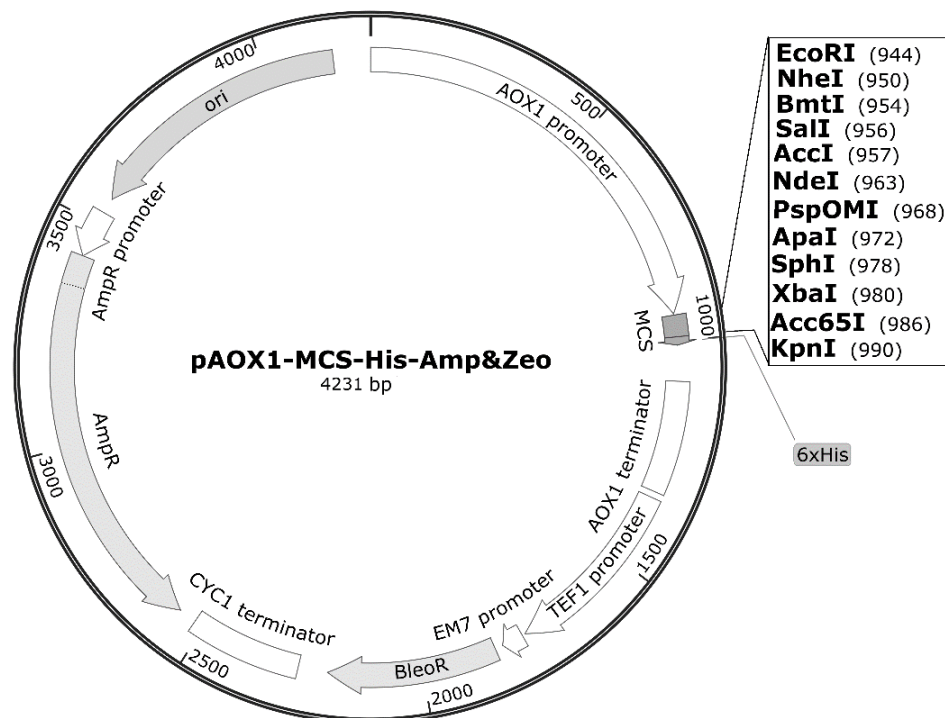


## pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo

产品编号	产品名称	包装
D2883-1μg	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	1μg
D2883-100μg	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	100μg

### 产品简介:

- pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo是碧云天研发的以毕赤酵母(*Pichia pastoris*)为表达菌株,表达C端带有His标签的目的蛋白的真核表达质粒。在多克隆位点(Multiple cloning sites, MCS)按照读码框插入不带有终止密码子的目的基因,就可以表达C端带有His标签的目的蛋白。
- 毕赤酵母作为蛋白真核表达系统有很多优势:易于操作,蛋白正确折叠以及翻译后修饰等。与昆虫表达系统和哺乳动物细胞表达系统相比,它快速、高效且经济,通常外源蛋白还具有较高的表达水平。与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)相比,其外源蛋白表达水平往往高10-100倍;它们均能进行分泌蛋白的N-连接糖苷键修饰,表达分泌蛋白进行糖基化修饰时糖链长度是有差别的,毕赤酵母修饰的分泌蛋白的糖链长度通常是8-14甘露糖残基(Mannose residue),而酿酒酵母修饰的分泌蛋白的糖链长度通常是50-150个甘露糖残基;毕赤酵母很少对分泌蛋白进行O-连接糖苷键的修饰。
- 本质粒转化X-33, SMD1168H或GS115菌株后,因为宿主菌有功能完好的组氨酸脱氢酶基因,适合进行Zeocin筛选转化子,并能使目的基因在甲醇诱导后实现高水平表达。常用的毕赤酵母宿主菌GS115 (D0412)和KM71 (D0413),二者的组氨酸脱氢酶基因(*his4*)发生突变,阻止它们合成组氨酸,因此具有His<sup>4</sup>营养缺陷标记,适合在组氨酸缺少的培养基进行转化子筛选。GS115/X-33/SMD1168H菌株具有功能完整的*AOX1*基因,属于Mut<sup>+</sup> (Methanol utilization plus)表型,即甲醇利用正常,在甲醇诱导的情况下生产快速。KM71/KM71H菌株的*AOX1*位点被*ARG4*基因插入破坏,表型为Mut<sup>s</sup> (Methanol utilization slow),即甲醇利用缓慢,在甲醇诱导的情况下生产缓慢。
- 本质粒5'端含有醇氧化酶基因*AOX1*启动子,可以高效启动目的基因的毕赤酵母胞内表达。在毕赤酵母中,*AOX1*启动子属于甲醇诱导型强启动子,其严格依赖于甲醇的诱导,并受葡萄糖、果糖、甘油、乙醇等碳源的抑制,因此可通过控制葡萄糖、甘油等碳源的消耗和甲醇的流加来调控*AOX1*启动子的表达。
- 本质粒为氨苄青霉素(Ampicillin)和博来霉素(Zeocin)双抗性。大肠杆菌博来霉素筛选推荐浓度为25-50μg/ml(低盐LB培养基,NaCl浓度不能超过5g/L),酵母筛选推荐浓度为50-300μg/ml(YPD或基本培养基)。氨苄青霉素通常配制成为100mg/ml的储备液,使用时可以按照1:1000的比例稀释使用,即推荐使用浓度为100μg/ml。
- pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo质粒(4231bp)的图谱如下:



➤ pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
AOX1 promoter	2..940
6×His	992..1009
AOX1 terminator	1089..1335
TEF1 promoter	1350..1761
EM7 promoter	1769..1816
BleoR	1835..2209
CYC1 terminator	2275..2522
AmpR	2563..3423
AmpR promoter	3424..3528
ori	3563..4151

➤ pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo的详细图谱如下:

```

1      AOX1 promoter
AGATCTAACA TCCAAAGACG AAAGGTTGAA TGAAACCTTT TTGCCATCCG
TCTAGATTGT AGGTTTCTGC TTTCCAACCT ACTTTGGAAA AACGGTAGGC

51     ACATCCACAG GTCCATTCTC ACACATAAGT GCCAAACGCA ACAGGAGGGG
TGTTAGGTGTC CAGGTAAGAG TGTGTATTCA CGGTTTGCGT TGTCTCTCCC

101    ATACACTAGC AGCAGACCGT TGCAAACGCA GGACCTCCAC TCCTCTTCTC
TATGTGATCG TCGTCTGGCA ACGTTTGCCT CCTGGAGGTG AGGAGAAGAG

151    CTCAACACCC ACTTTTGCCA TCGAAAAACC AGCCCAGTTA TTGGGCTTGA
GAGTTGTGGG TGAAAACGGT AGCTTTTTTG TCGGGTCAAT AACCCGAAC

201    TTGGAGCTCG CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA ACACCATGAC
AACCTCGAGC GAGTAAGGTT AAGGAAGATA ATCCGATGAT TGTGGTACTG

251    TTTATTAGCC TGTCTATCCT GGCCCCCCTG GCGAGGTTC A TGTGTGTTA
AAATAATCGG ACAGATAGGA CCGGGGGGAC CGCTCCAAGT ACAAACAAAT

301    TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC CCGAACATCA CTCCAGATGA
AAAGGCTTAC GTTGTTCGAG GCGTAATGTG GGCTTGTAGT GAGGTCTACT

351    GGGCTTTCTG AGTGTGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC AAATGGCCCA
CCCGAAAGAC TCACACCCCA GTTTATCAA GTACAAGGGG TTTACCGGGT

401    AAACTGACAG TTTAAACGCT GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA
TTTACTGTC AAATTTGCGA CAGAACCCTG GATTATACTG TTTTCGCACT

451    TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCG TTGAAATGCT AACGGCCAGT
AGAGTAGGTT CACTTGTATT CAAACCAAGC AACTTTACGA TTGCCGGTCA

501    TGGTCAAAAA GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT CTTGTTTGGT
ACCAGTTTTT CTTTGAAGGT TTTCAGCCGT ATGGCAAACA GAACAAACCA

551    ATTGATTGAC GAATGCTCAA AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT
TAACTAACTG CTTACGAGTT TTTATTAGAG TAATTACGAA TCGCGTCAGA

601    CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG TGCCGAAACG CAAATGGGGA
GAGATAGCGA AGACTTGGGG CCACGTGGAC ACGGCTTTGC GTTTACCCCT

651    AACACCCGCT TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT GTATGCTTCC
TTGTGGGCGA AAAACCTACT AATACGTAAC AGAGGTGTAA CATACGAAGG

```

701 AAGATTCTGG TGGGAATACT GCTGATAGCC TAACGTTTCAT GATCAAAATT  
TTCTAAGACC ACCCTTATGA CGACTATCGG ATTGCAAGTA CTAGTTTTAA

751 TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT ATATAAACAG AAGGAAGCTG  
ATTGACAAGA TTGGGGATGA ACTGTCGTTA TATATTTGTC TTCCTTCGAC

801 CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA  
GGGACAGAAT TTGGAAGAAA AAATAGTAGT AATAATCGAA TGAAAGTATT  
5' AOX1 sequencing primer

851 TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA  
AACGCTGACC AAGGTAACT GTTCGAAAAC TAAAATTGCT GAAAATTGCT  
Met EcoRI

901 CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG **ATGGAATTCG**  
GTTGAACTCT TCTAGTTTTT TGTTGATTAA TAAGCTTTGC **TACCTTAAGC**  
NheI SalI NdeI ApaI SphI XbaI KpnI His tag

