

組換えタンパク質発現用ベクター

Expression Vector
pLEAD DNA, pre-digested
and
pLEAD Expression Kit

マニュアル (第 1 版)

Code No. 315-06801

Code No. 312-06811

Code No. 319-06821

Code No. 316-06831

NIPPON GENE CO., LTD.

目次

I	製品説明	2
	【Expression Vector pLEAD DNA の発現システムについて】	2
	【Expression Vector pLEAD DNA における第 1 ORF 及び第 2 ORF の構造模式図】	3
	【第 1 ORF 終止コドンと第 2 ORF 開始コドンのオーバーラップ部位】	3
	【Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested のクローニングサイト周辺配列情報】	4
II	キット内容	5
III	保存	6
IV	使用上の注意	6
V	プロトコル	6
	【本品以外に必要な試薬、培地、機器など】	6
	【ベクターの選択】 <共通プロトコル> *	7
	【インサート DNA の調製】 <共通プロトコル> *	7
	[リーダーORF 及びタンパク質 N 末端近傍の発現模式図]	7
	【遺伝子クローニング】	
	<Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested 標準プロトコル>	11
	<pLEAD Expression Kit 標準プロトコル>	13
	【タンパク質発現確認】 <共通プロトコル> *	14
	【タンパク質発現】 <共通プロトコル> *	14
VI	データ集	15
VII	トラブルシューティング	16
VIII	関連製品	17
IX	参考文献	18

* <共通プロトコル>: Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested 及び pLEAD Expression Kit で共通するプロトコル

I 製品説明

Expression Vector pLEAD DNAは、大腸菌を用いてタンパク質を生産するための組換えタンパク質発現用ベクターです。転写された mRNA から効率良く翻訳が行われるように改変された配列を有し、大腸菌での発現が難しいとされる好熱菌や放線菌などの GC 含有率の高い遺伝子からのタンパク質発現に特に有効です。タグ配列を付加せず、また融合タンパク質としないため、タンパク質本来のアミノ酸配列を反映した発現が可能です。

Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested はあらかじめクローニングに用いる制限酵素で消化済みであるため、簡単に実験を開始できます。

pLEAD Expression Kit には上述の消化済みクローニングベクターに加え、ライゲーション用の試薬と形質転換用の大腸菌 (JM109 株) 及び SOC medium が添付されておりますので、インサート DNA を準備するだけで容易にタンパク質発現クローンを取得できます。

【Expression Vector pLEAD DNA の発現システムについて】

発現用ベクターを用いて大腸菌に異種タンパク質を発現させる手法は、タンパク質の研究や産業応用において不可欠な技術とされています。大腸菌は取り扱いが簡便で成育が早く、異種タンパク質の生産に最適な宿主として広く用いられていますが、遺伝子の配列によっては大腸菌に対し致命的に作用する場合や、不溶化などにより極めて少量のタンパク質しか得られない場合が少なくありません。

この問題を解決するために、GC 含有率の高い遺伝子からのタンパク質発現効率が良い発現用ベクタークローンのスクリーニング⁽¹⁾の結果に基づき、Expression Vector pLEAD4 DNA 及び Expression Vector pLEAD5 DNA が構築されました⁽²⁾。この発現効率の上昇は、目的遺伝子の直前に挿入された短い ORF (Open Reading Frame) に起因しています。スクリーニングにより得られた高発現クローンでは、この短い ORF (リーダーORF) の終止コドンと目的遺伝子の開始コドンに塩基の重複が見出されました^(1, 3, 4)。

