

製品コード 3360_3364

研究用

Takara

pCold™ DNA シリーズ
(コールドショック発現システム)

説明書

v202003Da

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あり、効率の良いタンパク質生産システムはポストゲノム解析に必須の基盤技術と言えます。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。しかしながら、大腸菌発現系は扱いやすく低コストである反面、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という問題が起こることがあります。

本製品は、米国ニュージャージー医科歯科大学の井上正順教授との共同研究により開発されたコールドショック発現ベクターで、大腸菌コールドショック遺伝子のプロモーターを利用しています。従来の大腸菌発現系と比較して発現の成功率が高く、他の発現系では全く発現しなかったタンパク質の発現や、より高い発現量、発現タンパク質の可溶化が期待できます。さらに、コールドショック発現系では、他の大腸菌由来のタンパク質の発現が抑えられるため、純度の高い発現タンパク質を得ることが可能で、機能解析、構造解析を始めとするタンパク質研究の重要なツールとして利用できます。また、目的タンパク質が最大で新生タンパク質の90%に達するため同位体標識にも非常に有用です。多くの場合、細胞を破碎するだけで¹⁵N、¹³Cでラベルしたタンパク質を精製することなくNMRによる構造研究に供することが可能です¹⁾。

大腸菌の培養中に培養温度を低温にシフトさせると、菌の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が誘導されます。pColdベクターはコールドショック遺伝子の一つである*cspA*遺伝子のプロモーターを利用したコールドショック発現ベクターで、*cspA*プロモーターの下流に5'非翻訳領域(5' UTR)、translation enhancing element (TEE)、Hisタグ配列、Factor Xa切断配列、multicloning site (MCS)などが配置されています。TEE配列には翻訳を促進する作用があります。Hisタグ配列、Factor Xa切断配列は発現タンパク質の精製と精製後のタグの除去に有用です。また、プロモーターの下流には発現を厳密に制御するための*lac* operatorが挿入されています。

pColdベクターには、TEE配列、Hisタグ配列、Factor Xa切断配列の有無が異なるpCold I～IV DNAの4種類があり、目的に合わせて最適なベクターを選択することができます。

また、pColdベクターは大腸菌由来のプロモーターを用いているため、ほとんどの大腸菌株を発現用宿主として利用することができます。

I. 内容

pCold Vector Set (製品コード 3360)

1. pCold I DNA 5 μg
2. pCold II DNA 5 μg
3. pCold III DNA 5 μg
4. pCold IV DNA 5 μg

