

製品コード HB121 ~ HB123

研究用

Takara

Brevibacillus 発現システム

His タグ融合発現ベクター

pNC-HisT DNA (製品コード HB121)

pNC-HisF DNA (製品コード HB122)

pNC-HisE DNA (製品コード HB123)

説明書

目次

I.	内容	4
II.	保存	4
III.	<i>Brevibacillus</i> 発現システムの概略	4
	III-1. 発現ベクターの選択	
	III-2. 発現ベクターへのクローニング	
	III-3. <i>Brevibacillus</i> の形質転換	
	III-4. タンパク質生産の確認とスケールアップ	
IV.	使用方法	
	IV-1. <i>Brevibacillus</i> 菌株について	7
	IV-1-1. 遺伝子型	
	IV-1-2. <i>Brevibacillus</i> 組換え体の保存	
	IV-2. <i>E. coli</i> 宿主	8
	IV-3. pNC-His シリーズを用いた発現ベクターの構築	8
	IV-3-1. pNC-His シリーズへのインサートのクローニング	
	IV-3-2. <i>E. coli</i> 組換え体の解析	
	IV-3-3. シーケンス	
	IV-3-4. プラスミドの精製	
	IV-4. <i>Brevibacillus</i> の形質転換	9
	IV-4-1. 準備	
	IV-4-2. NTP 法による形質転換	
	IV-5. <i>Brevibacillus</i> 組換え体を用いた目的タンパク質の発現	10
	IV-5-1. 概略	
	IV-5-2. 培地	
	IV-5-3. 培養生産（分泌生産）	
	IV-6. SDS-PAGE 分析	11
	IV-6-1. サンプルの調製	
	IV-6-2. コントロール	
	IV-6-3. タンパク質発現の解析	
	IV-7. タンパク質生産の至適化	12
	IV-7-1. 生産量が低い場合	
	IV-7-2. 生産が認められない場合	
	IV-8. 目的タンパク質の精製	12
	IV-9. 培地組成	13
V.	実験例	14
VI.	関連製品	15
VII.	参考文献	15
VIII.	注意	16

Brevibacillus (ブレヴィバチルス、*Bacillus brevis*) 発現システムは高効率分泌発現を特長とするタンパク質生産能に優れたシステムです。本菌はグラム陽性の細菌で、タンパク質を大量に分泌生産する特長を有しています¹⁾。この特長を生かし、これまでに多数の異種タンパク質生産に成功してきました。本システムには以下に示すような特長があり、特に分泌タンパク質の生産において能力を発揮しています。

- 大量のタンパク質を菌体外に分泌生産する
- プロテアーゼ活性をほとんど示さない
- 活性型のタンパク質を生産する
- 培養、滅菌が容易
- 遺伝子操作が簡単
- 安全な宿主

本システムによるタンパク質生産実績の一部を表1に示しました。酵素、抗原、サイトカインなどの高発現を達成しており、これらにはすべて活性があることを確認しています。また、バクテリア、古細菌、真核生物由来のタンパク質生産実績もあり、遺伝子の由来にかかわらず、高い実績を有しています。特に、真核生物由来の分泌タンパク質は通常 S-S 結合を介した構造を有しており、他の原核生物の発現系では一般に生産が難しいとされていますが、本宿主においては、分泌生産という特徴から S-S 結合を有するタンパク質でも効率的に生産できることが確認されています。

表1. *B. choshinensis* 宿主—ベクター系による異種タンパク質の発現例

タンパク質	起源	発現量 (g/L)	文献
Enzymes			
α -アミラーゼ	<i>B. licheniformis</i>	3.7	
Sphingomyelinase	<i>B. cereus</i>	3.0	
キシラナーゼ	<i>B. halodurans</i>	0.2	
CGTase	<i>B. macerans</i>	1.5	2)
キトサナーゼ	<i>B. circulans</i>	1.4	
超耐熱性プロテアーゼ	<i>A. pernix</i>	0.1	
超耐熱性ヌクレアーゼ	<i>P. horikoshii</i>	0.7	
PDI	ヒト	1.0	3)
抗原			
表層抗原	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9	
表層抗原	<i>T. pallidum</i>	0.8	
サイトカイン			
EGF	ヒト	1.5	4)
NGF	マウス	0.2	
IFN- γ	ニワトリ	0.5	5)
TNF- α	ウシ	0.4	
GM-CSF	ウシ	0.2	
GH	ヒラメ	0.2	

