

## pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo

产品编号	产品名称	包装
D2810-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1μg
D2810-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo	100μg

### 产品简介:

- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo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、增强绿色荧光蛋白EGFP和博来霉素(Zeocin)抗性基因的表达式粒。
- 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的抗体(AF0036/AF5051/AF519)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。

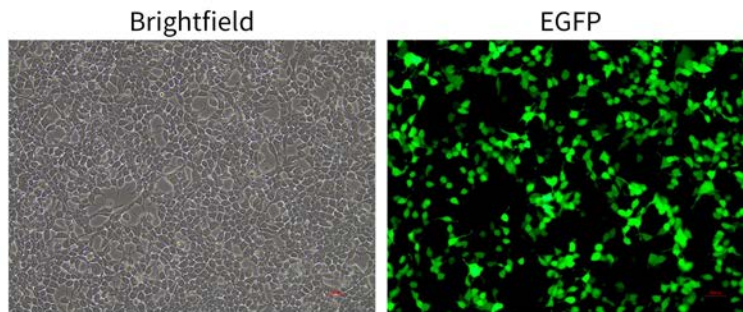
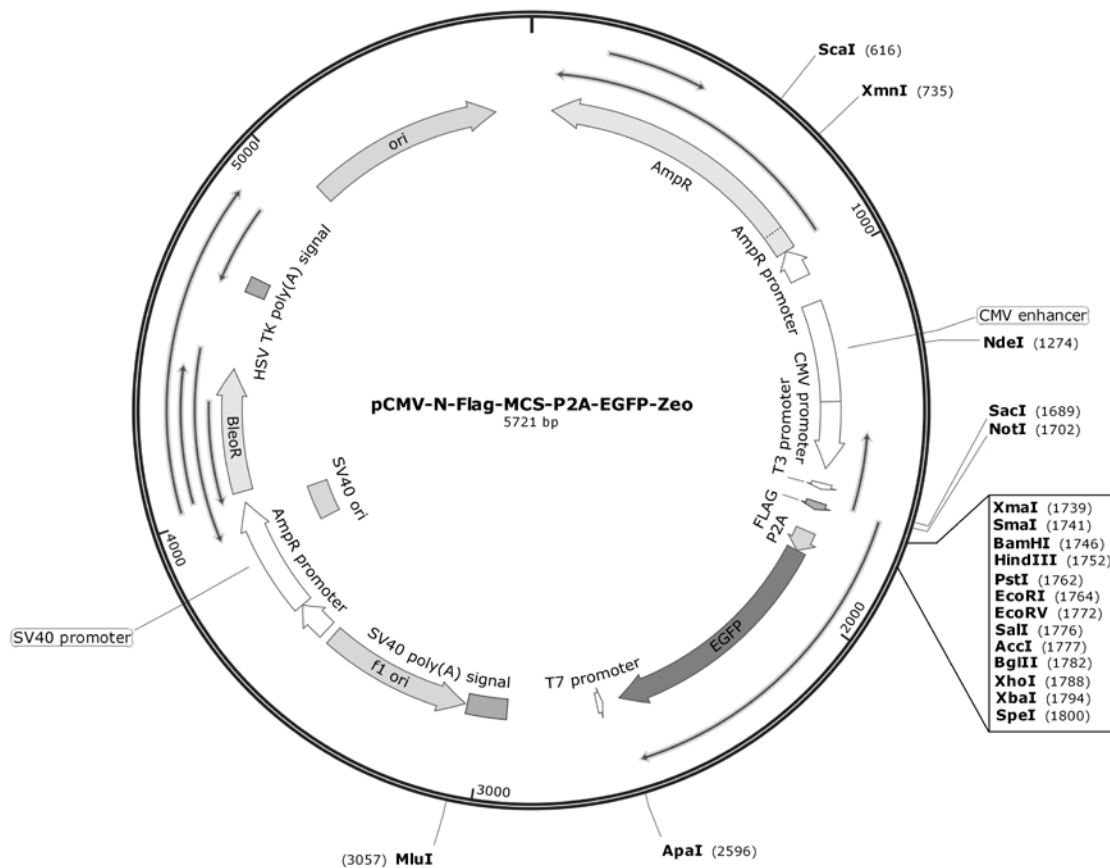


图1. 碧云天pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片,右侧为荧光照片。本图仅供参考,实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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)和博来霉素(Zeocin)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Zeocin (ST1450)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo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
EGFP	1872-2591
T7 promoter	2643-2661
SV40 poly(A) signal	2935-3056
f1 ori	3063-3518
AmpR promoter	3545-3649
SV40 promoter	3651-4008
SV40 ori	3859-3994
BleoR	4043-4417