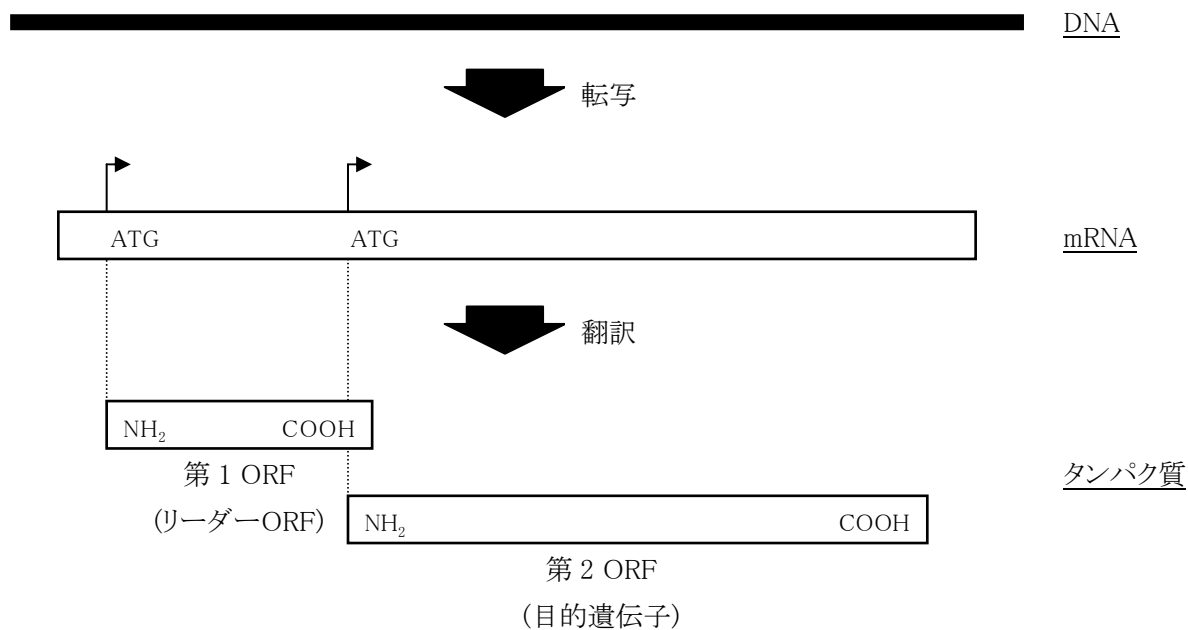
一般に大腸菌に用いる発現用プラスミド DNA は、ベクター上のプロモーター下流に目的遺伝子を挿入して構築されます。しかしながら、実際に発現するかどうかは使用するプロモーターと発現させたいタンパク質をコードする遺伝子の N 末端付近の配列に依存すると考えられており、安定な発現系の構築までには試行錯誤が必要となります。特に GC 含有率の高い遺伝子は大腸菌での発現が困難となる場合があり、原因はその翻訳開始効率の低さにあると考えられています⁽⁵⁾。

この ORF の重複を利用して組換えタンパク質を効率良く翻訳させることを目的に構築されたのが Expression Vector pLEAD4 DNA 及び Expression Vector pLEAD5 DNA です⁽²⁾。Expression Vector pLEAD DNA は AT 含有率の高い遺伝子の発現に対しても有効であることが示されており⁽⁶⁾、通常のタンパク質発現だけでなく、従来の発現用ベクターでは発現が難しかった遺伝子からのタンパク質発現における効果が期待できます。

* () 中の数字は参考文献番号に対応しています。参考文献に関しては、18 ページを参照して下さい。

【Expression Vector pLEAD DNA における第 1 ORF 及び第 2 ORF の構造模式図】

1 つの転写単位の中に 2 つの翻訳単位を配置することにより、第 1 ORF (リーダーORF) の翻訳と第 2 ORF (目的遺伝子) の翻訳を同時に行います。



【第 1 ORF 終止コドンと第 2 ORF 開始コドンのオーバーラップ部位】

下図の RBS は、遺伝子にコードされる mRNA 上の Ribosome Binding Sequence に対応しています。

Expression Vector pLEAD4 DNA: 4 bp overlap



Expression Vector pLEAD5 DNA: 1 bp overlap



II キット内容

Code No. 315-06801

<u>Expression Vector pLEAD4 DNA, pre-digested</u>	5.0 µg
Expression Vector pLEAD4 DNA, pre-digested (0.5 µg/µl)	10 µl
マニュアル	1 部

Code No. 312-06811

<u>Expression Vector pLEAD5 DNA, pre-digested</u>	5.0 µg
Expression Vector pLEAD5 DNA, pre-digested (0.5 µg/µl)	10 µl
マニュアル	1 部

Code No. 319-06821

<u>pLEAD4 Expression Kit</u>	20 回用
Expression Vector pLEAD4 DNA, pre-digested (0.1 µg/µl)	30 µl
2×Ligation Mix	100 µl × 1 本
Competent <i>E.coli</i> JM109	100 µl × 20 本
SOC medium	1 ml × 20 本
マニュアル	1 部

