

製品コード 3390
3392

研究用

Takara

pHEK293 Ultra Expression Vector I
(製品コード 3390)

pHEK293 Ultra Expression Vector II
(製品コード 3392)

説明書

pHEK293 Ultra Expression Vector は、HEK293 系細胞で組換えタンパク質を一過性に高生産することができるプラスミドベクターです。本製品を使用することで、従来のサイトメガロウイルス由来プロモーターを用いた遺伝子発現と比較して、2～10 倍量の組換えタンパク質の生産が可能となります。

1 ベクタータイプの pHEK293 Ultra Expression Vector I は、HEK293 系細胞にトランスフェクションして、簡便に目的遺伝子を高発現させます。

一方、2 ベクタータイプの pHEK293 Ultra Expression Vector II は、添付の pHEK293 Enhancer Vector と共に HEK293 系細胞にコトランスフェクションして、目的遺伝子を高発現させます。そのため、pHEK293 Ultra Expression Vector II では、目的タンパク質にあわせてトランスフェクションする 2 種類のプラスミド比率を最適化することで、より効率的な目的タンパク質の生産が可能になります。

注：本製品は HEK293 系細胞での高発現用ベクターです。ヒト以外の哺乳類細胞では本製品の効果が十分に発揮できないことがあります。

I. 製品説明

【 pHEK293 Ultra Expression Vector I 】

pHEK293 Ultra Expression Vector I には、サイトメガロウイルス由来プロモーター (CMV IE promoter)、Trans Activation Responsive region (TAR) をコードする配列、マルチクロニングサイト (MCS)、Internal Ribosome Entry Site (IRES)、Trans AcTivator (Tat) 遺伝子、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼのポリ A シグナル (HSV TK polyA) が搭載されています (4 ページ図 4)。MCS に目的遺伝子を挿入し、HEK293 系細胞にトランスフェクションすることで、目的タンパク質を一過性に高発現することができます。

【 pHEK293 Ultra Expression Vector II 】

pHEK293 Ultra Expression Vector II には、サイトメガロウイルス由来プロモーター (CMV IE promoter)、TAR をコードする配列、マルチクロニングサイト (MCS)、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼのポリ A シグナル (HSV TK polyA) が搭載されています (5 ページ図 5)。さらに、Tat 供給用のプラスミドベクターとして、pHEK293 Enhancer Vector が添付されています (5 ページ図 6)。pHEK293 Ultra Expression Vector II の MCS に目的遺伝子を挿入し、HEK293 系細胞に pHEK293 Enhancer Vector とコトランスフェクションすることで、目的タンパク質を一過性に高発現することができます。なお、コトランスフェクションに使用する pHEK293 Ultra Expression Vector II と pHEK293 Enhancer Vector の使用比率は目的タンパク質に応じて最適化することができます。

II. 内容

pHEK293 Ultra Expression Vector I (製品コード 3390)

1. pHEK293 Ultra Expression Vector I 20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

pHEK293 Ultra Expression Vector II (製品コード 3392)

1. pHEK293 Ultra Expression Vector II 20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. pHEK293 Enhancer Vector 20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

III. 保存

－ 20℃

※ 適切に保存し、受け取り後 2 年を目途にご使用ください。

IV. 原理

本製品は、エイズウイルスゲノム由来の RNA 配列である TAR と、転写活性化因子である Tat による高発現システム (TAR-Tat 発現システム) を利用しています (図 1)。HIV-LTR からの転写活性化は、Tat がウイルス RNA の 5' 末端に形成される TAR と呼ばれるループ構造に結合し、RNA polymerase II をリン酸化することで行われます。本製品はこの原理を利用して、目的タンパク質発現用ベクターと Tat 発現用ベクターの 5' 側非翻訳領域に TAR をコードする配列を付加しています。これにより、Tat タンパク質の効率的な発現が可能となり、目的タンパク質の発現量を大幅に向上させることができます (図 2、図 3：特許出願中)。なお、TAR 配列は非翻訳領域に位置していますので、原理上、目的タンパク質のアミノ酸配列への影響はありません。

