

pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla

产品编号	产品名称	包装
D2807-1μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla	1μg
D2807-100μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla	100μg

产品简介:

- pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla是碧云天研发的用于在哺乳动物细胞中表达N端带有HA标签(HA Tag, YPYDVPDYA)的目的蛋白、增强绿色荧光蛋白EGFP和灭瘟素S (Blasticidin S)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；可以方便地利用抗HA的抗体(AF5057/AF2305/AF0039/AH158)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。

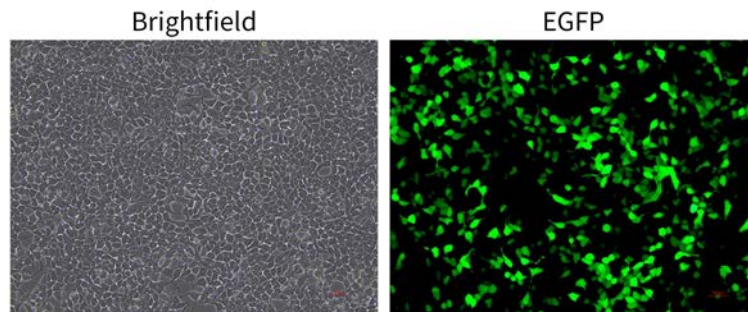
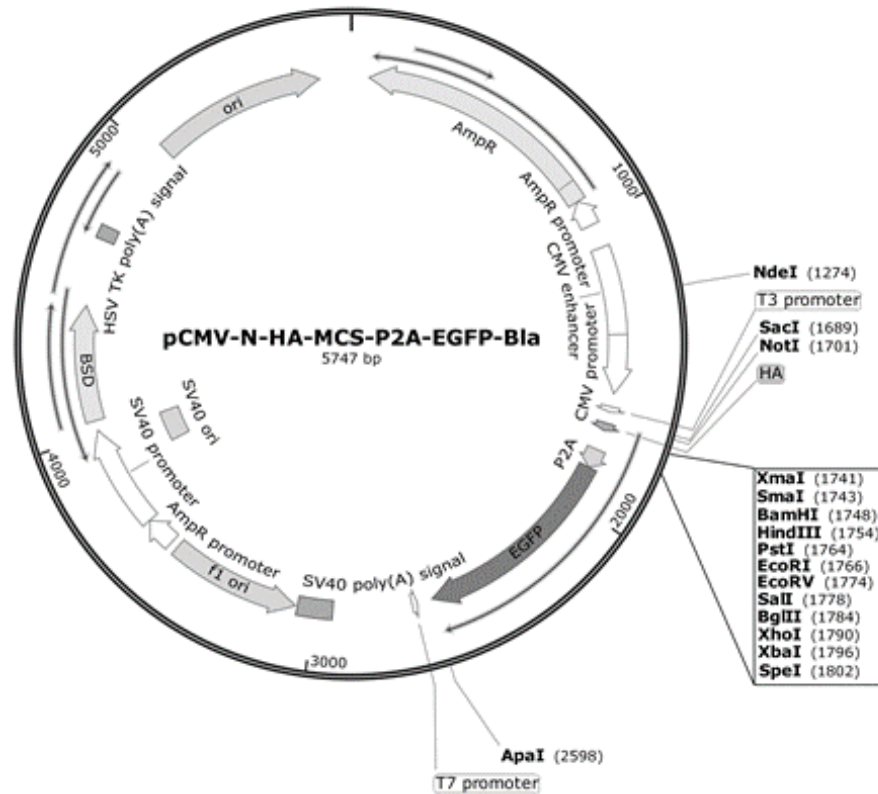


图1. 碧云天pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。本图仅供参考，实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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]。
- 本质粒为氨苄青霉素(Ampicillin)和灭瘟素S (Blasticidin S)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Blasticidin S (ST018)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla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
EGFP	1874-2593
T7 promoter	2645-2663
SV40 poly(A) signal	2937-3058
f1 ori	3065-3520
AmpR promoter	3547-3651
SV40 promoter	3653-4010
SV40 ori	3861-3996
BSD	4045-4443
HSV TK poly(A) signal	4675-4722

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla质粒(5747bp)的图谱如下:



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

SacI

```

1651  CGAAATTAAC  CCTCACTAAA  GGAACAAAA  GCTGGAGCTC  CACGCGGTGG
      GCTTTAATTG  GGAGTGATTT  CCCTTGTTTT  CGACCTCGAG  GTGCGCCACC
                HA tag
NotI  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1701  CGGCCGCCAT  GTACCCATAC  GATGTTCCAG  ATTACGCTAG  CCCGGGCGGA
      GCCGCGGTA  CATGGGTATG  CTACAAGTC  TAATGCGATC  GGGCCCGCCT
                PstI
      HindIII      EcoRI  EcoRV  SalI  BglIII  XhoI  XbaI
1751  TCCAAGCTTC  TGCAGGAATT  CGATATCGTC  GACAGATCTC  TCGAGTCTAG
      AGTTTCGAAG  ACGTCCTTAA  GCTATAGCAG  CTGTCTAGAG  AGCTCAGATC
                P2A sequence
      SpeI  G  S  G  A  T  N  F  S  L  L  K  Q  A  G  D
1801  AACTAGTGA  AGCGGAGCTA  CTAACTTCAG  CTGCTGAAG  CAGGCTGGAG
      TTGATCACCT  TCGCCTCGAT  GATTGAAGTC  GGACGACTTC  GTCCGACCTC
                V  E  E  N  P  G  P  EGFP sequence
1851  ACGTGGAGGA  GAACCCTGGA  CCTATGGTGA  GCAAGGGCGA  GGAGCTGTTC
      TGCACCTCCT  CTTGGGACCT  GGATACCACT  CGTTCCCGCT  CCTCGACAAG
1901  ACCGGGTGG  TGCCATCCT  GGTCGAGCTG  GACGGCGACG  TAAACGGCCA
      TGGCCCACC  ACGGGTAGGA  CCAGCTCGAC  CTGCCGCTGC  ATTTGCCGGT
1951  CAAGTTCAGC  GTGTCCGGCG  AGGGCGAGGG  CGATGCCACC  TACGGCAAGC
      GTTCAAGTCG  CACAGGCCGC  TCCCGTCCC  GCTACGGTGG  ATGCCGTTCG
2001  TGACCCTGAA  GTTCATCTGC  ACCACCGGCA  AGCTGCCCGT  GCCCTGGCCC
      ACTGGGACTT  CAAGTAGACG  TGGTGGCCGT  TCGACGGGCA  CGGGACCGGG

