

製品コード 9120 ~ 9125

研究用

Takara

Chaperone Competent Cells BL21 シリーズ

説明書

Chaperone Competent Cells BL21 は、Chaperone Plasmid Set (製品コード 3340) に含まれる 5 種類のシャペロンプラスミドでそれぞれ形質転換した大腸菌 BL21 株のコンピテントセルです。

大腸菌を用いたタンパク質発現は、最も簡単で発現系も豊富なため、組換えタンパク質発現のためによく用いられています。しかしながら、大腸菌で異種タンパク質を発現させた場合、発現タンパク質がインクルージョンボディを形成したり、プロテアーゼによる分解を受けたりするケースがしばしば見られます。これは発現タンパク質が正しく折りたたまれていないことが原因であることが多く、組換えタンパク質を対象とした研究の大きな障害でした。本製品に保持されている 5 種類のプラスミド (pG-KJE8、pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16) はタンパク質の折りたたみに共同して働くことが知られている複数の分子シャペロンがそれぞれ一つのプラスミド上にコードされ、シャペロンチームとして効率よく発現するように設計されています。これらのシャペロンチームのいずれかと目的タンパク質を共発現させることにより、発現タンパク質の可溶化を促進することができます。

大腸菌 BL21 株は、*lon* プロテアーゼ、*ompT* 外膜プロテアーゼを欠損した B 株由来の菌株です。発現タンパク質の安定性の向上が期待できるため、組換えタンパク質の発現に広く用いられています。

通常、シャペロンプラスミドを用いて目的タンパク質とシャペロンチームとの共発現を行うには、まずシャペロンプラスミドで宿主大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体を用いてコンピテントセルを作製し、更に目的タンパク質を発現するプラスミドを用いて形質転換を行う必要があります。

本製品は、あらかじめシャペロンプラスミドで形質転換した BL21 株から調製したコンピテントセルであり、一回の形質転換で簡単に目的タンパク質とシャペロンチームとの共発現大腸菌を得ることができます。シャペロンプラスミドを保持する 5 種類のコンピテントセルの他、コントロール用として、シャペロンプラスミドを含まない BL21 株のコンピテントセルも用意しています。

本製品は、特に、コールドショック発現ベクター pCold™ DNA シリーズ (製品コード 3360 ~ 3364) との組合せで高い効果が期待できます。

なお、本製品の宿主に用いている BL21 株は T7 RNA Polymerase を発現していないため、pET システムなどの T7 プロモーターを利用した発現系には使用できません。

注 1：本製品は研究目的にのみ使用が許可されています。スクリーニングや生産など商用目的での使用にあたっては、別途、弊社との間で商業利用契約の締結が必要となります。また本製品を許可無く改変したり、プラスミド調製のために使用することは禁じられています。

注 2：本製品はエレクトロポレーションには使用できません。

I. 製品の内容

● Chaperone Competent Cells BL21 Set (製品コード 9120)

1. Chaperone Competent Cells pG-KJE8/BL21	100 μ l \times 3
2. Chaperone Competent Cells pGro7/BL21	100 μ l \times 3
3. Chaperone Competent Cells pKJE7/BL21	100 μ l \times 3
4. Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21	100 μ l \times 3
5. Chaperone Competent Cells pTf16/BL21	100 μ l \times 3
6. TaKaRa Competent Cells BL21	100 μ l \times 3
7. pUC19 DNA (0.1 ng/ μ l)	10 μ l
8. SOC Medium *	1 ml \times 18

● Chaperone Competent Cells pG-KJE8/BL21 (製品コード 9121)

● Chaperone Competent Cells pGro7/BL21 (製品コード 9122)

● Chaperone Competent Cells pKJE7/BL21 (製品コード 9123)

● Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21 (製品コード 9124)

● Chaperone Competent Cells pTf16/BL21 (製品コード 9125)

● TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)

製品コード 9121 ~ 9126 の内容

1. コンピテントセル	100 μ l \times 10
2. pUC19 DNA (0.1 ng/ μ l)	10 μ l
3. SOC Medium *	1 ml \times 10

* SOC Medium の組成：

2%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgSO ₄
10 mM	MgCl ₂
20 mM	Glucose

表 1. 各プラスミドにコードされるシャペロンチームと誘導物質 (マップは 7 ページ参照)