本宿主は形質転換効率がいため、遺伝子操作を簡単に行うことができます。発現ベクターの構築は、大腸菌とのシャトルベクターを用いて、大腸菌内で行います。

目的タンパク質の培養生産に2種類の培地 (IV-9, 培地組成 参照) を用います。試験管やフラスコを用いて振とう培養を行い、培養上清を遠心分離によって回収することにより、簡単に目的タンパク質を得ることができます。菌体の破碎工程などが必要ないため、遠心による除菌操作で回収した清澄な上清画分から目的タンパク質が得られ、後の精製工程に有利です。

pNC-HisT DNA、pNC-HisF DNA、pNC-HisE DNA は、本システムで目的タンパク質を His タグ融合タンパク質として分泌生産するための発現ベクターです。

I. 内容

pNC-HisT DNA (製品コード HB121)	10 μ g (0.2 μ g/ μ l)
pNC-HisF DNA (製品コード HB122)	10 μ g (0.2 μ g/ μ l)
pNC-HisE DNA (製品コード HB123)	10 μ g (0.2 μ g/ μ l)

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

II. 保存

− 20℃

※適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

III. *Brevibacillus* 発現システム His タグ融合発現ベクターの概略

本製品を用いて、目的タンパク質を分泌生産させるまでの実験の流れを以下に示します。

III-1. 発現ベクターの選択

pNC-HisT DNA、pNC-HisF DNA、pNC-HisE DNA は *Brevibacillus* と大腸菌のシャトルベクターで、分泌発現ベクターである pNCMO2 DNA (製品コード HB112) を部分的に改変しています。pNCMO2 上の分泌シグナルの下流に His タグ配列 (6 × His 配列) とタグの除去のためのプロテアーゼ認識配列が挿入された構造で、pNCMO2 同様大腸菌内で発現プラスミドを構築後、*Brevibacillus* に導入し、発現実験に進むことができます。His タグ配列の後に、pNC-HisT DNA は Thrombin の配列が、pNC-HisF DNA は Factor Xa の配列が、pNC-HisE DNA は Enterokinase の配列が続きます。目的タンパク質に合わせて最適のベクターを選択できます。

pNCMO2 と同じく発現プロモーターには宿主菌の細胞壁タンパク質由来の P2 プロモーターを用いています。P2 プロモーターは大腸菌内では働かないため、目的遺伝子のクローニングに有利です。一方、*Brevibacillus* においては非常に強いプロモーターとして働きます。従って、*Brevibacillus* での効率的なタンパク質生産を行うことができます。しかし、その強力なプロモーター活性のために、形質転換体の生育を妨げてしまう場合があります。このような場合は、プロモーター活性が弱めで宿主内で安定に保たれる pNY326 DNA の使用をご検討ください。(ただし、N 末端への His タグ導入はできません。)

