



碧云天网站



微信公众号

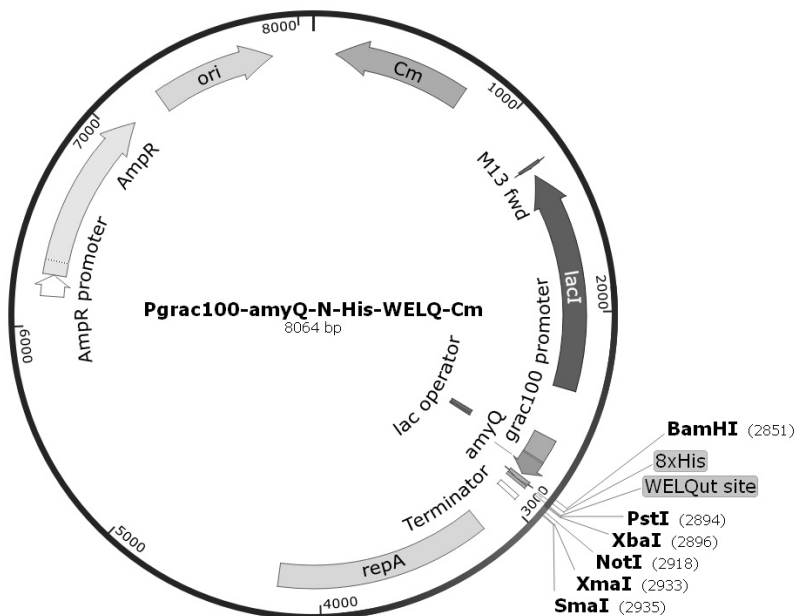
碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm

产品编号	产品名称	包装
D2524-1μg	Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm	1μg
D2524-100μg	Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm	100μg

产品简介:

- Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm是碧云天自行研发的一种用于枯草芽孢杆菌分泌表达N端含有His标签(His tag)和WELQ蛋白酶酶切位点的目的蛋白的原核表达质粒。该质粒为大肠杆菌/枯草芽孢杆菌穿梭质粒, 可在大肠杆菌中进行载体构建和扩增并在枯草芽孢杆菌中进行高水平外源蛋白表达。
- 本质粒含有Pgrac100强启动子和Lac操纵子, 可以在异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)的诱导下高效启动目的基因表达[1, 2]。多克隆位点5'端含有淀粉酶amyQ信号肽, 可以将目的蛋白分泌到枯草芽孢杆菌胞外的培养基中。信号肽后面连接的His标签紧接着连接12bp的碱基, 翻译出W-E-L-Q四个氨基酸, 可以被WELQ Protease (P2311)识别并在Q残基位点后进行切割。在多克隆位点内按照读码框的方向插入带有终止密码子的目的基因, 就可以表达N端带有His标签和WELQ蛋白酶酶切位点的目的蛋白。
- WELQ蛋白酶能特异性地识别四肽序列Trp-Glu-Leu-Gln (W-E-L-Q), 并对Gln (Q)之后的肽键进行酶切, 常用于重组蛋白除去His或者其它融合标签, 其最突出优势是酶切后不会在目的蛋白的N端留下任何额外的氨基酸残基。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是工业应用中一种重要的模式菌株, 具有内毒素低、非致病性、遗传背景清晰、分泌蛋白能力强、容易分离培养等特性, 是异源蛋白表达和分泌的理想宿主。由于从枯草芽孢杆菌中提取质粒和构建质粒较为困难, 而在大肠杆菌中操作则更为简单方便, 所以可通过构建大肠杆菌/枯草芽孢杆菌穿梭载体, 先将外源目的基因在大肠杆菌中构建完成后再转入枯草芽孢杆菌中进行外源蛋白表达[3]。
- Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm能表达α-淀粉酶amyQ的信号肽(氨基酸序列为: MIQKRKRTVSFRLVLMCTLLFVSLPITK ASA), 可用于引导目的蛋白的分泌表达。蛋白前体在核糖体合成过程中或合成后被信号肽识别颗粒(SRP)或分子伴侣识别并通过Sec分泌途径实现跨膜, 蛋白在输出到外膜时, I型信号肽酶(SPase I)会识别amyQ信号肽的保守序列, 即A-X(任意氨基酸)-A, 并且在最后一个A(丙氨酸)后面产生酶切, 释放成熟蛋白, 之后在折叠因子和分子伴侣作用下折叠成正确的蛋白构象[4, 5]。因此, 如果将目的蛋白通过无缝克隆的方式克隆在紧邻amyQ信号肽序列之后, 目的蛋白的N端不会残留任何多余氨基酸残基。
- 本质粒为氨苄青霉素(Ampicillin)和氯霉素(Chloramphenicol)双抗性, 在大肠杆菌中进行质粒扩增时, 推荐氨苄青霉素筛选浓度为100μg/ml, 在枯草芽孢杆菌中进行蛋白表达时, 推荐氯霉素筛选浓度为5μg/ml [6]。
- 本质粒适用于转化枯草芽孢杆菌168Δ4菌株(D0441), 在转化枯草芽孢杆菌感受态细胞时, 建议做一组不转化质粒的阴性对照, 防止出现抗生素浓度低, 对宿主无效的情况。根据阴性对照实际情况, 再适当调整抗生素的使用浓度。枯草芽孢杆菌转化推荐使用碧云天枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒(D0312)。
- Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm质粒(8064bp)的图谱如下:



- Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm质粒的主要信息如下:

Feature	Nucleotide	Position
Chloramphenicol resistance ORF (Cm)		113-763
lacI		1298-2380
P $grac100$		2632-2748
Lac operator		2709-2733
Ribosome-binding site (RBS)		2739-2746
amyQ (signal peptide of α -amylase)		2755-2847
8X His		2860-2883
WELQut site		2884-2895
Multiple cloning sites (MCS)		2896-2924
Terminator		2941-2966
repA		3167-4200
AmpR promoter		6141-6245
AmpR resistance ORF		6246-7106
ori		7277-7865

➤ P $grac100$ -amyQ-N-His-WELQ-Cm的多克隆位点的详细图谱如下:

		<i>grac100</i> promoter				
2632	AGGAGGTAAG	GATCACTAGA	AAATTTTTTA	AAAAATCTCT	TGACATTGGA	
	TCCTCCATTC	CTAGTGATCT	TTTAAAAAAT	TTTTTAGAGA	ACTGTAACCT	
		Lac operator				
2682	AGGGAGATAT	GTTATTATAA	GAATTGCGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	
	TCCCTCTATA	CAATAATATT	CTTAACGCCT	TAACACTCGC	CTATTGTAA	
		RBS amyQ				
2732	CCCATATAAA	GGAGGAAGGA	TCAATGATTTC	AAAAACGAAA	GCGGACAGTT	
	GGGTATATTT	CCTCCTTCCT	AGTTACTAAG	TTTTTGCTTT	CGCCTGTCAA	
		8X His				
2782	TCGTTTCAGAC	TTGTGCTTAT	GTGCACGCTG	TTATTTGTCA	GTTTGCCGAT	
	AGCAAGTCTG	AACACGAATA	CACGTGCGAC	AATAAACAGT	CAAACGGCTA	
		A S A ↓ BamHI				
2832	TACAAAAGCA	TCAGCTGCTG	GATCCATGCA	TCACCATCAC	CATCACCATC	
	ATGTTTTTCG	AGTCGACGAC	CTAGGTACGT	AGTGGTAGTG	GTAGTGGTAG	
		WELQut site XbaI SpeI AatII NotI				
2882	ACTGGGAAC	TGAGTCTAGA	ACTAGTGTCT	ACGTCGCGGC	CGCATAACGT	
	TGACCCTTGA	CGTCAGATCT	TGATCACAGC	TGCAGCGCCG	CGGTATTGCA	
		XmaI/SmaI Terminator				
2932	CCCCGGGGCA	GCCCGCCTAA	TGAGCGGGCT	TTTTT		
	GGGGCCCCGT	CGGGCGGATT	ACTCGCCCGA	AAAAA		

