

pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur

产品编号	产品名称	包装
D2826-1 μ g	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur	1 μ g
D2826-100 μ g	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur	100 μ g

产品简介:

- pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur是碧云天研发的用于在哺乳动物细胞中同时表达目的蛋白、红色荧光蛋白mCherry和嘌呤霉素(Puromycin)抗性基因的表达式粒。
- 本质粒含有CMV启动子可以高效启动目的基因的表达,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。

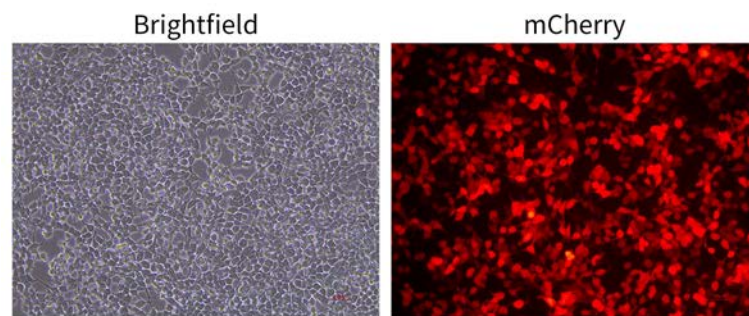
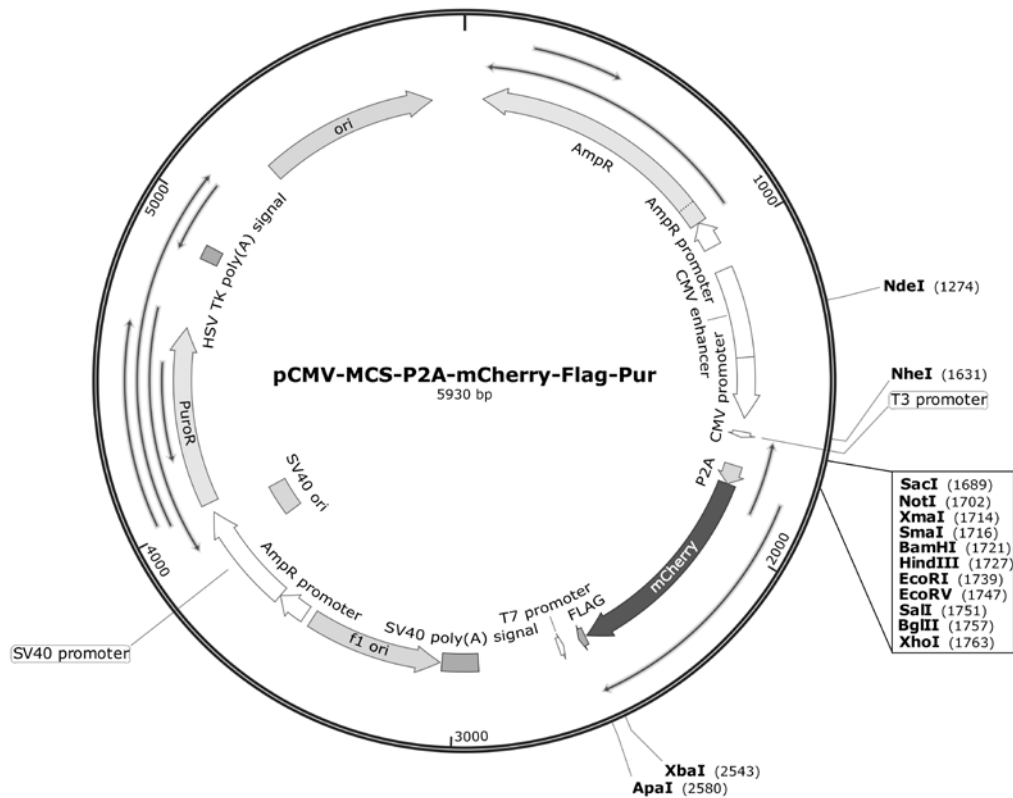