Code No. 316-06831

<u>pLEAD5 Expression Kit</u>	20 回用
Expression Vector pLEAD5 DNA, pre-digested (0.1 µg/µl)	30 µl
2×Ligation Mix	100 µl × 1 本
Competent <i>E.coli</i> JM109	100 µl × 20 本
SOC medium	1 ml × 20 本
マニュアル	1 部

III 保存

Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested は-20℃で保存して下さい。

pLEAD Expression Kit は-80℃ドライアイス梱包にて発送します。納品後は Competent *E.coli* JM109 は-80℃で保存し、その他の内容物は-20℃で保存して下さい。

IV 使用上の注意

- 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いわないでください。
- 本品のお取り扱い、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、株式会社ニッポンジーンでは責任を負いかねます。
- pLEAD を用いた異種タンパク質の高発現システムは株式会社ニッポンジーンが特許出願中です。

V プロトコル

【本品以外に必要な試薬、培地、機器など】

- マイクロピペット
- ピペットチップ
- マイクロチューブ
- インキュベーター
- マイクロ遠心機
- LB 培地 (液体・寒天)
- アンピシリン
- IPTG
- 滅菌蒸留水
- EDTA
- Tris-HCl (pH8.0)
- NaCl
- Tween 20
- Phenylmethylsulfonyl fluoride
- 2-mercaptoethanol
- Glycerol
- Bromo Phenol Blue
- T4 Polynucleotide Kinase: リン酸化プライマーを調製する場合
- 制限酵素: インサード DNA を制限酵素により調製する場合
- SDS

下記の試薬は、pLEAD Expression Kit を使用する場合には不要です。

- Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)
- 99.5 %エタノール
- 70 %エタノール
- 5 M Ammonium Acetate
- 大腸菌 *Lac* リプレッサー (*Lac^q* 遺伝子) 高発現株 (JM109、XL1-Blue 等)

【ベクターの選択】 <共通プロトコル>

<共通プロトコル>: Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested 及び pLEAD Expression Kit で共通するプロトコル

Expression Vector pLEAD4 DNA では、目的遺伝子の 2 アミノ酸目に対応するコドンの 1 塩基目が A に限定されます。従って、2 番目のアミノ酸はイソロイシン、メチオニン、スレオニン、アスパラギン、リジン、セリン、アルギニンのいずれかに制限されます。

発現させるタンパク質の N 末端側より 2 アミノ酸目に対応するコドンの 1 塩基目が A である場合 或いは A に置換可能である場合 (2 アミノ酸目がセリン或いはアルギニンの場合) は、Expression Vector pLEAD4 DNA、Expression Vector pLEAD5 DNA ともに使用可能です。

発現させるタンパク質の N 末端側より 2 アミノ酸目に対応するコドンの 1 塩基目が A 以外であり、A には置換できない場合 には、Expression Vector pLEAD5 DNA をご使用下さい。

【インサート DNA の調製】 <共通プロトコル>

各ベクターには、下記のインサート DNA をあらかじめ準備する必要があります。
インサート DNA の配列にはいくつかの制限がありますので、以下の方法に従ってインサートを作製して下さい。

[リーダーORF 及びタンパク質 N 末端近傍の発現模式図]

下図では、アミノ酸を一文字表記にて表示しており、ter は終止コドンを示しています。

Expression Vector pLEAD4 DNA

```
          リーダーORF
          M T M I D I R R I Y V ter
5' ----CATATGACCATGATTGATATCAGGAGGATTTACGTATGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN----3'
                                     M N N N N N N---ter
                                     目的遺伝子
```

Expression Vector pLEAD5 DNA

```
          リーダーORF
          M T M I T D I R R I T ter
5' ----CATATGACCATGATTACTGATATCAGGAGGATCACGTGATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN----3'
                                     M N N N N N N---ter
                                     目的遺伝子
```

方法 1: PCR 法を用いた制限酵素認識配列の付加及び 5' 末端のリン酸化

下記に従ってプライマーを設計し、PCR 法により C 末端側に制限酵素 *Sac* I 認識配列を付加します。目的遺伝子に *Sac* I の認識配列が含まれる場合は、代わりに *Kpn* I、*Stu* I、*Bam*H I、*Hind* III のいずれかの認識配列を付加し、pLEAD pre-digested も同一の制限酵素にて消化して下さい。