No.	Plasmid	Chaperone	Promoter	Resistant Marker	Inducer (最終濃度)
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	Cm	L-Arabinose (0.5 ~ 4 mg/ml) Tetracyclin (1 ~ 10 ng/ml)
2	pGro7	groES-groEL	<i>araB</i>	Cm	L-Arabinose (0.5 ~ 4 mg/ml)
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	<i>araB</i>	Cm	L-Arabinose (0.5 ~ 4 mg/ml)
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	<i>Pzt-1</i>	Cm	Tetracyclin (1 ~ 10 ng/ml)
5	pTf16	tig	<i>araB</i>	Cm	L-Arabinose (0.5 ~ 4 mg/ml)

<利用できる発現プラスミド>

シャペロンプラスミドは pACYC の複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm^r 遺伝子) を利用しているため、最もよく利用されている ColE1 タイプのアンピシリン耐性遺伝子をマーカーとした発現用プラスミドが使用できます。各シャペロン遺伝子は *araB* あるいは *Pzt-1* (tet) プロモーター下流に配置されており、目的遺伝子を *lac* など、他のプロモーターのコントロール下におけば、目的タンパク質とシャペロンを別々に誘導することが可能です。各プロモーターに必要なコンポーネント (*araC* あるいは *tetR*) はプラスミド上に配置されています。ただし、クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む発現プラスミドと組合せては利用できません。本製品は、特にコールドショック発現ベクター pCold DNA シリーズ (製品コード 3360 ~ 3364) との組合せで高い効果が得られます。

また、本製品の宿主に用いている BL21 は T7 RNA Polymerase を発現していないため、pET システムなどの T7 プロモーターを利用した発現系には使用できません。

II. 保存 - 80℃

【注意】 保存は - 80℃ 以下で行ってください。温度管理が不十分な場合、形質転換効率が低下することがあります。そのような事態が予想される場合は、付属の pUC19 を用いて形質転換効率を確認の上、使用してください。液体窒素では保存しないでください。

III. 使用方法

- (1) コンピテントセルを使用直前に、氷中で融解する。
- (2) 融解したら、穏やかに混和して均一にし、100 μ l のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) に移す (ボルテックスは用いない)。
- (3) 目的タンパク質発現用プラスミドを加える (10 ng 以下が望ましい)。
- (4) 氷中、30 分間放置する。
- (5) 42°C で 45 秒間インキュベートする。
- (6) 氷中 1 ~ 2 分間放置する。
- (7) あらかじめ 37°C に保温しておいた SOC Medium を最終 1 ml になるように加える。
- (8) 37°C で 1 時間振とうする (160 ~ 225 rpm)。
- (9) 薬剤を含む L-broth プレート*¹ に適当量*² まく。
- (10) 37°C で一晩放置する。

* 1 : Chaperone Competent Cells の場合は、クロラムフェニコール 20 μ g/ml、および発現プラスミド選択用の薬剤 (アンピシリン 50 ~ 100 μ g/ml など) を含む L-broth プレートをご使用ください。TaKaRa Competent Cells BL21 の場合は、発現プラスミド選択用の薬剤のみを含む L-broth プレートをご使用ください。

* 2 : プレートにまく液量は、直径 9 cm のプレートの場合 100 μ l 以下にしてください。

【使用上の注意】

1. 必要本数だけを取り出し、運搬時はドライアイス/エタノールに入れてください。
2. 14 ml 丸底チューブ (BD 社 Code. 352059 または 352057) の他、1.5 ml マイクロチューブを用いても形質転換は可能ですが、効率が若干悪くなることがあります。
3. 100 μ l のコンピテントセルを用いる場合、形質転換に用いる DNA の量を、高純度なもので 10 ng 以下にしないと、効率は悪くなります。
4. スケール (コンピテントセルの量など) を変えたり、他のチューブを使用する場合には、最適の条件を検討する必要があります。(例えば、1.5 ml マイクロチューブを用いるときは、42°C で 60 秒間インキュベートしてください)。
5. 回復培養は、SOC Medium の他、L-broth や ψ b-broth でも構いませんが、若干効率が悪くなることがあります。
6. プレートにまく際に希釈が必要なときは、III. 使用方法 -(7) で加えた培地で希釈してください。
7. L-broth プレート : 10 g Bacto tryptone、5 g Bacto yeast extract、5 g NaCl/1 L water を 1 N NaOH で pH7.5 前後に調整し、1.5% になるよう agar を添加し、オートクレーブする。
8. 一度融解したコンピテントセルを再度凍結保存することはお勧めしません。やむを得ず必要な場合、ドライアイス/エタノール中で凍結させ、- 80°C で保存してください。ただし、形質転換効率は 1 オーダー以上低下する可能性があります。
9. 本製品の保持するプラスミドは pACYC 由来の複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm^r 遺伝子) を利用しています。汎用されている ColEI タイプのアンピシリン耐性遺伝子をマーカーとした大腸菌発現系には共存させて使用できませんが、Cm^r 遺伝子を含むプラスミドは使用できません。