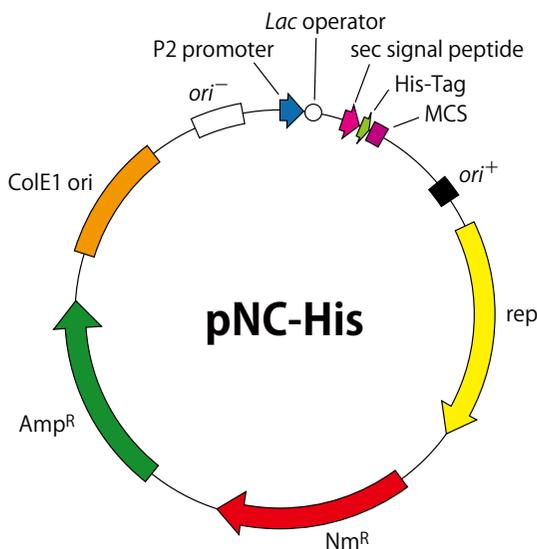


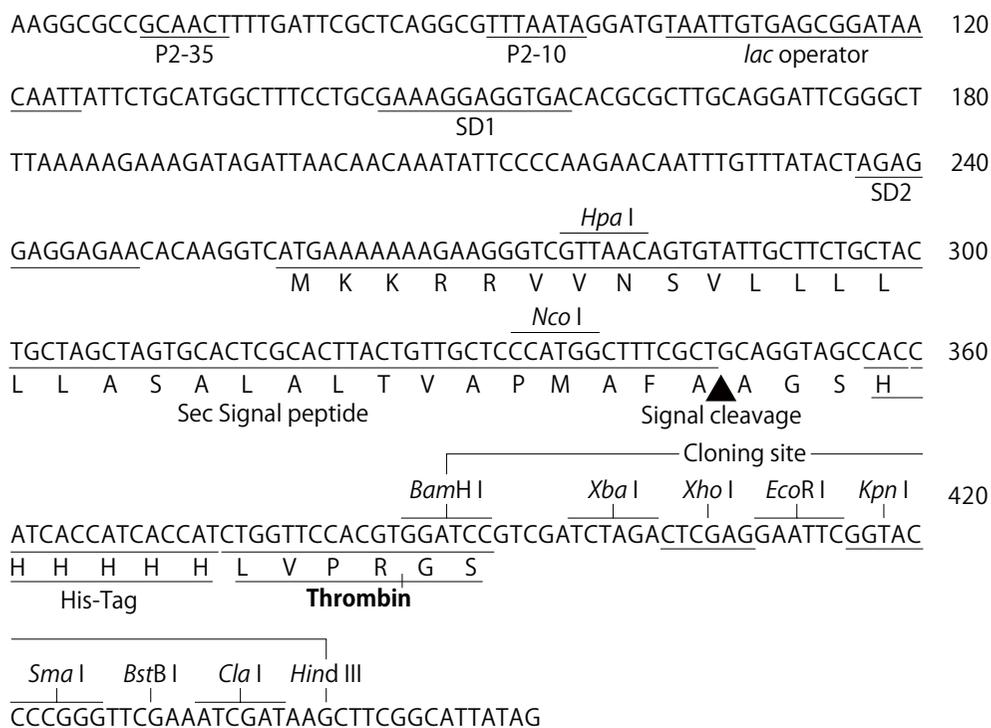
図 1. pNC-His DNA ベクターマップ

pNC-HisT DNA : 5,260 bp
pNC-HisF DNA : 5,260 bp
pNC-HisE DNA : 5,263 bp

< pNC-His シリーズのベクター情報 >

プロモーター (P2 promoter)	細胞壁タンパク質遺伝子の 5' 配列の一部を使用。 大腸菌ではほとんど活性がない。 <i>Brevibacillus</i> 内では強力に発現する。
分泌シグナル	汎用性を高める為、改変型の分泌シグナルを使用
マルチクローニングサイト	9 個の制限酵素切断部位 (次項参照)
His タグ+プロテアーゼ認識配列	Enterokinase (pNC-HisE) Factor Xa (pNC-HisF) Thrombin (pNC-HisT)
ターミネーター	マルチクローニングサイトの下流に 46 bp からなる ターミネーター構造が導入されている。
<i>Rep</i>	プラスミド複製に関わるタンパク質 (pUB110 由来)
<i>Ori</i>	プラスミド複製開始点 (pUB110 由来)
<i>Nm^R</i>	ネオマイシン耐性遺伝子 選択マーカー (<i>Brevibacillus</i>)
<i>ColE1 Ori</i>	pUC の複製開始点
<i>Amp^R</i>	アンピシリン耐性遺伝子 選択マーカー (大腸菌)

< pNC-HisT DNA のクローニングサイト図 >



III-2. 発現ベクターへのクローニング

発現ベクターには細胞壁タンパク質由来の分泌シグナルを採用しています。分泌シグナル、His タグ配列、プロテアーゼ認識サイトの下流に目的遺伝子を挿入するマルチクローニングサイトを設計しています。マルチクローニングサイト上の2種類の制限酵素部位を用いることによってインサートを目的の方向にクローニングできます。

III-3. *Brevibacillus* の形質転換

Brevibacillus の形質転換は NTP 法 (New Tris-PEG 法) によって行います。セクションはネオマイシン耐性によって行います。シャトルベクターを用いて大腸菌でサブクローニングする場合は、アンピシリン耐性によってセクションできます。