pCold I DNA (製品コード 3361) 25 μg

pCold II DNA (製品コード 3362) 25 μg

pCold III DNA (製品コード 3363) 25 μg

pCold IV DNA (製品コード 3364) 25 μg

【各ベクターの形状】 10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA

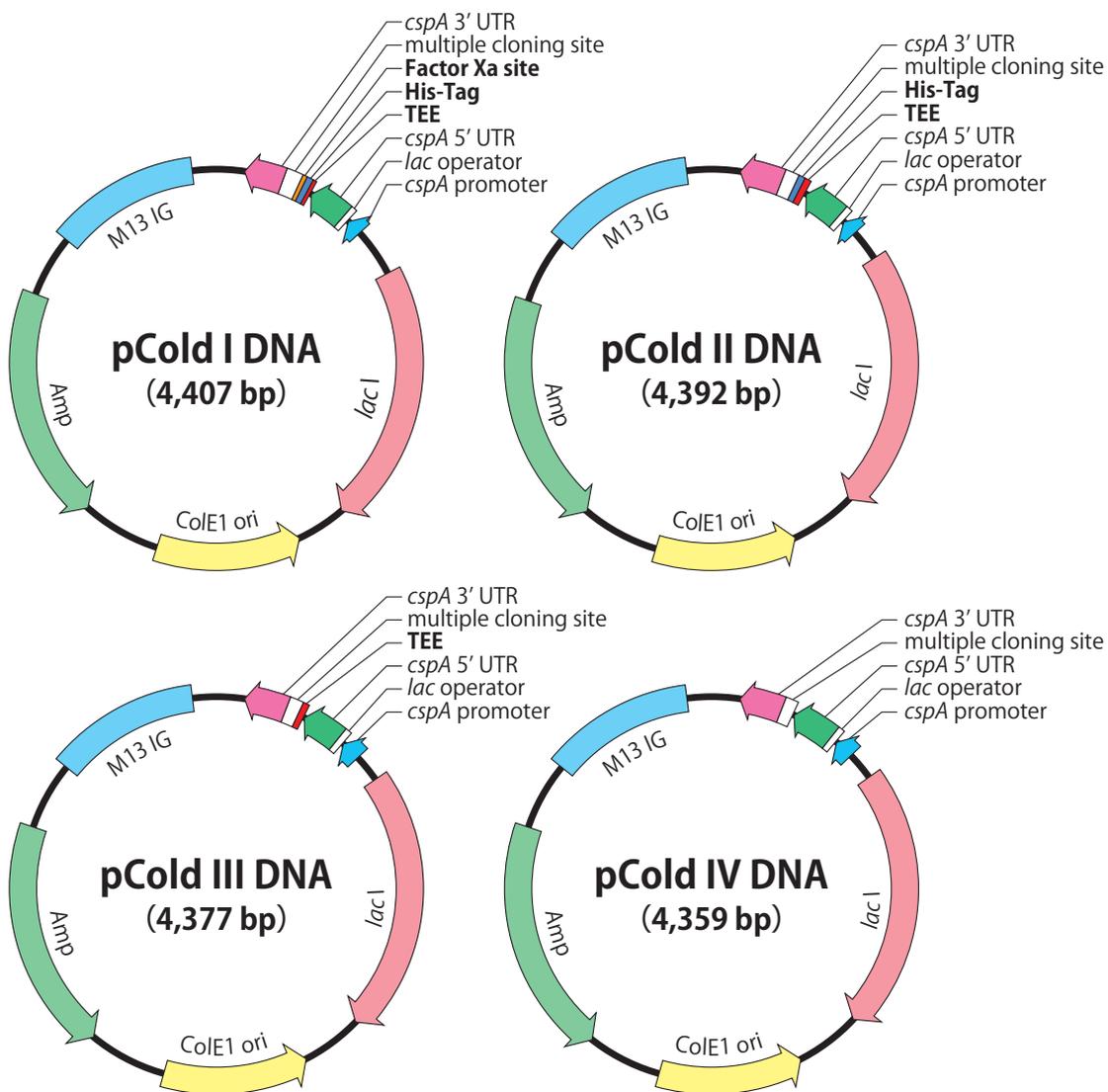
<利用できる大腸菌株>

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、殆ど全ての大腸菌株を発現用宿主として利用できます。

II. 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。



ベクター	TEE 配列	His タグ配列	Factor Xa 切断配列
pCold I DNA	○	○	○
pCold II DNA	○	○	—
pCold III DNA	○	—	—
pCold IV DNA	—	—	—

GenBank Accession No.

pCold I DNA : AB186388
 pCold II DNA : AB186389
 pCold III DNA : AB186390
 pCold IV DNA : AB186391

III. 使用方法

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。

目的遺伝子の発現方法

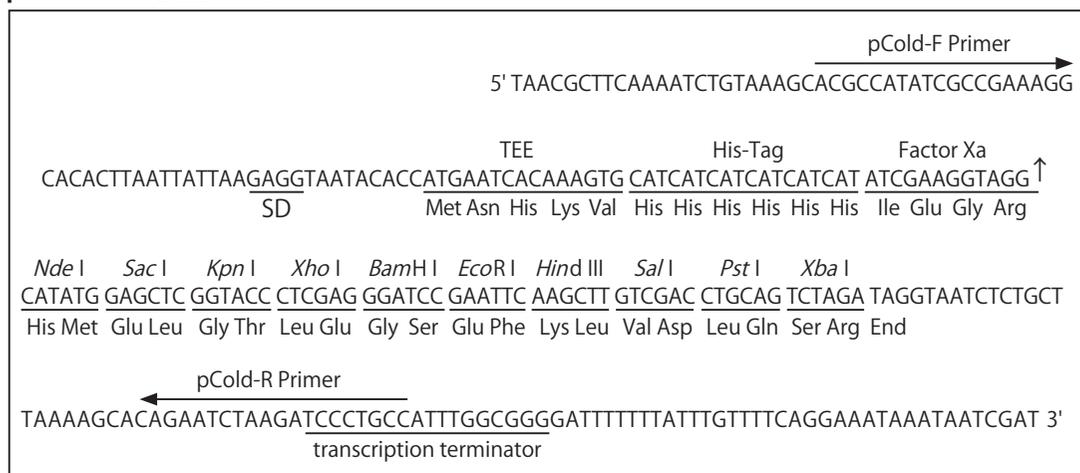
- (1) コールドショックベクター pCold DNA のマルチクローニングサイトに目的遺伝子を挿入して発現用プラスミドを作製する。^{*1}
* 1：発現プラスミドの構築については、VII. Appendix (11 ページ) をご参照ください。
- (2) 発現用プラスミドで宿主大腸菌^{* 2}を形質転換し、アンピシリンを含む選択培地プレート上で形質転換体を選択する。
* 2：本製品を用いる場合、目的遺伝子は大腸菌に由来する *cspA* プロモーターにより発現されるので、ほとんど全ての大腸菌株を発現用宿主として利用できます。
- (3) 50 ~ 100 μg/ml アンピシリンを含む LB 培地に形質転換体を植菌し、37℃で振とう培養する。
- (4) 培養液の OD₆₀₀ 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。
- (5) 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。
- (6) 培養終了後、SDS-PAGE や活性測定などにより目的産物の有無、発現量や可溶性を確認する。

発現用宿主大腸菌、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、誘導後の培養条件と温度など）を至適化することにより発現量、可溶化度を改善することができます。また、発現タンパク質が不溶化した場合には Chaperone Plasmid Set (シャペロンプラスミドセット) (製品コード 3340) や BL21 株にあらかじめシャペロンプラスミドを導入した Chaperon Competent Cells シリーズ (製品コード 9120 ~ 9125) との併用が有効です。

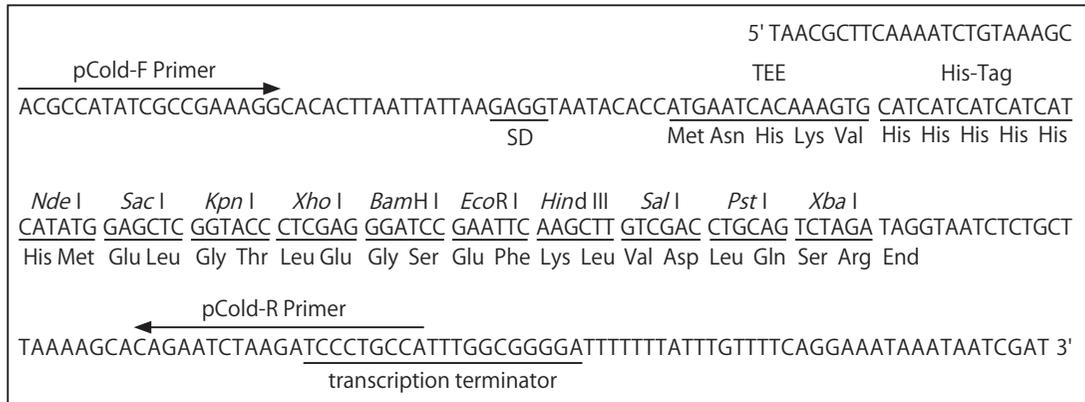
なお、His タグ融合タンパク質の精製には、クロンテックの TALON® His タグ融合タンパク質精製樹脂、His60 Ni Superflow Resin 等の使用をお勧めします。

