タンパク質可溶性発現の切り札

コールドショック発現のススメ

製品ガイド

（2016年9月改訂版）

タンパク質が発現しない!?　**可溶化しない??**

とお困りの方、必見です！

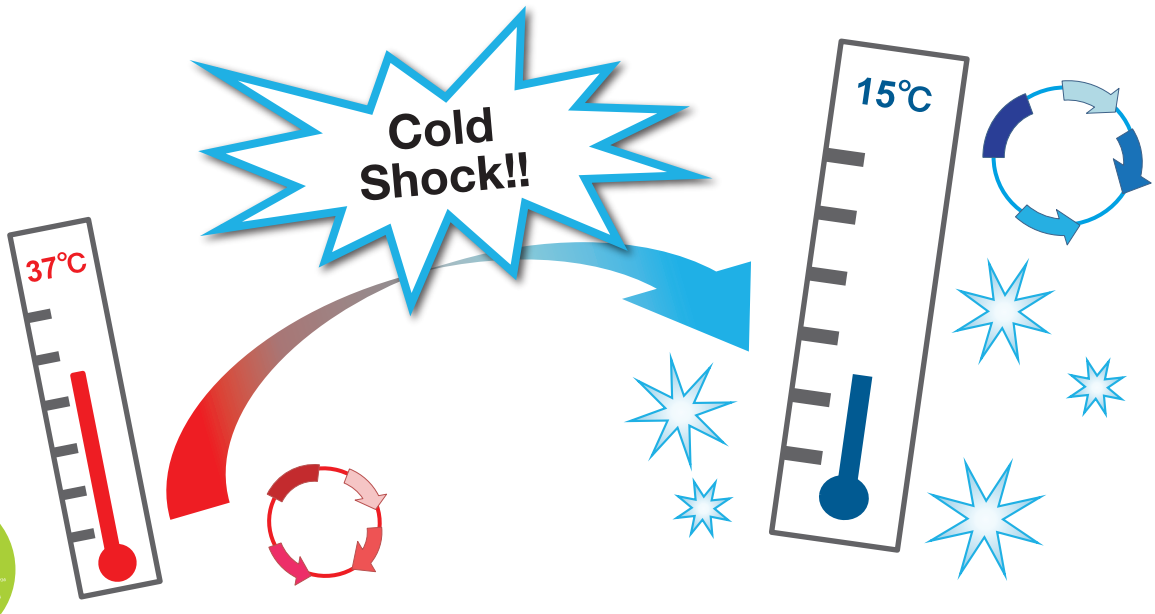
大腸菌コールドショック発現系のメリットは？

★培養液を15℃に冷却するだけの簡便な発現誘導システム

★従来の大腸菌発現系では不溶化するタンパク質も可溶性発現が可能

★特別な大腸菌ホストは必要なし

★可溶化タグやHisタグの有無など目的に合わせてベクター選択が可能



that's GOOD science!

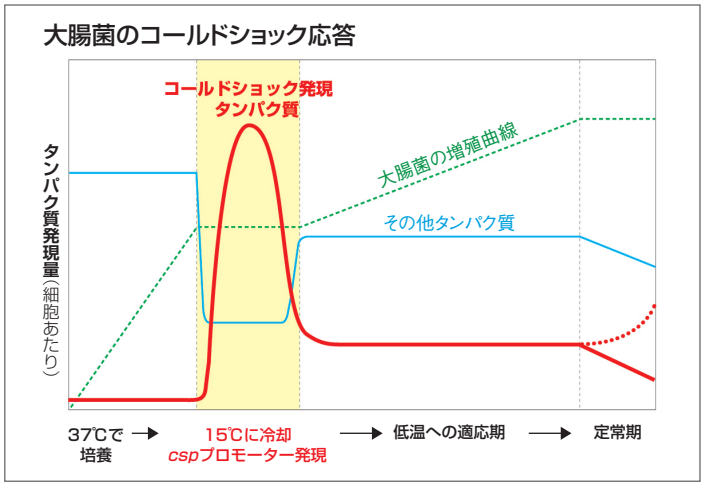
ユーザー様実施例やユーザーズボイスも多数掲載（P4～6参照）

Clontech TaKaRa cellartis

コールドショック発現系

大腸菌コールドショック発現系とは・・・

37℃で培養している大腸菌の培養温度を低温にシフトさせると、生育は一時停止し、大部分の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タンパク質(CSPs)は特異的に増加します。このメカニズムに注目し、タカラバイオと米国ニュージャージー医科歯科大学井上正順教授によって共同で開発されたのがコールドショック発現ベクター pCold シリーズです。従来の大腸菌発現系と比較して目的のタンパク質を効率的かつ高純度で得ることができます。