III-4. タンパク質生産の確認とスケールアップ

ネガティブコントロールを用い、目的タンパク質の発現を確認します。目的タンパク質発現プラスミドを導入した形質転換体をピックアップし、指定の液体培地で振とう培養することにより、48～64時間で目的のタンパク質が得られます。培養上清を SDS-PAGE 等で解析することにより、発現の有無が確認できます。生産量上げるためには、スケールアップを行ってください。*Brevibacillus* のラージスケールでの培養は比較的容易です。

IV. 使用方法

IV-1. *Brevibacillus* 菌株について

B. choshinensis は GILSP 自動化リストに掲載されている安全性の高い宿主です。遺伝子操作も簡単で、基本的な遺伝子工学的手法を用いることができます。

IV-1-1. 遺伝子型

B. choshinensis SP3 は孢子形成関連遺伝子が破壊されており、滅菌が簡単に行えます。また、わずかに活性を示していた菌体内プロテアーゼ遺伝子 (*imp*)、菌体外プロテアーゼ遺伝子 (*emp*) が破壊されており、生産された目的タンパク質の分解を最小限に抑えています。

IV-1-2. *Brevibacillus* 組換え体の保存

短期間の保存 (1週間程度)

1. シングルコロニーをピックアップし、MTNm プレートに塗抹する。
2. 30℃、一晩培養。
3. プレートをシールし、室温 (20℃前後) にて保存。

【注意】冷蔵保存は厳禁。

長期間の保存 (1ヵ月以上)

1. シングルコロニーをピックアップし、2SYNm 培地 (IV-9. 培地組成 参照) に植菌し、一晩振とう培養する。
2. 等量の LB 培地 (40% グリセロール含む) を添加し、凍結保存用バイアルに分注する。
3. -80℃で凍結保存する。
4. 使用する場合は1本を融解し、そのまま液体培地に植菌する。
植菌の目安：培地液量に対して 0.1～1% の範囲

【注意】凍結融解は最小限とする。

IV-2. *E. coli* 宿主

pNC-His シリーズには、大腸菌内でのプロモーター活性を弱める為、*lac* オペレーターを導入してあります。そのため、F 因子 (*lac I^q*) が組み込まれている JM109 のような宿主を用いる必要があります。参考に JM109 の遺伝子型を以下に示しました。

JM109 : *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K⁻m_K⁺), e14⁻ (mcrA⁻), supE44, relA1, Δ (lac-proAB) /F' [traD36, proAB⁺, lac I^q, lacZ Δ M15]*

IV-3. pNC-His シリーズを用いた発現ベクターの構築

< pNC-His シリーズを用いて発現ベクターを構築する際の手順と注意点 >

プラスミド構築に用いる大腸菌宿主には JM109 のような *lac I^q* を持ち、かつ *recA⁻* の株をお勧めします。

インサートは分泌シグナルと His タグの下流にフレームを合わせてクローニングします。

クローニングする目的遺伝子の最後に stop codon を導入します。

バクテリア由来の分泌タンパク質の発現を行う場合は、オリジナルの分泌シグナルを用いた方が良い結果が得られる場合もあります。この場合は pNY326 ベクターを用いる必要があります (N 末端への His タグは導入はできません)。

IV-3-1. pNC-His シリーズへのインサートのクローニング

< PCR による遺伝子の増幅 >

分泌シグナルの下流に目的遺伝子を挿入できるように、プライマーを設計します。発現ベクターにあわせて 2 種類の制限酵素サイトを PCR 産物の両端に導入し、方向性を持たせ、PCR によって目的遺伝子を増幅させます。PCR 条件はそれぞれの遺伝子や PCR 酵素にあわせて設定してください。PCR には高い正確性をもつ High-Fidelity PCR 酵素 (PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (製品コード R045A) など) をお勧めします。

< ライゲーションによる発現ベクターの構築 >

インサートおよびベクター 0.5 ~ 1.0 μg を 2 種類の制限酵素で処理します。それぞれをアガロースゲル電気泳動し、目的断片を回収・精製します。

精製 DNA をそれぞれ 100 ng 用い、ライゲーション試薬 (DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) など) を用いて反応させます。反応液の 1/5 を用い、大腸菌のトランスフォーメーションを行います。

