



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

## pGAL1,10- $\alpha$ factor-MCS-His-MCS-Flag-URA

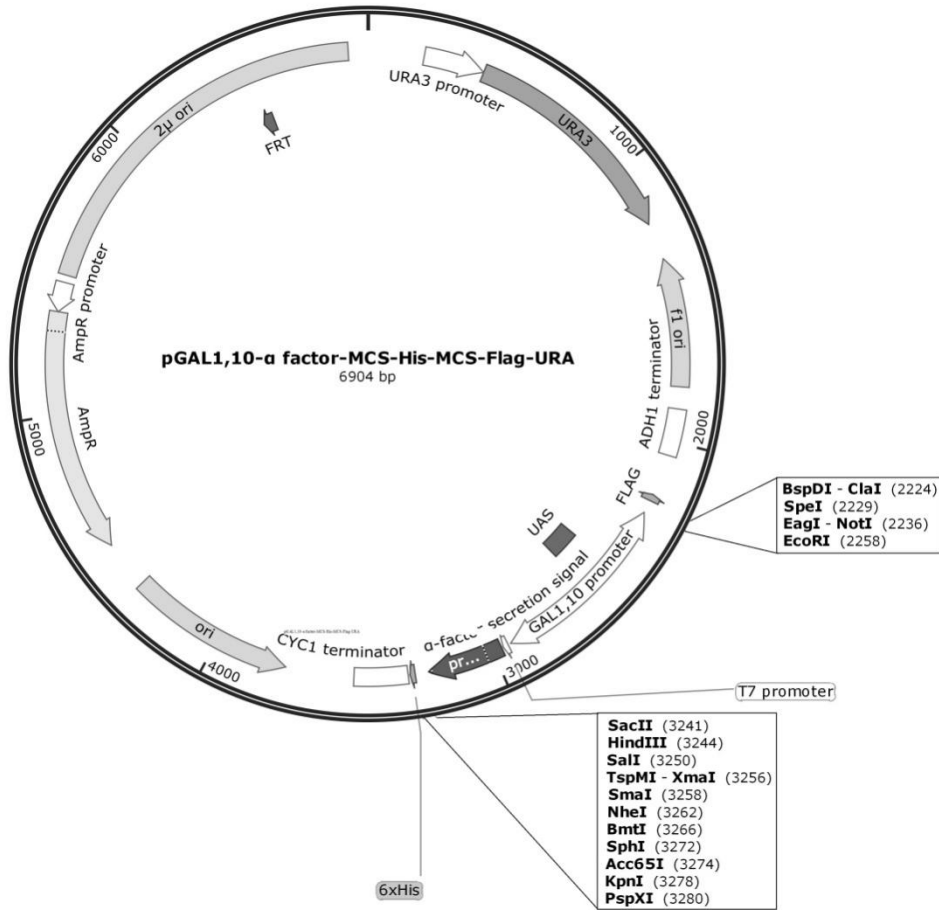
产品编号	产品名称	包装
D2892-1 $\mu$ g	pGAL1,10- $\alpha$ factor-MCS-His-MCS-Flag-URA	1 $\mu$ g
D2892-100 $\mu$ g	pGAL1,10- $\alpha$ factor-MCS-His-MCS-Flag-URA	100 $\mu$ g