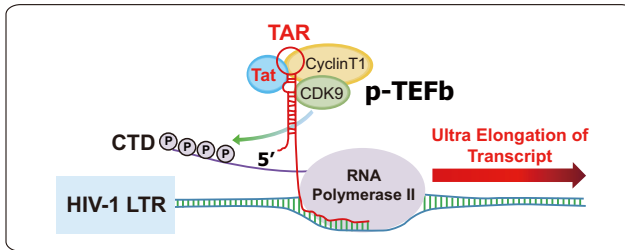


図 1. TAR-Tat 発現システムの原理

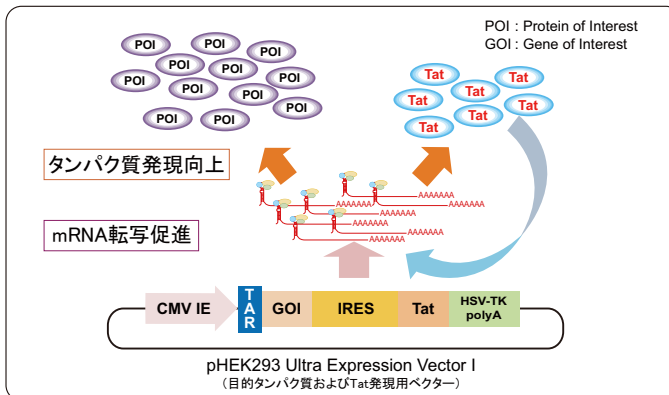


図 2. pHEK293 Ultra Expression Vector I を用いた目的タンパク質の発現

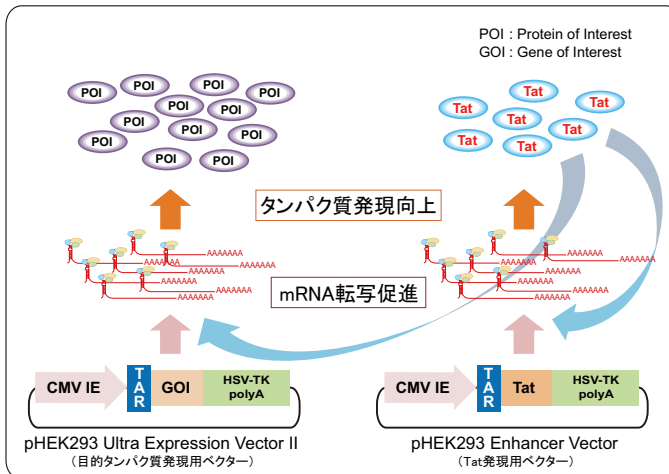


図 3. pHEK293 Ultra Expression Vector II を用いた目的タンパク質の発現

V. プラスミドマップ

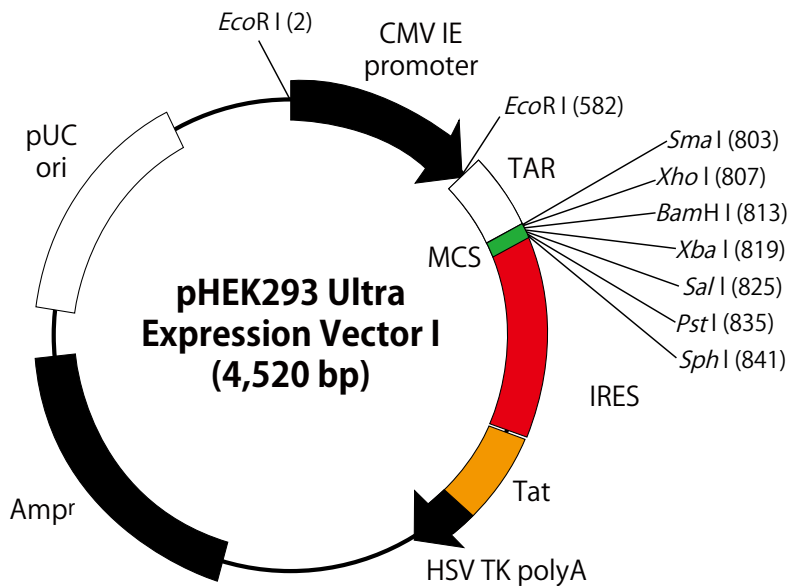
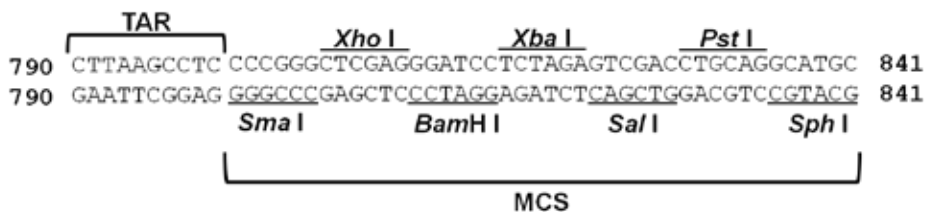