IV. マルチクローニングサイト周辺の塩基配列

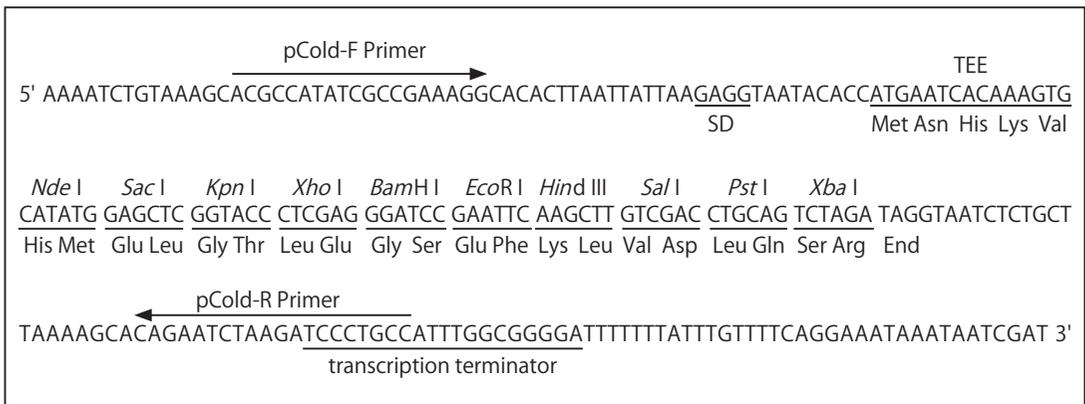
pCold1 DNA (製品コード 3361)



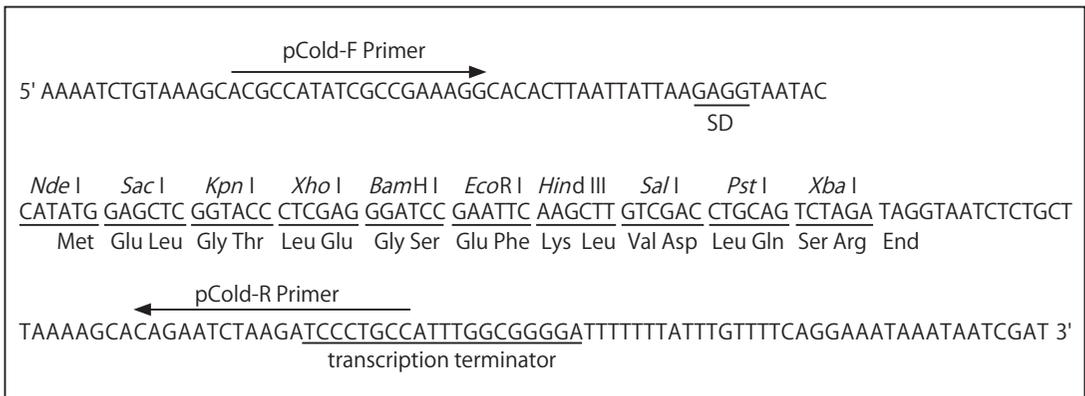
pCold II DNA (製品コード 3362)



pCold III DNA (製品コード 3363)



pCold IV DNA (製品コード 3364)



V. 実施例

T7 プロモーターによる発現系で発現量や可溶性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の発現を試みた。コールドショック発現系は pCold I DNA を用い、発現用宿主は大腸菌 BL21 株を使用して、[III. 使用方法、目的遺伝子の発現方法] に従って培養・発現誘導を行った。T7 プロモーターによる発現は、常法通り IPTG を添加後 37°C で培養することにより行った。

(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なかったが、コールドショック発現系では発現が確認された (図 1)。

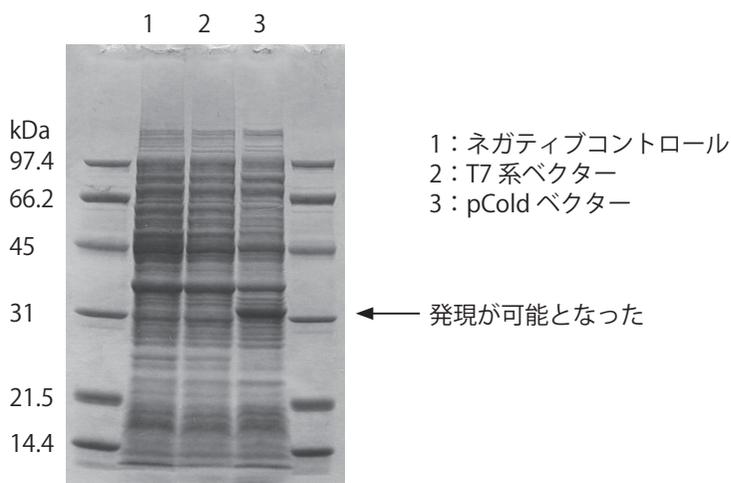


図 1. ヒト遺伝子 A の発現 (全タンパク質画分の CBB 染色)