コールドショック発現の標準プロトコール

pCold ベクターのマルチクローニングサイトに目的遺伝子を挿入して発現用プラスミドを作製する。
↓
発現用プラスミドで宿主大腸菌を形質転換し、アンピシリンを含む選択培地プレート上で形質転換体を選択する。
↓
50～100 μg/ml アンピシリンを含む LB 培地に形質転換体を植菌し、37℃で振とう培養する。
↓
培養液の OD_{600} が 0.4～0.5 となった時点で培養液をすみやかに 15℃に冷却し、30 分間放置する。
↓
終濃度 0.1～1.0 mM となるように IPTG を添加し、15℃で 24 時間振とう培養する。
↓
集菌

※最適な培養・誘導条件(培地、培養温度、通気攪拌条件、誘導のタイミング、誘導物質の濃度、誘導後の培養時間)は目的タンパク質によって異なりますので、必要に応じて条件検討を行ってください。

コールドショック発現の3つの利点

◆ バックグラウンドが少なく、効率の良い発現が可能

低温培養では夾雑プロテアーゼの活性が低く、また、大腸菌由来のタンパク質発現が低下するため、目的タンパク質が分解されにくく完全な形で得られ、高い収率が期待できます。最大で新生タンパク質の90%に達します。
これにより目的タンパク質の精製が容易になり、また、同位体標識を利用すると効率的なラベリングが可能です(図1)。

◆ 可溶性発現が向上

可溶性発現により、目的タンパク質は緩やかに立体構造を形成します。従来のT7発現系で発現しない、または不溶性発現となる場合であっても、コールドショック発現系では目的タンパク質の発現や可溶化が改善される場合が数多く見られます(図2、3)。
シャペロンプラスミドやシャペロンコンピテントセルとの併用でさらに可溶性発現が向上します。

◆ 幅広い大腸菌ホストで使用可能

大腸菌由来の*cspA*プロモーターにより転写が行われるので、ほとんどすべての大腸菌が宿主として使用できます。

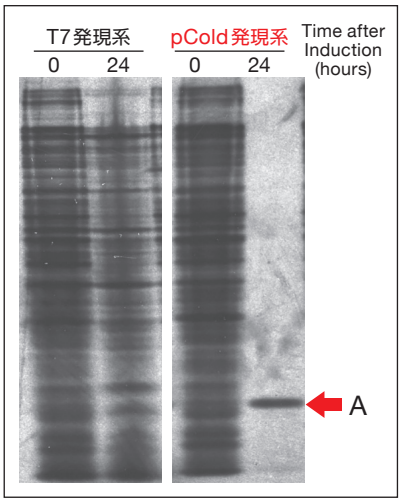


図1. パルスラベルによる標識例
ヒト遺伝子A(約12 kDa)

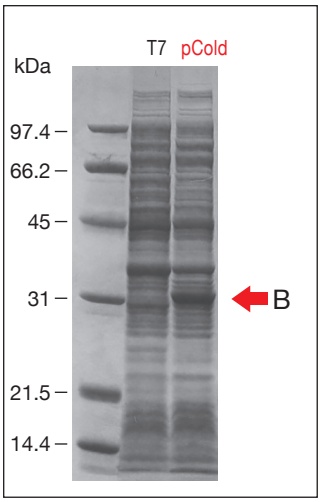


図2. 発現が可能となった例
ヒト遺伝子B(約31 kDa)
(全タンパク質画分のCBB染色)

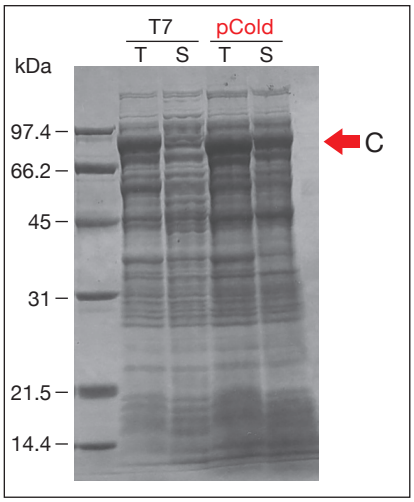


図3. 可溶性発現量が増大した例
ヒト遺伝子C(約80 kDa)
(T:全タンパク質画分、S:可溶性画分)

