

## 新产品介绍

要在一个原核表达系统中，表达一个蛋白，两个蛋白，三个……抑或八个蛋白？

在Novagen的新产品系列中，这些变得轻而易举！！

## 来自Novagen的最新产品——多蛋白表达系统

pETDuet 和 pACYCDuet T7 启动子表达载体都可以在同一大肠杆菌中同时共表达两种目的蛋白。pETDuet 和 pACYCDuet 载体可以一起使用（表达4种蛋白），或与pET及pETcoco™重组子配合使用（表达3种蛋白），只需要注意复制区和抗性的兼容性即可。pETDuet和pACYCDuet可以共转化、复制和诱导，适合用于复杂的蛋白复合物的优化表达及分析。

pETDuet和pACYCDuet的复制区(ColE1, P15A)兼容，抗性分别是氨苄和氯霉素抗性，完全可以在一个细胞中扩增和稳定存在。上述两种载体都是编码由T7lac启动子驱动的2个蛋白的高水平表达。每个启动子后都有核糖体结合位点序列和多克隆位点。第二个MCS后有T7终止序列。多克隆位点提供的选择足够多，非常方便用于克隆两种片段，而且这些限制性酶切位点的设计也与现有pET兼容，使插入序列的亚克隆很方便。pETDuet和pACYCDuet载体的设计使用户可以选择表达天然蛋白或带有His·Tag®和S·Tag™标签序列，以便对蛋白复合物进行检测、定量和亲和纯化。pACYCDuet-1与pET重组子兼容，并进行共表达。

既pETDuet 和 pACYCDuet之后，Novagen又进一步开发了两种载体，使研究者可以通过选择合适的载体和宿主菌组合，可以表达1至8个蛋白！！截至目前，Duet共表达载体家族已经有了4种T7表达质粒，它们拥有兼容的复制区和抗性筛选标记，同时使用时，可以在一个细菌宿主细胞共表达多达8个目的蛋白。

首批推出的pETDuet.-1和pACYCDuet.-1载体可以在多种宿主细胞中方便地克隆和表达。而T7表达系统中有许多宿主菌带有pLysS质粒，Rosetta菌则带有pRARE质粒。由于pLysS和pRARE质粒带有P15A复制区，并带有氯霉素抗性(CmR)，所以不能与pACYCDuet-1载体一起使用。鉴于此，最新推出的pCDFDuet.-1和pRSFDuet.-1载体可以弥补上述不足，最主要的设计在于在新的质粒载体上构建不同的质粒复制区和抗性筛选标记基因。pETDuet-1载体带有ColE1复制区和氨苄抗性(ApR)；pACYCDuet-1载体带有P15A复制区和氯霉素抗性(CmR)。基于目前对各种复制区兼容性的知识，新的载体选用了RSF1030（或被称为NTP1)和CloDF13。将CloDF13复制区和编码链霉素和壮观霉素的aadA构建成为pCDFDuet-1。而略经修饰的RSF复制区和卡那抗性构建成为pRSFDuet-1质粒。

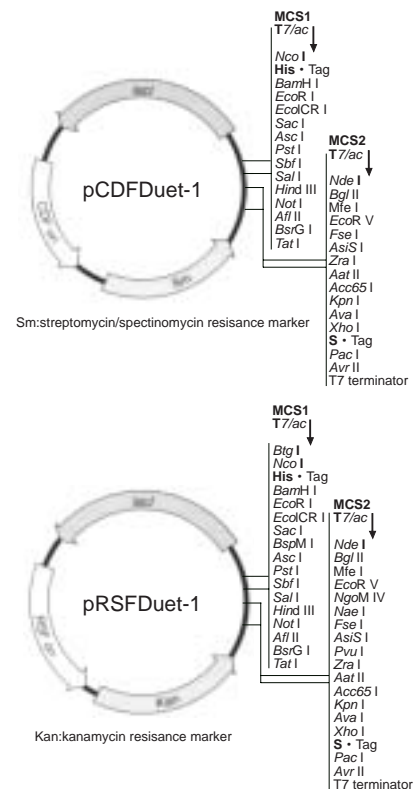


Figure 1.pCDFDuet-1 and pRSFDuet-1 vectors

Table 1: Plasmid replicons in Novagen <i>E. coli</i> expression systems		
Plasmid(s)	Replicon(source)	Copy Number
pET(all) pETDuet-1	ColE1 (pBR322)	~40
pACYCDuet-1 pLysS pLysE pLacI pRARE	P15A (pACYC184)	10-12
pRSF(all)	RSF1030	>100
pCDF(all)	CloDF13	20-40
pETBlue™(all) pTriEx™(all)	ColE1 (pUC)	>500
pETcoco™(all)	Mini-F/RK2 (7) (pBeloBAC11,RK2)	1,amplifiable to~40

## 载体拷贝数

将四种质粒共转化NovaBlue克隆宿主菌，对它们的拷贝数进行比较。经平行培养扩增，抽提后跑胶并比较质粒产量，发现这四种Duet质粒拷贝数pRSF > pET > pCDF > pACYC。通常，质粒拷贝数不同会直接影响目的蛋白的表达水平。