< In-Fusion[®] クローニングシステムを用いたクローニング >

Clontech 社の 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。In-Fusion クローニングシステムのプロトコールに従って実施してください。

< 大腸菌の形質転換 >

形質転換効率の高いクローニング用の宿主大腸菌を用います。

E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)、*E. coli* JM109 Electro-Cells (製品コード 9022) などをご使用ください。

IV-3-2. *E. coli* 組換え体の解析

形質転換後の混合液 100 ~ 200 μ l を 50 ~ 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレートに播きます。15 ~ 18 時間、37°C で培養します。

アンピシリン耐性のコロニーを 10 ~ 20 個選び、2 ml の LB 培地 (50 ~ 100 μ g/ml のアンピシリンを含む) に植菌します。

37°C で 15 ~ 18 時間培養後、菌体を集めます。市販のキットを用いてプラスミドを抽出します。通常、1.5 ~ 3 μ g の DNA が回収できます。

適量の DNA を用い、制限酵素による切断を行います。通常はクローニングに用いた制限酵素を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動によって、インサートの有無を確認します。

インサートが含まれていることを確認したら、シーケンスを行います。目的の遺伝子が挿入されているか、PCR によりエラーが挿入されていないかを調べる必要があります。

IV-3-3. シーケンス

シーケンスの確認には以下の Forward および Reverse プライマー配列が利用できます。(プライマー配列は pNCMO2、pNY326 とともに共通です。)

Forward Sequencing Primer : 5'-CGCTTGCAGGATTCGG- 3'

Reverse Sequencing Primer : 5'-CAATGTAATTGTTCCCTACCTGC- 3'

IV-3-4. プラスミドの精製

適切なインサートの挿入を確認した大腸菌クローンを適量培養し、市販のキットを用いてプラスミドを抽出・精製します。

IV-4. *Brevibacillus* の形質転換

IV-4-1. 準備

Brevibacillus Competent Cells (製品コード HB116)

(内容) *Brevibacillus* Competent Cells

MT medium

Solution A

Solution B

目的遺伝子発現用プラスミド

ネガティブコントロール用プラスミド (空のベクター)

MTNm プレート

培養用チューブ*

滅菌済みマイクロチューブ

* : 例として、14 ml 丸底滅菌チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) を推奨します。

IV-4-2. NTP 法による形質転換

- (1) Solution A、Solution B、MT 培地を融解しておく。
- (2) *Brevibacillus* Competent Cells を 37°C 温水中で急速解凍 (30 秒程度) する。
- (3) 微量遠心機により集菌 (12,000 rpm、30 秒～1 分) し、上清をマイクロピペットで除去する。

—以下は、室温で操作を行ってください。—

- (4) 5 μ l 以下の量に調製した DNA 溶液*¹ と 50 μ l の Solution A を混合する。
- (5) 混合した DNA 溶液を (3) のチューブに全量加え、ボルテックスにより菌のペレットを完全に懸濁する。*²
- (6) そのまま 5 分間静置する。
- (7) 150 μ l の Solution B (PEG 溶液) を加え*³、液が均一になるまで (5～10 秒) ボルテックスにより混和する。
- (8) 微量遠心機により集菌 (5,000 rpm、5 分) し、上清を除去する。
- (9) 再度、軽く遠心 (5,000 rpm、30 秒程度) し、完全に上清を除去する。
- (10) 1 ml MT 培地を加え、マイクロピペットを使って完全に懸濁する。
- (11) 菌を懸濁した培養液を培養用チューブに移し、37°C、120 rpm で 2 時間振とうする。
- (12) MTNm プレートに播き、37°C で 1 晩培養する。
- (13) 得られたコロニーをプラスミド解析またはタンパク質発現実験に用いる。

