



碧云天网站



微信公众号

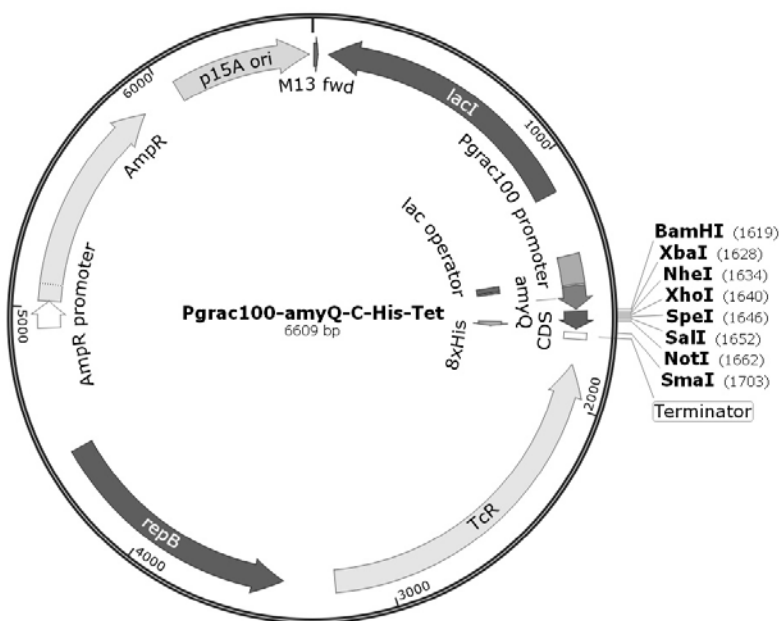
碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Pgrac100-amyQ-C-His-Tet

产品编号	产品名称	包装
D2526-1μg	Pgrac100-amyQ-C-His-Tet	1μg
D2526-100μg	Pgrac100-amyQ-C-His-Tet	100μg

产品简介:

- Pgrac100-amyQ-C-His-Tet是碧云天研发的一种用于枯草芽孢杆菌分泌表达C端含有His标签(His tag)的目的蛋白的表达质粒。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网页蛋白表达。
- 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]。在多克隆位点内按照读码框的方向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。此外, 本质粒还含有淀粉酶amyQ信号肽, 可将目的蛋白分泌到枯草芽孢杆菌胞外的培养基中。
- 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-C-His-Tet能表达α-淀粉酶amyQ的信号肽(氨基酸序列为: MIQKRKRTVSFRLVLMCTLLFVSLPITKASA), 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)和四环素(Tetracycline)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, 推荐四环素筛选浓度为15μg/ml [6]。
- 本质粒适用于转化枯草芽孢杆菌168 Δ4菌株(D0441)或WB800菌株(D0442), 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, 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-C-His-Tet质粒(6609bp)的图谱如下:



- Pgrac100-amyQ-C-His-Tet质粒的主要信息如下:

Feature	Nucleotide	Position
M13 fwd		7-23
lacI		66-1148

P _{grac100}	1400-1516
lac operator	1477-1501
Ribosome-binding site (RBS)	1507-1514
AmyQ (signal peptide of α -amylase)	1523-1615
8X His	1670-1693
Terminator	1709-1734
TcR (Tetracycline)	1838-3214
repB	3421-4425
AmpR promoter	4921-5025
AmpR	5026-5886
p15A ori	6051-6596

➤ P_{grac100}-amyQ-C-His-Tet的多克隆位点的详细图谱如下:

<i>grac100</i> promoter	
1400	AGGAGGTAAG GATCACTAGA AAATTTTTTA AAAAATCTCT TGACATTGGA TCCTCCATTC CTAGTGATCT TTTAAAAAAT TTTTATAGAGA ACTGTAACCT
Lac operator	
1450	AGGGAGATAT GTTATTATAA GAATTGCGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCCCTCTATA CAATAATATT CTTAACGCCT TAACACTCGC CTATTGTTAA
RBS amyQ	
1500	CCCATATAAA GGAGGAAGGA TCA ATG ATTC AAAAACGAAA GCGGACAGTT GGGTATATTT CCTCCTTCCT AGT TACT AAG TTTTGTCTTT CGCCTGTCAA
A S A ↓ BamHI XbaI NheI XhoI SpeI	
1550	TCGTTTCAGAC TTGTGCTTAT GTGCACGCTG TTATTTGTCA GTTTGCCGAT AGCAAGTCTG AACACGAATA CACGTGCGAC AATAAACAGT CAAACGGCTA
1600	TACAAAAGCA TCAGCTGCTG GATCC ATG TC TAGAGCTAGC CTCGAGACTA ATGTTTTCTG AGTCGACGAC CTAGGT TAC AG ATCTCGATCG GAGCTCTGAT
SalI NotI 8X His	
1650	GTGTCGACGT CGCGGCCGCA CATCACCATC ACCATCACCA TCACT AAC GT CACAGCTGCA GCGCCGCGCT GTAGTGGTAG TGGTAGTGGT AGTG ATT GCA
XmaI/SmaI Terminator	
1700	CCCCGGGGCA GCGCCGCTAA TGAGCGGGCT TTTTT GGGGCCCCGT CGGGCGGATT ACTCGCCCGA AAAAA

