

pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------------------|-------------------------------|-------------|
| D2796-1 μ g | pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg | 1 μ g |
| D2796-100 μ g | pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg | 100 μ g |

产品简介:

- pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg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、红色荧光蛋白mCherry和潮霉素B (Hygromycin B)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; 可以方便地使用抗HA标签的抗体(AF5057/AF2305/AF0039/AH158)来检测目的蛋白; 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。

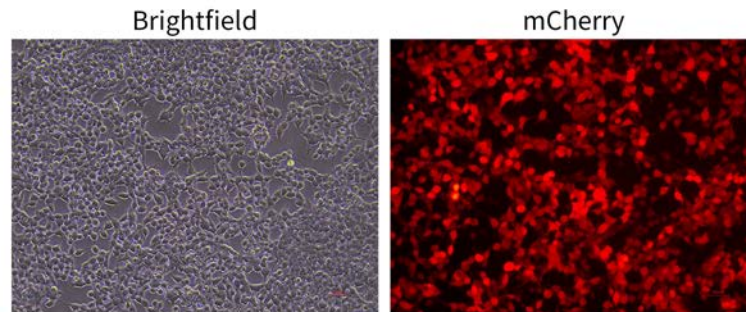
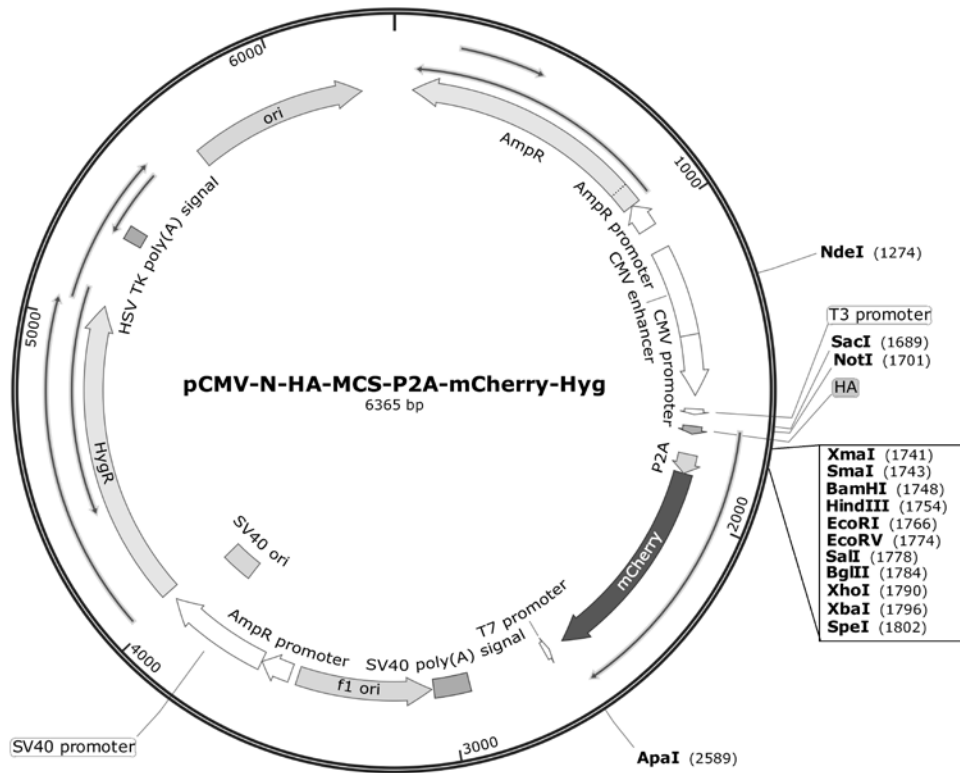


图1. 碧云天pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片, 右侧为荧光照片。本图仅供参考, 实际拍摄效果会因具体实验条件的不同而有所不同。

- 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)和潮霉素B (Hygromycin B)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Hygromycin B (ST1389) 筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg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 |
| mCherry | | 1874-2584 |
| T7 promoter | | 2636-2654 |
| SV40 poly(A) signal | | 2928-3049 |
| f1 ori | | 3056-3511 |
| AmpR promoter | | 3538-3642 |
| SV40 promoter | | 3644-4001 |
| SV40 ori | | 3852-3987 |
| HygR | | 4036-5061 |

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg质粒(6365bp)的图谱如下:



➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg的多克隆位点的详细图谱如下:

| | SacI | | NotI |
|------|------------|-------------------|-------------------------|
| 1651 | CGAAATTAAC | CCTCACTAAA | GGGAACAAAA |
| | GCTTTAATTG | GGAGTGATTT | CCCTTGTTTT |
| | | HA tag | |
| | | Y P Y D V P D Y A | |
| 1701 | CGGCCGCCAT | GTACCCATAC | GATGTTCCAG |
| | GCCGGCGGTA | CATGGGTATG | CTACAAGGTC |
| | | HindIII | EcoRI |
| | | EcoRV | Sali |
| | | BglIII | XbaI |
| 1751 | TCCAAGCTTC | TGCAGGAATT | CGATATCGTC |
| | AGGTTCGAAG | ACGTCCTTAA | GCTATAGCAG |
| | | P2A sequence | |
| | SpeI | G S G | A T N F S L L K Q A G D |
| 1801 | AACTAGTGG | AGCGGAGCTA | CTAACTTCAG |
| | TTGATCACCT | TCGCCTCGAT | GATTGAAGTC |
| | | V E E N P G P | mCherry sequence |
| 1851 | ACGTGGAGGA | GAACCTTGG | CCTATGGTGA |
| | TGCACCTCCT | CTTGGGACCT | GGATACCACT |
| 1901 | ATGGCCATCA | TCAAGGAGTT | CATGCGCTTC |
| | TACCGGTAGT | AGTTCCTCAA | GTACGCGAAG |
| 1951 | CGTGAACGGC | CACGAGTTCG | AGATCGAGGG |
| | GCACTTGCCG | GTGCTCAAGC | TCTAGCTCCC |
| 2001 | ACGAGGGCAC | CCAGACCGCC | AAGCTGAAGG |

TGCTCCCGTG GGTCTGGCGG TTCGACTTCC ACTGGTTCCT ACCGGGGGAC
 2051 CCCTTCGCCT GGGACATCCT GTCCCCTCAG TTCATGTACG GCTCCAAGGC
 GGGAAAGCGGA CCCTGTAGGA CAGGGGAGTC AAGTACATGC CGAGGTTCCT
 2101 CTACGTGAAG CACCCCGCCG ACATCCCCGA CTACTTGAAG CTGTCTTTCC
 GATGCACTTC GTGGGGCGGC TGTAGGGGCT GATGAACTTC GACAGGAAGG
 2151 CCGAGGGCTT CAAGTGGGAG CGCGTGATGA ACTTCGAGGA CGGCGGCGTG
 GGCTCCCGAA GTTCACCCTC GCGCACTACT TGAAGCTCCT GCCGCCGCAC
 2201 GTGACCGTGA CCCAGGACTC CTCCCTGCAG GACGGCGAGT TCATCTACAA
 CACTGGCACT GGGTCCTGAG GAGGGACGTC CTGCCGCTCA AGTAGATGTT
 2251 GGTGAAGCTG CGCGGCACCA ACTTCCCCTC CGACGGCCCC GTAATGCAGA
 CCACTTCGAC GCGCCGTGGT TGAAGGGGAG GCTGCCGGGG CATTACGTCT
 2301 AGAAGACCAT GGGCTGGGAG GCCTCCTCCG AGCGGATGTA CCCCAGGAC
 TCTTCTGGTA CCCGACCCTC CGGAGGAGGC TCGCCTACAT GGGGCTCCTG
 2351 GGCGCCCTGA AGGGCGAGAT CAAGCAGAGG CTGAAGCTGA AGGACGGCGG
 CCGCGGGACT TCCCGCTCTA GTTCGTCTCC GACTTCGACT TCCTGCCGCC
 2401 CCACTACGAC GCTGAGGTCA AGACCACCTA CAAGCCAAG AAGCCCGTGC
 GGTGATGCTG CGACTCCAGT TCTGGTGGAT GTTCCGGTTC TTCGGGCACG
 2451 AGCTGCCCCG CGCCTACAAC GTCAACATCA AGTTGGACAT CACCTCCCAC
 TCGACGGGCC GCGGATGTTG CAGTTGTAGT TCAACCTGTA GTGGAGGGTG
 2501 AACGAGGACT ACACCATCGT GGAACAGTAC GAACGCGCCG AGGGCCGCCA
 TTGCTCCTGA TGTGGTAGCA CCTTGTTCATG CTTGCGCGGC TCCCGGCGGT
 ApaI
 2551 CTCCACCGGC GGCATGGACG AGCTGTACAA GTAGGGGCC GGTACCTTAA
 GAGGTGGCCG CCGTACCTGC TCGACATGTT CATCCCGGG CCATGGAATT

