

pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo

产品编号	产品名称	包装
D2811-1 μ g	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1 μ g
D2811-100 μ g	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo	100 μ g

产品简介:

- pCMV-N-HA-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HA标签(HA Tag, YPYDVPDYA)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。

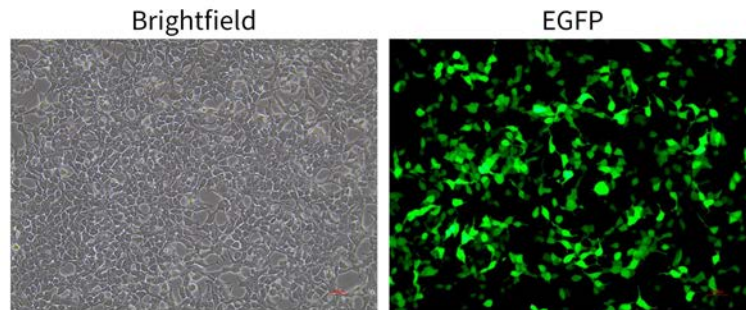
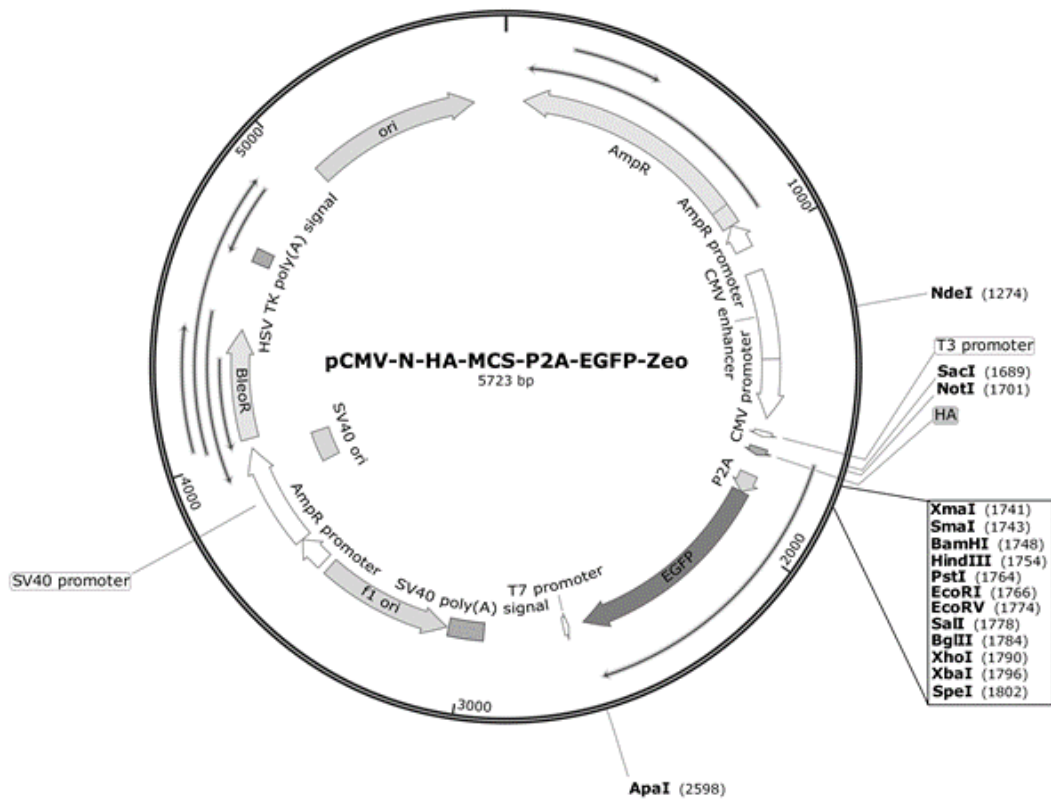


图1. 碧云天pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片, 右侧为荧光照片。本图仅供参考, 实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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-HA-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
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
BleoR	4045-4419

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo质粒(5723bp)的图谱如下:



➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo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 | Y P Y D V P D Y | XmaI SmaI BamHI