図 4. pHEK293 Ultra Expression Vector I のベクターマップ



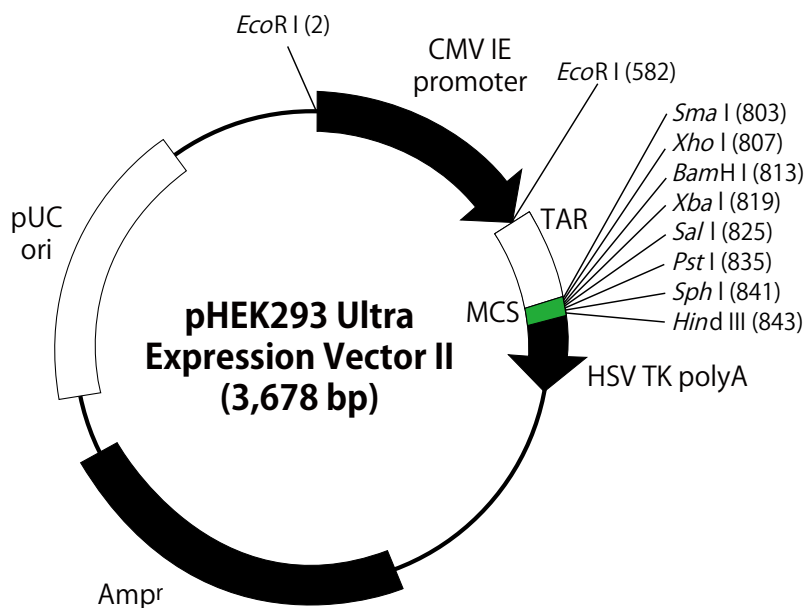


図 5. pHEK293 Ultra Expression Vector II のベクターマップ

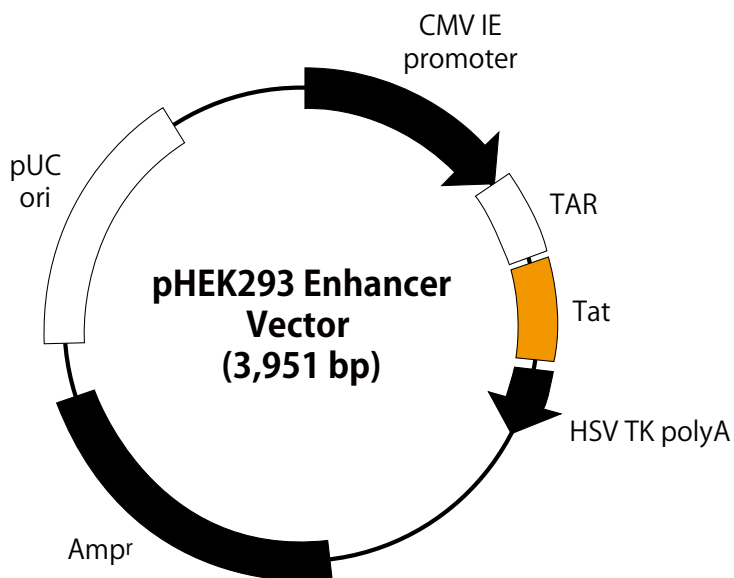
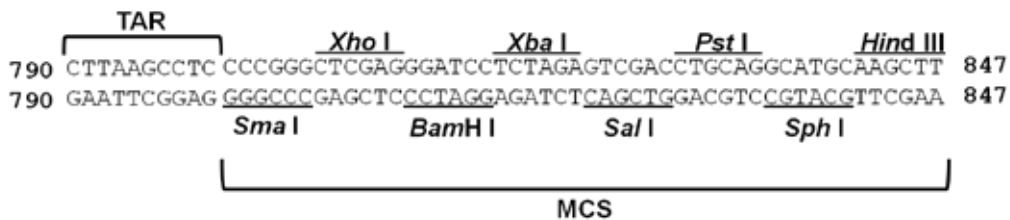