IV. 共発現実験

使用する培地には、目的タンパク質発現用プラスミド選択用の薬剤、シャペロンプラスミド選択用クロラムフェニコール (20 $\mu\text{g/ml}$) およびシャペロンプラスミドの種類に応じたシャペロン誘導物質を添加してください (表 1 参照)。生育阻害が著しい場合はシャペロン誘導物質を培養開始時から添加することは避け、タンパク質発現誘導時にシャペロン誘導物質も同時に添加してください。

有効なシャペロンの種類や培養条件 (培地、培養温度、エアレーション条件、誘導のタイミング、誘導剤の濃度、誘導時間など) は目的タンパク質により異なります。目的タンパク質に応じて至適条件を検討することをお勧めします。

以下にコールドショックベクター pCold I DNA (製品コード 3361) に目的遺伝子を挿入したプラスミド (アンピシリン耐性) とシャペロンプラスミドの共発現実験例を示します。

1. プラスミド選択用に 20 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコールと 50 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、およびシャペロン発現誘導用に 0.5 ~ 4 mg/ml L-アラビノースおよび (あるいは) 1 ~ 10 ng/ml テトラサイクリン*を含む L 培地を準備する。pG-KJE8 の場合は L-アラビノースとテトラサイクリンの両方、pGro7、pKJE7、pTf16 の場合は L-アラビノースのみ、pG-Tf2 の場合はテトラサイクリンのみを用いる。

* : まずは 0.5 mg/ml L-アラビノース、5 ng/ml テトラサイクリンでお試ください。
低濃度のテトラサイクリンは、大腸菌の生育に大きな影響は与えません。

2. pCold I DNA と Chaperone Plasmid を保持する形質転換体を培地に接種し、37°C で振とう培養する。
3. 培養液の OD₆₀₀ が 0.4 ~ 0.6 になった時点で、15°C で 30 分間放置する。
4. 終濃度 0.1 ~ 1.0 mM となるように IPTG を添加し、15°C で 24 時間振とう培養する。
5. 培養終了後、SDS-PAGE や活性測定などにより、目的産物の発現量や可溶性を確認する。

V. 形質転換効率

Chaperone Competent Cells は、それぞれ 1 ng の pUC19 DNA を用いて形質転換し、Cm⁺、Amp⁺ のプレートでコロニーを選別しました。