1701 CGGCCGCCAT GTACCCATAC GATGTTCCAG ATTACGCTAG CCCGGGCGGA
 GCCGGCGGTA CATGGGTATG CTACAAGGTC TAATGCGATC GGGCCCGCCT

PstI

HindIII EcoRI EcoRV SalI BglIII XhoI XbaI

1751 TCCAAGCTTC TGCAGGAATT CGATATCGTC GACAGATCTC TCGAGTCTAG
 AGGTTCGAAG ACGTCCTTAA GCTATAGCAG CTGTCTAGAG AGCTCAGATC

P2A sequence

SpeI G S G | A T N F S L L K Q A G D

1801 AACTAGTGGA AGCGGAGCTA CTAACCTCAG CCTGCTGAAG 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 ACCGGGGTGG TGCCCATCCT GGTCGAGCTG GACGGCGACG TAAACGGCCA
 TGGCCCCACC ACGGGTAGGA CCAGCTCGAC CTGCCGCTGC ATTTGCCGGT

1951 CAAGTTCAGC GTGTCCGGCG AGGGCGAGGG CGATGCCACC TACGGCAAGC
 GTTCAAGTCG CACAGGCCGC TCCCGTCCC GCTACGGTGG ATGCCGTTCG

2001 TGACCCTGAA GTTCATCTGC ACCACCGCA 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 TTGCAGATAT AGTACCGGCT GTTCGTCTTC

2351 AACGGCATCA AGGTGAAGTT CAAGATCCGC CACAACATCG AGGACGGCAG
TTGCCGTAGT TCCACTTGAA GTTCTAGGCG GTGTTGTAGC TCCTGCCGTC

2401 CGTGCAGCTC GCCGACCACT ACCAGCAGAA CACCCCATC GGCAGCGGCC
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-Zeo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	BbsI	BbrCI	BfrI	BlpI	BoxI
BpiI	Bpu1102I	BpuAI	BseAI	BshTI	BsiWI	Bsp13I
Bsp68I	Bsp1720I	BspEI	BspQI	BspTI	BssNAI	Bst98I
Bst1107I	BstAFI	BstEII	BstENI	BstPI	BstPAI	BstV2I
BstXI	BstZ17I	BtuMI	CelII	Cfr42I	CpoI	CspI
CspAI	DinI	Eco47III	Eco72I	Eco91I	EcoNI	EcoO65I
EgeI	EheI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KasI
Kpn2I	KspI	LguI	Mly113I	MreI	MroI	MspCI
MssI	NarI	NruI	PalAI	PciSI	Pfl123II	PflFI
PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PluTI	PmaCI	PmeI	PmlI
PpuMI	PshAI	Psp5II	PspCI	PspEI	PspLI	PspPPI
PspXI	PsrI	PsyI	RgaI	RsrII	Rsr2I	SacII
SanDI	SapI	SbfI	SdaI	SfaAI	SfoI	Sfr303I
SgfI	SgrBI	SgrDI	SgsI	SmiI	Sse8387I	SspDI
SstII	SwaI	Tth111I	Vha464I	XagI	XcmI	

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

AccI	GT'MK,AC	1779	MscI	TGG CCA	4048
AhdI	GACNN,N'NNGTC	136	NdeI	CA`TA,TG	1274
ApaI	G,GGCC`C	2598	NotI	GC`GGCC,GC	1701
BamHI	G`GATC,C	1748	Paer7I	C`TCGA,G	1790
BclI	T`GATC,A	2830	PciI	A`CATG,T	5671
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4471	PflMI	CCAN_NNN`NTGG	1696
BglIII	A`GATC,T	1784	PspOMI	G`GGCC,C	2594
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1842	PstI	C,TGCA`G	1764

BspDI	AT`CG,AT	4013	PvuII	CAG CTG	3671
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4471	SacI	G,AGCT`C	1689
BsrGI	T`GTAC,A	2583	SalI	G`TCGA,C	1778
BssHII	G`CGCG,C	4081	ScaI	AGT ACT	616
BstBI	TT`CG,AA	4435	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	3948
ClaI	AT`CG,AT	4013	SgrAI	CR`CCGG,YG	4159
CspCI	,NN`(N) ₁₁ CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₀ ,NN`	1416	SmaI	CCC GGG	1743
EarI	CTCTTCN`NNN,	931	SnaBI	TAC GTA	1380
Eco53kI	GAG CTC	1687	SpeI	A`CTAG,T	1802
EcoRI	G`AATT,C	1766	SrfI	GCCC GGGC	1743
EcoRV	GAT ATC	1774	StuI	AGG CCT	3994
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1842	TspMI	C`CCGG,G	1741
FseI	GG,CCGG`CC	4321	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
MluI	A`CGCG,T	3059			

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

➤ pCMV-N-HA-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
D2811-1μg	pCMV-N-HA-MCS-P2A-EGFP-Zeo	1μg
D2811-100μg	pCMV-N-HA-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-HA-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
D2810	pCMV-N-Flag-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