图1. 碧云天pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片,右侧为荧光照片。本图仅供参考,实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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-MCS-P2A-mCherry-Flag-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
P2A	1769-1834
mCherry	1835-2542
FLAG	2549-2572
T7 promoter	2627-2645
SV40 poly(A) signal	2919-3040
f1 ori	3047-3502
AmpR promoter	3529-3633
SV40 promoter	3635-3992
SV40 ori	3843-3978
PuroR	4027-4626
HSV TK poly(A) signal	4858-4905

➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur质粒(5930bp)的图谱如下:



➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur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

XmaI

NotI SmaI BamHI HindIII EcoRI EcoRV

1701 GCGGCCGCTC TAGCCCGGGC GGATCCAAGC TTCTGCAGGA ATTCGATATC
CGCCGGCGAG ATCGGGCCCG CCTAGGTTTCG AAGACGTCTT TAAGCTATAG

P2A sequence

SalI BglIII XhoI G S G A T N F S L L K

1751 GTCGACAGAT CTCTCGAGGG AAGCGGAGCT ACTAACTTCA GCCTGCTGAA
CAGCTGTCTA GAGAGCTCCC TTCGCCTCGA TGATTGAAGT CGGACGACTT

Q A G D V E E N P G P mCherry sequence

1801 GCAGGCTGGA GACGTGGAGG AGAACCTGG ACCTATGGTG AGCAAGGGCG
CGTCCGACCT CTGCACCTCC TCTTGGGACC TGGATACCAC TCGTTCCCGC

1851 AGGAGGATAA CATGGCCATC ATCAAGGAGT TCATGCGCTT CAAGGTGCAC
TCCTCCTATT GTACCGGTAG TAGTTCCTCA AGTACGCGAA GTTCCACGTG

1901 ATGGAGGGCT CCGTGAACGG CCACGAGTTC GAGATCGAGG GCGAGGGCGA
TACCTCCCGA GGCACCTGCC GGTGCTCAAG CTCTAGCTCC CGCTCCCGCT

1951 GGGCCGCCCC TACGAGGGCA CCCAGACCGC CAAGCTGAAG GTGACCAAGG
CCCGGCGGGG ATGCTCCCGT GGTCTGGCG GTTCGACTTC CACTGGTTCC

2001 GTGGCCCCCT GCCCTTCGCC TGGGACATCC TGTCCCTCA GTTCATGTAC
CACCGGGGGA CGGGAAGCGG ACCCTGTAGG ACAGGGGAGT CAAGTACATG

2051 GGCTCCAAGG CCTACGTGAA GCACCCCGCC GACATCCCCG ACTACTTGAA
 CCGAGTTCC GGATGCACTT CGTGGGGCGG CTGTAGGGGC TGATGAACTT

2101 GCTGTCCTTC CCCGAGGGCT TCAAGTGGGA GCGCGTGATG AACTTCGAGG
 CGACAGGAAG GGGCTCCCGA AGTTCACCCT CGCGCACTAC TTGAAGCTCC

2151 ACGGCGGCGT GGTGACCGTG ACCCAGGACT CCTCCCTGCA GGACGGCGAG
 TGCCGCCGCA CCACTGGCAC TGGGTCCTGA GGAGGGACGT CCTGCCGCTC

2201 TTCATCTACA AGGTGAAGCT GCGCGGCACC AACTTCCCCT CCGACGGCCC
 AAGTAGATGT TCCAATTGCA CGCGCCGTGG TTGAAGGGGA GGCTGCCGGG

2251 CGTAATGCAG AAGAAGACCA TGGGCTGGGA GGCCTCCTCC GAGCGGATGT
 GCATTACGTC TTCTTCTGGT ACCCGACCCT CCGGAGGAGG CTCGCCTACA

2301 ACCCCGAGGA CGGCGCCCTG AAGGGCGAGA TCAAGCAGAG GCTGAAGCTG
 TGGGGCTCCT GCCGCGGGAC TTCCCGCTCT AGTTTGTCTC CCACTTCGAC

2351 AAGGACGGCG GCCACTACGA CGCTGAGGTC AAGACCACCT ACAAGGCCAA
 TTCCTGCCGC CGGTGATGCT GCGACTCCAG TTCTGGTGA TGTTCGGTT

2401 GAAGCCCGTG CAGCTGCCCG GCGCCTACAA CGTCAACATC AAGTTGGACA
 CTTCGGGCAC GTCGACGGGC CGCGGATGTT GCAGTTGTAG TTCAACCTGT

