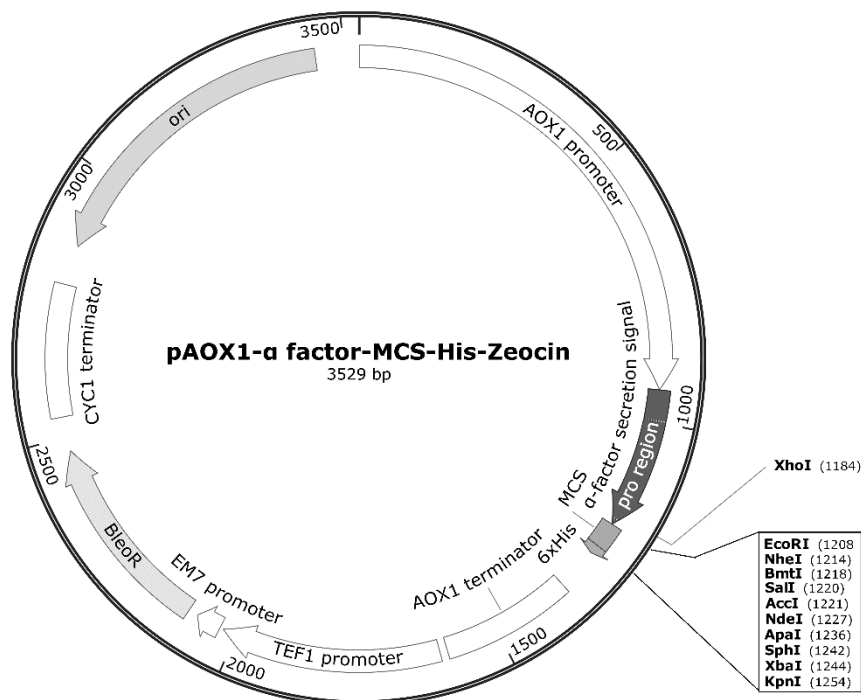


## pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Zeocin

产品编号	产品名称	包装
D2882-1 $\mu$ g	pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Zeocin	1 $\mu$ g
D2882-100 $\mu$ g	pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Zeocin	100 $\mu$ g

### 产品简介:

- pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin是碧云天研发的以毕赤酵母(*Pichia pastoris*)为表达菌株、利用 $\alpha$  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。而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 $\alpha$ -factor信号肽,用于引导目的蛋白的分泌表达。 $\alpha$ -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 $\alpha$ -factor C末端的EKREAEA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Zeocin (博来霉素)抗性。博来霉素(ST1450)抗性可用于大肠杆菌和酵母的筛选,大肠杆菌筛选推荐浓度为25-50 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml (YPD或基本培养基)。
- pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin质粒(3529bp)的图谱如下:



➤ pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin质粒的主要信息如下:

Feature	Nucleotide	Position
AOX1 promoter		2..940
$\alpha$ -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
ori		2861..3449

➤ pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin的详细图谱如下:

AOX1 promoter

1	AGATCTAACA	TCCAAAGACG	AAAGGTTGAA	TGAAACCTTT	TTGCCATCCG
	TCTAGATTGT	AGGTTTCTGC	TTTCCAACCT	ACTTTGGAAA	AACGGTAGGC
51	ACATCCACAG	GTCCATTCTC	ACACATAAGT	GCCAAACGCA	ACAGGAGGGG
	TGTAGGTGTC	CAGGTAAGAG	TGTGTATTCA	CGGTTTGCGT	TGTCCTCCCC
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	GGCCCCCTG	GCGAGGTTCA	TGTTTGTTTA
	AAATAATCGG	ACAGATAGGA	CCGGGGGGAC	CGCTCCAAGT	ACAAACAAAT
301	TTTCCGAATG	CAACAAGCTC	CGCATTACAC	CCGAACATCA	CTCCAGATGA
	AAAGGCTTAC	GTTGTTCGAG	GCGTAATGTG	GGCTTGTAGT	GAGGTCTACT
351	GGGCTTTCTG	AGTGTGGGGT	CAAATAGTTT	CATGTTCCCC	AAATGGCCCA
	CCCGAAAGAC	TCACACCCCA	GTTTATCAAA	GTACAAGGGG	TTTACCGGGT
401	AAACTGACAG	TTTAAACGCT	GTCTTGGAAC	CTAATATGAC	AAAAGCGTGA
	TTTGAAGTGC	AAATTTGCGA	CAGAACCTTG	GATTATACTG	TTTTCGCACT
451	TCTCATCCAA	GATGAACTAA	GTTTGGTTCG	TTGAAATGCT	AACGGCCAGT
	AGAGTAGGTT	CTACTTGATT	CAAACCAAGC	AACTTTACGA	TTGCCGGTCA
501	TGGTCAAAAA	GAAACTTCCA	AAAGTCGGCA	TACCGTTTGT	CTTGTTTGGT
	ACCAGTTTTT	CTTTGAAGGT	TTTCAGCCGT	ATGGCAAACA	GAACAAACCA
551	ATTGATTGAC	GAATGCTCAA	AAATAATCTC	ATTAATGCTT	AGCGCAGTCT
	TAACCTAAGT	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  
CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA  
5' AOX1 sequencing primer

