

高効率の可溶性タンパク質発現に最適!!

コールドショック発現ベクター 近日発売

pCold I DNA	Code 3361	25 µg
pCold II DNA	Code 3362	25 µg
pCold III DNA	Code 3363	25 µg
pCold IV DNA	Code 3364	25 µg

大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* のプロモーターを用いた新しいタンパク質発現ベクターです。

- 目的タンパク質の発現は最大で菌体タンパク質の60%。
- 従来の発現系では発現しないタンパク質の発現が可能。
- 従来の発現系では不溶化するタンパク質の可溶性発現が可能。
- 目的タンパク質が最大で新生タンパク質の90%に達し、同位体標識にも有用。
- 幅広い宿主大腸菌で使用可能。

タンパク質の構造や機能の解明はポストゲノムの重要な研究対象で、効率のよいタンパク質生産システムはそれらの研究に必須の基盤技術です。組換えタンパク質の生産には、大腸菌を宿主とする発現系が広く利用されています。大腸菌発現系は扱いやすく、低コストであるという利点がありますが、遺伝子によっては発現が困難であったり、発現タンパク質が不溶化する場合などがあります。

この問題の解決を図るために、弊社は米国ニュージャージー医科歯科大学の井上正順教授と共同研究を行い、大腸菌の低温発現遺伝子(コールドショック遺伝子)を利用した高効率のタンパク質発現ベクターを開発しました。本製品は上記の特長をもち、機能解析や構造解析をはじめとするタンパク質研究の重要なツールとなります。

本製品の概要と特長

大腸菌の培養温度を低温にシフトさせると、生育は一時的に停止し、大部分の大腸菌タンパク質の発現は減少しますが、コールドショックタンパク質と呼ばれる一連のタンパク質は特異的に発現誘導されます。本製品は、コールドショック遺

伝子の一つである *cspA* 遺伝子プロモーターを利用しており、この *cspA* プロモーターの下流に、*lac* operator、5 非翻訳領域(*cspA* 5' UTR) translation enhancing element(TEE) His・Tag 配列、Factor Xa 切断配列、マルチクローニングサイトが配置されています。*lac* operator は発現を厳密に制御する働きを有し、TEE 配列は翻訳を促進する作用があります。His・Tag 配列、Factor Xa 切断配列はタンパク質の精製と精製後のTagの除去に有用です。本製品にはTEE 配列、His・Tag 配列、Factor Xa 切断配列の有無によって配列が異なるpCold I ~ IV の4種類があり、目的に合わせて最適なベクターを選択できます。また、本製品は、大腸菌に由来する *cspA* プロモーターを用いているので、ほとんどすべての大腸菌株を発現宿主として利用することができます。

目的遺伝子の発現方法

目的遺伝子をコールドショックベクターに挿入して発現用プラスミドを作製

発現用プラスミドで宿主大腸菌(BL21 など)を形質転換

アンピシリンを含む培地に形質転換体を植菌し、37 °C で培養

OD₆₀₀ = 0.4 ~ 0.5 付近で、培養液を15 °C に冷却し、30 分間放置

培養液にIPTGを加え、15 °C でさらに24時間振とう培養

集菌、破碎

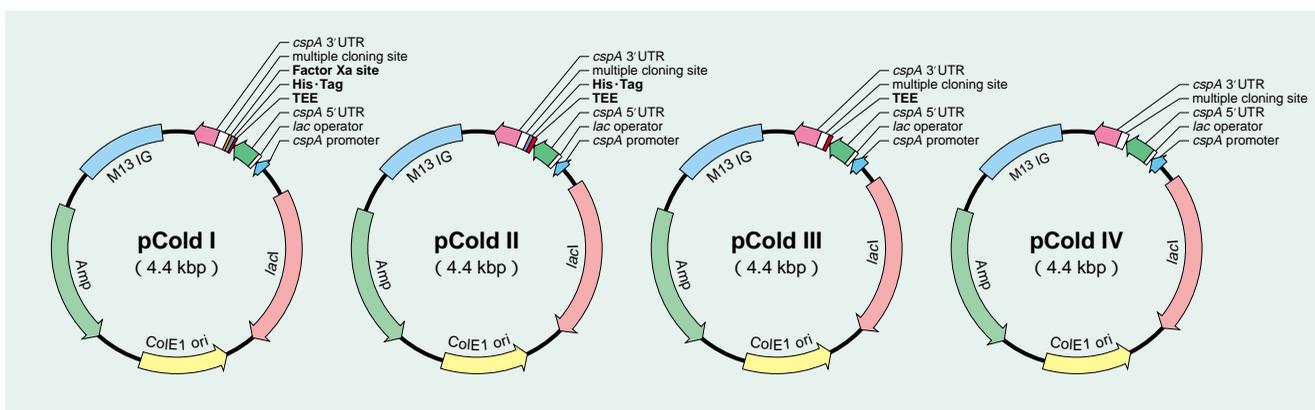


図1 コールドショックベクターの概略図

SDS-PAGE により、可溶性および不溶性画分における目的産物の有無および発現量を確認

実施例

T7 プロモーターによる発現系では発現量や可溶性度に問題があった遺伝子について、コールドショックベクターで発現を試みた例を以下に示します。なお、コールドショック発現ベクターは pCold I DNA を用い、発現用宿主は BL21 を使用しました。T7 プロモーターによる発現は、常法通り IPTG を添加後 37℃ で培養して行いました。

