

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

产品编号	产品名称	包装
D2827-1 $\mu$ g	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla	1 $\mu$ g
D2827-100 $\mu$ g	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla	100 $\mu$ g

### 产品简介:

- pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla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。

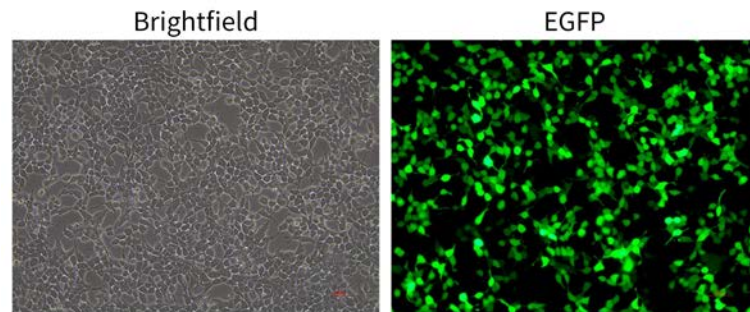
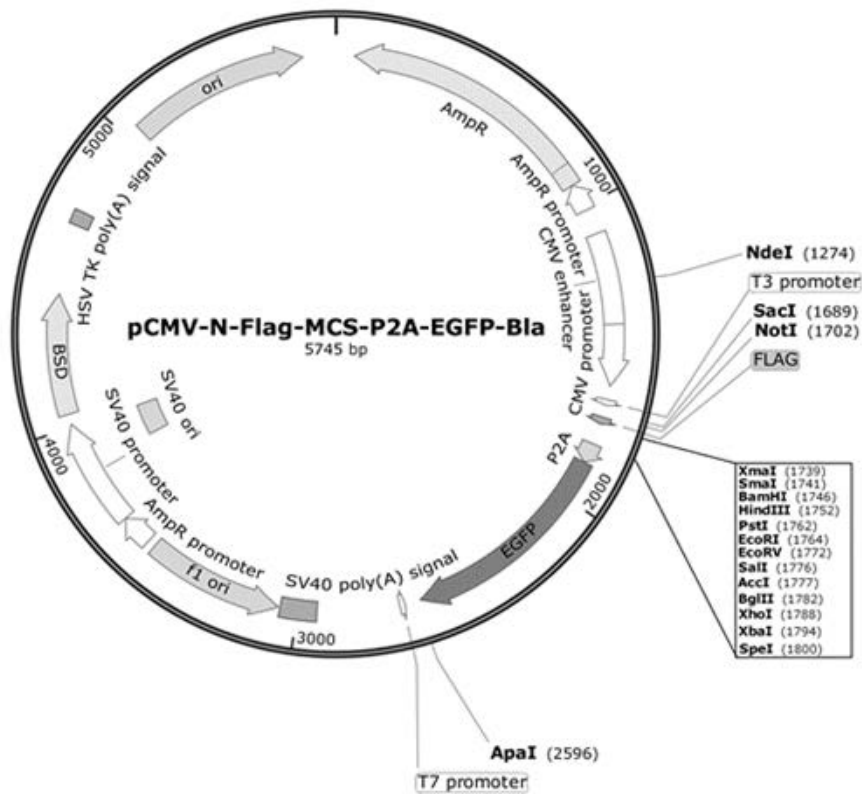


图1. 碧云天pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。本图仅供参考，实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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-Flag-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
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	3959-3994
BSD	4043-4441
HSV TK poly(A) signal	4673-4720

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla质粒(5745bp)的图谱如下:



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

SacI

1651 CGAAATTAAC CCTCACTAAA GGGAACAAAA 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 GCCCGCCTAG

PstI

AccI

HindIII EcoRI EcoRV SalI BglIII XhoI XbaI

1751 CAAGCTTCTG CAGGAATTCG ATATCGTCTGA 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 CTAGTGGAAAG CGGAGCTACT AACTTCAGCC TGCTGAAGCA GGCTGGAGAC  
GATCACCTTC GCCTCGATGA TTGAAGTCGG ACGACTTCGT CCGACCTCTG

V E E N P G P EGFP sequence

1851 GTGGAGGAGA ACCCTGGACC TATGGTGAGC AAGGGCGAGG AGCTGTTTAC  
CACCTCCTCT TGGGACCTGG ATACCACTCG TTCCCCTCC TCGACAAGTG

1901 CGGGGTGGTG CCCATCCTGG TCGAGCTGGA CGGCGACGTA AACGGCCACA  
GCCCCACCAC GGGTAGGACC AGCTCGACCT GCCGCTGCAT TTGCCGGTGT

1951 AGTTCAGCGT GTCCGGCGAG GGCGAGGGCG ATGCCACCTA CGGCAAGCTG  
TCAAGTCGCA CAGGCCGCTC CCGTCCCGC TACGGTGGAT GCCGTTTCGAC

2001 ACCCTGAAGT TCATCTGCAC CACCGCAAG CTGCCCGTGC CCTGGCCAC  
TGGGACTTCA AGTAGACGTG GTGGCCGTTT GACGGGCACG GGACCGGGTG

2051 CCTCGTGACC ACCCTGACCT ACGGCGTGCA GTGCTTCAGC CGCTACCCCG  
GGAGACTGG TGGGACTGGA TGCCGCACGT CACGAAGTCG GCGATGGGGC

2101 ACCACATGAA GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC CGAAGGCTAC  
TGGTGTACTT CGTCGTGCTG AAGAAGTTCA GCGGGTACGG GCTTCCGATG

