

製品コード 3372

研究用

---

**Takara**

**pCold™ GST DNA**

---

説明書

v201909Da

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。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できない、あるいは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。タカラバイオでは、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、有用な大腸菌コールドショック発現ベクター pCold DNA シリーズを開発しました。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が一時的に停止し、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 ベクターは大腸菌コールドショック遺伝子の一つである *cspA* 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、従来の大腸菌発現系と比較して、発現できる確率や発現産物の可溶性度を向上させることができます<sup>1)</sup>。低温発現のため、他の大腸菌由来のタンパク質の発現が抑えられ、純度の高い目的タンパク質を得ることが可能です。

今回、大阪大学蛋白質研究所の児嶋長次郎准教授により、コールドショックベクターをベースとして、*Schistosoma japonicum* 由来のグルタチオン S 転移酵素 (GST) を可溶性タグとして利用する発現ベクター pCold GST DNA が開発されました<sup>2)-4)</sup>。GST を目的タンパク質の N 末端側に融合発現させることで、融合タンパク質の安定性と可溶性の向上が期待できます。

本ベクターは、*cspA* プロモーターの下流に 5' 非翻訳領域 (5' UTR) と translation enhancing element (TEE)、His タグ、GST タグ、multi-cloning site (MCS) などが配置されています (図 1)。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。

GST タグ融合タンパク質は、親和性の高いアフィニティー精製が可能です。さらに、GST タグと MCS の間には、特異性の高い HRV 3C Protease の認識配列が挿入されており、融合タンパク質からタグを除去することができます。HRV 3C Protease は至適温度が 4 ~ 5℃ と低いため、目的タンパク質に対して穏やかな条件でタグ切断反応を行うことが可能です。

pCold GST DNA は大腸菌のプロモーターを用いているため、他の pCold DNA シリーズと同様に、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。

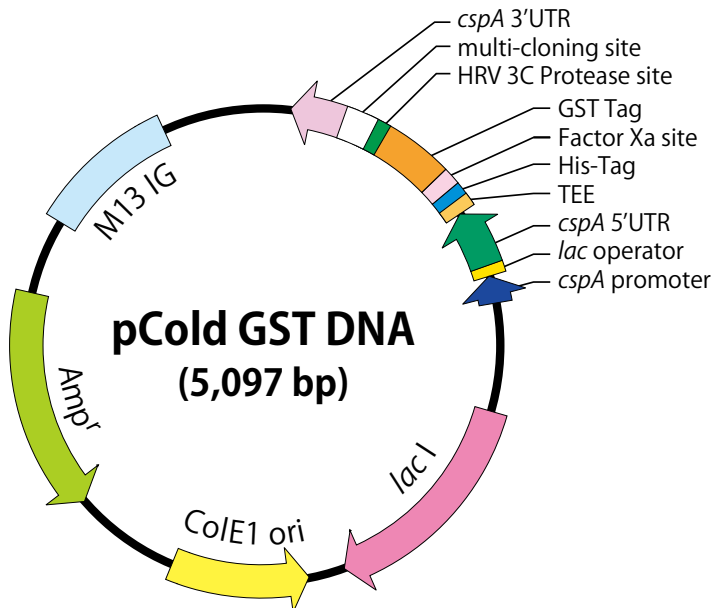


図 1. pCold GST DNA のベクターマップ

---

## I. 内容

pCold GST DNA	25 $\mu$ g
【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ほとんどすべての大腸菌株を発現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。

## III. 使用方法

### 目的遺伝子の発現方法

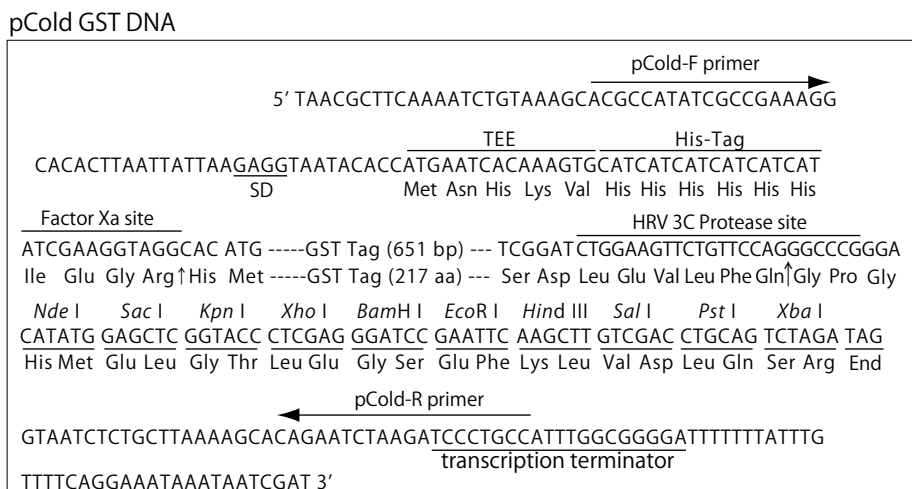
- (1) GST 遺伝子配列にフレームが合うように pCold GST DNA のマルチクローニングサイトに目的遺伝子を挿入して発現用プラスミドを作製する。
- (2) 発現用プラスミドで宿主大腸菌を形質転換し、アンピシリンを含む選択培地プレート上で形質転換体を選択する。
- (3) 50 ~ 100  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地に形質転換体を植菌し、37℃で振とう培養する。
- (4) 培養液の OD<sub>600</sub> が 0.4 ~ 0.8 程度となった時点で培養液を速やかに 15℃に冷却し、30 分間放置する。
- (5) 終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、15℃で 12 ~ 18 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、目的タンパク質の有無、発現量、可溶性などを確認する。