TaKaRa Competent Cells BL21 は、1 ng の pUC19 DNA を用いて形質転換し、Amp⁺ のプレートでコロニーを選別しました。

このとき、 $> 10^6$ transformants/1 μg pUC19 DNA の効率を得ました。

VI. Genotype

E. coli BL21 : F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻), *gal*, *dcm*

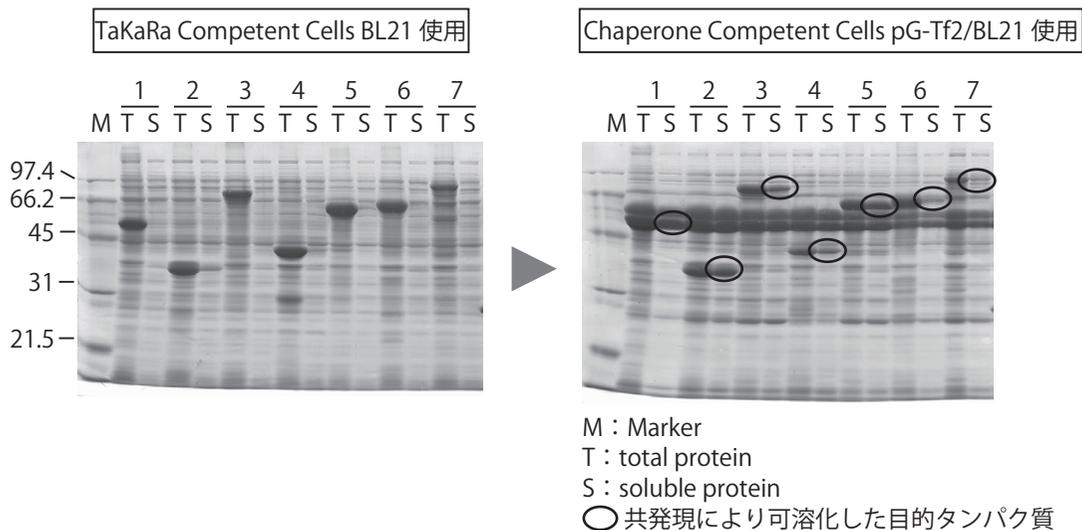
VII. 実験例

コールドショック発現ベクター pCold I DNA 単独では発現に問題があった 7 種類のヒト遺伝子について、Chaperone Competent Cells での発現を試みた。

pCold I DNA 単独発現の形質転換には TaKaRa Competent Cells BL21 を、シャペロンプラスミドとの共発現には Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21 を使用した。

[IV. 共発現実験] の方法に従って培養、発現誘導を行った。

その結果、pCold I DNA 単独では不溶化していた目的タンパク質が、シャペロンプラスミドとの共発現では大幅に可溶化発現していることが確認できた。



VIII. Q & A

Q1. 発現するシャペロンタンパク質のサイズは？

A1. GroEL (約 60 kDa)、GroES (約 10 kDa)、DnaK (約 70 kDa)、DnaJ (約 40 kDa)、Tf (約 56 kDa)、GrpE (約 22 kDa) です。ただし、これらの数字は文献上の数値で実際の泳動では違って見えることがあります。GrpE は電気泳動では 29 kDa のマーカーより上にバンドが確認されます。

Q2. 発現タンパク質を精製したいが？

A2. 発現タンパク質の精製には、His タグなどを利用したアフィニティー精製が便利です (pCold I DNA、pCold II DNA では His タグを利用しています)。GST タグを利用して精製した場合に、稀に精製後の SDS-PAGE でシャペロンタンパク質のバンドが見られることがあります。これは、シャペロンタンパク質が目的タンパク質を介して、あるいは非特異的な吸着でグルタチオン樹脂に残ってきたものであると考えられています。