(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た (図 2)。

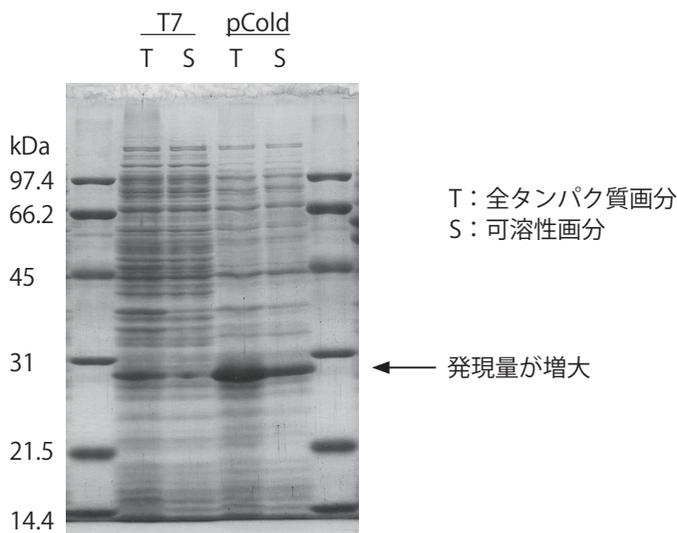


図 2. 好熱菌遺伝子 B の発現 (CBB 染色)

(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 発現では大部分が不溶性発現となる。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た (図 3)。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、可溶性度が向上することが期待される。

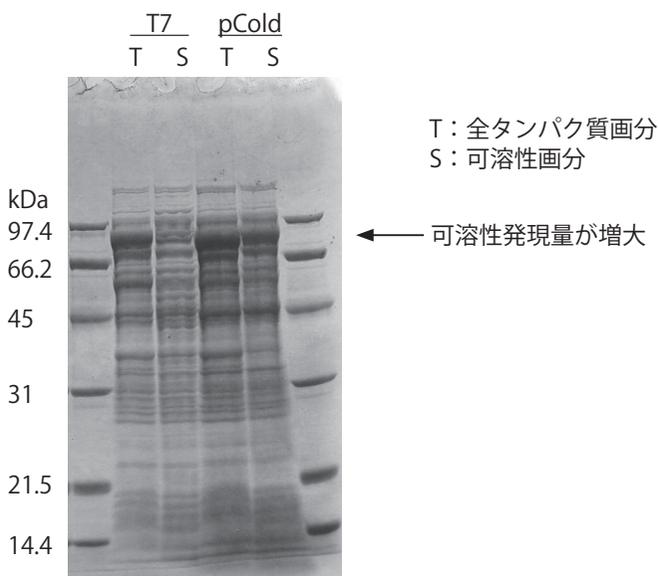


図 3. ヒト遺伝子 C の発現 (CBB 染色)

(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、両発現系を比較した (図 4)。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た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る。

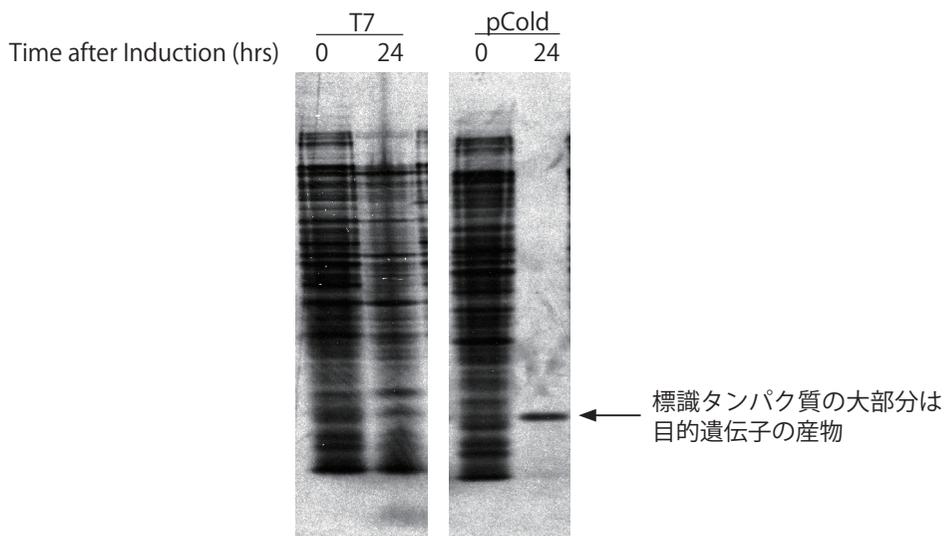


図 4. ヒト遺伝子 D のパルスラベルによる標識

VI. Q & A

Q 1. pCold DNA を利用するとタンパク質が低温で効率よく発現する理由は？

A 1. pCold DNA は、コールドショックタンパク質をコードする *cspA* 遺伝子をベースに構築されており、*cspA* プロモーター、5' UTR、*cspA* タンパク質の N 末端をコードする部分を含んでいます。

cspA プロモーターからの転写は 37°C でも行われますが、その下流の 5' UTR が 37°C では非常に不安定なため、効率的な翻訳は行われません。しかし、温度を 37°C から 15°C に低下させると、5' UTR の構造が非常に安定となり、その結果、翻訳効率が上昇し、低温 (15°C) で非常に効率よくタンパク質の合成が行われます。²⁾

さらに、転写によって *cspA* タンパク質の N 末端の一部をコードする mRNA が生成すると、その mRNA の翻訳にリボソームが優先的に使用され、他の mRNA の翻訳にはリボソームがあまり供給されなくなります (リボソームトラップ現象)。³⁾

このように pCold DNA は、低温でも転写活性が落ちない *cspA* プロモーターと 5' UTR の低温での構造安定性、およびリボソームトラップ現象により、低温で非常に効率よくタンパク質発現を行うことができます。低温でのタンパク質発現は従来から行われていましたが、pCold DNA はこれまでの発現ベクターにない上記の特徴をもつ、低温でのタンパク質発現に適したユニークな発現ベクターです。

2) Mitta M, *et al. Mol Microbiol.* (1997) **26**, 321-335.