コールドショック発現ベクター製品のラインナップ

目的に合わせて、可溶化タグの種類、Hisタグの有無などを選択してください。
※製品コード、価格などは次ページの製品リストをご覧ください。

製品名	GenBank Accession No.	可溶化タグ	Hisタグ	タグ切断に使用できる酵素	翻訳促進配列(TEE)
pCold™ GST DNA	–	**GST**	●	Factor Xa (※1)、HRV 3C Protease (※2)	●
pCold™ ProS2 DNA	–	**ProS2(Protein S)**	●	HRV 3C Protease (※2)、Thrombin (※2)、Factor Xa (※2)	●
pCold™ TF DNA	AB213654	**TF(Trigger Factor)**	●	HRV 3C Protease (※2)、Thrombin (※2)、Factor Xa (※2)	●
pCold™ I DNA	AB186388	–	●	Factor Xa (※1)	●
pCold™ II DNA	AB186389	–	●	–	●
pCold™ III DNA	AB186390	–	–	–	●
pCold™ IV DNA	AB186391	–	–	–	–

※1：Hisタグ配列を除去　※2：Hisタグおよび可溶化タグ配列を除去

コールドショック発現ベクターシリーズの使い分けは？

■ Hisタグ配列をもつベクターを利用すれば、Hisタグを利用した目的タンパク質のアフィニティー精製が可能です。

■ 目的タンパク質のN末端への余分なアミノ酸配列の付加が望ましくない場合は、タグ配列をFactor Xaで切断することができるpCold I DNA、あるいは翻訳促進配列(TEE)やタグ配列がないpCold IV DNAをお勧めします。

■ pCold I～IV DNAで目的タンパク質が発現しなかった場合や可溶化しなかった場合は、可溶化タグと融合発現を行う pCold TF DNA、pCold ProS2 DNA、pCold GST DNAをお試しください。

コールドショックベクター製品のご紹介

▼可溶化タグを持たないベーシックタイプ

pCold™ I～IV DNA
(製品コード 3361～3364)

特 長

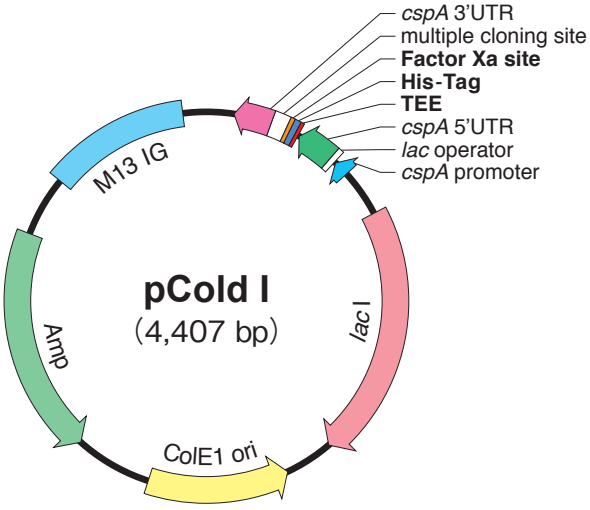
■ **高い生産効率：**
目的タンパク質が、最大で宿主大腸菌内タンパク質の60%に達する。

■ **発現確率の向上：**
T7系では発現しない多くのタンパク質の発現が可能である。

■ **可溶性発現の向上：**
T7系では不溶性発現だった多くのタンパク質が可溶性発現する。(※3)

■ **同位体標識に便利：**
目的タンパク質が、最大で新生タンパク質の90%以上に達するので効率的なラベリングが可能である。

■ **幅広いホストで使用可能：**
大腸菌に由来する*cspA*プロモーターにより転写されるので、ほとんどすべての大腸菌が宿主として使用できる。



※3：目的タンパク質の可溶性発現には、Chaperone Plasmid Set (製品コード 3340)やChaperone Competent Cells BL21シリーズ(製品コード 9120～9125)を利用したシャペロン共役発現も有効です。