---

851 TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA  
AACGCTGACC AAGGTTAACT GTTCGAAAAC TAAAATTGCT GAAAATTGCT

---

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

---

951 CTTC AATTTT TACTGCTGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT  
GAAGTTAAAA 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 AACGGGTAT TGTTTATAAA TACTACTATT  
GTAAAAGGTT GTCGTGTTTA TTGCCCAATA 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 GGGGCCGCA TGCTCTAGAG  
ACTTCGACTT AAGCGATCGC AGCTGGTATA CCCCAGGCGT ACGAGATCTC  
↑ ↑  
Ste13 signal cleavage  
KpnI His tag

---

1251 GTACCCATCA TCATCATCAT CAT**TGA**GTTT GTAGCCTTAG ACATGACTGT  
CATGGGTAGT AGTAGTAGTA GTA**ACT**CAAA CATCGGAATC TGTACTGACA

---

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-Zeocin中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc16I	Acc36I	Acc113I	AcvI
AfeI	AflIII	AhdI	AhlI	AjuI	AloI	Aor13HI
Aor51HI	AscI	AsiSI	AspI	Asp700I	AspA2I	AspEI
AviII	AvrII	AxyI	BaeI	BanIII	BarI	BbeI
BbrPI	BbvCI	BcgI	BcuI	BfrI	BfuAI	BlnI
BmcAI	BmeRI	BoxI	Bpu10I	BpvUI	Bsa29I	BsaAI
Bse21I	BseAI	BseCI	BsgI	BshVI	BsmBI	Bsp13I
Bsp68I	BspDI	BspeI	BspMI	BspQI	BspTI	BspXI
BssNAI	Bst98I	Bst1107I	BstAFI	BstBAI	BstEII	BstENI
BstHPI	BstPI	BstPAI	BstSNI	BstZ17I	Bsu15I	Bsu36I

BsuTUI	BtsaI	BtuMI	BveI	CciNI	Cfr42I	ClaI
CpoI	CspI	CspCI	DinI	DriI	Eam1105I	Eco47III
Eco72I	Eco81I	Eco91I	Eco105I	EcoNI	EcoO65I	EgeI
EheI	Esp3I	FalI	FspI	FspAI	HpaI	I-CeuI
I-PpoI	I-SceI	KasI	Kpn2I	KspI	KspAI	LguI
Mly113I	MreI	MroI	MroXI	MspCI	NarI	NotI
NruI	NsbI	PacI	PalAI	PasI	PciSI	PdmI
PflFI	PI-PspI	PI-SceI	Ple19I	PluTI	PmaCI	PmlI
Ppu21I	PshAI	PspCI	PspEI	PspXI	PsrI	PstI
PsyI	PvuI	RgaI	RruI	RsrII	Rsr2I	SacII
SapI	SbfI	ScaI	SdaI	SfaAI	SfiI	SfoI
Sfr303I	SgfI	SgrBI	SgrDI	SgsI	SmiI	SnaBI
SpeI	SrfI	Sse8387I	SspI	SspDI	SstII	SwaI
TsoI	TstI	Tth111I	Vha464I	XagI	XmaJI	XmnI
ZrmI						

➤ pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin中的单酶切位点包括:

AatII	Acc65I	AccI	AgeI	AleI	AlwNI	ApaI
BamHI	BglIII	BlpI	BmrI	BmtI	BseYI	BsiWI
BsrDI	BsrGI	BssHII	BssSI	BstAPI	BstBI	BstXI
BtgZI	DraI	DraIII	EagI	Eco53kI	EcoRI	EcoRV
FseI	HaeII	HindIII	KpnI	MfeI	MluI	MscI
MslI	NcoI	NdeI	NheI	NsiI	Paer7I	PciI
PflMI	PmeI	PsiI	PspOMI	PvuII	SacI	SalI
SexAI	SgrAI	SmaI	SphI	StuI	StyI	TspMI
XbaI	XcmI	XhoI	XmaI	ZraI		

➤ pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin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- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin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
D2882-1 $\mu$ g	pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Zeocin	1 $\mu$ g
D2882-100 $\mu$ g	pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Zeocin	100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g包装的本产品质粒浓度为0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l，共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。
3. pAOX1- $\alpha$  factor-MCS-His-Zeocin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 $\mu$ g	pAOX1-MCS-His-Zeocin	1 $\mu$ g
D2881-100 $\mu$ g	pAOX1-MCS-His-Zeocin	100 $\mu$ g
D2883-1 $\mu$ g	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	1 $\mu$ g
D2883-100 $\mu$ g	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	100 $\mu$ g
D2884-1 $\mu$ g	pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Amp&Zeo	1 $\mu$ g

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