATG

2051 GGCTCCAAGG CCTACGTGAA GCACCCCGCC GACATCCCCG ACTACTTGAA
 CCGAGTTCC GGATGCACTT CGTGGGGCGG CTGTAGGGGC TGATGAACTT

2101 GCTGTCCTTC CCCGAGGGCT TCAAGTGGGA GCGCGTGATG AACTTCGAGG
 CGACAGGAAG GGGCTCCCGA AGTTCACCCT CGCGCACTAC TTGAAGCTCC

2151 ACGGCGGCGT GGTGACCGTG ACCCAGGACT CCTCCCTGCA GGACGGCGAG
 TGCCGCCGCA CCACTGGCAC TGGGTCCTGA GGAGGGACGT CCTGCCGCTC

2201 TTCATCTACA AGGTGAAGCT GCGCGGCACC AACTTCCCCT CCGACGGCCC
 AAGTAGATGT TCCAATTGCA CGCGCCGTGG TTGAAGGGGA GGCTGCCGGG

2251 CGTAATGCAG AAGAAGACCA TGGGCTGGGA GGCCTCCTCC GAGCGGATGT
 GCATTACGTC TTCTTCTGGT ACCCGACCCT CCGGAGGAGG CTCGCCTACA

2301 ACCCCGAGGA CGGCGCCCTG AAGGGCGAGA TCAAGCAGAG GCTGAAGCTG
 TGGGGCTCCT GCCGCGGGAC TTCCCGCTCT AGTTTCGTCTC CGACTTCGAC

2351 AAGGACGGCG GCCACTACGA CGCTGAGGTC AAGACCACCT ACAAGGCCAA
 TTCCTGCCGC CGGTGATGCT GCGACTCCAG TTCTGGTGA TGTTCGGTT

2401 GAAGCCCGTG CAGCTGCCCG GCGCCTACAA CGTCAACATC AAGTTGGACA
 CTTCGGGCAC GTCGACGGGC CGCGGATGTT GCAGTTGTAG TTCAACCTGT

2451 TCACCTCCCA CAACGAGGAC TACACCATCG TGGAACAGTA CGAACGCGCC
 AGTGGAGGGT GTTGCTCCTG ATGTGGTAGC ACCTTGTCAT GCTTGCGCGG

2501 GAGGGCCGCC ACTCCACCGG CGGCATGGAC GAGCTGTACA AGTCTAGAGA
 CTCCCGCGCG TGAGGTGGCC GCCGTACCTG CTCGACATGT TCAGATCTCT

XbaI | D

Flag tag
 Y K D D D D K ApaI

2551 TTACAAGGAT GACGACGATA AGTAAGGGCC CGGTACCTTA ATTAATTAAG
 AATGTTCCCTA CTGCTGCTAT TCATTCCCGG GCCATGGAAT TAATTAATTC

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

AarI	AbsI	AcvI	AfeI	AflII	AgeI	AhlI
Aor51HI	AscI	AsiGI	BaeI	BbrPI	BcuI	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	LguI
MauBI	MreI	MspCI	MssI	NruI	PalAI	PauI
PciSI	Pfl123II	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmeI
PmlI	PpuMI	Psp5II	PspCI	PspLI	PspPPI	PspXI
PsrI	RigI	SanDI	SapI	SgrDI	SgsI	SmiI
SpeI	SwaI	Vha464I	XagI			

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

AccI	GT`MK, AC	1752	MluI	A`CGCG, T	3041
ApaI	G, GGCC`C	2580	MscI	TGG CCA	1865
AsiSI	GCG, AT`CGC	4391	NdeI	CA`TA, TG	1274
BamHI	G`GATC, C	1721	NheI	G`CTAG, C	1631
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	2270	NotI	GC`GGCC, GC	1702
BbvCI	CC`TCA, GC	2373	Paer7I	C`TCGA, G	1763
BcgI	, NN` (N) ₁₀ CGANNNNNNTGC (N) ₁₀ , NN`	641	PciI	A`CATG, T	6304
BclI	T`GATC, A	2812	PflFI	GACN`N, NGTC	4531
BglII	A`GATC, T	1757	PflMI	CCAN, NNN`NTGG	2274
BmgBI	CAC GTC	1813	PshAI	GACNN NNGTC	4054

BmtI	G,CTAG`C	1635	PspOMI	G`GGCC,C	2576
Bpu10I	CC`TNA,GC	2373	RsrII	CG`GWC,CG	4435
BsgI	GTGCAGNNNNNNNNNNNNNN,NN`	2429	SacI	G,AGCT`C	1689
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1803	SacII	CC,GC`GG	1696
BspDI	AT`CG,AT	3995	SalI	G`TCGA,C	1751
BsrGI	T`GTAC,A	2535	SbfI	CC,TGCA`GG	2190
BstBI	TT`CG,AA	5068	SfiI	GGCCN,NNN`NGGC C	3930
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	1697	SgrAI	CR`CCGG,YG	2516
ClaI	AT`CG,AT	3995	SmaI	CCC GGG	1716
CspCI	,NN`(N) ₁₁ CAANNNNNGTGG(N) ₁₀ ,NN`	1416	SnaBI	TAC GTA	1380
EarI	CTCTTCN`NNN,	931	SrfI	GCCC GGGC	1716
Eco53kI	GAG CTC	1687	TspMI	C`CCGG,G	1714
EcoRI	G`AATT,C	1739	Tth111I	GACN`N,NGTC	4531
EcoRV	GAT ATC	1747	XbaI	T`CTAG,A	2543
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1803	XcmI	CCANNNN,N`NNNN TGG	2521
HindIII	A`AGCT,T	1727	XhoI	C`TCGA,G	1763
HpaI	GTT AAC	2918	XmaI	C`CCGG,G	1714
MfeI	C`AATT,G	2905	XmnI	GAANN NNTTC	735

➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-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 (1837-1853): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-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
D2798-1μg	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg	1μg
D2798-100μg	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg	100μg
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃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：

- 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。
- 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。
- pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-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：

- Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, et al. PLoS One. 2011. 6(4):e18556.
- 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
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
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