コールドショック発現系

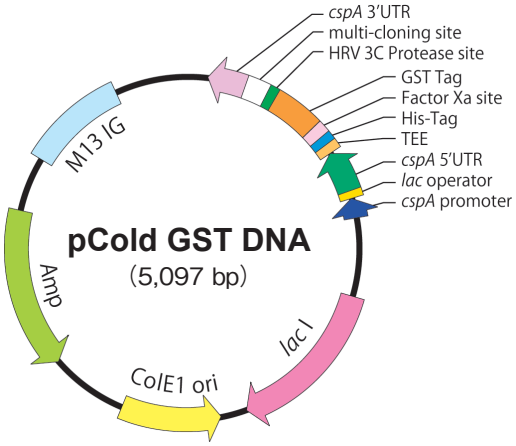
▼可溶化タグ付きのベクターはこちら

GSTタグ融合発現タイプ

pCold™ GST DNA
（製品コード 3372）

特 長

- 発現条件の至適化なしでも高い可溶化率を実現
- GSTアフィニティー精製、Hisタグ精製、タグ切断が可能

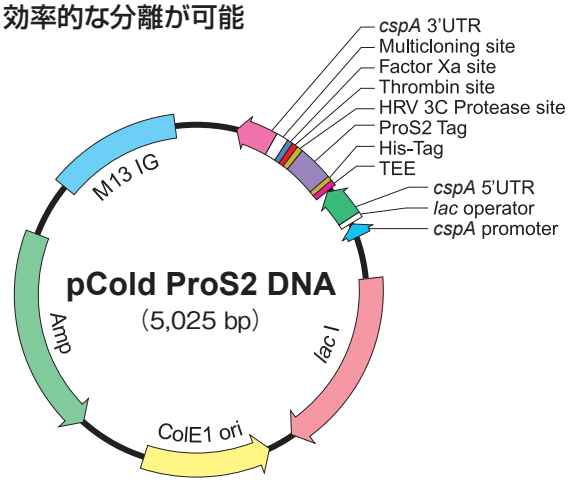


ProS2タグ融合発現タイプ

pCold™ ProS2 DNA
（製品コード 3371）

特 長

- ProS2タグ融合発現により可溶性が向上
- Hisタグ精製、可溶化タグの切断が可能
- ProS2タグは目的タンパク質との相互作用が低いため、効率的な分離が可能



pCold Q & A

Q. 発現可能なタンパク質の分子量は？
A. 数kDaから100 kDaのタンパク質を発現させた実績があります。

Q. 発現実績のある遺伝子の生物種は？
A. 大腸菌、好熱菌、超好熱菌、ヒト、マウス、植物などです。

Q. 培地1 Lあたりの発現量は？
A. 目的タンパク質によって異なりますが、通常は数mg～数10 mg/L程度になります。
小スケールで発現テストを行い、粗抽出液を用いたSDS電気泳動でCBB染色により目的タンパク質の発現が確認できるレベルであれば、3 L程度の培養でmg単位の精製タンパク質が回収できます。

★ウェブサイトの製品ページでは、他にもよくある質問にお答えしています！ ぜひご活用ください。

【コールドショック発現ベクター製品リスト】

製 品 名	容 量	製品コード	価 格(税別)
pCold™ GST DNA	25 µg	3372	¥100,000
pCold™ ProS2 DNA	25 µg	3371	¥100,000
pCold™ TF DNA	25 µg	3365	¥105,000
pCold™ I DNA	25 µg	3361	¥53,000
pCold™ II DNA	25 µg	3362	¥53,000
pCold™ III DNA	25 µg	3363	¥53,000
pCold™ IV DNA	25 µg	3364	¥53,000
pCold™ Vector Set	pCold™ I ～ IV 各5 µgのセット	3360	¥110,000