図 6. pHEK293 Enhancer Vector のベクターマップ

VI. 使用方法

培養条件は使用する細胞種や目的タンパク質によって異なるため、目的タンパク質に応じた培養条件の検討が必要です。以下に一般的な使用例を示します。

VI-1. 目的遺伝子の挿入

pHEK293 Ultra Expression Vector I または pHEK293 Ultra Expression Vector II のマルチクローニングサイトに目的遺伝子の ORF を挿入してください。アンピシリン耐性遺伝子が搭載されているため、組換え大腸菌を選択できます。クローニングには In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639648 など) も使用できます。このキットを用いると、PCR 産物をどのような直鎖状ベクターにも容易にクローニングすることができます。また、この際に使用するコンピテントセルには相同性組換えの起こりにくい *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) の使用を推奨します。

得られた組換えクローンより、トランスフェクションに適したグレードのプラスミドを調製してください。プラスミドの調製には、NucleoBond Xtra Midi/Midi Plus (製品コード 740410.10/740412.10 など) の使用を推奨します。

pHEK293 Ultra Expression Vector I および pHEK293 Ultra Expression Vector II の配列情報は、タカラバイオウェブカタログからダウンロードできます。

注：目的遺伝子配列 (cDNA あるいは遺伝子断片) は ATG 開始コドンと終始コドンを含む配列で挿入してください。

VI-2. 細胞へのトランスフェクション

TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700) などの市販のトランスフェクション試薬を用いて、構築したプラスミドを HEK293 系細胞へトランスフェクションします。トランスフェクション方法やプラスミド使用量は、各トランスフェクション試薬のプロトコールに準じて実施してください。

【pHEK293 Ultra Expression Vector II を使用する場合】

pHEK293 Ultra Expression Vector II を使用する場合は、さらに pHEK293 Enhancer Vector をコトランスフェクションする必要があります。これらのベクターの使用比率は、目的タンパク質の生産効率に応じて最適化することができますが、通常は、pHEK293 Ultra Expression Vector II : pHEK293 Enhancer Vector = 5 : 1 (重量比) で使用することをお勧めします。

VII. 実施例

VII-1. 蛍光タンパク質 (AcGFP1) の発現

VII-1-1. 接着性 HEK293T 細胞

あらかじめ 12 ウェル細胞培養用プレートに培養しておいた HEK293T/17 細胞に、TransIT-293 Transfection Reagent を使用して、キットのプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。各実験で使用したプラスミドを表 1 に示した。

VII-1-2. 浮遊性 HEK293 細胞

あらかじめ 125 ml 三角フラスコに培養しておいた浮遊性 HEK293 細胞 (FreeStyle 293-F cells、Thermo Fisher Scientific 社製) に、キットのプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。各実験で使用したプラスミドを表 1 に示した。