➤ P $grac100$ -amyQ-N-His-WELQ-Cm中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc36I	AccB7I	AcvI	AdeI
AfeI	AgeI	AleI	AloI	Aor13HI	Aor51HI	AscI
AsiGI	AsiSI	AspI	AspA2I	AvrII	AxyI	BaeI
BalI	BarI	BbrPI	BbvCI	BfuAI	BlnI	BlpI
BoxI	Bpu1102I	BsaMI	Bse21I	BseAI	BshTI	BsmI
Bsp13I	Bsp68I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspEI	BspMI	BsrGI
BssNAI	Bst1107I	BstAUI	BstENI	BstPAI	BstZ17I	Bsu36I
BtuMI	BveI	CelII	Cfr42I	CpoI	CspI	CspAI
DraII	DraIII	Eco47III	Eco72I	Eco81I	EcoNI	EcoO109I
FseI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KflI	Kpn2I
KspI	MauBI	MlsI	MluNI	MreI	MroI	MroNI
MscI	Msp20I	MssI	Mva1269I	NaeI	NgoMIV	NruI
OliI	PacI	PalAI	PasI	PctI	PdiI	PflFI
PflMI	PfoI	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmeI
PmlI	PpuMI	PshAI	Psp5II	PspCI	PspPPI	PspXI
PsrI	PsyI	RgaI	RigI	RruI	RsrII	Rsr2I
SacII	SanDI	SbfI	SdaI	SfaAI	SfiI	Sfr303I
SgfI	SgrAI	SgrBI	SgrDI	SgsI	SrfI	Sse8387I

SspBI	SstII	Tth111I	Van91I	XagI	XmaJI	
➤ <i>Pgrac100</i> -amyQ-N-His-WELQ-Cm中的单酶切位点包括:						
AatII	Acc65I	AflII	AhdI	ApaI	BamHI	BmgBI
BmtI	Bpu10I	BsaI	BsaBI	BseRI	BsiWI	BspDI
BssHII	BstEII	ClaI	DrdI	EagI	Eco53kI	EcoRV
HpaI	KasI	KpnI	MfeI	NarI	NheI	NotI
PaeR7I	PluTI	PspOMI	PstI	SacI	SexAI	SfoI
SmaI	SnaBI	SpeI	SphI	TspMI	XbaI	XhoI
XmaI	ZraI					

➤ *Pgrac100*-amyQ-N-His-WELQ-Cm质粒中推荐使用的测序引物序列如下:

Forward primer (2598-2617): 5'-GACCTCGTTTCCACCGGAAT-3'

Reverse primer (3201-3220): 5'-TCTTCTTCCGTGATTCCTTG-3'

➤ *Pgrac100*-amyQ-N-His-WELQ-Cm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
D2524-1μg	<i>Pgrac100</i> -amyQ-N-His-WELQ-Cm	1μg
D2524-100μg	<i>Pgrac100</i> -amyQ-N-His-WELQ-Cm	100μg
—	说明书	1份

保存条件:

-20℃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0.5μg/μl，可以直接用于酶切或者转化。
3. *Pgrac100*-amyQ-N-His-WELQ-Cm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，构建的质粒可以用常规方法转入表达菌株进行表达纯化。

参考文献:

1. Phan TT, Tran LT, Schumann W. Microb Cell Fact. 2015. 14(1):72.
2. Phan TT, Nguyen HD, Schumann W. J Biotechnol. 2012. 157(1):167-172.
3. 熊海涛, 韦宇拓. 广西科学. 2018. 25(03):233-241.
4. Freudl Roland. Microb Cell Fact. 2018. 17(1).
5. 陈华友, 张金红, 李萍萍, 宁德刚, 杨胜利. International Conference on Biomedicine and Engineering. 2011. 6:584-589.
6. Zhang XZ, Zhang Y. Microb Biotechnol. 2011. 4(1):98-105.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0312	枯草芽孢杆菌感受态制备试剂盒	20次/100次
D0441	枯草芽孢杆菌168 Δ 4甘油菌	200μl
D0442	枯草芽孢杆菌WB800甘油菌	200μl
D2521	<i>Pgrac100</i> -C-His-Cm	1μg/100μg
D2522	<i>Pgrac100</i> -amyQ-C-His-Cm	1μg/100μg
D2523	<i>Pgrac100</i> -N-His-WELQ-Cm	1μg/100μg
D2524	<i>Pgrac100</i> -amyQ-N-His-WELQ-Cm	1μg/100μg
D2525	<i>Pgrac100</i> -C-His-Tet	1μg/100μg
D2526	<i>Pgrac100</i> -amyQ-C-His-Tet	1μg/100μg
ST1150	氯霉素(≥98%, Reagent grade)	5g/25g/100g