2451 TCACCTCCCA CAACGAGGAC TACACCATCG TGGAACAGTA CGAACGCGCC
 AGTGGAGGGT GTTGCTCCTG ATGTGGTAGC ACCTTGTCTAT GCTTGC GCGG

XbaI | D

2501 GAGGGCCGCC ACTCCACCGG CGGCATGGAC GAGCTGTACA AGTCTAGAGA
 CTCCCGCGCG TGAGGTGGCC GCCGTACCTG CTCGACATGT TCAGATCTCT

Flag tag

Y K D D D D K ApaI

2551 TTACAAGGAT GACGACGATA AGTAAAGGGCC CGGTACCTTA ATTAATTAAG
 AATGTTCCCTA CTGCTGCTAT TCATTCCCGG GCCATGGAAT TAATTAATTC

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

AarI	AbsI	AcvI	AfeI	AflII	AgeI	AhlI
Aor51HI	AscI	AsiGI	AsiSI	BaeI	BbrPI	BcuI
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	SpeI	SwaI	Vha464I	XagI		

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

AccI	GT`MK,AC	1752	MluI	A`CGCG,T	3041
ApaI	G,GGCC`C	2580	NdeI	CA`TA,TG	1274
BamHI	G`GATC,C	1721	NheI	G`CTAG,C	1631
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	2270	NotI	GC`GGCC,GC	1702
BbvCI	CC`TCA,GC	2373	Paer7I	C`TCGA,G	1763
BclI	T`GATC,A	2812	PciI	A`CATG,T	5878
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4678	PflFI	GACN`N,NGTC	4069
BglII	A`GATC,T	1757	PflMI	CCAN,NNN`NTGG	2274
BmgBI	CAC GTC	1813	PspOMI	G`GGCC,C	2576
BmtI	G,CTAG`C	1635	RsrII	CG`GWC,CG	4143

BsgI	GTGCAGNNNNNNNNNNNNNNNN, NN`	2429	SacI	G, AGCT`C	1689
BsiWI	C`GTAC, G	4083	SalI	G`TCGA, C	1751
BspDI	AT`CG, AT	3995	SbfI	CC, TGCA`GG	2190
BspEI	T`CCGG, A	4140	ScaI	AGT ACT	616
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4678	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	3930
BsrGI	T`GTAC, A	2535	SgrAI	CR`CCGG, YG	2516
BssHII	G`CGCG, C	4482	SmaI	CCC GGG	1716
BstBI	TT`CG, AA	4642	SnaBI	TAC GTA	1380
BstXI	CCAN, NNNN`NTGG	1697	SrfI	GCCC GGGC	1716
ClaI	AT`CG, AT	3995	TspMI	C`CCGG, G	1714
CspCI	, NN`(N) ₁₁ CAANNNNNGTGG(N) ₁₀ , NN`	1416	Tth111I	GACN`N, NGTC	4069
Eco53kI	GAG CTC	1687	XbaI	T`CTAG, A	2543
EcoRI	G`AATT, C	1739	XcmI	CCANNNN, N`NNNNTGG	2521
EcoRV	GAT ATC	1747	XhoI	C`TCGA, G	1763
HindIII	A`AGCT, T	1727	XmaI	C`CCGG, G	1714
HpaI	GTT AAC	2918	XmnI	GAANN NNTTC	735
MfeI	C`AATT, G	2905			

➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-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 (1837-1853): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-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
D2826-1μg	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-Pur	1μg
D2826-100μg	pCMV-MCS-P2A-mCherry-Flag-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-MCS-P2A-mCherry-Flag-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
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
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