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo质粒(5721bp)的图谱如下:



➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo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
                                Flag tag                                SmaI
      NotI      | D Y K D D D D K XmaI BamHI
1701  GCGGCCGCCA TGGATTACAA GGATGACGAC GATAAGAGCC CGGGCGGATC
      CGCCGGCGGT ACCTAATGTT CCTACTGCTG CTATTCTCGG GCCCGCTAG
                                PstI
      HindIII      EcoRI EcoRV SalI BglII XhoI XbaI
1751  CAAGCTTCTG CAGGAATTCG ATATCGTCGA CAGATCTCTC GAGTCTAGAA
      GTTCGAAGAC GTCCTTAAGC TATAGCAGCT GTCTAGAGAG CTCAGATCTT
                                P2A sequence
      SpeI G S G A T N F S L L K Q A G D
1801  CTAGTGAAG CGGAGCTACT AACTTCAGCC TGCTGAAGCA GGCTGGAGAC
      GATCACCTTC GCCTCGATGA TTGAAGTCGG ACGACTTCGT CCGACCTCTG
                                EGFP sequence
      V E E N P G P
1851  GTGGAGGAGA ACCCTGGACC TATGGTGAGC AAGGGCGAGG AGCTGTTCAC
      CACCTCCTCT TGGGACCTGG ATACCACTCG TTCCCGCTCC TCGACAAGTG

1901  CGGGGTGGTG CCCATCCTGG TCGAGCTGGA CGGCACGTA AACGGCCACA
      GCCCCACCAC GGTAGGACC AGCTCGACCT GCCGCTGCAT TTGCCGGTGT

1951  AGTTCAGCGT GTCGGCGGAG GCGAGGGCG ATGCCACCTA CGGCAAGCTG
      TCAAGTCGCA CAGGCCGCTC CCGCTCCCGC TACGGTGGAT GCCGTTTCGAC
    