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg中没有的酶切位点包括:

| | | | | | | |
|---------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| AarI | AbsI | AcvI | AfeI | AflII | AgeI | Aor51HI |
| AscI | AsiGI | BaeI | BbrPI | BfrI | BlpI | Bpu1102I |
| BsePI | BshTI | BsiWI | Bsp68I | Bsp1720I | BspQI | BspTI |
| BssHII | BssNAI | Bst98I | Bst1107I | BstAFI | BstENI | BstXI |
| BstZ17I | BtuMI | CelII | Cfr42I | CspAI | Eco47III | Eco72I |
| EcoNI | FseI | FspAI | I-CeuI | I-PpoI | I-SceI | KspI |
| LguI | MauBI | MreI | MspCI | MssI | NruI | PalAI |
| PauI | PciSI | Pfl23II | PI-PspI | PI-SceI | PinAI | PmaCI |
| PmeI | PmlI | PpuMI | Psp5II | PspCI | PspLI | PspPPI |
| PspXI | PsrI | RigI | SacII | SanDI | SapI | Sfr303I |
| SgrBI | SgrDI | SgsI | SmiI | SstII | SwaI | Vha464I |
| XagI | | | | | | |

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

| | | | | | |
|-------|--|------|--------|-------------|------|
| AccI | GT`MK,AC | 1779 | MluI | A`CGCG,T | 3050 |
| AleI | CACNN NNGTG | 2516 | MscI | TGG CCA | 1904 |
| ApaI | G,GGCC`C | 2589 | NdeI | CA`TA,TG | 1274 |
| AsiSI | GCG,AT`CGC | 4400 | NotI | GC`GGCC,GC | 1701 |
| BamHI | G`GATC,C | 1748 | Paer7I | C`TCGA,G) | 1790 |
| BbsI | GAAGACNN`NNNN, | 2309 | PciI | A`CATG,T | 6313 |
| BbvCI | CC`TCA,GC | 2412 | PflFI | GACN`N,NGTC | 4540 |
| BcgI | NN`(N) ₁₀ CGA(N) ₆ TGC(N) ₁₀ ,NN` | 641 | PshAI | GACNN NNGTC | 4063 |
| BclI | T`GATC,A | 2821 | PspOMI | G`GGCC,C | 2585 |

| | | | | | |
|---------|---|------|---------|-----------------------|------|
| BglII | A`GATC,T | 1784 | RsrII | CG`GWC,CG | 4444 |
| BmgBI | CAC GTC | 1852 | SacI | G,AGCT`C | 1689 |
| Bpu10I | CC`TNA,GC | 2412 | SalI | G`TCGA,C | 1778 |
| BsgI | GTGCAGNNNNNNNNNNNNNNN,NN` | 2468 | SbfI | CC,TCGA`GG | 2229 |
| BsmBI | CGTCTCN`NNNN, | 1842 | SfiI | GGCCN,NNN`NGGCC | 3939 |
| BspDI | AT`CG,AT | 4004 | SgrAI | CR`CCGG,YG | 2555 |
| BsrGI | T`GTAC,A | 2574 | SmaI | CCC GGG | 1743 |
| BstBI | TT`CG,AA | 5077 | SnaBI | TAC GTA | 1380 |
| ClaI | AT`CG,AT | 4004 | SpeI | A`CTAG,T | 1802 |
| CspCI | NN`(N) ₁₁ CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₀ ,NN` | 1416 | SrfI | GCCC GGGC | 1743 |
| EarI | CTCTTCN`NNN, | 931 | TspMI | C`CCGG,G | 1741 |
| Eco53kI | GAG CTC | 1687 | Tth111I | GACN`N,NGTC | 4540 |
| EcoRI | G`AATT,C | 1766 | XbaI | T`CTAG,A | 1796 |
| EcoRV | GAT ATC | 1774 | XcmI | CCANNNN,N`NNNNT GG | 2560 |
| Esp3I | CGTCTCN`NNNN, | 1842 | XhoI | C`TCGA,G | 1790 |
| HindIII | A`AGCT,T | 1754 | XmaI | C`CCGG,G | 1741 |
| HpaI | GTT AAC | 2927 | XmnI | GAANN NNTTC | 735 |
| MfeI | C`AATT,G | 2914 | | | |

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg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 (1876-1892): 5' CCTCGCCCTTGCTCACC 3'

➤ pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg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 |
|-------------|-------------------------------|-------|
| D2796-1μg | pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg | 1μg |
| D2796-100μg | pCMV-N-HA-MCS-P2A-mCherry-Hyg | 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-mCherry-Hyg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 |
|--------------|---------------------|-------|
| ST1389-50mg | Hygromycin B (潮霉素B) | 50mg |
| ST1389-250mg | Hygromycin B (潮霉素B) | 250mg |
| ST1389-1g | Hygromycin B (潮霉素B) | 1g |
| ST1389-5g | Hygromycin B (潮霉素B) | 5g |
| 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 |
| 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