3) Xia B, *et al. J Biol Chem.* (2001) **276**, 35581-35588.

Q 2. 発現が認められない場合、何を検討したらよいか？

A 2. 用いるベクターの種類、宿主や培養・誘導条件をご検討ください。

- ・ベクターの種類 (pCold I ~ IV DNA、pCold TF DNA、pCold ProS2 DNA、pCold GST DNA) を変更する。N 末端に TEE 配列や His タグ配列を付けると発現することがある。可溶化タグと融合発現する pCold TF DNA や pCold ProS2 DNA、pCold GST DNA は、特に有効である。
- ・コドンの使用頻度を調べる。遺伝子によってはコドン使用頻度の影響を受ける場合がある (タカラバイオでは宿主に最適化した塩基配列の設計と人工合成遺伝子作製の受託を行っているのでご利用ください)。コドン使用頻度のみならず安定性や効率を考慮して設計した遺伝子により発現量の増大が期待される。レアコドンに対応した市販の大腸菌株 (Rosetta 2 など) を使用することで改善される場合もある。
- ・前培養の有無や発現クローンの保存方法が影響することがある (Q 8 参照)。
- ・コールドショック誘導のタイミングを検討する。誘導のタイミングが遅いと発現量が低下する場合があります。
- ・IPTG を加える前の冷却は十分に行い (標準的には 15°C で 30 分間以上)、IPTG 添加後も 15°C で培養する。

Q 3. 発現タンパク質が不溶化した場合、何を検討したらよいか？

A 3. 最適な培養・誘導条件は目的タンパク質によって異なります。培養・誘導条件や、宿主として用いる大腸菌株、抽出方法などを以下の事項を参考にしてご検討ください。

- ・誘導のタイミングを変更する (対数期初期から後期までの間で検討する)。
- ・誘導物質 (IPTG) の濃度を変更する (0.1 ~ 1 mM)。
- ・誘導後の培養温度、培養時間を検討する (通常 15°C、24 時間が最適)。
- ・宿主大腸菌の種類やシャペロンの利用を検討する。Chaperone Plasmid Set (シャペロンプラスミドセット) を利用したシャペロン共役発現や、発現タンパク質の可溶化を促進する宿主大腸菌株 (Origami など) をお試しください。
- ・抽出方法を変更する。市販の大腸菌溶解用試薬では十分に可溶化されないタンパク質もあります。0.1 ~ 1% の界面活性剤 (オクチルグリコシド、NP-40、Triton X-100) などに加えて超音波処理を行うのも有効です。
- ・ベクターの種類を変更する。可溶化タグと融合発現する pCold TF DNA、pCold ProS2 DNA や pCold GST DNA は特に有効である。

Q 4. 発現可能なタンパク質の分子量は？

A 4. 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 5. 発現実績のある遺伝子の生物種は？
A 5. 大腸菌、好熱菌、超好熱菌、ヒト、マウス、植物などです。
- Q 6. pCold ベクターシリーズの選択の基準は？
A 6. pCold I, II, III DNA に含まれる TEE 配列は、目的遺伝子の翻訳を促進します。また、His タグ配列をもつベクター (pCold I, II DNA) を利用すれば、クロンテックの TALON Resin などを用いた発現タンパク質の精製を行うことができます。目的タンパク質の N 末端に余分なアミノ酸配列が付くこと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 TEE 配列やタグ配列がない 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には、可溶化タグと融合発現を行う pCold TF DNA、pCold ProS2 DNA や pCold GST DNA をお試しください。
- Q 7. 培地 1 L あたりの発現量は？
A 7. 目的遺伝子によって異なりますが、通常は数 mg ~ 数十 mg/L 程度になります。小スケールで発現テストを行い、粗抽出液を用いて SDS 電気泳動を行い、CBB 染色で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。
- Q 8. 目的遺伝子を挿入した pCold ベクターで形質転換した大腸菌を、プレート上で 4℃ 保存できるか？
A 8. プレート上で 4℃ 保存することはお勧めできません。目的遺伝子を挿入した pCold ベクターで形質転換した大腸菌をプレート上で 4℃ 保存すると、目的タンパク質が漏出し、pCold ベクターを維持できない可能性があります。できるだけ早くピックアップしてグリセロールストックを調製し、-80℃ で保存することをお勧めします。
- Q 9. Chaperone Plasmid Set を利用した共発現を行う際、5 種類あるシャペロンプラスミドの選択の目安は？
A 9. pCold ベクターを用いた発現系は、tig 配列を含むシャペロンチームとの共発現でより良い結果を生む傾向があります。まず、pG-Tf 2 または pTf16 との共発現から検討することをお勧めします。
- Q 10. 誘導後、15℃ で 24 時間培養した場合、OD₆₀₀ はどのくらいまで上がるか？
A 10. 本システムを用いて培養した場合の OD₆₀₀ は、宿主大腸菌株や、挿入した目的遺伝子の種類によって異なりますが、BL21 株を宿主に用いた場合、1.2 前後になります。
- Q 11. pCold DNA での発現に適した宿主は？また、pET ベクターで発現用宿主として用いる DE3 を含む宿主は使用可能か？
A 11. pCold DNA は大腸菌由来の *cspA* プロモーターを用いているため、ほとんどの大腸菌を発現用宿主として利用できますが、まずは BL21 株の使用をお勧めします。TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126) をご利用ください。また、BL21 株にあらかじめシャペロンプラスミドを導入した Chaperone Competent Cells シリーズ (製品コード 9120 ~ 9125) も可溶化の促進などに有効です。その他、ジスルフィド結合形成が促進される Origami 2 株や、大腸菌でのコドン使用頻度の制約を受ける遺伝子配列に対してもユニバーサルな翻訳が可能な Rosetta 2 株など、多くの発現用宿主が利用できます。目的にあわせてご使用ください。
なお、DE3 を含む大腸菌は lacUV プロモーター下流に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子をもつ入ファージの溶原菌であり、IPTG 誘導で T7 RNA ポリメラーゼを発現します。この機能は、T7 プロモーターを用いる pET ベクターには必須ですが、pCold DNA には必要ありません。ただ、DE3 は pCold DNA による発現に特に影響を与えないため、実際には DE3 を含む大腸菌での発現実績も多数あります。
弊社ウェブカタログで、pCold DNA 使用文献リストと使用した宿主を紹介していますので、ご参照ください。
-