表 1

	細胞	AcGFP1 発現ベクター		pHEK293 Enhancer Vector
		プラスミドの種類	プラスミド量 (μg)	プラスミド量 (μg)
1	接着性 HEK293T 細胞	pBApo-CMV/AcGFP1	1	-
2		Vector I/AcGFP1	1	-
3		Vector II/AcGFP1	1	0.008
4		Vector II/AcGFP1	1	0.2
5		A 社 Vector/AcGFP1	1	-
6	浮遊性 HEK293 細胞	pBApo-CMV/AcGFP1	30	-
7		Vector I/AcGFP1	30	-
8		Vector II/AcGFP1	30	0.24
9		Vector II/AcGFP1	30	6
10		A 社 Vector/AcGFP1	30	-

pBApo-CMV : pBApo-CMV DNA (製品コード 3242)

Vector I : pHEK293 Ultra Expression Vector I

Vector II : pHEK293 Ultra Expression Vector II

A 社 Vector : A 社タンパク質高発現ベクター

VII-1-3. トランフェクションから2日後、顕微鏡観察（接着性 HEK293T 細胞のみ）およびフローサイトメーターで蛍光強度の観察を行った。結果を図7および図8に示した。本製品を用いることで一般的な CMV プロモーターを利用した発現ベクター（pBApo-CMV DNA）と比較して5～11倍、A社製高発現ベクターと比較して2～7倍の蛍光強度の増加が認められた。

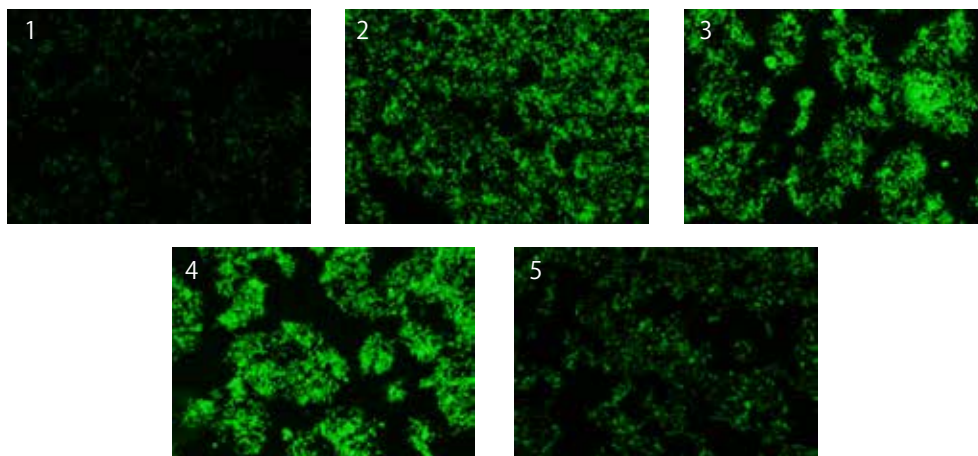


図7. 蛍光顕微鏡画像

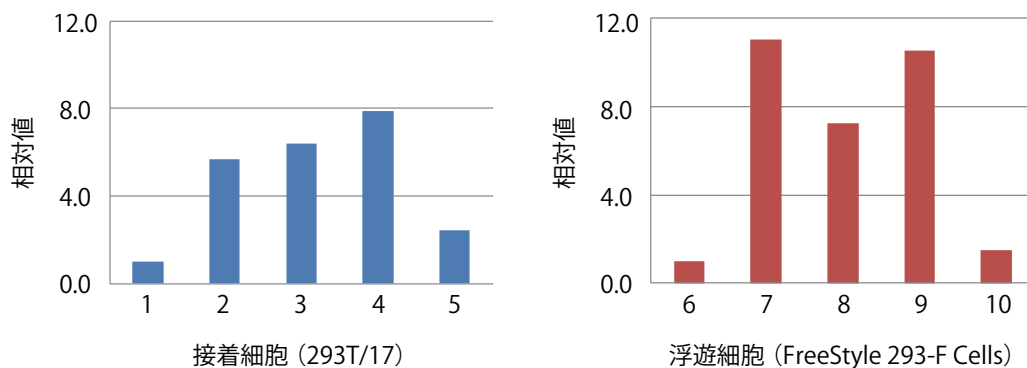


図8. AcGFP 陽性細胞の蛍光強度

[接着性 HEK293T 細胞]

