

pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur

产品编号	产品名称	包装
D2801-1μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur	1μg
D2801-100μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur	100μg

产品简介:

- pCMV-N-HA-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HA标签(HA Tag, YPYDVPDYA)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HA标签的抗体(AF5057/AF2305/AF0039/AH158)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

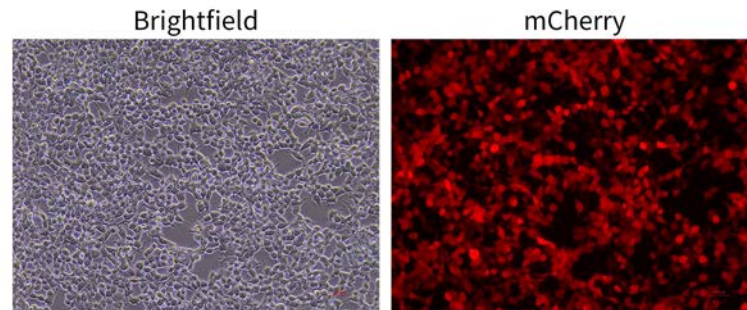
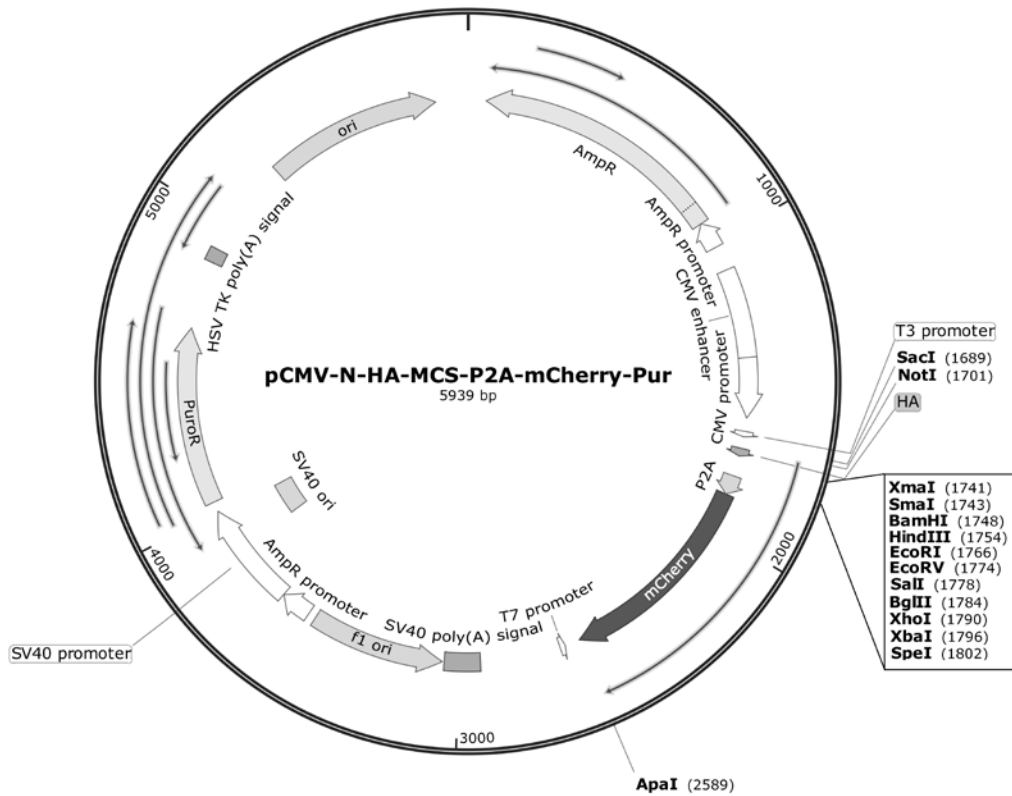


