

pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur

产品编号	产品名称	包装
D2799-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur	1μg
D2799-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur	100μg

产品简介:

- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur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和嘌呤霉素(Puromycin)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。

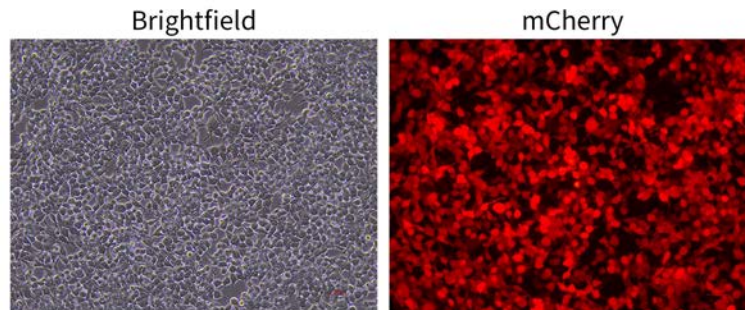
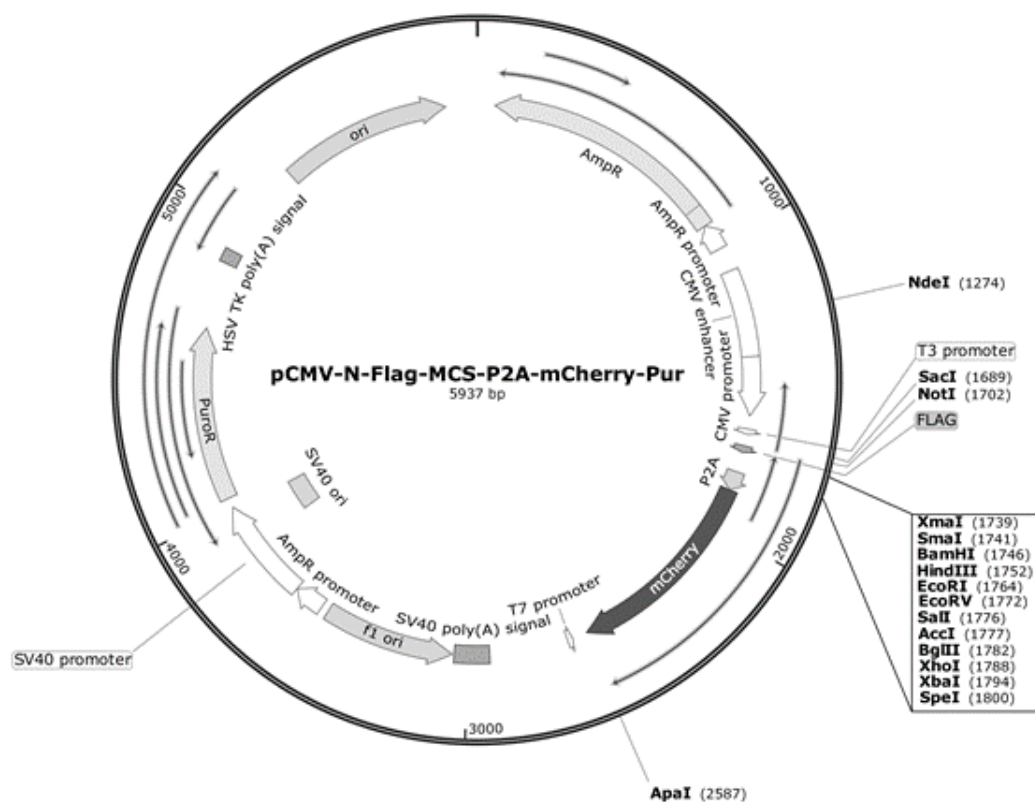


图1. 碧云天pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。本图仅供参考，实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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)和嘌呤霉素(Puromycin)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Puromycin (ST551)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur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
PuroR	4034-4633

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur质粒(5937bp)的图谱如下:



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

	Flag tag												
	SacI		NotI		D Y K D D D D K								
1685	GAGCTCCACC	GCGGTGCGG	CCGCCATGGA	TTACAAGGAT	GACGACGATA	CTCGAGGTGG	CGCCACCGCC	GGCGGTACCT	AATGTTCTA	CTGCTGCTAT			
	XmaI				AccI								
1735	AGAGCCCGGG	CGGATCCAAG	CTTCTGCAGG	AATTCGATAT	CGTCGACAGA	TCTCGGGCCC	GCCTAGGTTC	GAAGACGTCC	TTAAGCTATA	GCAGCTGTCT			
	SmaI	BamHI	HindIII	EcoRI	EcoRV	SalI	BglII						
1785	TCTCTCGAGT	CTAGAACTAG	TGGAAGCGGA	GCTACTA	ACTTCAGT	TCAGCCTGCT							
	XhoI	XbaI	SpeI	G S G	P2A sequence			A T N F S L L					
1785	TCTCTCGAGT	CTAGAACTAG	TGGAAGCGGA	GCTACTA	ACTTCAGT	TCAGCCTGCT							
	XhoI	XbaI	SpeI	G S G	P2A sequence			A T N F S L L					
1835	GAAGCAGGCT	GGAGACGTGG	AGGAGAACCC	TGGACCTATG	mCherry sequence				GTGAGCAAGG				
	K Q A	G D V	E E N P	G P									
1835	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								
	GCTCCC	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
 CTTCCGACAGG AAGGGGCTCC CGAAGTTCAC CCTCGCGCAC TACTTGAAGC

2185 AGGACGGCGG CGTGGTGACC GTGACCCAGG ACTCCTCCCT GCAGGACGGC
 TCCTGCCGCC GCACCACTGG CACTGGGTCC TGAGGAGGGA CGTCCTGCCG

2235 GAGTTCATCT ACAAGGTGAA GCTGCGCGGC ACCAACTTCC CCTCCGACGG
 CTCAAGTAGA TGTTCCACTT 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

ApaI

2535 GCCGAGGGCC GCCACTCCAC CGGCGGCATG GACGAGCTGT ACAAGTAGGG
 CGGCTCCCGG CGGTGAGGTG GCCGCCGTAC CTGCTCGACA TGTTTCATCCC

2585 GCCCGGTACC TTAATTAATT AAGGTACCAG
 CGGGCCATGG AATTAATTAA TTCCATGGTC

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

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

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

AccI	GT`MK, AC	1777	MluI	A`CGCG, T	3048
ApaI	G, GGCC`C	2587	NdeI	CA`TA, TG	1274
BamHI	G`GATC, C	1746	NheI	G`CTAG, C	1631
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	2307	NotI	GC`GGCC, GC	1702
BbvCI	CC`TCA, GC	2410	Paer7I	C`TCGA, G	1788
BclI	T`GATC, A	2819	PciI	A`CATG, T	5885
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4685	PflFI	GACN`N, NGTC	4076
BglII	A`GATC, T	1782	PflMI	CCAN, NNN`NTGG	2311
BmgBI	CAC GTC	1850	PspOMI	G`GGCC, C	2583
BmtI	G, CTAG`C	1635	RsrII	CG`GWC, CG	4150
BsgI	GTGCAGNNNNNNNNNNNN, NN`	2466	SacI	G, AGCT`C	1689

BsiWI	C`GTAC,G	4090	SalI	G`TCGA,C	1776
BspDI	AT`CG,AT	4002	SbfI	CC,TGCA`GG	2227
BspEI	T`CCGG,A	4147	ScaI	AGT ACT	616
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4685	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	3937
BsrGI	T`GTAC,A	2572	SgrAI	CR`CCGG,YG	2553
BssHII	G`CGCG,C	4489	SmaI	CCC GGG	1741
BstBI	TT`CG,AA	4649	SnaBI	TAC GTA	1380
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	1697	SpeI	A`CTAG,T	1800
ClaI	AT`CG,AT	4002	SrfI	GCCC GGGC	1741
CspCI	,NN`(N) ₁₁ CAANNNNNGTGG(N) ₁₀ ,NN`	1416	TspMI	C`CCGG,G	1739
Eco53kI	GAG CTC	1687	Tth111I	GACN`N,NGTC	4076
EcoRI	G`AATT,C	1764	XbaI	T`CTAG,A	1794
EcoRV	GAT ATC	1772	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

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur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-Pur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
D2799-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur	1μg
D2799-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-mCherry-Pur	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-Pur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
ST551-10mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×1ml
ST551-50mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×5ml
ST551-250mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	250mg
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
D2798	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Hyg	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