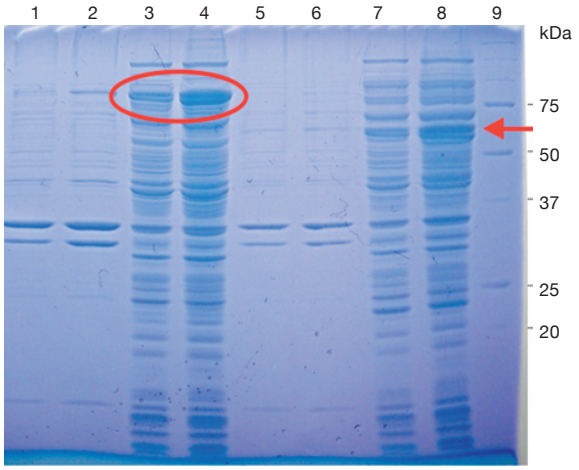
ユーザー様の実施例をご紹介

▼ GST融合植物タンパク質の発現

<データご提供> 名古屋市立大学大学院 システム自然科学研究科 木藤研究室 木藤新一郎先生、横山悠里様

【方法】
3 mlのLB培地(+Amp)に植菌し、一晩培養して種菌を作成した。作成した種菌の一部を30 mlのLB培地(+Amp)に加え、37℃で約2時間(OD_{600}=0.5前後になるまで)振とう培養した後、15℃の水槽に培養液を移し、30分間静置し冷却した。
0.1 M IPTGを加え(終濃度0.1 mM)、15℃にて一定時間(4時間と24時間)振とう培養して目的タンパク質を発現誘導させた。
培養液3 mlをチューブに分注し、遠心分離で集菌後に培地を取り除き、回収した大腸菌に1×PBSを300 µl加え、懸濁後にソニケーションを行なった。遠心分離(15,000 rpm、10 min、4℃)を行い、可溶性の上清と不溶性の沈殿に分けた。沈殿(不溶性画分)と上清(可溶性画分)をSDS-PAGEで解析し、誘導と可溶性の有無を確認した。

レーンNo.	発現タンパク質	画分	誘導時間
1	GST-Full (全長)	不溶性	4時間
2			24時間
3		可溶性	4時間
4			24時間
5	GST-Nt (N末端側)	不溶性	4時間
6			24時間
7		可溶性	4時間
8			24時間
9	マーカー		



【結果】
pCold GSTを用いてタンパク質の全長(レーン1～4)とN末端側(レーン5～8)を発現誘導させた。また、IPTGを添加してからの誘導時間を4時間と24時間に変え、タンパク質を発現誘導させた。
推定分子量50 kDaほどの目的タンパク質をGSTとの融合タンパク質として発現させたので、タンパク質全長では約75 kDa付近にバンドが見られた。誘導24時間後の結果では不要性画分にも薄いバンドが見られるが、大多数が可溶性画分に回収できた(レーン3、4)。
N末端側をGSTに融合したタンパク質も、可溶性画分の60 kDa付近に誘導されたバンドが確認できた(レーン7、8)。

ユーザー様のコメント

Q. 今回の製品を使用したきっかけは?
A. これまでにもGST融合タンパク質をpGEXベクターなどで作成していたが、不溶性になるものもあり、低温で誘導することで改善できるのではないかと考え購入を決めた。

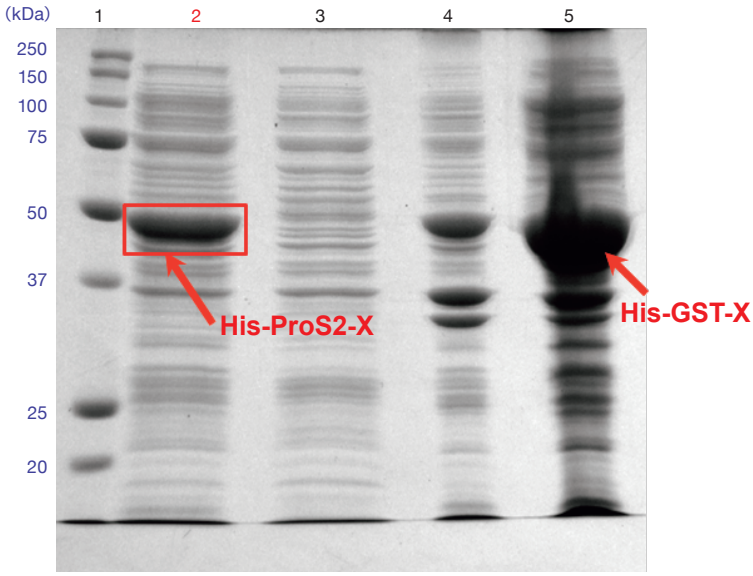
Q. 実際に使ってみていかがでしたか?
A. 別のベクターでは不溶性になっていたタンパク質も、pColdシリーズでは可溶性画分として回収することができ、研究の進展に非常に役立った。

▼ pCold™ ProS2とpCold™ GSTの比較

<データご提供> 大阪府立大学 総合リハビリテーション学類 栄養療法学専攻 神谷重樹先生

【方法】
目的である細菌のタンパク質を発現し、超音波破砕して遠心後に上清と沈殿に分け電気泳動を行った。

1：マーカー
2：sup pCold ProS2-X
3：sup pCold GST-X
4：ppt pCold ProS2-X
5：ppt pCold GST-X