発現用宿主大腸菌、培養および発現誘導条件（培地、培養温度、通気攪拌条件、誘導のタイミング、誘導物質 IPTG の濃度、誘導後の培養条件など）を至適化することにより、発現量や可溶化率を改善できる場合があります。

GST タグ融合タンパク質の精製には、クロンテックの Glutathione-Superflow Resin（製品コード 635607）等の GST アフィニティー精製樹脂が使用できます。

GST タグは、HRV 3C Protease（製品コード 7360）を用いて切断できます。

#### IV. マルチクローニングサイト周辺の塩基配列



プライマー配列  
 pCold-F primer : 5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG  
 pCold-R primer : 5'-GGCAGGGATCTTAGATTCTG

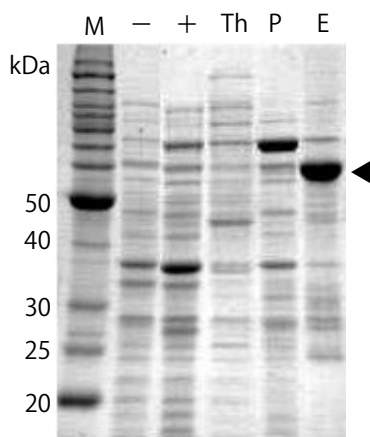
#### V. 実施例

以下の実験データは、大阪大学蛋白質研究所の児嶋長次郎准教授よりご提供いただいたものです。

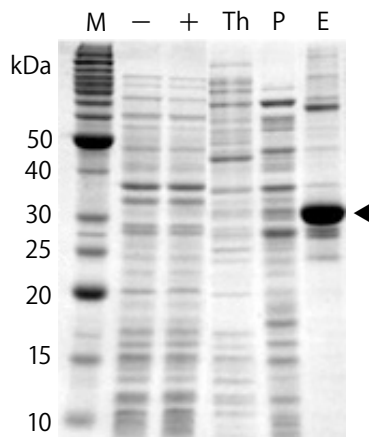
##### (1) GST 融合タンパク質の発現と精製の例

pCold GST DNA に下記の遺伝子配列を挿入し、大腸菌に導入後、使用方法に従って発現誘導を行い、GST 融合タンパク質を発現させた。

その後、GST アフィニティー樹脂を用いて GST 融合タンパク質を精製した。



GST-植物HY2 (286 aa) 融合タンパク質：  
 分子量 (理論値) 約 61.9 kDa

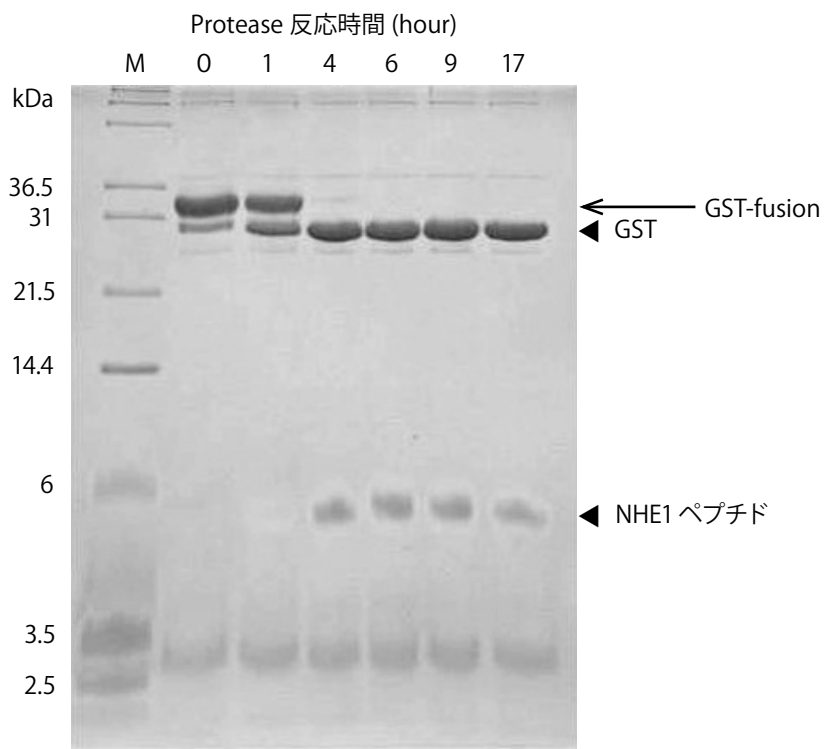


GST-哺乳類NHE1ペプチド (42 aa) 融合タンパク質：  
 分子量 (理論値) 約 34.8 kDa

- : 発現誘導前の菌体破砕液
- + : 発現誘導後の菌体破砕液
- Th : GST アフィニティー精製樹脂非吸着画分
- P : 菌体破砕液不溶性画分
- E : GST アフィニティー精製溶出画分
- ◀ : GST 融合タンパク質

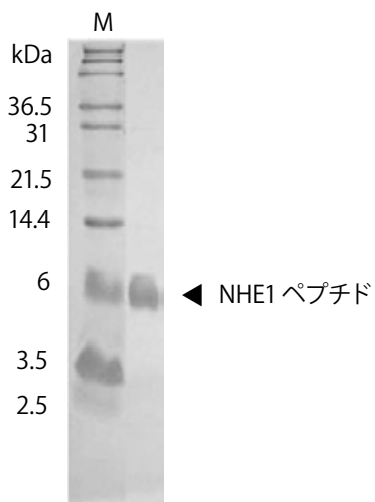
いずれの場合も、発現誘導した GST 融合タンパク質の大部分が溶出画分に得られた。

- (2) GST 融合タンパク質からの GST タグ切断・除去精製の例  
pCold GST DNA を用いて発現させた GST-NHE1 ペプチド融合タンパク質から GST タグを除去するため、HRV 3C Protease による消化を行い、継時変化を追跡した(反応温度 4°C)。



GST-NHE1 ペプチド融合タンパク質からのタグ切断反応

さらに、Protease 消化物の Ni アフィニティー精製画分についてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。



精製した NHE1 ペプチド

Protease 消化によるタグ切断、および、消化物の精製により、高純度に目的産物を得られた。

---

## VI. 参考文献

- 1) Qing G, *et al. Nat Biotechnol.* (2004) **22**: 877-882.
- 2) Hayashi K and Kojima C. *Protein Expr Purif.* (2008) **62**: 120-127.
- 3) 林こころ、児嶋長次郎 実験医学 (2009) **27**: No. 6, 927-932.
- 4) Hayashi K and Kojima C. *J Biomol NMR.* (2010) **48**: 147-155.