PCR 法により得られた DNA 断片は Klenow Fragment により平滑化^{注1}し、続いて 5'末端をリン酸化^{注2}してから C 末端側に付加した制限酵素認識配列をその制限酵素で消化して下さい。

非特異的な増幅産物が認められる場合には、ライゲーションの前にアガロースゲルからの切り出しを行い、DNA 断片の精製を行って下さい。

注1 3'-5' exonuclease 活性を有する DNA Polymerase を PCR 法に用いた場合、DNA 断片の平滑化は不要です。

注2 あらかじめ化学合成或いは T4 Polynucleotide Kinase により 5'末端にリン酸基を付加したプライマーを使用する場合、5'末端のリン酸化は不要です。

Expression Vector pLEAD4 DNA

PCR プライマー

N 末端側: 5'-GTATGATG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* ATG (下線部) は目的遺伝子の開始コドンに対応

C 末端側: 5'-NNNNN GAGCTC TTA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC TA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC A + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* TTA、CTA、TCA (下線部) は目的遺伝子の終止コドンに対応

使用する制限酵素

GAGCT|C: *Sac* I

Expression Vector pLEAD5 DNA

PCR プライマー

N 末端側: 5'-GTGATG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-CTGATG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* ATG (下線部) は目的遺伝子の開始コドンに対応

C 末端側: 5'-NNNNN GAGCTC TTA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC TA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC A + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* TTA、CTA、TCA (下線部) は目的遺伝子の終止コドンに対応

使用する制限酵素

GAGCT|C: *Sac* I

[リン酸化プライマー調製プロトコル]

- ① 下記の組成の反応溶液を作製する。

100 μ M オリゴヌクレオチド	50 μ l	
10 \times Kinase Buffer A 注 ³	10 μ l	
100 mM rATP	1 μ l	
T4 Polynucleotide Kinase	5 μ l	(100 units)
H ₂ O	34 μ l	/Total 100 μ l

注 3 10 \times Kinase Buffer A 組成

500 mM Tris-HCl (pH 7.6)
100 mM MgCl ₂
50 mM DTT
1 mM Spermidine
1 mM EDTA

- ② 37 $^{\circ}$ Cで1時間静置する。
- ③ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) 100 μ l を添加し、ボルテックスにより十分に攪拌した後、12,000 rpm、5 分間、25 $^{\circ}$ Cにて遠心する。
- ④ 上清 100 μ l を新しいチューブに移し、5 M Ammonium Acetate 100 μ l と 99.5 %エタノール 400 μ l を添加してボルテックスにより十分に攪拌した後、-80 $^{\circ}$ Cに 15 分間或いは-20 $^{\circ}$ Cに 1 時間静置する。
- ⑤ 15,000 rpm、15 分間、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、上清を除去する。
- ⑥ 70 %エタノール 1 ml を添加して穏やかにチューブを転倒させた後、15,000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、上清を除去する。
- ⑦ キャップを開けたまま 15 分間程度静置し、沈澱を風乾する。
- ⑧ 滅菌蒸留水に溶解し、濃度を 10 μ M 程度に調整して PCR 法に用いる。

方法 2: PCR 法を用いた制限酵素認識配列の付加

下記に従ってプライマーを設計し、PCR 法により両末端に制限酵素認識配列を付加します。目的遺伝子に *Sac* I の認識配列が含まれる場合は、代わりに *Kpn* I、*Stu* I、*Bam*H I、*Hind* III のいずれかの認識配列を C 末端側に付加し、pLEAD pre-digested も同一の制限酵素にて消化して下さい。

非特異的な増幅産物が認められる場合には、ライゲーションの前にアガロースゲルからの切り出しを行い、DNA 断片の精製を行って下さい。

Expression Vector pLEAD4 DNA

PCR プライマー

N 末端側: 5'-NNNNN TACGTA TGA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* ATG (下線部) は目的遺伝子の開始コドンに対応

C 末端側: 5'-NNNNN GAGCTC TTA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC TA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC A + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* TTA、CTA、TCA (下線部) は目的遺伝子の終止コドンに対応