【結果】
GSTタグでは可溶化できなかったものがProS2タグで可溶化することができた(赤枠)。

ユーザー様のコメント

Q. 今回の製品を使用したきっかけは?
A. 細菌のタンパクの可溶化がうまくいかなかったから。

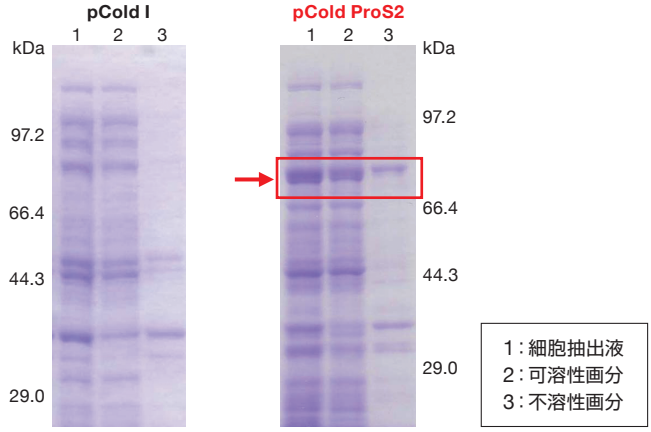
Q. 実際に使ってみていかがでしたか?
A. 発現させたタンパクが完全に可溶化されて、大量精製が可能になった。

自社実施例をご紹介

▼ pCold™ ProS2での発現量と可溶性度をpCold™ Iと比較

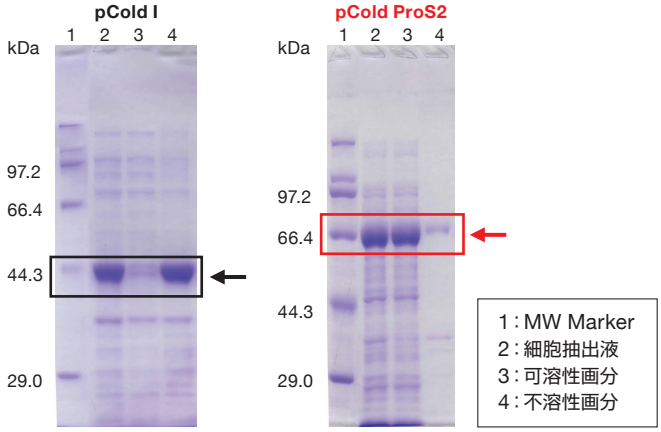
【方法】pCold ProS2 DNAを用いた発現系とpCold I DNA単独発現系で、発現量、可溶性度について比較した。発現用宿主にはBL21を使用し、標準プロトコールに従って、培養・発現誘導を行った。

＜発現が可能となった遺伝子の例＞



【結果】
酵素タンパク質D(推定分子量52.4 kDa)は、pCold I DNAを用いた発現系では推定分子量付近に明確なバンドは認められなかったが、pCold ProS2 DNAを用いた場合には、約75 kDa(52.4 kDa+23 kDa)の目的タンパク質の発現が確認され、その大部分は可溶性であった。

＜可溶性発現量が増大した例＞



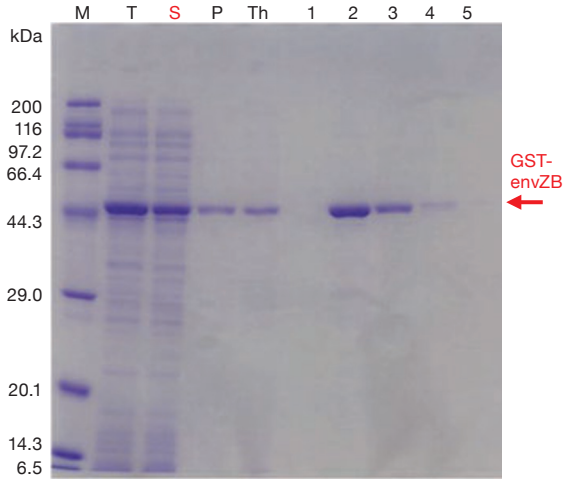
【結果】
タンパク質E(推定分子量43.3 kDa)は、pCold I DNAを用いた発現系ではほとんど可溶性発現が認められなかった。一方、pCold ProS2 DNAを用いた場合には、約66 kDa(43.3 kDa+23 kDa)の目的タンパク質の大部分が可溶性画分に得られた。

