

pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo

产品编号	产品名称	包装
D2633-1 μ g	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo	1 μ g
D2633-100 μ g	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo	100 μ g

产品简介:

- pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo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、增强绿色荧光蛋白EGFP和新霉素(Neomycin)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，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。

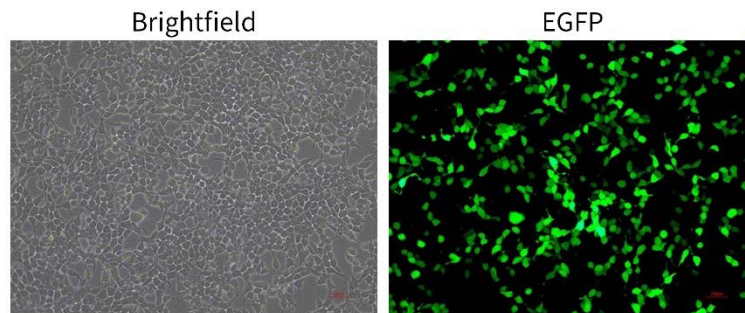


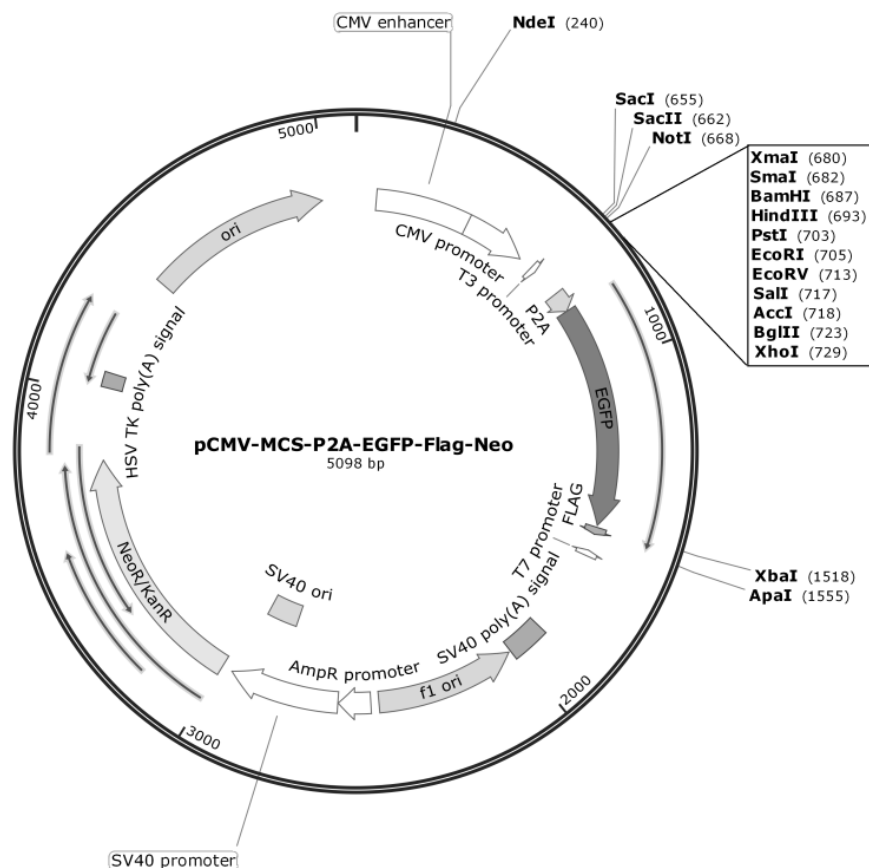
图1. 碧云天pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。本图仅供参考，实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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]。
- 本质粒为卡那霉素(Kanamycin)和新霉素(Neomycin)抗性。可利用其卡那霉素抗性，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G-418 (ST081/ST082)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。

- pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV enhancer	67-370
CMV promoter	371-574
T3 promoter	620-638
P2A	744-800
EGFP	801-1517
Flag	1524-1547
T7 promoter	1602-1620
SV40 poly(A) signal	1894-2015
f1 ori	2022-2475
AmpR promoter	2502-2606
SV40 promoter	2608-2965
SV40 ori	2816-2951
NeoR/KanR	3000-3794
HSV-thymidine kinase (TK) poly(A) signal	4026-4073
Ori	4402-4990

- pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo质粒(5098bp)的图谱如下:



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

	SacI	SacII	NotI	XmaI	BamHI	HindIII	
647	GCTGGAGCTC	CACCGCGGTG	GCGGCCGCTC	TAGCCCGGGC	GGATCCAAGC		
	CGACCTCGAG	GTGGCGCCAC	CGCCGGCGAG	ATCGGGCCCG	CCTAGGTTCG		
			SalI				P2A sequence
697	PstI	EcoRI	EcoRV	AccI	BglII	XhoI	G S G A
	TTCTGCAGGA	ATTTCATATC	GTCGACAGAT	CTCTCGAGGG	AAGCGGAGCT		
	AAGACGTCTT	TAAGCTATAG	CAGCTGTCTA	GAGAGCTCCC	TTCGCCTCGA		
			P2A sequence				
747	T N F S L L K	Q A G	D V E E	N P G			
	ACTAACTTCA	GCCTGCTGAA	GCAGGCTGGA	GACGTGGAGG	AGAACCCTGG		
	TGATTGAAGT	CGGACGACTT	CGTCCGACCT	CTGCACCTCC	TCTTGGGACC		
			EGFP sequence				
797	ACCTATGGTG	AGCAAGGGCG	AGGAGCTGTT	CACCGGGGTG	GTGCCCATCC		
	TGGATACCAC	TCGTTCCCGC	TCCTCGACAA	GTGGCCCCAC	CACGGGTAGG		
847	TGGTCGAGCT	GGACGGCGAC	GTAACGGCC	ACAAGTTCAG	CGTGTCCGGC		
	ACCAGCTCGA	CCTGCCGCTG	CATTTGCCGG	TGTTCAAGTC	GCACAGGCCG		
897	GAGGGCGAGG	GCGATGCCAC	CTACGGCAAG	CTGACCCTGA	AGTTCATCTG		
	CTCCCCTCC	CGCTACGGTG	GATGCCGTTT	GACTGGGACT	TCAAGTAGAC		
947	CACCACCGGC	AAGCTGCCCCG	TGCCCTGGCC	CACCCTCGTG	ACCACCCTGA		
	GTGGTGGCCG	TTCGACGGGC	ACGGGACCGG	GTGGGAGCAC	TGGTGGGACT		
997	CCTACGGCGT	GCAAGTCTTC	AGCCGCTACC	CCGACCACAT	GAAGCAGCAC		
	GGATGCCGCA	CGTCACGAAG	TCGGCGATGG	GGCTGGTGTA	CTTCGTCGTG		
1047	GACTTCTTCA	AGTCCGCCAT	GCCCCAAGGC	TACGTCCAGG	AGCGCACCAT		

CTGAAGAAGT TCAGGCGGTA CGGGCTTCCG ATGCAGGTCC TCGCGTGGTA

1097 CTTCTTCAAG GACGACGGCA ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTCG
GAAGAAGTTC CTGCTGCCGT TGATGTTCTG GGCGCGGCTC CACTTCAAGC

1147 AGGGCGACAC CCTGGTGAAC CGCATCGAGC TGAAGGGCAT CACTTCAAG
TCCCCTGTG GGACCACTTG GCGTAGCTCG ACTTCCCCTA GCTGAAGTTC

1197 GAGGACGGCA ACATCCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAAC ACAACAGCCA
CTCCTGCCGT TGTAGGACCC CGTGTTCGAC CTCATGTTGA TGTGTCCGGT

1247 CAACGTCTAT ATCATGGCCG ACAAGCAGAA GAACGGCATC AAGGTGAACT
GTTGCAGATA TAGTACCGGC TGTTCGTCTT CTTGCCGTAG TTCCACTTGA

1297 TCAAGATCCG CCACAACATC GAGGACGGCA GCGTGCAGCT CGCCGACCAC
AGTTCTAGGC GGTGTTGTAG CTCCTGCCGT CGCACGTCGA GCGGCTGGTG

1347 TACCAGCAGA ACACCCCAT CGGCGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA
ATGGTCTCT TGTGGGGGTA GCCGCTGCCG GGCACGACG ACGGGCTGTT