951 CTAGCGTCGA CCATATGGGG CCCGCATGCT CTAGAGGTAC CCATCATCAT  
GATCGCAGCT GGTATACCCC GGGCGTACGA GATCTCCATG **GGTAGTAGTA**

1001 **CATCATCAT** **GAGTTTGTAG** CCTTAGACAT GACTGTTCCCT CAGTTCAAGT  
**GTAGTAGTAA** **CTCAAACATC** GGAATCTGTA CTGACAAGGA GTCAAGTTCA

1051 TGGGCACTTA CGAGAAGACC GGTCTTGCTA GATTCTAATC AAGAGGATGT  
ACCCGTGAAT GCTCTTCTGG CCAGAACGAT CTAAGATTAG TTCTCCTACA  
3' AOX1 sequencing primer

1101 CAGAATGCCA TTTGCCTGAG AGATGCAGGC TTCATTTTTG ATACTTTTTT  
**GTCTTACGGT** **AAACGGACTC** TCTACGTCCG AAGTAAAAAC TATGAAAAAA

1151 ATTTGTAACC TATATAGTAT AGGATTTTTT TTGTCATTTT GTTTCTTCTC  
TAAACATTGG ATATATCATA TCCTAAAAAA AACAGTAAAA CAAAGAAGAG

➤ pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo中没有的酶切位点包括:

AanI	AarI	AbsI	AccIII	Acc36I	AccvI	AfeI
AflIII	AhlI	AjuI	AloI	Aor13HI	Aor51HI	ArsI
AscI	AsiSI	AspI	AspA2I	AvrII	AxyI	BaeI
BanIII	BarI	BbeI	BbrPI	BbvCI	BcuI	BfrI
BfuAI	BlnI	BoxI	Bpu10I	Bsa29I	BsaAI	Bse21I
BseAI	BseCI	BsgI	BshVI	BsmBI	Bsp13I	Bsp68I
BspDI	BspEI	BspMI	BspQI	BspTI	BspXI	BssNAI
Bst98I	Bst1107I	BstAFI	BstAPI	BstBAI	BstENI	BstHPI
BstPAI	BstSNI	BstZ17I	Bsu15I	Bsu36I	BsuTUI	BtuMI
BveI	CciNI	Cfr42I	ClaI	CpoI	CspI	CspCI
DinI	Eco47III	Eco72I	Eco81I	Eco105I	EcoNI	EgeI
EheI	Esp3I	FalI	FspAI	HpaI	I-CeuI	I-PpoI
I-SceI	KasI	Kpn2I	KspI	KspAI	LguI	Mly113I
MreI	MroI	MspCI	NarI	Nb.BbvCI	Nb.Bpu10I	NotI
NruI	Nt.BbvCI	Nt.Bpu10I	Nt.BspQI	PacI	PaeR7I	PalAI
PaqCI	PasI	PciSI	PflFI	PI-PspI	PI-SceI	PluTI
PmaCI	PmlI	Ppu21I	PshAI	PsiI	PspCI	PspXI
PsrI	PsyI	RgaI	RruI	RsrII	Rsr2I	SacII
SapI	SbfI	SdaI	SfaAI	SfiI	SfoI	Sfr274I
Sfr303I	SgfI	SgrBI	SgrDI	SgsI	SlaI	SmiI
SnaBI	SpeI	SrfI	Sse8387I	SspDI	SstII	SwaI
TstI	Tth111I	Vha464I	XagI	XhoI	XmaJI	

➤ pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo的单酶切位点包括:

AatII	Acc65I	AccI	AgeI	AhdI	AleI	AlwNI
ApaI	BamHI	BcgI	BglII	BlpI	BmtI	BseYI
BsiWI	BsrGI	BssHII	BstBI	BstEII	BstXI	BtgZI
DraIII	EagI	Eco53kI	EcoRI	EcoRV	FseI	FspI
HaeII	HindIII	KpnI	MfeI	MluI	MscI	NcoI
NdeI	NheI	NsiI	PciI	PflMI	PmeI	PspOMI
PstI	PvuI	PvuII	SacI	SalI	ScaI	SexAI

SgrAI                      SmaI                      SphI                      SspI                      StuI                      StyI                      TspMI  
XbaI                      XcmI                      XmaI                      XmnI                      ZraI

- pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo质粒可使用的测序引物序列如下：  
5' AOX1 sequencing primer (855-875): 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'  
3' AOX1 sequencing primer (1095-1115): 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
- pAOX1-MCS-His-Amp&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
D2883-1μg	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	1μg
D2883-100μg	pAOX1-MCS-His-Amp&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. pAOX1-MCS-His-Amp&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。

**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
D2881-1μg	pAOX1-MCS-His-Zeocin	1μg
D2881-100μg	pAOX1-MCS-His-Zeocin	100μg
D2882-1μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Zeocin	1μg
D2882-100μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Zeocin	100μg
D2884-1μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Amp&Zeo	1μg
D2884-100μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Amp&Zeo	100μg
D0412	毕赤酵母GS115甘油菌	200μl
D0413	毕赤酵母KM71甘油菌	200μl
D0414	毕赤酵母X-33甘油菌	200μl

Version 2022.05.23