-
- Q 12. pCold ベクター発現系では、培養温度を低温にすることで目的タンパク質の発現が誘導されるはずであるが、誘導時に IPTG を加えるわけは？
- A 12. pCold ベクターはコールドショックタンパク質のプロモーターを使用していますので、本来は 37°C では目的タンパク質はほとんど発現しません。しかし、インサートによっては微量の漏れが生じる場合があるため、補助的に *lac* オペロンによる制御系を用いています。pET ベクターの場合では、発現のオンオフは IPTG の添加のみによって行うため、IPTG 無添加で発現が制御されるかどうかは重要な問題となります。一方、pCold ベクターの場合では、誘導は温度変化によって行うため、低温にシフトさせた後に *lac* オペロンの制御がかかっているかどうかは重要な問題ではありませんが、少しでも制御がかかっていると不都合ですので IPTG の添加は必要になります。
lac オペロンの制御の強さは、使用する宿主大腸菌の種類によっても変わります。JM109 など *lac*⁺ をもつものと、BL21 株など本来大腸菌がもつ *lac*⁻ のみで制御しているものとは制御の強さは変わると考えられます。しかし、低温にシフトさせた後の制御の強さは重要な問題ではありませんので、特に *lac*⁺ をもつ菌株を選ぶ必要はありません。
- Q13. pCold DNA とシャペロンプラスミドとの共発現系から、発現したシャペロンを除く方法は？
- A13. His タグ配列をもつベクター (pCold I, II DNA) を利用し、His タグを利用して目的タンパク質のアフィニティー精製を行うことで、シャペロンを取り除く方法をお勧めします。
- Q14. 誘導のため、37°C から 15°C に冷却するが、温度は急に下げたほうがいいのか？
- A14. 37°C から 15°C まで温度を下げる操作はできるだけ短時間で行ってください。例えば、氷水に培養容器を浸して 15°C まで冷却する方法などがお勧めです。培養液量が多い場合は培地の温度が不均一となる可能性があります。念のため 15°C に達した後、さらに 30 分間放置してください。
- Q15. pCold DNA に目的遺伝子をクローニングしたいが、マルチクローニングサイトに適切な制限酵素サイトがない。
- A15. クロンテックの In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 ほか) をご利用ください。本キットを用いると、適切な制限酵素サイトが存在しない場合でも、線状化ベクターと、ベクター末端の 15 塩基を付加した目的 DNA 増幅用プライマーを用いて PCR 産物を調製するだけで、余分な配列をいっさい付加せず簡単に・迅速にディレクショナルクローニングが行え、大変便利です。なお、pCold TF DNA、pCold ProS2 DNA や pCold GST DNA のマルチクローニングサイトは、pCold I ~ IV DNA のマルチクローニングサイトと配列が同じですので、制限酵素処理による目的遺伝子の乗せ替えをスムーズに行うことができます。
- Q16. His タグ融合タンパクを精製する場合は、どの精製カラムを使えばいいか？
- A16. クロンテックの TALON レジンは Co²⁺ ベースのレジんで His タグ融合タンパク質に対して高い特異性、親和性を示すため、非特異的な吸着による夾雑タンパク質の混入が抑えられ、His タグ融合タンパク質を高純度に精製できます。結晶構造解析、活性測定などの用途に最適です。また、His60 Ni Superflow Resin は Ni²⁺ ベースのレジんで、非常に高い結合容量 (最大 60 mg His タグ融合タンパク質 / ml レジン) をもち、1 ステップでの精製が可能です。高収量が必要な用途にお勧めで、標識化や抗体作製用抗原などに使用できます。用途にあわせて選択してください。

VII. Appendix

発現プラスミドの構築

発現プラスミドを構築するには、(1)目的タンパク質をコードするインサート DNA が pCold の読み取りフレームに合うように考慮して制限酵素サイトを選択し、(2)インサートの調製、(3)ベクターの制限酵素切断を行い、(4)切断したベクターとインサートを連結後、適当な大腸菌を形質転換して、(5)得られたコロニーよりプラスミドを調製して正しくインサートが入ったものを選択する必要があります。

インサート DNA の調製法としては PCR を用いる方法や、プラスミドにクローニングされた遺伝子を制限酵素消化によって切り出す方法、合成遺伝子を用いる方法があります。

pCold I ~ IV DNA は、pCold ProS2 DNA、pCold TF DNA および pCold GST DNA のマルチクローニングサイトと配列が同じですので、制限酵素による乗せ替えをスムーズに行うことができます。

