



pSmart IV载体

1. 产品介绍

早期筛选大肠杆菌融合蛋白表达体系主要靠个人经验和感觉, 有人做过 Ubiquitin、EGFP、DsbA 等融合表达体系。但是由于这些体系的明显缺陷, 最终并没有流行起来。随着经验积累, 有研究者提出了一个 Wilkinson-Harrison 溶解性模型, 通过这一经验公式, 可以计算某一个蛋白在大肠杆菌中可溶表达的概率。NusA 就是这样被挑选出来作为融合表达标签蛋白的。

大肠杆菌的 NusA 蛋白是一个抗终止因子, 约 55kDa 大小。自身水溶性很好, 同时又是大肠杆菌的内源蛋白, 拥有极高的表达水平。有人使用 NusA 融合表达体系, 测试了人的 γ -干扰素, 白介素 IL-3 等蛋白在大肠杆菌中的表达, 都获得了可溶产物。我们使用 NusA 也实现了 RNasin 抑制剂的表达。另外 NusA 也可能对于稳定转录有些帮助。因此, 我们构建了 pSmart-IV 载体系统, NusA 标签蛋白序列被克隆到 pET-28a 载体中, 保留了原载体的整体框架以及多克隆酶切位点。使用时请注意, NusA 本身太大了, 即使表达量较高, 最终获得的目的蛋白的水平也不如 pSmart-I 载体。



图 1 载体图谱

2. 多克隆位点

N-terminal-his6

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAACAAAGAAATTTGGCTGTAGTT
 GAAGCCGTATCCAATGAAAAGGCGCTACCTCGCGAGAAGATTTTGAAGCATCGAAAGCGCGCTGGCGACAGCAACAAAGAAAA
 ATATGAACAAGAGATCGACGTCCGCGTACAGATCGATCGAAAAGCGGTGATTTTGACACTTCCGTCGCTGGTTAGTTGTTGATGAA
 GTCACCCAGCCGACCAAGGAAATCACCCTTGAAGCCGCACGTTATGAAGATGAAAGCCTGAACCTGGGCGATTACGTTGAAGATCA
 GATTGAGTCTGTTACCTTTGACCGTATCACTACCCAGACGGCAAACAGTTATCGTGCAGAAAGTGCGTGAAGCCGAACGTGCGAT
 GGTGGTTGATCAGTTCCGTGAACACGAAGGTGAAATCATCACCGGCGTGGTGAAAAAGTAAACCGCGACAACATCTCTCTGGATCT
 GGGCAACAACGCTGAAGCCGTGATCCTGCGCGAAGATATGCTGCCGCGTGAACCTTCCGCCCTGGCGACCGCGTTCGTGGCGTG
 CTCTATCCGTTCCGCCGAAGCGCGTGGCGCGCAACTGTTGCTCACTCGTTCGAAGCCGAAATGCTGATCGAAGTTCGGTATT
 GAAGTGCCAGAAATCGGCGAAGAAGTGATTGAAATTAAGCAGCGGCTCGCGATCCGGTTCCTGTCGAAAATCGCGGTGAAAAC
 CAACGATAACGTATCGATCCGGTAGGTGCTTGCCTAGGTATGCGTGGCGCGCGTGTTCAGGCGGTGCTACTGAACTGGGTGGCG
 AGCGTATCGATATCGTCTGTGGGATGATAACCCGGCGCAGTTCGTGATTAACGCAATGGCACCGGCAGACGTTGCTTCTATCGTGG





TGGATGAAGATAAACACACCATGGACATCGCCGTTGAAGCCGGTAATCTGGCGCAGGCGATTGGCCGTAACGGTCAGAACGTGCGT
CTGGCTTCGCAACTGAGCGGTTGGAACTCAACGTGATGACCGTTGACGACCTGCAAGCTAAGCATCAGGCGGAAGCGCACGCAG
CGATCGACACCTTACCAAATATCTCGACATCGACGAAGACTTCGCGACTGTTCTGGTAGAAGAAGGCTTCTCGACGCTGGAAGAAT
TGGCCTATGTCCGATGAAAGAGCTGTTGAAATCGAAGGCCTTGATGAGCCGACCGTTGAAGCACTGCGCGAGCGTGCTAAAAAT
GCACTGGCCACCATTGCACAGGCCAGGAAGAAAGCCTCGGTGATAACAAACCGGCTGACGATCTGCTGAACCTTGAAGGGGTAGA
TCGTGATTTGGCATTCAAACCTGGCCGCCCGTGGCGTTGTACGCTGGAAGATCTCGCCGAACAGGGCATTGATGATCTGGCTGATAT
CGAAGGGTTGACCGACGAAAAAGCCGGAGCATTGATTATGGCTGCCCGTAATATTTGCTGGTTCGGTGACGAAGCGGAAAAACCTGT
ATTTTCAGGGA|GGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTT|GCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

multi-clonal sites(BamH I, EcoR I, Sac I, Sa II, HindIII, Not I, Xho I) C-terminal-his6