使用する制限酵素

TAC|GTA: *Sna*B I、*Eco*105 I

GAGCT|C: *Sac* I

Expression Vector pLEAD5 DNA

PCR プライマー

N 末端側: 5'-NNNNN CACGTG ATG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN CAGCTG ATG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* ATG (下線部) は目的遺伝子の開始コドンに対応

C 末端側: 5'-NNNNN GAGCTC TTA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC TA + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

5'-NNNNN GAGCTC A + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

* TTA、CTA、TCA (下線部) は目的遺伝子の終止コドンに対応

使用する制限酵素

CAC|GTG: *Pma*C I、*Pml* I、*Bbr*P I、*Eco*72 I

CAG|CTG: *Pvu* II (インサート DNA は切り出せなくなります)

GAGCT|C: *Sac* I

【遺伝子クローニング】 <Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested 標準プロトコル>

目的遺伝子に *Sac* I が含まれない場合

- ① 滅菌蒸留水を用いて Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested を 0.1 µg/µl に希釈する。
- ② インサートDNAを準備し、ライゲーション、形質転換^{注4}を行う。ライゲーションにおけるベクター:インサート比に関しては下記を参照する。
- ③ コロニーPCR^{注5}によりインサートDNAの挿入を確認する。
- ④ 必要に応じてプラスミドDNAを抽出してシーケンシングにより内部配列を確認する。

目的遺伝子に *Sac* I が含まれる場合

目的遺伝子に *Sac* I が含まれる場合は Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested を *Kpn* I、*Stu* I、*Bam*H I、*Hind* III のいずれかの制限酵素でさらに消化する必要があります。

- ① *Kpn* I、*Stu* I、*Bam*H I、*Hind* III の中から目的遺伝子に含まれない制限酵素認識配列を選択し、100 µl の反応系にて Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested 及びインサートDNAをそれぞれ消化する。
- ② Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) 100 µl を添加し、ボルテックスにより十分に攪拌した後、12,000 rpm、5 分間、25°Cにて遠心する。
- ③ 上清 100 µl を新しいチューブに移し、5 M Ammonium Acetate 100 µl と 99.5 %エタノール 400 µl を添加してボルテックスにより十分に攪拌した後、-80°Cに 15 分間或いは-20°Cに 1 時間静置する。
- ④ 15,000 rpm、15 分間、4°Cにて遠心し、上清を除去する。
- ⑤ 70 %エタノール 1 ml を添加して穏やかにチューブを転倒させた後、15,000 rpm、5 分間、4°Cにて遠心し、上清を除去する。
- ⑥ キャップを開けたまま 37°Cのエアーインキュベーター内に静置し、沈澱を風乾する。
- ⑦ 滅菌蒸留水に沈澱を溶解し、Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested の DNA 濃度を 0.1 µg/µl に調整する。
- ⑧ 上記と同様に調製されたインサートDNAとライゲーションし、形質転換^{注4}を行う。ライゲーションにおけるベクター:インサート比に関しては下記を参照する。
- ⑨ コロニーPCR^{注5}によりインサートDNAの挿入を確認する。
- ⑩ 必要に応じてプラスミドDNAを抽出してシーケンシングにより内部配列を確認する。

ベクター:インサート比

ベクター:インサートのモル比はライゲーションの効率に大きく影響しますので、下記の表を参考にベクター:インサート比を設定して下さい。

インサート長	200 bp	600 bp	1,000 bp	3,000 bp
ベクター	1.0	1.0	1.0	1.0
インサート	5.0	5.0	2.0-10.0	0.5-2.0

注 4 宿主とする大腸菌には、JM109、XL1-Blue 等、*Lac* リプレッサー (*LacI^q* 遺伝子) 高発現株を選択して下さい。
Lac リプレッサーを発現していない大腸菌では、形質転換効率が低下する場合があります。

注 5 コロニーPCR には、プライマーが別途必要です。
下記配列のプライマーが使用可能です。各ベクターの配列は GenBank (NCBI; National Center for Biotechnology Information) を参照して下さい。

Accession number

Expression Vector pLEAD4 DNA: AB049968

Expression Vector pLEAD5 DNA: AB049969

プライマー配列

pLEAD-Forward: 5'-ACAATTAATCATCGGCTCG-3'

pLEAD-Reverse: 5'-CAGACCGCTTCTGCGTTCTG-3'