```

2051 ACCCTCGTGA CCACCCTGAC CTACGGCGTG CAGTGCTTCA GCCGCTACCC
TGGGAGCACT GGTGGGACTG GATGCCGCAC GTCACGAAGT CGGCGATGGG

2101 CGACCACATG AAGCAGCACG ACTTCTTCAA GTCCGCCATG CCCGAAGGCT
GCTGGTGTAC TTCGTCGTGC TGAAGAAGTT CAGGCGGTAC GGGCTTCCGA

2151 ACGTCCAGGA GCGCACCATC TTCTTCAAGG ACGACGGCAA CTACAAGACC
TGCAGGTCTT CGCGTGGTAG AAGAAGTTCC TGCTGCCGTT GATGTTCTGG

2201 CGCGCCGAGG TGAAGTTCGA GGGCGACACC CTGGTGAACC GCATCGAGCT
GCGCGGCTCC ACTTCAAGCT CCCGCTGTGG GACCACTTGG CGTAGCTCGA

2251 GAAGGGCATC GACTTCAAGG AGGACGGCAA CATCTGGGG CACAAGCTGG
CTTCCCGTAG CTGAAGTTCC TCCTGCCGTT GTAGGACCCC GTGTTGACC

2301 AGTACAATA CAACAGCCAC AACGTCTATA TCATGGCCGA CAAGCAGAAG
TCATGTTGAT GTTGTGGTG TGCAGATAT AGTACCGGCT GTTCGTCTTC

2351 AACGGCATCA AGGTGAAGTT CAAGATCCGC CACAACATCG AGGACGGCAG
TTGCCGTAGT TCCACTTGAA GTTCTAGGCG GTGTTGTAGC TCCTGCCGTC

2401 CGTGCAGCTC GCCGACCACT ACCAGCAGAA CACCCCATC GGCGACGGCC
GCACGTCGAG CGGCTGGTGA TGGTCGTCTT GTGGGGGTAG CCGCTGCCGG

2451 CCGTGCTGCT GCCCGACAAC CACTACCTGA GCACCCAGTC CGCCCTGAGC
GGCAGCAGCA CGGGCTGTTG GTGATGGACT CGTGGGTCAG GCGGGACTCG

2501 AAAGACCCA ACGAGAAGCG CGATCACATG GTCCTGCTGG AGTTCGTGAC
TTTCTGGGGT TGCTCTTCGC GCTAGTGTAC CAGGACGACC TCAAGCACTG

ApaI

2551 CGCCGCCGGG ATCACTCTCG GCATGGACGA GCTGTACAAG TAAGGGCCCG
GCGGCGGCC TAGTGAGAGC CGTACCTGCT CGACATGTTT ATTCCCGGGC

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

AarI	AbsI	AccIII	AcvI	AfeI	AflII	AgeI
Aor13HI	Aor51HI	AscI	AsiGI	AsiSI	AspI	BaeI
BbeI	BbrPI	BbvCI	BfrI	BoxI	BseAI	BsePI
BshTI	BsiWI	Bsp13I	BspEI	BspQI	BspTI	BssHII
BssNAI	Bst98I	Bst1107I	BstAFI	BstEII	BstENI	BstPI
BstPAI	BstXI	BstZ17I	Cfr42I	CpoI	CspI	CspAI
DinI	Eco47III	Eco72I	Eco91I	EcoNI	EcoO65I	EgeI
EheI	FseI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KasI
Kpn2I	KspI	LguI	MauBI	Mly113I	MreI	MroI
MspCI	MssI	NarI	PalAI	PauI	PciSI	Pfl123II
PflFI	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PluTI	PmaCI	PmeI
PmlI	PshAI	PspCI	PspEI	PspLI	PspXI	PsrI
PsyI	RgaI	RigI	RsrII	Rsr2I	SacII	SanDI
SapI	SbfI	SdaI	SfaAI	SfoI	Sfr303I	SgfI
SgrAI	SgrBI	SgrDI	SgsI	SmiI	Sse8387I	SspDI
SstII	SwaI	Tth111I	Vha464I	XagI	XcmI	

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

AccI	GT`MK,AC	1779	MluI	A`CGCG,T	3059
AhdI	GACNN,N`NNGTC	136	MscI	TGG CCA	4048
ApaI	G,GGCC`C	2598	NdeI	CA`TA,TG	1274
BamHI	G`GATC,C	1748	NotI	GC`GGCC,GC	1701
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	4130	NruI	TCG CGA	4276
BclI	T`GATC,A	2830	Paer7I	C`TCGA,G	1790
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4495	PciI	A`CATG,T	5695

BglII	A`GATC,T	1784	PflMI	CCAN,NNN`NTGG	1696
BlnI	GC`TNA,GC	4440	PpuMI	RG`GWC,CY	4204
BmgBI	CAC GTC	1852	PpuMI	RG`GWC,CY	4204
BsaXI	,NNN`(N) ₉ ACNNNNNCTCC(N) ₇ ,NNN`	3223	PstI	C,TGCA`G	1764
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1842	SacI	G,AGCT`C	1689
BspDI	AT`CG,AT	4013	SalI	G`TCGA,C	1778
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4495	ScaI	AGT ACT	616
BsrGI	T`GTAC,A	2583	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	3948
BstBI	TT`CG,AA	4459	SmaI	CCC GGG	1743
ClaI	AT`CG,AT	4013	SnaBI	TAC GTA	1380
EarI	CTCTTCN`NNN,	931	SpeI	A`CTAG,T	1802
Eco53kI	GAG CTC	1687	SrfI	GCCC GGGC	1743
EcoRI	G`AATT,C	1766	StuI	AGG CCT	3994
EcoRV	GAT ATC	1774	TspMI	C`CCGG,G	1741
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1842	XbaI	T`CTAG,A	1796
HindIII	A`AGCT,T	1754	XhoI	C`TCGA,G	1790
HpaI	GTT AAC	2936	XmaI	C`CCGG,G	1741
MfeI	C`AATT,G	2923	XmnI	GAANN NNTTC	735

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla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EGFP primer的序列如下：

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

EGFP primer (1876-1892): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla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
D2807-1μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla	1μg
D2807-100μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Bla	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-EGFP-Bla质粒在其多克隆位点适当酶切后可以插入待表达的基因，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
ST018-10mg	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg
ST018-1ml	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg/ml×1ml
ST018-50mg	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	50mg
ST018-5ml	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg/ml×5ml
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
D2801	pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Pur	1μg/100μg
D2803	pCMV-N-Myc-MCS-P2A-mCherry-Pur	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