### 产品简介:

- pGAL1,10- $\alpha$  factor-MCS-His-MCS-Flag-URA是碧云天研发生产的以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为表达菌株, 带有双启动子的表达质粒。本质粒可以在多克隆位点(Multiple cloning sites, MCS)按照开放读码框(Open reading frame, ORF)插入不带有终止密码子的目的基因, 经半乳糖诱导可以通过 *GAL1* promoter表达C端带有His标签(His Tag, HHHHHH)的目的蛋白或通过 *GAL10* promoter表达C端带有Flag标签(Flag Tag, DYKDDDDK)的目的蛋白, 并且这两种蛋白可以同时表达。
- 酿酒酵母是真核生物, 基因组约 $1.2 \times 10^7$ bp, 细胞核内含有16条染色体, 约6000个ORF, 仅4%的酵母基因有内含子, 遗传背景简单[1]。酿酒酵母具有类似原核生物的生长特性, 便于培养和进行遗传操作, 是一种模式真核生物, 被称为真核生物的‘大肠杆菌’。酿酒酵母表达系统表达外源基因时具有一定的翻译后加工能力, 收获的外源蛋白质在一定程度上进行了折叠加工和糖基化修饰, 有利于保持蛋白的活性和稳定性, 并且外源基因可在酿酒酵母中分泌表达, 表达产物分泌至胞外不仅有利于纯化, 还避免了产物在胞内大量蓄积[2]。
- 酿酒酵母能够以半乳糖为唯一碳源。半乳糖通过特定的半乳糖苷通透酶(Galactoside permease)运输到细胞中, 并通过半乳糖激酶、 $\alpha$ -D-半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶和尿苷二磷酸葡萄糖-4-差异构酶的顺序作用转化为葡萄糖-1-磷酸, 这三种酶分别由名为 *GAL1*、*GAL7*和*GAL10*的一簇紧密联系的基因编码[3]。酿酒酵母转化时质粒的选择基于营养缺陷型突变菌株的使用, 如果没有特定的培养基成分(氨基酸、嘌呤或嘧啶), 突变菌株就无法生长, 因此用与突变基因互补的质粒进行转化使转化子就能够在缺乏所需营养成分的培养基上生长。
- 本质粒含有相反方向的酵母启动子 *GAL1*和*GAL10*, 可以将一个或两个目的基因引入酵母宿主菌株中。在 *GAL10* promoter后的MCS插入目的基因时, 需要目的基因带有起始密码子, 而在 *GAL1* promoter后的MCS插入目的基因时, 由于 $\alpha$ -factor信号肽已带有起始密码子, 插入的目的基因不需要带有起始密码子。当两个基因分别插入两个MCS共表达时, 可以通过免疫沉淀分析确认蛋白质与蛋白质的相互作用。本质粒含有酵母2 $\mu$  origin复制子, 2 $\mu$  origin的序列最初是从天然存在的酵母2 $\mu$ 质粒中分离出来, 因此含有2 $\mu$  origin能够在酿酒酵母中自主复制质粒。
- 本质粒含有 $\alpha$ -factor信号肽序列, 可以用于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。
- 本质粒含有氨苄青霉素(Ampicillin)抗性和URA3筛选标记。在大肠杆菌中呈现氨苄青霉素抗性。本质粒转化酵母细胞后, 可利用URA3筛选标记, 转化酿酒酵母Ura营养缺陷型菌株, 如酿酒酵母INVSc1 (D0432), 在不含Uracil的培养基中筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。
- pGAL1,10- $\alpha$  factor-MCS-His-MCS-Flag-URA质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
URA3 promoter	201..416
URA3	417..1220
f1 ori	1351..1806
ADH1 terminator	1885..2050
FLAG	2198..2221
GAL1,10 promoter	2268..2932
UAS	2484..2601
T7 promoter	2943..2961
$\alpha$ -factor secretion signal	2968..3237
6xHis	3286..3303
CYC1 terminator	3311..3500
ori	3743..4331
AmpR	4502..5362
AmpR promoter	5363..5467
2 $\mu$ ori	5494..6836

➤ pGAL1,10- $\alpha$  factor-MCS-His-MCS-Flag-URA质粒(6904bp)的图谱如下:



➤ pGAL1,10- $\alpha$  factor-MCS-His-MCS-Flag-URA的多克隆位点的详细图谱如下:

					K
2151	GACTTGACCA AACCTCTGGC GAAGAATTGT TAATTAAGAG <b>CTCAGATCTT</b>				
	CTGAACTGGT TTGGAGACCG CTTCTTAACA ATTAATTCTC <b>GAGTCTAGAA</b>				
	Flag tag	ClaI	NotI		
	D D D D K Y	D	BspDI SpeI EagI		
2201	<b>ATCGTCGTCA TCCTTGTAAT CCATCGATAC</b> TAGTGCGGCC GCCCTTTAGT				
	<b>TAGCAGCAGT AGGAACATTA GGTAGCTATG</b> ATCACGCCGG CGGGAAATCA				
	EcoRI	←			
2251	GAGGGTTGAA TTCGAATTTT CAAAAATTCT TACTTTTTTTT TTGGATGGAC				
	CTCCCAACTT AAGCTTAAAA GTTTTTAAGA ATGAAAAAAA AACCTACCTG				
2301	GCAAAGAAGT TTAATAATCA TATTACATGG CATTACCACC ATATACATAT				
	CGTTTCTTCA AATTATTAGT ATAATGTACC GTAATGGTGG TATATGTATA				
2351	CCATATACAT ATCCATATCT AATCTTACTT ATATGTTGTG GAAATGTAAA				
	GGTATATGTA TAGGTATAGA TTAGAATGAA TATAACAACAC CTTTACATT				
2401	GAGCCCCATT ATCTTAGCCT AAAAAACCT TCTCTTTGGA ACTTTCAGTA				
	CTCGGGGTAA TAGAATCGGA TTTTTTTGGA AGAGAAACCT TGAAAGTCAT				
	GAL10 promoter	GAL1 promoter			
2451	ATACGCTTAA CTGCTCATTG CTATATTGAA GTACGGATTA GAAGCCGCCG				
	TATGCGAATT GACGAGTAAC GATATAACTT CATGCCTAAT CTTCGGCGGC				
2501	AGCGGGTGAC AGCCCTCCGA AGGAAGACTC TCCTCCGTGC GTCCTCGTCT				

```

TCGCCCCTG TCGGGAGGCT TCCTTCTGAG AGGAGGCACG CAGGAGCAGA
-----
2551 TCACCGGTCG CGTTCCTGAA ACGCAGATGT GCCTCGCGCC GCACTGCTCC
AGTGGCCAGC GCAAGGACTT TGCCTCTACA CGGAGCGCGG CGTGACGAGG
-----
2601 GAACAATAAA GATTCTACAA TACTAGCTTT TATGGTTATG AAGAGGAAAA
CTTGTATTAT CTAAGATGTT ATGATCGAAA ATACCAATAC TTCTCCTTTT
-----
2651 ATTGGCAGTA ACCTGGCCCC ACAAACCTTC AAATGAACGA ATCAAATTAA
TAACCGTCAT TGGACCGGGG TGTGGGAAAG TTTACTTGCT TAGTTTAATT
-----
2701 CAACCATAGG ATGATAATGC GATTAGTTTT TTAGCCTTAT TTCTGGGGTA
GTTGGTATCC TACTATTACG CTAATCAAAA AATCGGAATA AAGACCCCAT
-----
2751 ATTAATCAGC GAAGCGATGA TTTTGTATCT ATTAACAGAT ATATAAATGC
TAATTAGTCG CTTTCGCTACT AAAAAGTAGA TAATTGTCTA TATATTTACG
-----
2801 AAAAAGTACA TAACCACTTT AACTAATACT TTCAACATTT TCGGTTTGTA
TTTTTGCAGT ATTGGTGAAA TTGATTATGA AAGTTGTAAA AGCCAAACAT
-----
2851 TTACTTCTTA TTCAAATGTA ATAAAAGTAT CAACAAAAAA TTGTTAATAT
AATGAAGAAT AAGTTTACAT TATTTTCATA GTTGTTTTTT AACAATTATA
-----
2901 ACCTCTATAC TTTAACGTCA AGGAGAAAAA ACCCCGGATC CGTAATACGA
TGGAGATATG AAATTGCAGT TCCTCTTTTT TGGGGCCTAG GCATTATGCT
          α-factor secretion signal
-----
2951 CTCACTATAG GTAAAAAATG TCTAGATTTT CTTCAATTTT TACTGCTGTT
GAGTGATATC CATTTTTTTAC AGATCTAAAAG GAAGTTAAAA ATGACGACAA
-----
3001 TTATTTCGAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT CCAGTCAACA CTACAACAGA
AATAAGCGTC GTAGGAGGCG TAATCGACGA GGTCAAGTTGT GATGTTGTCT
-----
3051 AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC TGTCAATCGG TACTCAGATT
TCTACTTTGC CGTGTTTAAG GCCGACTTCG ACAGTAGCCA ATGAGTCTAA
-----
3101 TAGAAGGGGA TTTCGATGTT GCTGTTTTGC CATTTCCTAA CAGCACAAAT
ATCTTCCCTT AAAGCTACAA CGACAAAACG GTAAAAGGTT GTCGTGTTTA
-----
3151 AACGGTTTAT TGTTTATAAA TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAGA
TTGCCCAATA ACAAATATTT ATGATGATAA CGGTGTAAC GACGATTTCT
          Kex2 signal cleavage
          E K R E A E A
          ↓ SacII HindIII
3201 AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA AAAGAGAGGC TGAAGCTCCG CGGAAGCTTG
TCTTCCCAT AGAGAGCTCT TTTCTCTCCG ACTTCGAGGC GCCTTCGAAC
          ↑ ↑
          TspMI Ste13 signal cleavage
          SmaI BmtI KpnI PspXI His tag
          XmaI NheI SphI Acc65I
-----
3251 TCGACCCCGG GGCTAGCGCA TGCGGTACCC TCGAGCATCA TCATCATCAT
AGCTGGGGCC CCGATCGCGT ACGCCATGGG AGCTCGTAGT AGTAGTAGTA
-----
3301 CATTGGATAAG ATCCGCTCTA ACCGAAAAGG AAGGAGTTAG ACAACCTGAA
GTACTATTTC TAGGCGAGAT TGGCTTTTCC TTCCTCAATC TGTGGACTT