Expression Vector pLEAD4 DNA

```
5'-TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGATAACAATTC
ACACAGGAAACAGAATTCAGGAGGATTATCATATGACCATGATTGATATCAGGAGGATTC
ACGTATGA---NNNAGCTCGGTACCTAGGCCTGGATCCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATG
AGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGAAGCGGTCTGATAAAA-3'
```

Expression Vector pLEAD5 DNA

```
5'-TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
CACACAGGAAACAGAATTCAGGAGGATTATCATATGACCATGATTACTGATATCAGGAGG
ATCACGTGATG---NNNAGCTCGGTACCTAGGCCTGGATCCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGG
ATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGAAGCGGTCTGATAAAA-3'
```

■部分はベクター由来の配列を示す。

【遺伝子クローニング】 <pLEAD Expression Kit 標準プロトコル>

- ① インサート DNA を準備する。
- ② Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested (0.1 µg/µl) 1 µl にインサート DNA と滅菌蒸留水を添加して 5 µl とする。ライゲーションにおけるベクター:インサート比に関しては下記を参照する。
- ③ 2×Ligation Mix 5 µl を添加してピペッティングにより混和する。
- ④ 16°C で 15 分間静置する。
- ⑤ Competent *E.coli* JM109 90 µl を添加してピペッティングにより混和する。
- ⑥ 氷上或いは 4°C にて 30 分間静置する。
- ⑦ ヒートブロック或いはウォーターバスを用いて 42°C、45 秒間熱処理した後、速やかに氷上或いは 4°C に移し 5 分間静置する。
- ⑧ SOC medium 900 µl を添加し、チューブを転倒させて混和した後 37°C に 1 時間静置する。
- ⑨ 6,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し、上清 900 µl を除去する。
- ⑩ ピペッティングにより Competent *E.coli* JM109 の沈澱を懸濁し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布する。
- ⑪ 37°C にて一晩倒置培養する。
- ⑫ コロニー PCR によりインサート DNA の挿入を確認する。
- ⑬ 必要に応じてプラスミド DNA を抽出してシーケンシングにより内部配列を確認する。

ベクター:インサート比

ベクター:インサートのモル比はライゲーションの効率に大きく影響しますので、下記の表を参考にベクター:インサート比を設定して下さい。

インサート長	200 bp	600 bp	1,000 bp	3,000 bp
ベクター	1.0	1.0	1.0	1.0
インサート	5.0	5.0	2.0-10.0	0.5-2.0

【タンパク質発現確認】 <共通プロトコル>

- ① プラスミド DNA を保持した菌体を 50 µg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 1~5 ml に植菌し、37°C にて 20 時間程度振盪培養する。
- ② 培養液をマイクロチューブに移し、12,000 rpm、1 分間、4°C で集菌し、上清を除去する。
- ③ 集菌した菌体に破砕バッファー^{注6} 100 µl と 2×サンプルバッファー^{注7} 100 µl を添加し、90°C で 2 分間処理する。
- ④ 5~10 µl を SDS-PAGE により分離し、タンパク質の発現を確認する。

注 6 破砕バッファー組成

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA (pH 8.0)
200 mM NaCl
1 % Tween 20
30 µg/ml Phenylmethylsulfonyl fluoride
2 mM 2-mercaptoethanol

注 7 2×サンプルバッファー組成

40 mM Tris-HCl (pH 6.8)
4 % SDS
20 % Glycerol
0.02 % Bromo Phenol Blue
5 mM 2-Mercaptoethanol

【タンパク質発現】 <共通プロトコル>

- ① 前培養: プラスミド DNA を保持した菌体を 50 µg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 (本培養の 1/100 倍量) に植菌し、37°C にて 20 時間程度振盪培養する。
- ② 本培養: 培養液を 100 倍量の LB 液体培地に植え継ぎ、37°C にて 20 時間程度振盪培養する。
- ③ 適した容量の容器に培養液を移し、遠心により集菌する。
- ④ タンパク質の精製を行う。すぐに使用しない場合は -80°C に保存する。