➤ P_{grac100}-amyQ-C-His-Tet中没有的酶切位点包括:

AasI	AbsI	AccIII	AcvI	AdeI	AfeI	AleI
AlfI	AloI	Aor13HI	Aor51HI	AscI	AsiSI	AspI
AspA2I	AvrII	AxyI	BaeI	BarI	BbrPI	BbuI
BbvCI	BlnI	BlpI	Bpu1102I	BsaBI	Bse8I	Bse21I
BseAI	BseJI	Bsp13I	Bsp68I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspEI
BspLU11I	BspQI	BsrGI	BssNAI	Bst1107I	BstAUI	BstENI
BstZ17I	Bsu36I	BtuMI	CelII	Cfr42I	CpoI	CsiI
CspI	CspCI	DraIII	DrdI	DseDI	Eco47III	Eco72I
Eco81I	EcoNI	FseI	FspAI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI
KflI	Kpn2I	KspI	LguI	MabI	MamI	MauBI
MreI	MroI	MroNI	MssI	NaeI	NgoMIV	NruI
OliI	PacI	PaeI	PalAI	PasI	PciI	PciSI
PdiI	PflFI	PI-PspI	PI-SceI	PmaCI	PmeI	PmlI
PscI	PspCI	PspXI	PsrI	PsyI	RgaI	RigI
RruI	RsrII	Rsr2I	SacII	SanDI	SapI	SbfI
SdaI	SexAI	SfaAI	SfiI	Sfr303I	SgfI	SgrAI
SgrBI	SgrDI	SgsI	SphI	SrfI	Sse8387I	SspBI
SstII	Tth111I	XagI	XmaJI			

➤ P_{grac100}-amyQ-C-His-Tet中的单酶切位点包括:

AarI	Acc65I	AflII	AgeI	AhdI	ApaI	BamHI
BfuAI	BglI	BglII	BmgBI	BmtI	Bpu10I	BsiWI
BsmI	BsmFI	BspDI	BspMI	BstBI	ClaI	EagI

Eco53kI	EcoO109I	FaqI	FspI	HindIII	KasI	KpnI
MscI	NarI	NdeI	NheI	NotI	NsiI	PaeR7I
PflMI	PfoI	PluTI	PpuMI	PshAI	PspOMI	PstI
PvuI	SacI	SalI	SfoI	SmaI	SnaBI	SpeI
StuI	SwaI	TspMI	XbaI	XhoI	XmaI	

- *Pgrac100-amyQ-C-His-Tet*质粒中推荐使用的测序引物序列如下：
Forward primer (1366-1385): 5'-GACCTCGTTTCCACCGGAAT-3'
Reverse primer (2064-2082): 5'-AACAGCAGGAAGCTGGTGC-3'
- *Pgrac100-amyQ-C-His-Tet*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
D2526-1μg	<i>Pgrac100-amyQ-C-His-Tet</i>	1μg
D2526-100μg	<i>Pgrac100-amyQ-C-His-Tet</i>	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：
- 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。
 - 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。
 - Pgrac100-amyQ-C-His-Tet*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：
- Phan TT, Tran LT, Schumann W. Microb Cell Fact. 2015. 14(1).72.
 - Phan TT, Nguyen HD, Schumann W. J Biotechnol. 2012. 157(1):167-172.
 - 熊海涛, 韦宇拓. 广西科学. 2018. 25(03):233-241.
 - Freudl Roland. Microb Cell Fact. 2018. 17(1).
 - 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.
 - Yao Z, Meng Y, Le HG. J Microbiol Biotechnol. 2021.31(6):833-839.

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168Δ4甘油菌	200μl
D0442	枯草芽孢杆菌WB800甘油菌	200μl
D2521	<i>Pgrac100-C-His-Cm</i>	1μg/100μg
D2522	<i>Pgrac100-amyQ-C-His-Cm</i>	1μg/100μg
D2523	<i>Pgrac100-N-His-WELQ-Cm</i>	1μg/100μg
D2524	<i>Pgrac100-amyQ-N-His-WELQ-Cm</i>	1μg/100μg
D2525	<i>Pgrac100-C-His-Tet</i>	1μg/100μg
D2526	<i>Pgrac100-amyQ-C-His-Tet</i>	1μg/100μg
ST2753	四环素盐酸盐(≥95%, Reagent grade)	5g/25g/100g