```

➤ pGAL1,10-α factor-MCS-His-MCS-Flag-URA中没有的酶切位点包括:

AarI	AatII	AbsI	AccIII	AccB7I	AcvI	AflII
AleI	Aor13HI	AscI	AsiSI	AspI	AspA2I	AvrII
AxyI	BaeI	BalI	BbeI	BbrPI	BbvCI	BclI
BfrI	BlnI	BlpI	BoxI	BplI	Bpu1102I	BsaBI
Bse8I	Bse21I	BseAI	BseJI	BsePI	BsiWI	Bsp13I
Bsp68I	Bsp1720I	BspEI	BspTI	BssHII	Bst98I	BstAFI
BstEII	BstENI	BstHPI	BstPI	BstPAI	Bsu36I	BtuMI
CelII	CpoI	CsiI	CspI	DinI	Eco72I	Eco81I
Eco91I	EcoNI	EcoO65I	EgeI	EheI	FbaI	FseI
FspAI	HpaI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI	KasI	KflI
Kpn2I	Ksp22I	KspAI	MabI	MamI	MauBI	MlsI
MluNI	Mly113I	Mox20I	MreI	MroI	MscI	Msp20I
MspCI	MssI	NarI	Nb.BbvCI	NruI	Nt.BbvCI	OliI
PalAI	PaqCI	PasI	PauI	Pfl23II	PflFI	PflMI
PI-PspI	PI-SceI	PluTI	PmaCI	PmeI	PmlI	PshAI
PspCI	PspEI	PspLI	PsrI	PsyI	PteI	RgaI
RigI	RruI	RsrII	Rsr2I	SanDI	SexAI	SfaAI
SfiI	SfoI	SgfI	SgrAI	SgrDI	SgsI	SmiI
SrfI	SspDI	Swal	Tth111I	Van91I	Vha464I	XagI
XmaJI	ZraI					

➤ pGAL1,10-α factor-MCS-His-MCS-Flag-URA中的单酶切位点包括:

Acc65I	AgeI	AhdI	ApaI	BamHI	BfuAI	BglII
BmgBI	BmtI	Bpu10I	BsaHI	BsgI	BsmI	BspDI
BspMI	BsrGI	BstXI	ClaI	CspCI	EagI	Eco53kI
EcoRI	EcoRV	HindIII	KpnI	MfeI	MluI	NaeI
NcoI	NdeI	NgoMIV	NheI	NotI	PacI	PspOMI
PspXI	PstI	SacI	SacII	SalI	SbfI	SmaI
SnaBI	SpeI	SphI	StuI	TspMI	XmaI	

➤ pGAL1,10-α factor-MCS-His-MCS-Flag-URA质粒中对于插入片段进行测序时，推荐使用的正向测序引物GAL1-F、GAL10-F和反向测序引物GAL1-R、GAL10-R的序列如下:

GAL1-F (2837-2857): 5'-ATTTTCGGTTTGTATTACTTC-3'  
 GAL1-R (3377-3397): 5'-GTTCTTAATACTAACATAACT-3'  
 GAL10-F (2319-2340): 5'-GGTGGTAATGCCATGTAATATG-3'  
 GAL10-R (2118-2140): 5'-GGCAAGGTAGACAAGCCGACAAC-3'

➤ pGAL1,10-α factor-MCS-His-MCS-Flag-URA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
D2892-1μg	pGAL1,10-α factor-MCS-His-MCS-Flag-URA	1μg
D2892-100μg	pGAL1,10-α factor-MCS-His-MCS-Flag-URA	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. pGAL1,10- $\alpha$  factor-MCS-His-MCS-Flag-URA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。

## 参考文献:

1. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, et al. Science. 1996. 274(5287):546, 563-7.
2. Bussineau CM, Shuster JR. Dev Biol Stand. 1994. 83:13-9.
3. Yocum RR, Hanley S, West R Jr, Ptashne M. Mol Cell Biol. 1984. 4(10):1985-98.

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D2881-1 $\mu$ g	pAOX1-MCS-His-Zeocin	1 $\mu$ g
D2881-100 $\mu$ g	pAOX1-MCS-His-Zeocin	100 $\mu$ g
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
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
D2884-100 $\mu$ g	pAOX1- $\alpha$ factor-MCS-His-Amp&Zeo	100 $\mu$ g
D2892-1 $\mu$ g	pGAL1,10- $\alpha$ factor-MCS-His-MCS-Flag-URA	1 $\mu$ g
D2892-100 $\mu$ g	pGAL1,10- $\alpha$ factor-MCS-His-MCS-Flag-URA	100 $\mu$ g
D2894-1 $\mu$ g	pGAL1,10-MCS-His-MCS-Flag-URA	1 $\mu$ g
D2894-100 $\mu$ g	pGAL1,10-MCS-His-MCS-Flag-URA	100 $\mu$ g
D0412	毕赤酵母GS115甘油菌	200 $\mu$ l
D0413	毕赤酵母KM71甘油菌	200 $\mu$ l
D0414	毕赤酵母X-33甘油菌	200 $\mu$ l
D0415	毕赤酵母SMD1168H甘油菌	200 $\mu$ l
D0308S	毕赤酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	50次
D0308M	毕赤酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	250次
D0310S	酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	50次
D0310M	酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	250次
D7278S	酵母菌落PCR试剂盒(碱裂解法)	100次
D7278M	酵母菌落PCR试剂盒(碱裂解法)	500次
D7279S	酵母菌落PCR试剂盒(酶解法)	100次
D7279M	酵母菌落PCR试剂盒(酶解法)	500次
D0432	酿酒酵母INVSc1甘油菌	200 $\mu$ l
ST961	BeyoPure™ YPD Broth (premixed powder)	10 $\times$ 500ml
ST963	BeyoPure™ YPD Broth with Agar (premixed powder)	10 $\times$ 500ml
ST965	BeyoPure™ YPD Broth (YPD肉汤培养基)	500ml

Version 2024.03.08