LB 液体培地中において基底レベルで十分な発現量が得られるため、原則として IPTG による強制発現誘導は不要です。

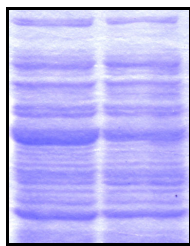
LB 液体培地で発現量が少ない場合には、IPTG による発現誘導が必要である場合があります。その場合は 0.1 mM 程度の IPTG を添加して発現コントロールを行って下さい。IPTG 過多の条件下では発現量 (発現菌体量) が著しく低下する場合がありますのでご注意下さい。

VI データ集

【実験例1】 Expression Vector pLEAD5 DNA による耐熱性 DNA ポリメラーゼの発現

耐熱性DNAポリメラーゼを発現させた大腸菌を超音波破碎し、可溶性画分をSDS-PAGEにより分離した。

Expression Vector pLEAD5 では、IPTG による強制的な発現誘導を行うことなく、従来の発現用ベクター (vector A) よりも効率良く耐熱性 DNA ポリメラーゼが豊富に発現した。



1 2

<発現条件>

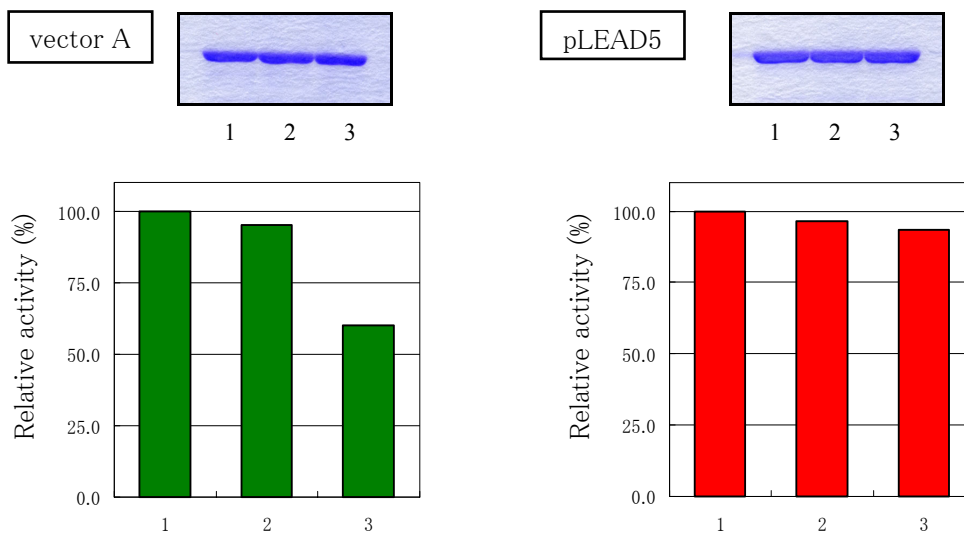
Lane 1: pLEAD5 (*E.coli* JM109/37°C)

Lane 2: vector A (*E.coli* JM109/37°C、1 mM IPTG)

【実験例2】 Expression Vector pLEAD5 DNA で発現したタンパク質の熱安定性試験

上記実験例1で得た耐熱性DNAポリメラーゼを精製し、熱処理後の活性を評価した。

Expression Vector pLEAD5で発現した耐熱性DNAポリメラーゼは、70°Cで80分間の熱処理を施した後も活性を維持しており、従来の発現ベクター (vector A) を用いてIPTG誘導により強制発現させたタンパク質と比較して熱安定性において優れていた。



1: 未処理 2: 70°C・40 分間 3: 70°C・80 分間

* 未処理の場合の DNA ポリメラーゼ活性を 100 %とする。

VII トラブルシューティング

問題	考えられる原因	考えられる対策
コロニーが得られない	ベクター:インサート比が適していない	インサート量を増やして再検討して下さい。
	DNA の末端が一致していない	末端の配列が正しいかどうか確認して下さい。
	宿主とする大腸菌が <i>Lac</i> リプレッサーを発現していない	宿主とする大腸菌には、JM109、XL1-Blue 等、 <i>Lac</i> リプレッサー (<i>LacI^q</i> 遺伝子) 高発現株を選択して下さい。 <i>Lac</i> リプレッサーを発現していない大腸菌では、形質転換効率が低下する場合があります。
	IPTG 過剰の状態になっている	IPTG を含む培地中では大腸菌の育成が著しく阻害される場合があります。
発現しない	インサートに短い DNA 断片が混入している	アガロースゲルからの切り出しを行って下さい。
タンパク質の発現が少ない	フレームが合っていない	フレームが正しく合っているか確認して下さい。
	強制発現誘導が必要である	LB 液体培地で発現量が少ない場合には、IPTG による発現誘導が必要である場合があります。0.1 mM 程度の IPTG を添加して発現コントロールを行って下さい。
	コドンユセージが大腸菌に適していない	目的遺伝子の N 末端周辺の配列は大腸菌の菌体内における翻訳効率に影響します。必要な場合は大腸菌のコドンユセージに合わせた塩基への変更を検討して下さい。
	発現が困難なタンパク質である	上述の IPTG 誘導を検討しても効果が見られない場合には、培養時間を 20 時間以上に増やして下さい。