1. pBApo-CMV/AcGFP1 (1 μ g)
2. Vector I/AcGFP1 (1 μ g)
3. Vector II/AcGFP1 (1 μ g) + Enhancer Vector (0.008 μ g)
4. Vector II/AcGFP1 (1 μ g) + Enhancer Vector (0.2 μ g)
5. A社 Vector/AcGFP1 (1 μ g)

[浮遊性 HEK293 細胞]

6. pBApo-CMV/AcGFP1 (30 μ g)
7. Vector I/AcGFP1 (30 μ g)
8. Vector II/AcGFP1 (30 μ g) + Enhancer Vector (0.24 μ g)
9. Vector II/AcGFP1 (30 μ g) + Enhancer Vector (6 μ g)
10. A社 Vector/AcGFP1 (30 μ g)

VII-2. 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の発現

VII-2-1. 接着性 HEK293T 細胞

あらかじめ 12 ウェル細胞培養用プレートに培養しておいた HEK293T/17 細胞に、TransIT-293 Transfection Reagent を使用して、キットのプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。各実験で使用したプラスミドを表 2 に示した。

VII-2-2. 浮遊性 HEK293 細胞

あらかじめ 125 ml 三角フラスコに培養しておいた浮遊性 HEK293 細胞 (FreeStyle 293-F cells、Thermo Fisher Scientific 社製) に、キットのプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。各実験で使用したプラスミドを表 2 に示した。

表 2

	細胞	G-CSF 発現ベクター		pHEK293 Enhancer Vector
		プラスミドの種類	プラスミド量 (μg)	プラスミド量 (μg)
1	接着性 HEK293T 細胞	pBApo-CMV/G-CSF	1	-
2		Vector I/G-CSF	1	-
3		Vector II/G-CSF	1	0.008
4		Vector II/G-CSF	1	0.2
5		Negative Control	-	-
6	浮遊性 HEK293 細胞	pBApo-CMV/G-CSF	30	-
7		Vector I/G-CSF	30	-
8		Vector II/G-CSF	30	0.24
9		Vector II/G-CSF	30	6
10		Negative Control	-	-

VII-2-3. トランスフェクションから 2、5、7 日後に培養上清を回収し、Human G-CSF Assay Kit (IBL 社 Code. 27131) を用いて G-CSF 定量を行った。結果を図 9 に示した。本製品を使用することで、一般的な CMV プロモーターを利用した発現ベクター (pBApo-CMV DNA) と比較して、3 ~ 5 倍の G-CSF 発現量の向上が認められた。

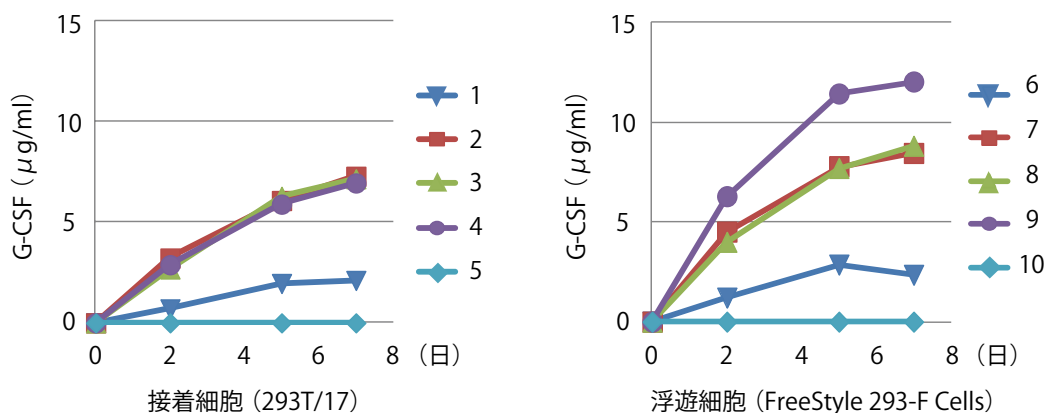


図 9. G-CSF の定量

VII-3. マウス抗ヒト IgG 抗体の生成

VII-3-1. 接着性 HEK293T 細胞

あらかじめ 12 ウェル細胞培養用プレートに培養しておいた HEK293T/17 細胞に、TransIT-293 Transfection Reagent を使用して、キットのプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。各実験で使用したプラスミドを表 3 に示した。