## VII. 関連製品

### タンパク質発現・精製関連製品

#### < 目的タンパク質の発現誘導 >

- TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)
- IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (製品コード 9030)

#### < GST 融合タンパク質の精製 >

- Glutathione-Superflow Resin (製品コード 635607/635608)
- GST Purification Kit (製品コード 635619)

#### < His タグ融合タンパク質精製関連試薬 >

- TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin (製品コード 635501 ~ 635504/635652/635653)
- TALON<sup>®</sup> Superflow Metal Affinity Resin (製品コード 635506/635507/635668 ~ 635670)
- HisTALON<sup>™</sup> Superflow Cartridge Purification Kit (製品コード 635649/635681)

#### < pCold ベクターシリーズ >

- pCold<sup>™</sup> DNA シリーズ (製品コード 3360 ~ 3364)
- pCold<sup>™</sup> TF DNA (製品コード 3365)
- pCold<sup>™</sup> ProS2 DNA (製品コード 3371)

### クローニング関連製品

#### < PCR による目的遺伝子の増幅 >

- PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
- PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
- PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)
- Tks Gflex<sup>™</sup> DNA Polymerase (製品コード R060A/B)

#### < 目的遺伝子配列の精製 >

- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

#### < 目的遺伝子配列のベクターへの挿入と形質転換 >

- In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit (製品コード 639633 ~ 639650)
- E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
- E. coli* DH5 $\alpha$  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 $\alpha$  Electro-Cells (製品コード 9027)
- E. coli* JM109 Electro-Cells (製品コード 9022)

#### < 大腸菌からのプラスミド調製 >

- NucleoSpin Plasmid EasyPure (製品コード 740727.10/.50/.250)

## VIII. 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 はタカラバイオ株式会社の、TALON、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。pCold、Tks Gflex はタカラバイオ株式会社の、His-TALON 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**