图1. 碧云天pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片, 右侧为荧光照片。本图仅供参考, 实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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-HA-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
HA		1712-1738
P2A		1808-1873
mCherry		1874-2584
T7 promoter		2636-2654
SV40 poly(A) signal		2928-3049
f1 ori		3056-3511
AmpR promoter		3538-3642
SV40 promoter		3644-4001
SV40 ori		3852-3987
PuroR		4036-4635

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur质粒(5939bp)的图谱如下:



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

	SacI		NotI	
1651	CGAAATTAAC	CCTCACTAAA	GGGAACAAAA	GCTGGAGCTC
	GCTTTAATTG	GGAGTGATTT	CCCTTGTTTT	CGACCTCGAG
	HA tag		XmaI	
	Y P Y D V P D Y A		SmaI	BamHI
1701	CGGCCGCCAT	GTACCCATAC	GATGTTCCAG	ATTACGCTAG
	GCCGGCGGTA	CATGGGTATG	CTACAAGGTC	TAATGCGATC
	HindIII	EcoRI	EcoRV	SalI
		BglIII	XbaI	
1751	TCCAAGCTTC	TGCAGGAATT	CGATATCGTC	GACAGATCTC
	AGGTTCGAAG	ACGTCCTTAA	GCTATAGCAG	CTGTCTAGAG
	P2A sequence			
	SpeI	G S G	A T N F S L L K Q A G D	
1801	AACTAGTGGG	AGCGGAGCTA	CTAACTTCAG	CCTGCTGAAG
	TTGATCACCT	TCGCCTCGAT	GATTGAAGTC	GGACGACTTC
	mCherry sequence			
	V E E N P G P			
1851	ACGTGGAGGA	GAACCTTGGG	CCTATGGTGA	GCAAGGGCGA
	TGCACCTCCT	CTTGGGACCT	GGATACCACT	CGTTCCTCGCT
1901	ATGGCCATCA	TCAAGGAGTT	CATGCGCTTC	AAGGTGCACA
	TACCGGTAGT	AGTTCCTCAA	GTACGCGAAG	TTCCACGTGT
1951	CGTGAACGGC	CACGAGTTCG	AGATCGAGGG	CGAGGGCGAG
	GCACTTGCCG	GTGCTCAAGC	TCTAGCTCCC	GCTCCCGCTC
2001	ACGAGGGCAC	CCAGACCGCC	AAGCTGAAGG	TGACCAAGGG
			TGGCCCCCTG	

TGCTCCCGTG GGTCTGGCGG TTCGACTTCC ACTGGTTCCT ACCGGGGGAC
 2051 CCCTTCGCCT GGGACATCCT GTCCCCTCAG TTCATGTACG GCTCCAAGGC
 GGGAAAGCGGA CCCTGTAGGA CAGGGGAGTC AAGTACATGC CGAGGTTCCT
 2101 CTACGTGAAG CACCCCGCCG ACATCCCCGA CTACTTGAAG CTGTCTTTCC
 GATGCACTTC GTGGGGCGGC TGTAGGGGCT GATGAACTTC GACAGGAAGG
 2151 CCGAGGGCTT CAAGTGGGAG CGCGTGATGA ACTTCGAGGA CGGCGGCGTG
 GGCTCCCGAA GTTCACCCTC GCGCACTACT TGAAGTCTCT GCCGCCGCAC
 2201 GTGACCGTGA CCCAGGACTC CTCCCTGCAG GACGGCGAGT TCATCTACAA
 CACTGGCACT GGGTCCTGAG GAGGGACGTC CTGCCGCTCA AGTAGATGTT
 2251 GGTGAAGCTG CGCGGCACCA ACTTCCCCTC CGACGGCCCC GTAATGCAGA
 CCACTTCGAC GCGCCGTGGT TGAAGGGGAG GCTGCCGGGG CATTACGTCT
 2301 AGAAGACCAT GGGCTGGGAG GCCTCCTCCG AGCGGATGTA CCCCAGGAC
 TCTTCTGGTA CCCGACCCTC CGGAGGAGGC TCGCCTACAT GGGGCTCCTG
 2351 GGCGCCCTGA AGGGCGAGAT CAAGCAGAGG CTGAAGCTGA AGGACGGCGG
 CCGCGGGACT TCCCGCTCTA GTTCGTCTCC GACTTCGACT TCCTGCCGCC
 2401 CCACTACGAC GCTGAGGTCA AGACCACCTA CAAGCCAAG AAGCCCGTGC
 GGTGATGCTG CGACTCCAGT TCTGGTGGAT GTTCCGGTTC TTCGGGCACG
 2451 AGCTGCCCCG CGCCTACAAC GTCAACATCA AGTTGGACAT CACCTCCCAC
 TCGACGGGCC GCGGATGTTG CAGTTGTAGT TCAACCTGTA GTGGAGGGTG
 2501 AACGAGGACT ACACCATCGT GGAACAGTAC GAACGCGCCG AGGGCCGCCA
 TTGCTCCTGA TGTGGTAGCA CCTTGTGATG CTGCGCGGC TCCCGCGGT