また、クロンテックの In-Fusion HD Cloning Kit を用いると、適切な制限酵素サイトが存在しない場合でも、簡単・迅速にディレクショナルクローニングが行えるので便利です。

ここでは、一般的なクローニング法による PCR を用いた実験例を示します。

【大腸菌チオレドキシンをコードする遺伝子の発現用プラスミド構築例】

(1) 制限酵素サイトの選択とプライマーの設計

・プライマー設計時の手順と注意点

1. マルチクローニングサイトにある制限酵素の中から目的配列を切断しない 2 種類の制限酵素を選ぶ。ただし、隣り合う制限酵素サイトは切断できないことがあるので避けるようにする。
2. 目的配列を挟むようにプライマーを設定し、それぞれのプライマーの 5' 側に制限酵素サイトを付加する。
N 末側は pCold の読み取りフレームにインサートのフレームが合うように目的配列と制限酵素サイトの間の塩基数を調整する。C 末側はストップコドンに直接制限酵素サイトを付加してもよい。
3. 制限酵素サイトの外側に 4 base 程度の任意配列を付加する。多くの制限酵素は認識配列の外側に数 bp 以上の塩基がないと切断効率が悪くなる。

・プライマー設計例

pCold の *Nde*I/*Xho*I サイトに挿入する場合

Primer 1 (順方向プライマー) 5'-GCCGCATATGAGCGATAAAAATTATTCAC
任意配列 *Nde*I チオレドキシ由来配列*1

Primer 2 (逆方向プライマー) 5'-GCCGCTCGAGTTAGGCCAGGTTAGCGTC
任意配列 *Xho*I * チオレドキシ由来配列*2

* 1 : *Nde*I サイトを利用する場合は、*Nde*I サイトの ATG にインサートの開始コドン (ATG) を合わせることを推奨します。

* 2 : 終止コドン (*) を含む相補的なチオレドキシンの配列です。

(2) インサートの調製

1. PCR による目的遺伝子 (約 350 bp) の増幅

高い正確性を持つ High-Fidelity PCR 酵素 (PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A) など) を用いて、PCR 反応を行う。

鋳型 DNA (5 ng) *1	1 μ l
5×PrimeSTAR Buffer*2	10 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	4 μ l
Primer 1 (10 ~ 50 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (10 ~ 50 pmol/ μ l)	1 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.5 μ l
滅菌精製水	32.5 μ l
Total	50 μ l

* 1 : プラスミドの場合は 10 pg ~ 1 ng 程度、cDNA やゲノム DNA の場合は 5 ~ 200 ng 程度使用します。

* 2 : 5×PrimeSTAR Buffer、dNTP Mixture は PrimeSTAR HS DNA Polymerase (製品コード R010A) に添付されています。

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	5 ~ 15 sec.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch/Gradient* (製品コード TP350/TP600) を用いる場合

2. 増幅産物の確認

PCR 反応液 5 μ l を用いて電気泳動を行い、増幅サイズを確認する。

3. 増幅産物の精製

増幅産物がシングルバンドの場合には、フェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いる PCR clean-up などのタンパク質除去操作を行う。
増幅産物に複数のバンドがある場合にはアガロースゲルからの回収を行う。

4. 増幅産物の制限酵素切断

精製を行ったインサート DNA を制限酵素により切断する。

1) 以下の反応液を調製する。

インサート DNA	0.5 ~ 1 μ g
10 × K Buffer	3 μ l
<i>Nde</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
<i>Xho</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
滅菌精製水	X μ l
Total	30 μ l

2) 37°C で 1 時間反応させる。

3) 反応液をエタノール沈殿などにより精製する。*

4) 電気泳動、吸光度測定 (OD₂₆₀) などにより、回収したフラグメントのサイズと濃度を確認する。

* : 制限酵素 *Nde* I、*Xho* I はどちらもエタノール沈殿により失活させることができます。エタノール沈殿で完全に失活しない制限酵素を用いた場合にはフェノール処理を行ってください。また、アガロースゲルからの DNA 回収を行うと、切断によって生じた短い断片を完全に除去することができます。

[エタノール沈殿の手順]

1. サンプルの 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) を加え攪拌する。
2. サンプルの 2 ~ 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加えてよく攪拌し、
-20°C で 30 分以上放置する。
3. 4°C、12,000 rpm で 10 ~ 15 分間遠心し、上清を除去する。
4. 70% 冷エタノールを加え、4°C、12,000 rpm で 5 分間遠心する。
5. 上清を除去し、風乾する。
6. 適当量 (10 ~ 50 μ l 程度) の TE バッファーに溶解する。

(3) pCold の制限酵素切断

増幅断片の消化に用いた制限酵素を用いてコールドショックベクター pCold を消化し精製する。精製した DNA は TE バッファーに溶解し、吸光度により DNA 濃度を測定する。

1. 以下の反応液を調製する。

pCold ベクター	1 μ g
10 \times K Buffer	3 μ l
<i>Nde</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
<i>Xho</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
滅菌精製水	X μ l
Total	30 μ l

2. 37°C で 1 ~ 2 時間反応させる。
3. 反応液をエタノール沈殿により精製する。*
4. 適量の TE バッファーに溶解する。
5. 吸光度 (OD₂₆₀) 測定し、DNA 濃度を計算する。
dsDNA の場合、1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml として濃度を算出
6. 100 ng/ μ l となるように濃度を調整する。