▼ GST-envZB融合タンパク質(約46.3 kDa)の発現～精製、タグの除去

① 発現と精製

【方法】
*envZB*遺伝子配列(162aa)を挿入したpCold GST DNAで、TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)を形質転換して発現誘導を行った。
菌体破砕液を可溶性画分と不溶性画分に分け、可溶性画分をGSTタグ融合タンパク質精製樹脂 Glutathione-Superflow Resin (製品コード 635607)を用いて精製した。溶出は33 mM還元型グルタチオンを含む50 mM Tris-HCl, pH8.0を用いて行い、各画分をSDS-PAGE後、CBB染色により分析した。

M：Protein Molecular Weight Marker (Broad) (製品コード 3452)
T：菌体破砕液
S：菌体破砕液可溶性画分
P：菌体破砕液不溶性画分
Th：Glutathione-Superflow 非吸着画分
1～5：Glutathione-Superflow 溶出画分 1～5

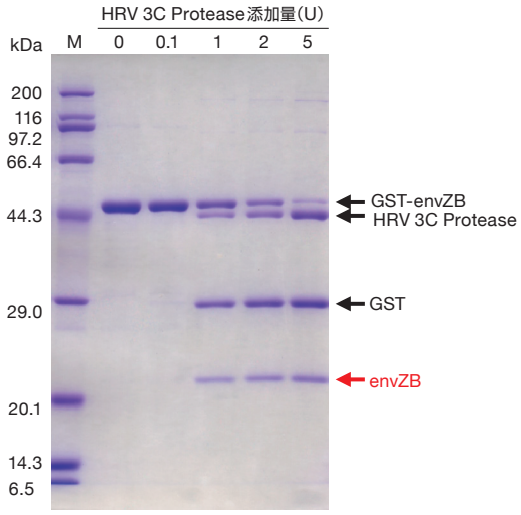


【結果】
GST融合タンパク質が高発現し、大部分が可溶性画分に得られた。
さらにアフィニティー精製により、高純度な産物が得られた。

② タグ除去

【方法】
①にて発現・精製したGST-envZB融合タンパク質 5 µgについて、HRV 3C Protease (0.1 U、1 U、2 U、5 U 添加)消化によるGSTタグ除去を行った。4℃で16時間反応後、各反応液をSDS-PAGE～CBB染色により分析した。

【結果】
HRV 3C Protease添加量の増加に応じて、GST-envZBの切断効率が上がり、目的のenvZBの生成量が増加した。



ユーザーズボイスのご紹介

実際にpCold™ベクターをご使用になったユーザー様から「ユーザーズボイス」をいただきました。
一部を下記でご紹介いたします。
まだ使われていない方も、検討中の方もぜひご覧ください。

◆ K研究所　M様（pCold ProS2 DNA）

Q1 今回の製品を使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

他の方法でタンパクの発現量が低く困っていた。
同僚から勧められた。

Q2 実際に使ってみていかがでしたか？

他の発現系ではうまく発現しなかったものがよく発現した。
低温条件で発現させるので、大腸菌の他のタンパク質の量が相対的に少なく、組換えタンパク質の発現に有利だと思った。

Q3 まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

多様なマルチクローニングサイトと組換えタンパクの大量調製が必要な時は、1度は試してみるとよい発現システムだと思います。

◆ K大学　N様（pCold Vector Set）

Q1 今回の製品を使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

いろいろなベクターを使って発現実験を行ってきたが、可溶性タンパク質が得られにくく困ったので。

Q2 実際に使ってみていかがでしたか？

予想以上にうまくいった。

Q3 まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

発現タンパク質が得られるまで一日多くなりますが、その待ち時間が期待できる結果への一歩だと思えるなら、是非使うべきです。

◆ T大学　S様（pCold GST DNA）

Q1 今回の製品を使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

Xho、*Nde*の切断酵素が使用でき、GSTタグのベクターだったため。

Q2 実際に使ってみていかがでしたか？

ゲルエクストラクションで遺伝子導入したが、失敗もなくすんなりと成功した。発現も温度管理である程度調整が可能なため使用しやすい。

Q3 まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

多様なマルチクローニングサイトと二つのタグがあり、温度による発現調整も可能なため万能性があると思います。使用可能な環境にあるなら持っておくといろんな場合で使えて便利です。