(1) 発現が可能となった遺伝子の例

ヒト遺伝子 A (推定分子量 31 kDa) は T7 発現系では発現が認められませんでした。コールドショック発現系では発現が確認されました (図 2)。

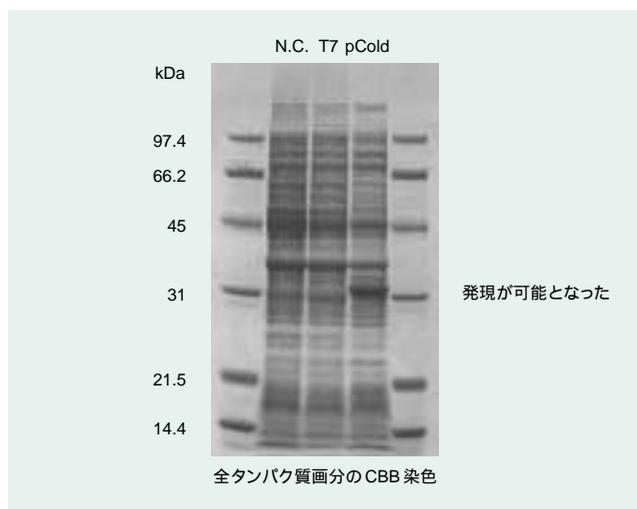


図 2 ヒト遺伝子 A の発現

(2) 発現量が増大した遺伝子の例

好熱菌遺伝子 B (推定分子量 30 kDa) では、T7 発現系と比較して可溶性度が向上すると同時に発現量も増大しました (図 3)。

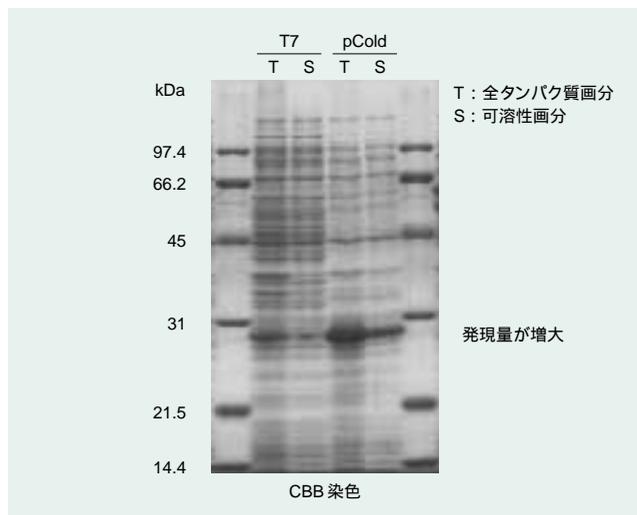


図 3 好熱菌遺伝子 B の発現

(3) 可溶性発現量が増大した遺伝子の例

ヒト遺伝子 C (推定分子量 80 kDa) は、T7 発現系では大部分が不溶性発現となります。一方、コールドショック発現系では可溶性画分の発現量が顕著に増加しました (図 4)。コールドショック発現系は、T7 発現系と比較して目的産物の発現量や可溶性度が向上することが期待されます。

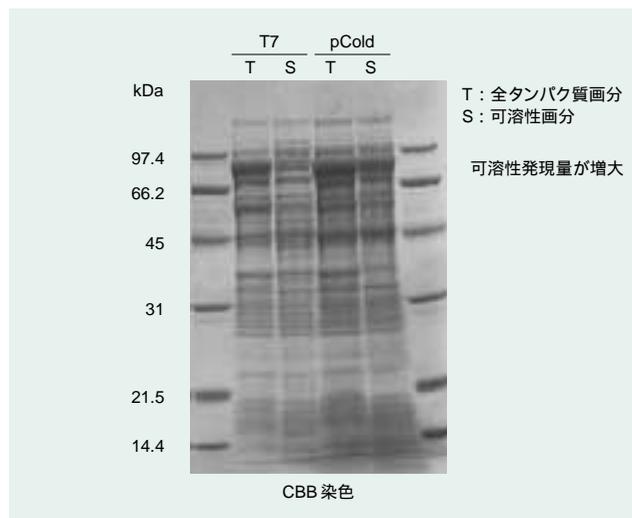


図 4 ヒト遺伝子 C の発現

(4) パルスラベル実験による比較試験

ヒト遺伝子 D (推定分子量 12 kDa) をパルスラベルにより標識し、両発現系を比較しました (図 5)。T7 発現系では目的タンパク質以外の大腸菌タンパク質も標識されますが、コールドショック発現系では標識タンパク質の大部分は目的遺伝子の発現産物であり、目的遺伝子が特異的に発現誘導されることがわかります。

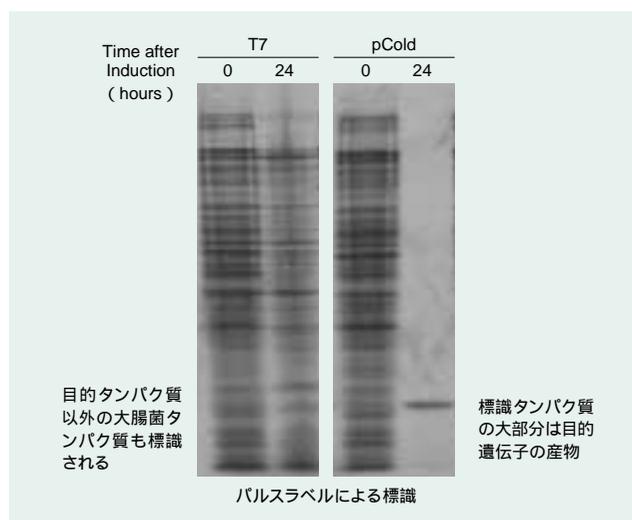


図 5 ヒト遺伝子 D のパルスラベル

コールドショック発現系は、同位体標識タンパク質の調製や、組換えタンパク質の発現システムとして大変有用です。本法を用いたタンパク質発現受託サービスも承ります。弊社カスタムサービスセンターまでお問い合わせください。