1397 CCACTACCTG AGCACCCAGT CCGCCCTGAG CAAAGACCCC AACGAGAAGC
GGTGATGGAC TCGTGGGTCA GGCGGGACTC GTTTCTGGGG TTGCTCTTCG

1447 GCGATCACAT GGTCTGCTG GAGTTCGTGA CCGCCGCCGG GATCACTCTC
CGCTAGTGTA CCAGGACGAC CTCAAGCACT GGCGGCGGCC CTAGTGAGAG

Flag tag
XbaI | D Y K D D D D K

1497 GGCATGGACG AGCTGTACAA GTCTAGAGAT TACAAGGATG ACGACGATAA
CCGTACCTGC TCGACATGTT CAGATCTCTA ATGTTCTCTAC TGCTGCTATT

- ApaI

1547 GTAAGGGCCC
CATTCCGGG

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

AclI	AfeI	AflII	AhdI	AscI	AsiSI	BaeI
BbsI	BbvCI	BlpI	BsiWI	BspEI	BspQI	BssHII
BstEII	BstZ17I	EarI	EcoNI	FseI	NruI	PaqCI
PflMI	PmeI	PmlI	PpuMI	PshAI	PspXI	SapI
SbfI	ScaI	SgrAI	SpeI	SwaI	XcmI	XmnI

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

AccI	GT`MK, AC	718	MluI	A`CGCG, T	2016
ApaI	G, GGCC`C	1555	MscI	TGG CCA	3210
ApaLI	G`TGCA, C	4732	NarI	GG`CG, CC	3128
BamHI	G`GATC, C	687	NdeI	CA`TA, TG	240
BcgI	, NN`(N) ₁₀ CGA(N) ₆ TGC(N) ₁₀ , NN`	891	NheI	G`CTAG, C	597
BclI	T`GATC, A	1787	NotI	GC`GGCC, GC	668
BglII	A`GATC, T	723	Paer7I	`GCGC, C	729
BmgBI	CAC GTC	779	PciI	A`CATG, T	5046
BmtI	G, CTAG`C	601	PflFI	GACN`N, NGTC	3246
BsaI	GGTCTCN`NNNN	4117	PluTI	G, GCGC`C	3131
BsaXI	, NNN`(N) ₉ AC(N) ₅ CTCC(N) ₇ , NNN`	2180	PspOMI	G`GGCC, C	1551
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	769	PstI	C, TGCA`G	703
BspDI	AT`CG, AT	2968	PvuI	CG, AT`CG	1633
BsrDI	GCAATG, NN`	3361	RsrII	CG`GWC, CG	3644
BsrGI	T`GTAC, A	1510	SacI	G, AGCT`C	655
BstBI	TT`CG, AA	3810	SacII	CC, GC`GG	662
BstXI	CCAN, NNNN`NTGG	663	SalI	G`TCGA, C	717
Clal	AT`CG, AT	2968	SfiI	GGCCN, NNN`NGGCC	2903
CspCI	NN`(N) ₁₁ CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₀ , NN`	382	SfoI	GGC GCC	3129
DraIII	CAC, NNN`GTG	2246	SmaI	CCC GGG	682
Eco53KI	GAG CTC	653	SnaBI	TAC GTA	346

EcoRI	G`AATT,C	705	SrfI	GCCC GGGC	682
EcoRV	GAT ATC	713	StuI	AGG CCT	2949
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	769	TspMI	C`CCGG,G	680
HindIII	A`AGCT,T	693	Tth111I	GACN`N,NGTC	3246
HpaI	GTT AAC	1893	XbaI	T`CTAG,A	1518
KasI	G`GCGC,C	3127	XhoI	C`TCGA,G	729
MfeI	C`AATT,G	1880	XmaI	C`CCGG,G	680

➤ pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo质粒中对于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 (620-639): 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'

EGFP primer (803-819): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo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
D2633-1μg	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo	1μg
D2633-100μg	pCMV-MCS-P2A-EGFP-Flag-Neo	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-EGFP-Flag-Neo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
ST081	G-418	1g
ST082	G-418	5g
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
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