## 克隆策略

所有四种Duet载体都可以用于以正确的开放阅读框(ORF)克隆和表达两种目的蛋白。载体含有两个独立的表达单位：分别受T7lac启动子控制，拥有各自的核糖体结合位点(RBS)以及多克隆位点(MCS)。载体的MCS1在ATG(Met)翻译起始位置上有一个Nco I位点(CCATGG)，可以用来表达非融合蛋白；同时，载体上还设计了6个组氨酸构成的His标签以及Novagen多数pET载体常用的限制性酶切位点(BamH I, EcoR I, Sac I, Sal I, Hind III, Not I等，详见网站www.novagen.com上的质粒图谱)。MCS2则以Nde I(CATATG)位点起始，因此也可以用来表达非融合蛋白。MCS2包含Bgl II, Mun I以及Xho I位点，分别与BamH I, EcoR I和Sal I粘端互补。由此可见，将目的片段由pET载体亚克隆到新的Duet质粒相当方便。MCS2中的Xho I位点后设计了15个氨基酸的S标签。

### 小结

采用正确的载体/宿主菌组合，研究者可以用新的Duet质粒和传统的pET质粒，方便地完成表达多组分蛋白或同时表达多种蛋白的实验研究。有关载体的详细信息请参考www.novagen.com上的载体图谱及序列，表达效果请参考已经发表的文献。

Table 3. Vector and host strain compatibilities for coexpression of four to eight target proteins

Compatible Vector Combinations				Compatible Target Proteins (number)	Host Strain Group
Vector 1	Vector 2	Vector 3	Vector 4		
pETDuet <sup>TM</sup> -1(Ap <sup>R</sup> )	pACYCDuet-1(Cm <sup>R</sup> )	pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	pCDFDuet-1(Sm <sup>R</sup> )	8	A
pET(Ap <sup>R</sup> )	pACYCDuet-1(Cm <sup>R</sup> )	pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	pCDFDuet-1(Sm <sup>R</sup> )	7	A
pETDuet-1(Ap <sup>R</sup> )	pACYCDuet-1(Cm <sup>R</sup> )	pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	none	6	A
pETDuet-1(Ap <sup>R</sup> )	pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	pCDFDuet-1(Sm <sup>R</sup> )	none	6	B
pET(Ap <sup>R</sup> )	pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	pCDFDuet-1(Sm <sup>R</sup> )	none	5	B
pETDuet-1(Ap <sup>R</sup> )	pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	none	none	4	B
pRSFDuet-1(Kn <sup>R</sup> )	pCDFDuet-1(Sm <sup>R</sup> )	none	none	4	B
pETDuet-1(Ap <sup>R</sup> )	pCDFDuet-1(Sm <sup>R</sup> )	none	none	4	C

Host Strain Groups			
Group A	Group B	Group C	
B834(DE3)	B834(DE3)	B834(DE3)	RosettaBlue(DE3)
BL21(DE3)	B834(DE3)pLysS	B834(DE3)pLysS	RosettaBlue(DE3)pLysS
BLR(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)	Rosetta-gami <sup>TM</sup> (DE3)*
HMS174(DE3)	BL21(DE3)pLysS	BL21(DE3)pLysS	Rosetta-gami(DE3)pLysS*
NovaBlue(DE3)	BLR(DE3)	BLR(DE3)	Rosetta-gami B(DE3)
Tuner <sup>TM</sup> (DE3)	BLR(DE3)pLysS	BLR(DE3)pLysS	Rosetta-gami B(DE3)pLysS
	HMS174(DE3)	HMS174(DE3)	Tuner(DE3)
	HMS174(DE3)pLysS	HMS174(DE3)pLysS	Tuner(DE3)pLysS
	NovaBlue(DE3)	NovaBlue(DE3)	
	NovaBlue(DE3)pLysS	NovaBlue(DE3)pLysS	
	Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)	Origami <sup>TM</sup> (DE3)*	
	Rosetta(DE3)pLysS	Origami(DE3)pLysS*	
	RosettaBlue <sup>TM</sup> (DE3)	Origami B(DE3)	
	RosettaBlue(DE3)pLysS	Origami B(DE3)pLysS	
	Tuner(DE3)	Rosetta(DE3)	
	Tuner(DE3)pLysS	Rosetta(DE3)pLysS	

\*These strains carry the *rpsL* mutation that confers resistance to streptomycin; therefore, spectinomycin must be used for selection of pCDFDuet recombinants.  
Resistance markers: Ap<sup>R</sup>, ampicillin/carbenicillin; Kn<sup>R</sup>, Kanamycin; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol; Sm<sup>R</sup>, streptomycin/spectinomycin  
For strain descriptions, please refer to www.novagen.com or the Novagen catalog.

Product	Size	Cat.No.
pCDFDuet <sup>TM</sup> -1 DNA	10 μg	71340-3
pRSFDuet <sup>TM</sup> -1 DNA	10 μg	71341-3
pETDuet <sup>TM</sup> -1 DNA	10 μg	71146-3
pACYCDuet <sup>TM</sup> -1 DNA	10 μg	71147-3
Product	Size	Cat.No.
BL21(DE3) Competent Cells	0.4ml	69450-3
	1ml	69450-4
guaranteed efficiency:>2x10 <sup>6</sup> cfu/μg		
BL21(DE3) Singles <sup>TM</sup> Competent Cells	11 rxn	70235-3
	22 rxn	70235-4
guaranteed efficiency:>2x10 <sup>6</sup> cfu/μg		
NovaBlue Competent Cells	0.4ml	69825-3
	1ml	69825-4
guaranteed efficiency:>2x10 <sup>6</sup> cfu/μg		
NovaBlue Singles Competent Cells	11 rxn	70181-3
	22 rxn	70181-4
guaranteed efficiency:>2x10 <sup>6</sup> cfu/μg		