タンパク質の発現にはその生物独自の様々な細胞内の要素が関与しています。大腸菌を用いた異種タンパク質の発現はタンパク質研究において有用な技術ですが、全てのタンパク質について均一な発現を行うことは困難です。

目的の遺伝子によっては Expression Vector pLEAD DNA を用いても発現効率が改善しない場合や、従来の発現用ベクターよりも発現量が少なくなる可能性がありますので、タンパク質の性質を考慮した上で、適切なケースで Expression Vector pLEAD DNA を使用して下さい。

VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位	希望納入価格
311-90151	Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)	250 ml	15,000 円
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 ml	4,000 円
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml	9,000 円
319-90191	10 M Ammonium Acetate	100 ml	8,000 円
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml	15,000 円
311-05281	OneSTEP Marker 6 (λ / <i>StyI</i> digest)	1,500 μ l	9,000 円
313-05361	OneSTEP Ladder 500 (0.5-5 kbp)	500 μ l	12,000 円
312-01193	Agarose S	100 g	13,200 円
319-00302	<i>SacI</i>	1,500 units	9,000 円
312-03234	Gene <i>Taq</i> NT	50 units	5,600 円
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT	250 units	22,500 円
312-01551	T4 Polynucleotide Kinase	1,000 units	13,000 円
312-00814	Klenow Fragment	200 units	13,000 円
315-05963	Ligation-Convenience Kit	10 回分	3,200 円
319-05961	Ligation-Convenience Kit	100 回分	20,000 円
318-06293	Blunting-Convenience Kit	5 回用	5,600 円
312-06291	Blunting-Convenience Kit	25 回用	20,000 円
313-06243	<i>ECOS</i> SM Competent <i>E.coli</i> JM109	100 μ l x 20 本	36,000 円
317-06523	<i>ECOS</i> SM Competent <i>E.coli</i> XL1-Blue	100 μ l x 10 本	24,000 円
316-01353	Competent <i>E.coli</i> JM109	100 μ l x 10 本	18,000 円
314-06251	Bac'n' Roll Beads	100 回分	4,400 円

IX 参考文献

1. Suzuki, T., Tanaka, Y., Ishida, M., Ishizuka, M., Yamagishi, A., Oshima, T. (1997) Screening of a mutant plasmid with high expression efficiency of GC-rich *leuB* gene of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **121**, 1031-1034
2. Ishida, M., Oshima, T. (2002) Effective Structure of a Leader Open Reading Frame for Enhancing the Expression of GC-Rich Genes. *J. Biochem.* **132**, 63-70
3. Ishida, M., Oshima, T. (1996) A leader open reading frame is essential for the expression in *Escherichia coli* of GC-rich *leuB* gene of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 137-142
4. Ishida, M., Yoshida, M., Oshima, T. (1997) Highly efficient production of enzymes of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*: A practical method to overexpress GC-rich genes in *Escherichia coli*. *Extremophiles.* **1**, 157-162
5. Ishida, M., Oshima, T. (1994) Overexpression of genes of an extreme thermophile *Thermus thermophilus*, in *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **176**, 2767-2770
6. Ishida, M., Oshima, T., Yutani, K. (2002) Overexpression in *Escherichia coli* of the AT-rich *trpA* and *trpB* genes from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**, 179-183

株式会社ニッポンジーン

研究試薬部 開発課 学術営業グループ

〒930-0834 富山県富山市問屋町 1-8-7

TEL (076) 451-6548

FAX (076) 451-6547

Email info@nippongene.com

URL <http://nippongene.com/>