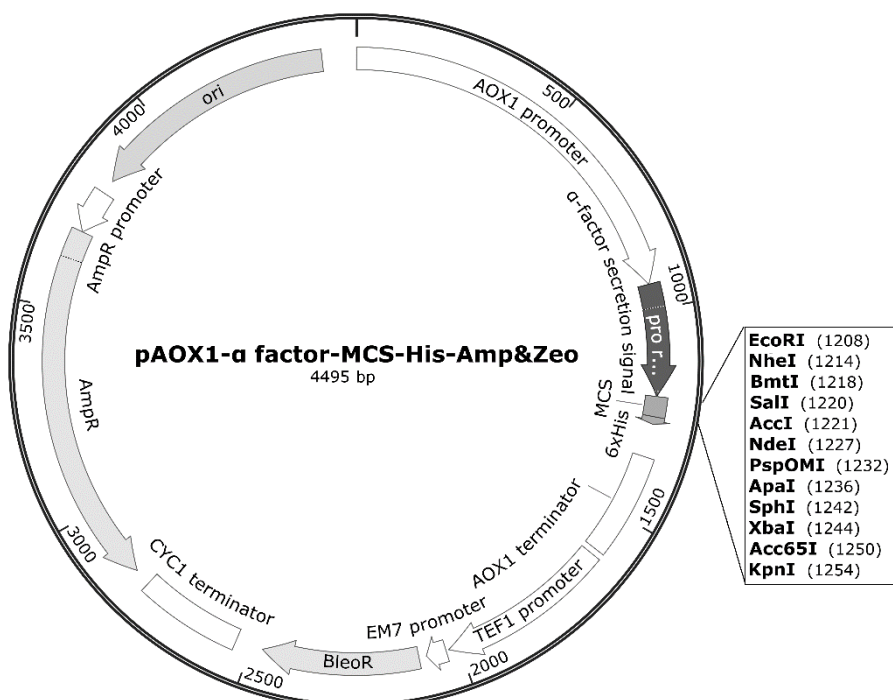


pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo

产品编号	产品名称	包装
D2884-1 μ g	pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo	1 μ g
D2884-100 μ g	pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo	100 μ g

产品简介:

- pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo是碧云天研发的以毕赤酵母(*Pichia pastoris*)为表达菌株、利用 α factor分泌表达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: 有助于蛋白正确折叠、翻译后修饰及易于操作等。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, 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KM71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His⁴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⁺ (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^s (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。
- 本质粒含有酿酒酵母的 α -factor信号肽, 用于引导目的蛋白的分泌表达。 α -factor信号肽引导目的蛋白进入分泌通路后, *Kex2*基因编码的类枯草菌素蛋白酶(Subtilisin-like protease)识别 α -factor C末端的EKREAE序列, 并在KR之后进行剪切, 这样目的蛋白N端会携带4个氨基酸残基(EAEA), 此时可能被*Ste13*基因编码的二肽蛋白氨酶氨基肽酶A (Dipeptidyl aminopeptidase A)识别EAEA基序并切割, 因此分泌到胞外的目的蛋白的N端可能会残留2-4个氨基酸残基。
- 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25-50 μ g/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50-300 μ g/ml (YPD或基本培养基)。氨苄青霉素通常配制成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100 μ g/ml。
- pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo质粒(4495bp)的图谱如下:



➤ pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
AOX1 promoter	2..940
α -factor secretion signal	941..1207
6 \times His	1256..1273
AOX1 terminator	1353..1599
TEF1 promoter	1614..2025
EM7 promoter	2033..2080
BleoR	2099..2473
CYC1 terminator	2539..2786
AmpR	2827..3687
AmpR promoter	3688..3792
ori	3827..4415

➤ pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo的详细图谱如下:

AOX1 promoter

```

1  AGATCTAACA TCCAAAGACG AAAGGTTGAA TGAAACCTTT TTGCCATCCG
   TCTAGATTGT AGGTTTCTGC TTTCCAACCTT ACTTTGGAAA AACGGTAGGC

51  ACATCCACAG GTCCATTCTC ACACATAAGT GCCAAACGCA ACAGGAGGGG
   TGTAGGTGTC CAGGTAAGAG TGTGTATTCA CGGTTTGCCT GTCTCTCCC

101 ATACACTAGC AGCAGACCGT TGCAAACGCA GGACCTCCAC TCCTCTTCTC
   TATGTGATCG TCGTCTGGCA ACGTTTGCCT CCTGGAGGTG AGGAGAAGAG

151 CTCAACACCC ACTTTTGCCA TCGAAAAACC AGCCCAGTTA TTGGGCTTGA
   GAGTTGTGGG TGAAAACGGT AGCTTTTGGG TCGGGTCAAT AACCCGAAC

201 TTGGAGCTCG CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA ACACCATGAC
   AACCTCGAGC GAGTAAGGTT AAGGAAGATA ATCCGATGAT TGTGGTACTG

251 TTTATTAGCC TGTCTATCCT GGCCCCCCTG GCGAGGTTCA TGTTTGTTTA
   AAATAATCGG ACAGATAGGA CCGGGGGGAC CGCTCCAAGT ACAAACAAAT

301 TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC CCGAACATCA CTCCAGATGA
   AAAGGCTTAC GTTGTTCGAG GCGTAATGTG GGCTTGTAGT GAGGTCTACT

351 GGGCTTCTG AGTGTGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC AAATGGCCCA
   CCCGAAAGAC TCACACCCCA GTTTATCAAA GTACAAGGGG TTTACCGGGT

401 AAACGTGACAG TTAAACGCT GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA
   TTTGACTGTC AAATTTGCGA CAGAACCCTG GATTATACTG TTTTCGCACT

451 TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCG TTGAAATGCT AACGGCCAGT
   AGAGTAGGTT CTAAGTATT CAAACCAAGC AACTTTACGA TTGCCGGTCA

501 TGGTCAAAAA GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT CTTGTTTGGT
   ACCAGTTTTT CTTTGAAGGT TTTTCAGCCG ATGGCAAACA GAACAAACCA

551 ATTGATTGAC GAATGCTCAA AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT
   TAACTAAGTG CTTACGAGTT TTTATTAGAG TAATTACGAA TCGCGTCAGA

601 CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG TGCCGAAACG CAAATGGGGA
   GAGATAGCGA AACTTTGGGG 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
CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA
5' AOX1 sequencing primer

851 TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA
AACGCTGACC AAGGTAACT GTTCGAAAAC TAAAATTGCT GAAAATTGCT

901 CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG **ATGAGATTTT**
GTTGAACTCT TCTAGTTTTT TGTTGATTAA TAAGCTTTGC **TACTCTAAAG**
α-factor secretion signal

951 CTTCAATTTT TACTGCTGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT
GAAGTAAAA ATGACGACAA AATAAGCGTC GTAGGAGGCG TAATCGACGA

1001 CCAGTCAACA CTACAACAGA AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC
GGTCAGTTGT GATGTTGTCT TCTACTTTGC CGTGTTTAAAG GCCGACTTCG

1051 TGTCATCGGT TACTCAGATT TAGAAGGGGA TTTCGATGTT GCTGTTTTGC
ACAGTAGCCA ATGAGTCTAA ATCTTCCCCT AAAGCTACAA CGACAAAACG

1101 CATTTTCCAA CAGCACAAAT AACGGTTAT TGTTTATAAA TACTACTATT
GTAAAAGGTT GTCGTGTTTA TTGCCAATA ACAAATATTT ATGATGATAA
Kex2 signal cleavage
E K R E A ↓

1151 GCCAGCATTG CTGCTAAAGA AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA AAAGAGAGGC
CGGTCGTAAC GACGATTTCT TCTTCCCCT AGAGAGCTCT TTTCTCTCCG
BmtI ACCI
E A EcoRI NheI SalI NdeI ApaI SphI XbaI

1201 TGAAGCTGAA TTCGCTAGCG TCGACCATAT GGGGCCCGCA TGCTCTAGAG
ACTTCGACTT AAGCGATCGC AGCTGGTATA CCCCAGGCGT ACGAGATCTC
↑ ↑
Ste13 signal cleavage
KpnI His tag

1251 GTACCCATCA TCATCATCAT CAT**TG**AGTTT GTAGCCTTAG ACATGACTGT
CATGGGTAGT AGTAGTAGTA GTA**ACT**CAA CATCGGAATC TGTA CTGACA

1301 TCCTCAGTTC AAGTTGGGCA CTTACGAGAA GACCGGTCTT GCTAGATTCT
AGGAGTCAAG TTCAACCCGT GAATGCTCTT CTGGCCAGAA CGATCTAAGA
3' AOX1 sequencing primer

1351 AATCAAGAGG ATGTCAGAAT GCCATTTGCC TGAGAGATGC AGGCTTCATT
TTAGTTCTCC TACAGTCTTA CGGTAAACGG ACTCTCTACG TCCGAAGTAA

► pAOX1-α factor-MCS-His-Amp&Zeo中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc36I	AcvI	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	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	PalAI	PaqCI	PasI	PciSI
PflFI	PI-PspI	PI-SceI	PluTI	PmaCI	PmlI	Ppu21I
PshAI	PspCI	PspXI	PsrI	PsyI	RgaI	RruI
RsrII	Rsr2I	SacII	SapI	SbfI	SdaI	SfaAI
SfiI	SfoI	Sfr303I	SgfI	SgrBI	SgrDI	SgsI
SmiI	SnaBI	SpeI	SrfI	Sse8387I	SspDI	SstII
SwaI	TstI	Tth111I	Vha464I	XagI	XmaJI	

➤ pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo中的单酶切位点包括:

AatII	Acc65I	AccI	AgeI	AhdI	AleI	AlwNI
ApaI	BamHI	BcgI	BglII	BlpI	BmtI	BseYI
BsiWI	BsrGI	BssHII	BstAPI	BstBI	BstEII	BstXI
BtgZI	DraIII	EagI	Eco53kI	EcoRI	EcoRV	FseI
FspI	HaeII	HindIII	KpnI	MfeI	MluI	MscI
NcoI	NdeI	NheI	NsiI	Paer7I	PciI	PflMI
PmeI	PsiI	PspOMI	PstI	PvuI	PvuII	SacI
SalI	ScaI	SexAI	SgrAI	SmaI	SphI	SspI
StuI	StyI	TspMI	XbaI	XcmI	XhoI	XmaI
XmnI	ZraI					

➤ pAOX1- α factor-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 (1359-1379): 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

➤ pAOX1- α factor-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
D2884-1 μ g	pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo	1 μ g
D2884-100 μ g	pAOX1- α factor-MCS-His-Amp&Zeo	100 μ g
—	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1 μ g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. 100 μ g包装的本产品质粒浓度为0.1 μ g/ μ l，共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。
3. pAOX1- α factor-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 \times 0.25ml
ST1450-1ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml \times 1ml
D2881-1 μ g	pAOX1-MCS-His-Zeocin	1 μ g
D2881-100 μ g	pAOX1-MCS-His-Zeocin	100 μ g
D2882-1 μ g	pAOX1- α factor-MCS-His- Zeocin	1 μ g
D2882-100 μ g	pAOX1- α factor-MCS-His- Zeocin	100 μ g
D2883-1 μ g	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	1 μ g

D2883-100μg	pAOX1-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