2151 GTCCAGGAGC GCACCATCTT CTTCAAGGAC GACGGCAACT ACAAGACCCG  
CAGGTCCTCG CGTGGTAGAA GAAGTTCCTG CTGCCGTTGA TGTTCCTGGGC

2201 CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCGC ATCGAGCTGA  
GCGGCTCCAC TTCAAGCTCC CGCTGTGGGA CCACTTGGCG TAGCTCGACT

2251 AGGGCATCGA CTTCAAGGAG GACGGCAACA TCCTGGGGCA CAAGCTGGAG  
TCCCGTAGCT GAAGTTCCTC CTGCCGTTGT AGGACCCCGT GTTCGACCTC

2301 TACAACTACA ACAGCCACAA CGTCTATATC ATGGCCGACA AGCAGAAGAA  
ATGTTGATGT TGTCGGTGTG GCAGATATAG TACCGGCTGT TCGTCTTCTT

2351 CGGCATCAAG GTGAACTTCA AGATCCGCCA CAACATCGAG GACGGCAGCG  
GCCGTAGTTC CACTTGAAGT TCTAGGCGGT GTTGTAGCTC CTGCCGTCGC

2401 TGCAGCTCGC CGACCACTAC CAGCAGAACA CCCCATCGG CGACGGCCCC  
ACGTCGAGCG GCTGGTGATG GTCGTCTTGT GGGGGTAGCC 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 ATGACGAGC TGTACAAGTA AGGGCCCGGT  
GGCGGCCCTA GTGAGAGCCG TACCTGCTCG ACATGTTTCA TCCCGGGCCA

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla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	BbvCI	BfrI	BoxI	BseAI
BsePI	BshTI	BsiWI	Bsp13I	BspEI	BspQI	BspTI
BssHII	BssNAI	Bst98I	Bst1107I	BstAFI	BstEII	BstENI
BstPI	BstPAI	BstZ17I	CpoI	CspI	CspAI	DinI
Eco47III	Eco72I	Eco91I	EcoNI	EcoO65I	EgeI	EheI
FseI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KasI	KflI
Kpn2I	LguI	MauBI	Mly113I	MreI	MroI	MspCI
MssI	NarI	Nb.BbvCI	Nt.BbvCI	Nt.BspQI	PalAI	PaqCI
PauI	PciSI	Pfl123II	PflFI	PflMI	PI-PspI	PI-SceI
PinAI	PluTI	PmaCI	PmeI	PmlI	PshAI	PspCI
PspEI	PspLI	PspXI	PsrI	PsyI	PteI	RgaI
RigI	RsrII	Rsr2I	SanDI	SapI	SbfI	SdaI
SfaAI	SfoI	SgfI	SgrAI	SgrDI	SgsI	SmiI
Sse8387I	SspDI	SwaI	Tth111I	Van91I	Vha464I	XagI
XcmI						

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

AccI	GT`MK,AC	1777	MfeI	C`AATT,G	2921
AhdI	GACNN,N`NNGTC	136	MluI	A`CGCG,T	3057
ApaI	G,GGCC`C	2596	MscI	TGG CCA	4046
BamHI	G`GATC,C	1746	NdeI	CA`TA,TG	1274
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	4128	NheI	G`CTAG,C	1631
BclI	T`GATC,A	2828	NotI	GC`GGCC,GC	1702
BfuAI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4493	NruI	TCG CGA	4274
BglII	A`GATC,T	1782	Paer7I	C`TCGA,G	1788

BlpI	GC`TNA,GC	4438	PciI	A`CATG,T	5693
BmgBI	CAC GTC	1850	PpuMI	RG`GWC,CY	4202
BmtI	G,CTAG`C	1635	PspOMI	G`GGCC,C	2592
BsaXI	,NNN`(N) <sub>9</sub> ACNNNNNCTCC(N) <sub>7</sub> ,NNN`	3221	PstI	C,TGCA`G	1762
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	1840	SacI	G,AGCT`C	1689
BspDI	AT`CG,AT	4011	SacII	CC,GC`GG	1696
BspMI	ACCTGCNNNN`NNNN,	4493	SalI	G`TCGA,C	1776
BsrGI	T`GTAC,A	2581	ScaI	AGT ACT	616
BstBI	TT`CG,AA	4457	SfiI	GGCCN,NNN`NGGCC	3946
BstXI	CCAN,NNNN`NTGG	1697	SmaI	CCC GGG	1741
ClaiI	AT`CG,AT	4011	SnaBI	TAC GTA	1380
DraIII	CAC,NNN`GTG	3287	SpeI	A`CTAG,T	1800
EarI	CTCTTCN`NNN,	931	SrfI	GCCC GGGC	1741
Eco53kI	GAG CTC	1687	StuI	AGG CCT	3992
EcoRI	G`AATT,C	1764	TspMI	C`CCGG,G	1739
EcoRV	GAT ATC	1772	XbaI	T`CTAG,A	1794
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	1840	XhoI	C`TCGA,G	1788
HindIII	A`AGCT,T	1752	XmaI	C`CCGG,G	1739
HpaI	GTT AAC	2934	XmnI	GAANN NNTTC	735

➤ pCMV-N-Flag-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 (1874-1890): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla的全序列信息请参考碧云天的网站上本质粒的信息。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D2827-1μg	pCMV-N-Flag-MCS-P2A-EGFP-Bla	1μg
D2827-100μg	pCMV-N-Flag-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-Flag-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
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
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
D2828	pCMV-MCS-P2A-EGFP-HA-Zeo	1µg/100µg
D2829	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Myc-Zeo	1µg/100µg

Version 2022.03.18