* : 制限酵素切断後、アルカリホスファターゼ [BAP (製品コード 2120A)、CIAP (製品コード 2250A) など] を用いた脱リン酸反応を行うことが出来ます。ただし、1 種類の制限酵素のみで切断した場合には必ず脱リン酸反応を行ってください。さらに、切断により生じた短い断片を完全に除きたい場合にはアガロースゲルからの DNA 回収を推奨します。

(4) pCold へのインサート DNA の挿入と形質転換

1. Ligation 反応

制限酵素消化したベクター断片とインサート DNA を混合し、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) を用いて連結する。

ベクターとインサートの使用量は、モル比で 1 : 3 ~ 1 : 10 が望ましい。

- 1) 氷上で以下の反応液を調製する。

切断処理済み pCold	100 ng (約 0.03 pmol)	1 μ l
インサート DNA (0.1 ~ 0.3 pmol)		4 μ l
Ligation Mix		5 μ l
Total		10 μ l

- 2) 16°C で 1 時間反応させる。

2. 形質転換

- 1) *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) を使用直前に氷中で融解する。
- 2) 100 μ l のコンピテントセルに 10 μ l の Ligation 反応液を加え、穏やかに攪拌する。
- 3) 氷中で 30 分間放置する。
- 4) 42°C で 45 秒間保温する。
- 5) 氷中で 1 ~ 2 分間放置する。
- 6) 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。
- 7) 37°C で 1 時間振とうする。
- 8) 100 μ g/ml アンピシリンを含む LB プレートに適量をまき、37°C で一晩培養する。

* : SOC Medium は *E. coli* HST08 Premium Competent Cells に添付されています。

(5) プラスミドの調製と確認

得られたコロニーをアンピシリンを含む LB 培地に接種し、一晩培養した培養液からプラスミドを調製する。プラスミドの調製には市販のキットが使用できる。

(NucleoSpin Plasmid EasyPure (製品コード 740727.10) など)

得られたプラスミドを制限酵素 *Nde* I、*Xho* I で切断した後、電気泳動によりインサートの有無を確認する。

正しいサイズのインサートを持つプラスミドが確認できたら、シーケンス反応によりインサートの塩基配列を確認し、発現用プラスミドとして以降の実験に用いる。

シーケンスには、下記のプライマー配列が利用できる。

上流側	pCold-F Primer	5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG
下流側	pCold-R Primer	5'-GGCAGGGATCTTAGATTCTG

VIII. 参考文献

- 1) Qing G *et al.* *Nature Biotechnology*. (2004) **22**: 877-882.
- 2) Mitta M *et al.* *Mol Microbiol.* (1997) **26**: 321-335.
- 3) Xia B, Etchegaray JP, and Masayori Inouye. *J Biol Chem.* (2001) **276 (38)**: 35581-35588.
- 4) Kunitoshi Yamanaka, Masanori Mitta, and Masayori Inouye. *J Bacteriology.* (1999) **181 (20)**: 6284-6291.
- 5) Li Fang, Yan Hou, and Masayori Inouye. *J Bacteriology.* (1998) **180 (1)**: 90-95.
- 6) Li Fang, Weining Jiang, Weonhye Bae, and Masayori Inouye. *Molecular Microbiology.* (1997) **23 (2)**: 355-364.
- 7) Weining Jiang, Li Fang, and Masayori Inouye. *J Bacteriology.* (1996) **178 (16)**: 4919-4925.
- 8) Hiroyuki Tanabe, Joel Goldstein, Maozhou Yang, and Masayori Inouye. *J Bacteriology.* (1992) **174 (12)**: 3867-3873.

IX. 関連製品

<組換えタンパク質の可溶性発現に>

Chaperone Competent Cells BL21 Set (製品コード 9120)
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 pG-Tf2/BL21 (製品コード 9124)
Chaperone Competent Cells pTf16/BL21 (製品コード 9125)
Chaperone Plasmid Set (製品コード 3340)

< *E. coli* コンピテントセル >

- ・発現用
 - TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)
- ・クローニング用
 - E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
 - E. coli* DH5 α Competent Cells (製品コード 9057)
 - E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
 - E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)
 - E. coli* DH5 α Electoro-Cells (製品コード 9027)
 - E. coli* JM109 Electoro-Cells (製品コード 9022)

< Hisタグ融合タンパク精製関連試薬 >

TALON[®] Metal Affinity Resin (製品コード 635501 ~ 635504/635652/635653)
HisTALON[™] Superflow Cartridge Purification Kit (製品コード 635649/635681)
HisTALON[™] Buffer Set (製品コード 635651)
His60 Ni Superflow Resin (製品コード 635659 ~ 635664)
His60 Ni Gravity Columns (製品コード 635657)
His60 Ni Buffer Set (製品コード 635665)
ほか各種

< 可溶化タグを融合発現する pCold ベクター >

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)

< その他 >

In-Fusion[®] HD Cloning Kit (製品コード 639633 ~ 639650)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (製品コード 9030)
NucleoSpin Plasmid EasyPure (製品コード 740727.10/.50/.250)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

X. 注意

1. 本製品は研究目的にのみ使用が許可されています。本製品または、本製品を利用して製造したものを商業目的で使用する際は、ライセンス付のベクター製品をご購入ください。この製品については弊社までお問い合わせください。
 2. 本製品、その構成部分またはその誘導體、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。但し、本製品の購入により既にコーールドショックベクターの研究目的での使用を許可されている第三者に対しては、別途、譲渡を行う者とタカラバイオ（株）の間で譲渡に係る契約を締結した上でこれらを譲渡することができます。
- 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。
 - PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、In-Fusion、TALON は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。pCold はタカラバイオ株式会社の、HisTALON は Takara Bio USA, Inc. 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。

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