VII-3-2. 浮遊性 HEK293 細胞

あらかじめ 125 ml 三角フラスコに培養しておいた浮遊性 HEK293 細胞 (FreeStyle 293-F cells、Thermo Fisher Scientific 社製) に、キットのプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。各実験で使用したプラスミドを表 3 に示した。

表 3

	細胞	重鎖発現ベクター		軽鎖発現ベクター		pHEK293 Enhancer Vector
		プラスミドの種類	プラスミド量 (μg)	プラスミドの種類	プラスミド量 (μg)	プラスミド量 (μg)
1	接着性 HEK293T 細胞	pBApo-CMV/HC	0.5	pBApo-CMV/LC	0.5	-
2		Vector II/HC	0.5	Vector II/LC	0.5	0.008
3		Vector II/HC	0.5	Vector II/LC	0.5	0.2
4		Negative Control	-	Negative Control	-	-
5	浮遊性 HEK293 細胞	pBApo-CMV/HC	15	pBApo-CMV/LC	15	-
6		Vector II/HC	15	Vector II/LC	15	0.24
7		Vector II/HC	15	Vector II/LC	15	6
8		Negative Control	-	Negative Control	-	-

HC : Heavy Chain、LC : Light Chain

VII-3-3. トランスフェクションから 2、5、7、9 日後に培養上清を回収し、Mouse IgG EIA Kit による Mouse IgG の定量を行った。結果を図 10 に示した。

本製品を使用することで一般的な CMV プロモーターを利用した発現ベクター (pBApo-CMV DNA) と比較して、5~7 倍の Mouse IgG 発現量の向上が認められた。

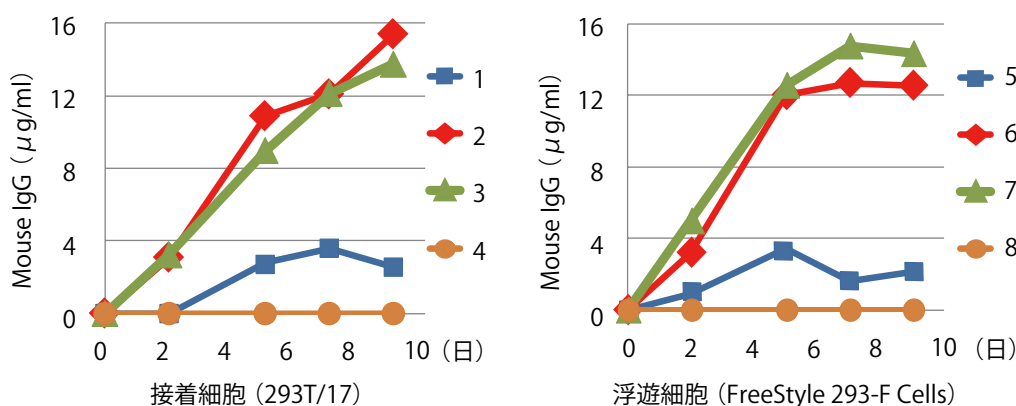


図 10. Mouse IgG の定量

VIII. 関連製品

In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 ~ 639650)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700/MIR2704/MIR2705/MIR2706)
pBApo Vector シリーズ (製品コード 3240~3244)
NucleoBond Xtra Midi/Midi Plus (製品コード 740410.10/.50/.100/740412.10/.50)

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- 本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- 本製品、その構成部分またはその誘導体、ならびにこれらで製造されたものを第三者に譲渡（無料配布、販売）することはできません。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社