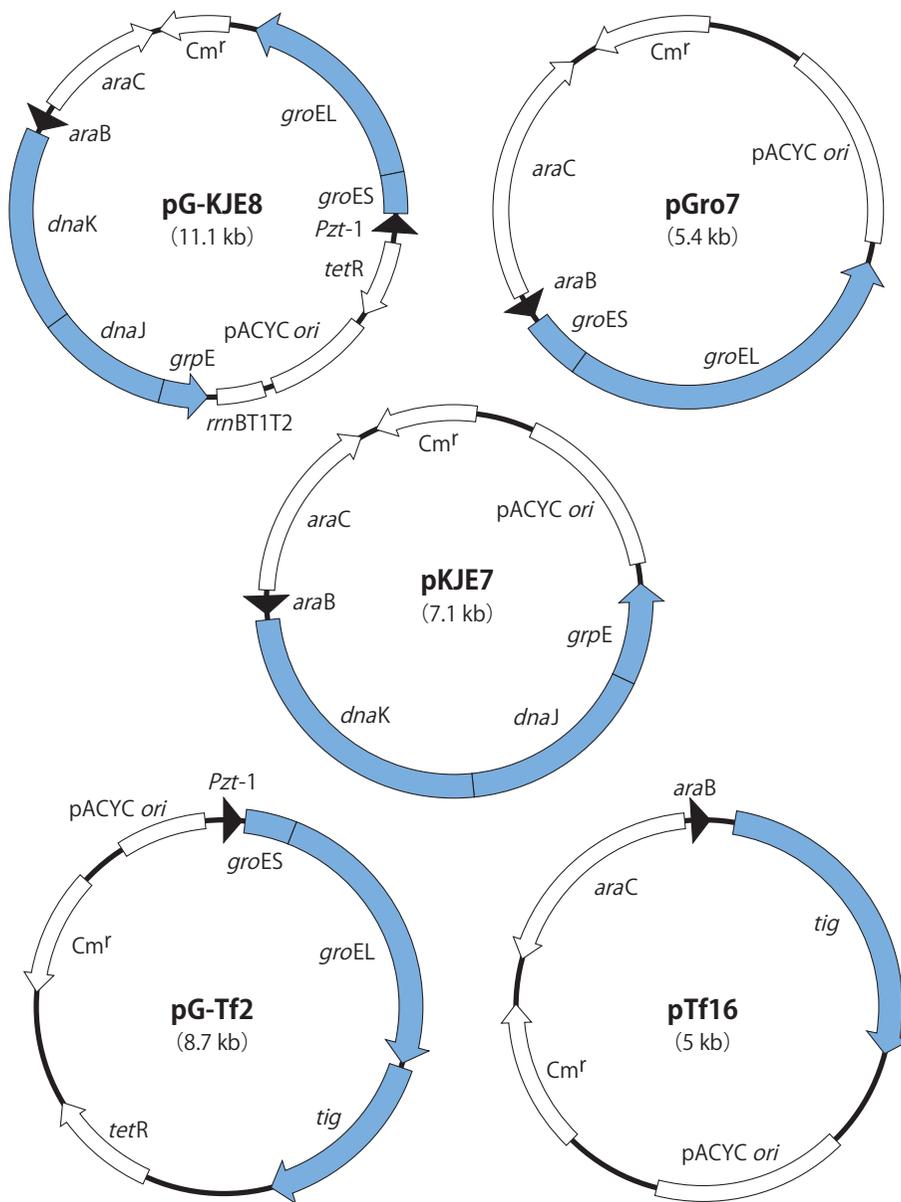
このような場合、下記のような方法で改善できたという報告があります。

- ・イオン交換樹脂で分離する。[*Proc Natl Acad Sci USA*. (1995) **92**, 1048]
- ・ATP-Agarose 担体で分離する。[*J Biol Chem*. (1984) **259**, 8820]
- ・融合タンパク質を吸着させた樹脂を 3 mM Mg-ATP を含むバッファーで洗浄する。
- ・融合タンパク質を吸着させた樹脂を 10 mM Mg-ATP、5 mg/ml casein を含むバッファー中、室温で数十分間保温する。

His タグを用いた場合には上記のような現象は起こっておりません。

発現タンパク質の精製には His タグを用いた精製をお勧めします。

IX. シャペロンプラスミド概略図



X. 参考文献

- 1) Thomas, J. G., *et al. Appl Biochem Biotech.* (1997) **66**, 197-238.
- 2) 柳、西原 バイオサイエンスとインダストリー (1999) **57**, 38-39.
- 3) 西原 化学と生物 (1999) **37**, 151-153.
- 4) Nishihara, K., *et al. Appl Environ Microbiol.* (1998) **64**, 1694-1699.
- 5) Nishihara, K., *et al. Appl Environ Microbiol.* (2000) **66**, 884-889.

XI. 関連製品

Chaperone Plasmid Set (製品コード 3340)
pCold™ Vector Set (製品コード 3360)
pCold™ I DNA (製品コード 3361)
pCold™ II DNA (製品コード 3362)
pCold™ III DNA (製品コード 3363)
pCold™ IV DNA (製品コード 3364)
pCold™ TF DNA (製品コード 3365)
pCold™ ProS2 DNA (製品コード 3371)
pCold™ GST DNA (製品コード 3372)
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (製品コード 9030)

XII. 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。
- ・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。
- ・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。
- ・pColdはタカラバイオ株式会社の商標です。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。

本製品のうち、Chaperone Plasmid pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pTf16を保持する大腸菌には *Salmonella typhimurium* 由来の *araB* プロモーターおよび *araC* 遺伝子が含まれます (製品コード 9120/9121/9122/9123/9125)。これらは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の遺伝子組換え生物等に該当します。ご使用の際は、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」(平成16年文科省・環境省令第1号) および組織内の安全委員会の指示に従って行ってください。

本製品は研究目的にのみ使用が許可されています。スクリーニングや生産など商用目的での使用にあたっては、別途、弊社との間で商業利用契約の締結が必要となります。また本製品を許可無く改変したり、プラスミド調製のために使用することは禁じられています。

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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社