◆ R研究所　S様（pCold GST DNA）

Q1 今回の製品を使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

あるタンパク質を精製しようとしていましたが、可溶性が低く目的の量のタンパク質を精製できず困っていた。

Q2 実際に使ってみていかがでしたか？

可溶性に若干の改善が見られ、またGSTだけでなくHisタグもついているので、改めてプラスミドを作らなくても変性条件下で精製を行えて、効率的に仕事がすすめられた。

Q3 まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

うまくいかないなら、一度試してみても損はないですよ！

◆ H大学　K様（pCold TF DNA）

Q1 今回の製品を使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

組換えタンパク質の可溶性発現に日頃苦労しており、その解決策の一環として導入しました。

Q2 実際に使ってみていかがでしたか？

試した殆どのタンパク質をタグ付き条件下で可溶性発現させることができ、極めて優れたシステムであることを確認しました。

Q3 まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

組換えタンパク質の可溶性発現が困難な場合の第一選択肢になり得るシステムであると思われます。

◆ S大学　T様（pCold I DNA）

Q1 今回の製品を使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

大腸菌でのタンパク質の発現系を立ち上げようと思った。

Q2 実際に使ってみていかがでしたか？

うまく産生できるタンパク質もあれば、できないものもある。
プロトコールから多少ずれたことをしても、タンパク質はできる。

Q3 まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

シンプルで使いやすいと思います。

他にもたくさんのユーザーズボイスをいただいています！ 詳細はウェブサイトをご覧ください。

コールドショック発現系 <関連製品>

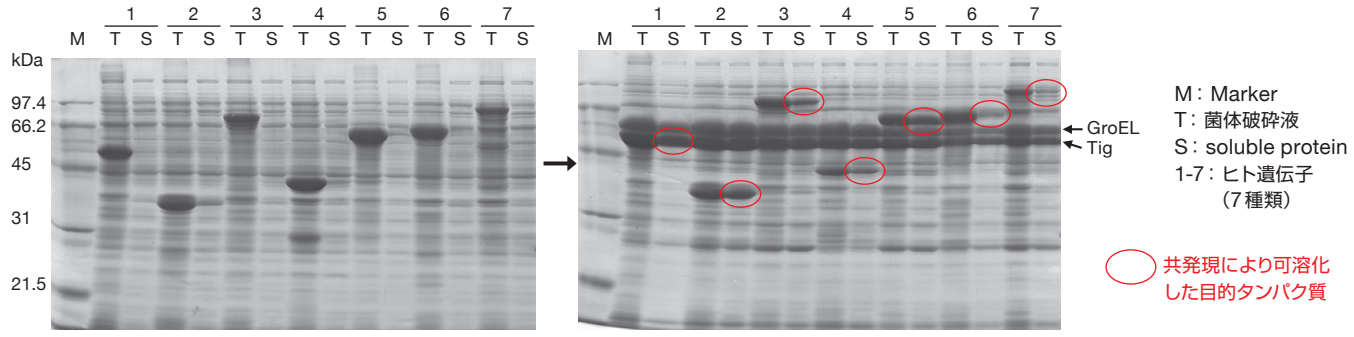
●シャペロン共発現コンピテントセル

シャペロンプラスミドで形質転換済みの大腸菌BL21株のコンピテントセルです。コールドショック発現ベクターシリーズと組み合わせて用いることで、より効果的に可溶化を促進します。

※各コンピテントセルは単品販売も行っています。詳しくはウェブカタログをご覧ください。

製 品 名	容 量	製品コード	価 格(税別)
Chaperone Competent Cells BL21 Set	100 µl×3×6種類	9120	¥65,000

▼ pCold™ I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大幅に可溶化した例



BL21 Competent Cells 使用

Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21使用

●タグ切断用の酵素

製 品 名	容 量	製品コード	価 格(税別)
HRV 3C Protease	500 U	7360	¥20,000

●最短5分、しかも室温で精製可能なHisタグ融合タンパク質精製キット

無料サンプル配布中

製 品 名	容 量	製品コード	価 格(税別)
Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit	20回	635710	¥32,000
Capturem™ His-Tagged Purification Maxiprep Kit	6回	635713	¥42,000
Capturem™ His-Tagged Purification 96	96 well plate	635714	¥60,000

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。
・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。　・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
・本パンフレット記載の価格は2016年9月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995
Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

取扱店

2016年9月作成17.5K