ApaI

2551 CTCCACCGGC GGCATGGACG AGCTGTACAA GTAGGGGCC GGTACCTTAA
 GAGGTGGCCG CCGTACCTGC TCGACATGTT CATCCCGGG CCATGGAATT

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

AccI	GT`MK,AC	1779	MluI	A`CGCG,T	3050
AleI	CACNN NNGTG	2516	NdeI	CA`TA,TG	1274
ApaI	G,GGCC`C	2589	NotI	GC`GGCC,GC	1701
BamHI	G`GATC,C	1748	Paer7I	C`TCGA,G	1790
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	2309	PciI	A`CATG,T	5887
BbvCI	CC`TCA,GC	2412	PflFI	GACN`N,NGTC	4078
BclI	T`GATC,A	2821	PspOMI	G`GGCC,C	2585
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4687	RsrII	CG`GWC,CG	4152
BglII	A`GATC,T	1784	SacI	G,AGCT`C	1689
BmgBI	CAC GTC	1852	SacII	CC,GC`GG	4250

BsgI	GTGCAGNNNNNNNNNNNNNNNN, NN`	2468	SalI	G`TCGA, C	1778
BsiWI	C`GTAC, G	4092	SbfI	CC, TGCA`GG	2229
BspDI	AT`CG, AT	4004	ScaI	AGT ACT	616
BspEI	T`CCGG, A	4149	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	3939
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4687	SgrAI	CR`CCGG, YG	2555
BsrGI	T`GTAC, A	2574	SmaI	CCC GGG	1743
BssHII	G`CGCG, C	4491	SnaBI	TAC GTA	1380
BstBI	TT`CG, AA	4651	SpeI	A`CTAG, T	1802
ClaI	AT`CG, AT	4004	SrfI	GCCC GGGC	1743
CspCI	, NN`(N) ₁₁ CAANNNGTGG(N) ₁₀ , NN`	1416	TspMI	C`CCGG, G	1741
Eco53kI	GAG CTC	1687	Tth111I	GACN`N, NGTC	4078
EcoRI	G`AATT, C	1766	XbaI	T`CTAG, A	1796
EcoRV	GAT ATC	1774	XcmI	CCANNNN, N`NNNTGG	2560
HindIII	A`AGCT, T	1754	XhoI	C`TCGA, G	1790
HpaI	GTT AAC	2927	XmaI	C`CCGG, G	1741
MfeI	C`AATT, G	2914	XmnI	GAANN NNTTC	735

➤ pCMV-N-HA-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 (1876-1892): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-HA-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
D2801-1μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur	1μg
D2801-100μg	pCMV-N-HA-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-HA-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
D2799	pCMV-N-Flag-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