注意接入蛋白的读码框需要和 NusA 的读码框重合, 上游酶切位点选择 BamH I, EcoR I, Sac I 均可。

3. 蛋白酶切位点

mgsshhhhhssglvprgshmnkeilavveavsnekalprekifeasesalatatkkyeqeidrvrqjdrksqdfdfrrwlvvdevtqptkeitleaaryedeslnldgyvedqiesvfdrittqt
akqvivqvrearamvvdqfrehegeiitgvvkvnrndisldgnnaevilredmlprenfprgdrvrvglysvrpeargaqlfvtrskpemlielfrievpeigeevieikaaardpgsrakiavk
tndkridpvgacvgrmarvqavstelggeridivlwdnnpaqlvinamapadvasivvdedkhtmdiaveagnlaqairngqnvrlasqlsgwelnvmtvddlqakhqaeahaaidtftkyl
didedfatvlveegfstleelayvpmkelleiegldeptvealreraknalatiaqaeeslgdnkpadllnlegvdrldfklargvctledlaeqiddladiegltdkekagalimaarnicwfgde
aenlyfqjggse

N-端的 His6-tag 可以用于镍柱纯化, C-端 His6-tag 也可以选择使用, 如果不需要, 在其前面加入终止密码子即可。融合蛋白可以被 TEV 蛋白酶切除, 识别序列是: Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly 箭头位置是蛋白酶的最终切点, 如果使用 BamH I 接入核酸序列, 蛋白酶切除标签以后, 目的蛋白 N-端将多出 Gly-Gly-Ser 三个冗余氨基酸残基。注意: 标准的蛋白酶切位点下游第一个氨基酸是 Gly, 才能保证切开。蛋白酶的具体信息请参考 TEV 蛋白酶产品说明书。

4. 测序引物

使用任何 pET-28a 载体的通用引物均可以, 但这里推荐距离目标蛋白较远的测序引物 T7-Pro 或者 T7-Ter, 获得的测序信息更加可靠。

5. 完整的载体序列

绿色标记的是 NusA 的核酸序列以及在载体中的位置 (反向互补)

ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT
GGCAGCAGCAACTCAGCTTCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT|CTCGAGTGC GGCCGCA
AGCTTGTGACGAGCTCGAATTCGGATCCTCCCTGAAAATACAGGTTTTCGCTTCGTACCGAACCAGCAAATATTACGGGCAGC
CATAATCAGTGTCCGGCTTTTTTCGTCGGTCAACCTTCGATATCAGCCAGATCATCAATGCCCTGTTCCGGCGAGATCTCCAGCGTA
CAAACGCCACGGGCGGCCAGTTTGAATGCCAAATCACGATCTACCCCTTCAAGGTTACGAGATCGTCAGCCGGTTTGTATACCG
AGGCTTCTTCTGGGCTGTGCAATGGTGGCCAGTGCATTTTTAGCACGCTCGCGCAGTGTTCACCGTTCGGCTCATCAAGGCC
TTCGATTCCAACAGCTCTTTCATCGGCACATAGCCAATTCTTCCAGCGTCGAGAAGCCTTCTTACCAGAACAGTCGCGAAGTCT
TCGTGATGTCGAGATATTTGGTGAAGGTGTCGATCGTGCCTGCGCTTCCGCTGATGCTTAGCTTGCAAGTTCGTCACCGGTCATC
ACGTTGAGTTCCCAACCGCTCAGTTGCGAAGCCAGACGCACGTTCTGACCGTTACGGCCAATCGCCTGCGCCAGATTACCGGCTTC
AACGGCGATGTCCATGGTGTGTTTATCTTCCATCCACCACGATAGAAGCAACGCTCTGCCGGTGCCATTGCGTTAATCACGAACCTGCGC
CGGGTTATCATCCACAGGACGATATCGATACGCTCGCCACCCAGTTCAGTAGACACCCGCTGAACACGCGCGCCACGCATACCTAC
GCAAGCACCTACCGGATCGATACGTTTATCGTTGGTTTTACCAGGATTTTCGCACGAGAACCAGGATCGCGAGCCGCTGCTTAAAT
TTCAATCACTTCTTCGCCGATTTCTGGCACTTCAATACGGAACAGTTCGATCAGCATTTCCGGCTTGAACGAGTGACGAACAGTTGC
GCGCCACGCGCTTCCGGGCGAACGGAATAGAGCACGCCACGAACGCGGTGCCAGGGCGGAAGTTTTACGCGGCAGCATATCT
TCGCGCAGGATCACGGCTTCAGCGTTGTTGCCAGATCCAGAGAGATGTTGTCGCGGTTACTTTTTACCACGCGCGGTGATGATT
TCACCTTCGTGTTACGGAACGATCAACCACATCGCACGTTCCGGCTTACGCACTTTCTGCACGATAACCTGTTTTGCCGCTGG
GTAGTGATACGGTCAAAGGTAACAGACTCAATCTGATCTTCAACGTAATCGCCAGGTTACAGGCTTTCATCTTATAACGTGCGGCTT
CAAGGGTGATTTCTTGGTCGGCTGGGTGACTTCATCAACAATAACCAGCGACGGAAGTGTCAAATACCCGCTTTTTCGATCGA
TCTGTACGCGGACGTCGATCTTGTTCATATTTTTCTTTGTTGCTGTGCCAGCGCGCTTCCGATGCTTCGAAAATCTTCTCGCG
AGGTAGCGCCTTTTCATTGATACGGCTTCAACTACAGCCAAAATTTCTTTGTTTCATATGGCTGCCGCGCGCACCCAGGCCGCTGCT
GTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTCTAAAGTTAAACAAAATTTTCTAGAGGGGAATTTGTTATCCGCTC
ACAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGG



CGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCT
TGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGGCGGCGG
CGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGGACACCAT
CGAATGGCGCAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTT
ATACGATGTCGAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGC
GGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCAACCGCGTGGCACAACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCT
GATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTG
CCAGCGTGGTGGTGTGATGGTGAACGAAGCGGCGTCAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAG
TGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTATTTCTTGAT
GTCTCTGACCAGACCCATCAACAGTATTATTTCTCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGT
CACCAGCAAATCGCGTGTAGCGGGCCATTAAGTTCTGTCTGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGC
AATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGG
CATCGTTCCCACTGCGATGCTGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTT
GGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATAACGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTC
GCCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCCTTCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCT
CACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATGCAGCTGGCA
CGACAGGTTTCCCGACTGAAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGAC
CGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCGCCACTTATGACTGTCTTC
TTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGAT
CGGCCTGTGCTTGGCGTATTCCGAATCTTGACAGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGA
AGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCCCACGGGTGCGCATGATCGTCTCCTGTGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGG
GTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTGCGACCTGAGCA
ACAACATGAATGGTCTTCCGTTTCCGTTTTCGTAAGTCTGGAACCGGAAAGTCAAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGC
ATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGT
CCCGCCGATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTATCATCAGTAACCCGATCGTGAGCAT
CCTCTCTGTTTTATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAACAGGAAAAACCGC
CCTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACAT
CTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTACCAGCTGCCTCGCGGTTTCGGTATGACGGTGAAAACCTCTGACACA
TGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTG
GCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCAGTAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTG
TACTGAGAGTGACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTGCAGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT
CAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCCGGCTTGGTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC
AGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCG
GGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTATCGCGCAAACAA
ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAGATCCTTTGATCTTTT
CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTA
ATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGCTTGTCTTAGGCCGCGATTAATTCACATGGATGCTGATTTATATGGG
TATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGA
AACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCAT
CAAGCATTATCCGACTCCTGATGATGCATGGTACTCAACACTGCGATCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATC
CTGATTACGGTGAATAATTTGTTGATGCGCTGGCAGTGTCTGCGCCGGTGCATTGATTCTGTTTGAATTGCTTTTTAACAGC
GATCGCGTATTTCTGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTGATGACGAGCGTAATGGCT
GGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAATTTTGCATTCTACCGGATTGAGTGCCTACTCATGGTATTTCTCACTTGA
TAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACAGGATCTTGCATCC
TATGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCA
GTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTAAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGT
TCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAACGTTAATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTC



ATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGA
ACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCAT
CACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGG
GAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACG
CTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCA

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
pSmart IV	SLP026	100 ng/μl, 10 μl