```

2001 ACCCTGAAGT TCATCTGCAC CACCGGCAAG CTGCCCCTGC CCTGGCCCAC  
TGGGACTTCA AGTAGACGTG GTGGCCGTTC GACGGGCACG GGACCGGGTG

2051 CCTCGTGACC ACCCTGACCT ACGGCGTGCA GTGCTTCAGC CGCTACCCCG  
GGAGCACTGG TGGGACTGGA TGCCGCACGT CACGAAGTCG GCGATGGGGC

2101 ACCACATGAA GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC CGAAGGCTAC  
TGGTGTACTT CGTCGTGCTG AAGAAGTTCA GGCGGTACGG GCTTCCGATG

2151 GTCCAGGAGC GCACCATCTT CTTCAAGGAC GACGGCAACT ACAAGACCCG  
CAGGTCCTCG CGTGGTAGAA GAAGTTCCTG CTGCCGTTGA TGTTCTGGGC

2201 CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCGC ATCGAGCTGA  
GCGGCTCCAC TTCAAGCTCC CGCTGTGGGA CCACTTGCGC TAGCTCGACT

2251 AGGGCATCGA CTTCAAGGAG GACGGCAACA TCCTGGGGCA CAAGCTGGAG  
TCCCGTAGCT GAAGTTCCTC CTGCCGTTGT AGGACCCCGT GTTCGACCTC

2301 TACAACTACA ACAGCCACAA CGTCTATATC ATGGCCGACA AGCAGAAGAA  
ATGTTGATGT TGTCGGTGTT GCAGATATAG TACCGGCTGT TCGTCTTCTT

2351 CGGCATCAAG GTGAAGTTC AAGATCCGCCA CAACATCGAG GACGGCAGCG  
GCCGTAGTTC CACTTGAAGT TCTAGGCGGT GTTGTAGCTC CTGCCGTCGC

2401 TGCAGCTCGC CGACCACTAC CAGCAGAACA CCCCATCGG CGACGGCCCC  
ACGTCGAGCG GCTGGTGATG GTCGTCTTGT GGGGTAGCC GCTGCCGGGG

2451 GTGCTGCTGC CCGACAACCA CTACCTGAGC ACCCAGTCCG CCCTGAGCAA  
CACGACGACG GGCTGTTGGT GATGGACTCG TGGGTCAGGC GGGACTCGTT

2501 AGACCCCAAC GAGAAGCGCG ATCACATGGT CCTGCTGGAG TTCGTGACCG  
TCTGGGGTTG CTCTTCGCGC TAGTGTACCA GGACGACCTC AAGCACTGGC

ApaI

2551 CCGCCGGGAT CACTCTCGGC ATGGACGAGC TGTACAAGTA AGGGCCCGGT  
GGCGGCCCTA GTGAGAGCCG TACCTGCTCG ACATGTTTCA TCCCGGGCCA

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

AarI	AbsI	AccIII	AccB7I	AcvI	AfeI	AflII
AgeI	Aor13HI	Aor51HI	AscI	AsiGI	AsiSI	AspI
BaeI	BbeI	BbrPI	BbsI	BbvCI	BfrI	BlpI
BoxI	BpiI	Bpu1102I	BpuAI	BseAI	BshTI	BsiWI
Bsp13I	Bsp68I	Bsp1720I	BspEI	BspQI	BspTI	BssNAI
Bst98I	Bst1107I	BstAFI	BstEII	BstENI	BstPI	BstPAI
BstV2I	BstZ17I	BtuMI	CelII	CpoI	CspI	CspAI
DinI	Eco47III	Eco72I	Eco91I	EcoNI	EcoO65I	EgeI
EheI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KasI	Kpn2I
LguI	Mly113I	MreI	MroI	MspCI	MssI	NarI
NruI	PalAI	PciSI	Pfl23II	PflFI	PflMI	PI-PspI
PI-SceI	PinAI	PluTI	PmaCI	PmeI	PmlI	PpuMI
PshAI	Psp5II	PspCI	PspEI	PspLI	PspPPI	PspXI
PsrI	PsyI	RgaI	RsrII	Rsr2I	SanDI	SapI
SbfI	SdaI	SfaAI	SfoI	SgfI	SgrDI	SgsI
SmiI	Sse8387I	SspDI	SwaI	Tth111I	Van91I	Vha464I
XagI	XcmI					

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

AccI	GT`MK, AC	1777	MluI	A`CGCG, T	3057
AhdI	GACNN, N' NNGTC	136	MscI	TGG CCA	4046
ApaI	G, GGCC`C	2596	NdeI	CA`TA, TG	1274
BamHI	G`GATC, C	1746	NheI	G`CTAG, C	1631

BclI	T`GATC, A	2828	NotI	GC`GGCC, GC	1702
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4469	PaeR7I	C`TCGA, G	1788
BglII	A`GATC, T	1782	PciI	A`CATG, T	5669
BmtI	G, CTAG`C	1635	PspOMI	G`GGCC, C	2592
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1840	PstI	C, TGCA`G	1762
BspDI	AT`CG, AT	4011	PvuII	CAG CTG	3669
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4469	SacI	G, AGCT`C	1689
BsrGI	T`GTAC, A	2581	SacII	CC, GC`GG	1696
BssHII	G`CGCG, C	4079	SalI	G`TCGA, C	1776
BstBI	TT`CG, AA	4433	ScaI	AGT ACT	616
BstXI	CCAN, NNNN`NTGG	1697	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	3946
ClaI	AT`CG, AT	4011	SgrAI	CR`CCGG, YG	4157
CspCI	, NN`(N) <sub>11</sub> CAA(N) <sub>5</sub> GTGG(N) <sub>10</sub> , NN`	1416	SmaI	CCC GGG	1741
EarI	CTCTTCN`NNN,	931	SnaBI	TAC GTA	1380
Eco53kI	GAG CTC	1687	SpeI	A`CTAG, T	1800
EcoRI	G`AATT, C	1764	SrfI	GCCC GGGC	1741
EcoRV	GAT ATC	1772	StuI	AGG CCT	3992
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1840	TspMI	C`CCGG, G	1739
FseI	GG, CCGG`CC	4319	XbaI	T`CTAG, A	1794
HindIII	A`AGCT, T	1752	XhoI	C`TCGA, G	1788
HpaI	GTT AAC	2934	XmaI	C`CCGG, G	1739
MfeI	C`AATT, G	2921	XmnI	GAANN NNTTC	735

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo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 (1874-1890): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo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
D2810-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1μg
D2810-100μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Zeo	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-EGFP-Zeo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
ST1450-20mg	Zeocin (博莱霉素)	20mg
ST1450-100mg	Zeocin (博莱霉素)	100mg
ST1450-0.25ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml×0.25ml
ST1450-1ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml×1ml
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
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
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