* 1 : 10～100 ng の精製プラスミドを使用してください。

* 2 : 菌の分散が不足すると形質転換効率が低下しますので十分に懸濁してください。

* 3 : Solution B (PEG 溶液) は粘性が高いため、1,000 μ l 用のマイクロピペットを使用してゆっくり吸い上げてください。

IV-5. *Brevibacillus* 組換え体を用いた目的タンパク質の発現

発現用宿主が完成したら、小スケールでのタンパク質発現試験を行います。ここでは一般的な発現確認手法を示します。

IV-5-1. 概略

発現用形質転換体の作製を確認したら、ベクターのみのネガティブコントロールと共に発現試験を実施します。

目的のタンパク質によっては形質転換体間で生産性が異なる恐れがあります。また、コロニーの大きさに違いが生じる場合もあります。そこで、発現試験にはランダムに (大小コロニーを含む) 6～10 コロニーを選んで、試験管培養を実施します。形質転換後のプレートを数日放置しますと生産能が低下する恐れがあります。そのような場合は、再度形質転換を行い、新たに形質転換体を調製してください。

IV-5-2. 培地

TM 培地および 2SY 培地を発現試験のベース培地として用います。培地によって生産性に違いが生じる可能性があります。生産性と生育のバランスが重要となりますので、まず、両培地を用いて生産性を確認します。

IV-5-3. 培養生産（分泌生産）

発現クローンと共にネガティブコントロールを培養し、これらの対比によって生産の確認を行います。

以下に発現試験プロトコールを示しました。

- (1) 3 ml の 2SYNm および TMNm 液体培地を分注した試験管（φ 16 mm）にシングルコロニーを選び、植菌する。30～33℃、120 rpm、48～64 時間振とう培養を行う。十分に通気が行えるようにキャップを緩め、試験管の傾きを調整する。この際、24 時間ごとにサンプリングし、目的タンパク質の生産を確認する。
- (2) 培養終了後、遠心分離（5,000 × g、5 分間）によって上清画分を分離する。沈殿画分は等量の PBS * で懸濁する。
- (3) 培養上清および沈殿画分について、SDS-PAGE（CBB 染色または Western blotting）や活性測定によって評価を行う。

*：PBS Tablets（製品コード T900）を用いて調製すると便利です。

IV-6. SDS-PAGE 分析

目的タンパク質の分離に適した SDS-PAGE 用のゲルを用い、電気泳動を行います。

IV-6-1. サンプルの調製

培養上清および沈殿懸濁液 40 μl に 10 μl の 5 × SDS-PAGE ローディングバッファーを加えます。

混合後、100℃、10 分間加熱処理し泳動用サンプルとします。

IV-6-2. コントロール

コントロールとして以下のサンプルを用います。

- a. 分子量マーカー
- b. 目的タンパク質スタンダード
- c. インサートを含まない発現用ベクターを導入した *B. choshinensis* SP3 の培養液サンプル（バックグラウンドコントロール）

IV-6-3. タンパク質発現の解析

目的タンパク質のスタンダードと培養上清を SDS-PAGE ゲル上で比較することにより生産の有無を確認することができます。生産性が低い場合、可溶性が低い場合、バックグラウンドタンパク質にマスクされてしまっている場合などは検出が難しい場合があります。このような場合は、目的タンパク質特異的抗体を用いたウェスタンブロットティングや機能性の評価（活性測定など）、特別な精製方法がある場合などは精製を実施し、生産性の確認を行ってください。

発現ベクターとして pNC-His シリーズを用いた場合は、抗 His タグ抗体によるウェスタンブロットティングでの目的タンパク質の検出が可能です。

IV-7. タンパク質発現の至適化

これまで、タンパク質発現にトライしてきた結果によると、30～40%の確率で発現に成功しています。いくつかは1 mg/mlを超える高発現を達成しており、大部分は100 µg/ml以上の生産性を示しています。もし、これらと比較して生産性が低いか、または生産が認められない場合は以下のガイドラインをご参照ください。

IV-7-1. 生産量が低い場合

- プロモーター活性を変えるために両方のベクター（pNC-His シリーズまたは別売のpNY326）を試してみてください。pNC-His シリーズのように、プロモーター活性が高いほうが生産性が良い場合もあります。または、pNY326のように弱めのプロモーター活性のベクターを用い、菌の生育が改善されることにより生産性が向上する場合もあります。
- 異なるタイプの培地を用いてみてください。培地の種類によって生産性に違いが生じることがあります。
- プラスミドのコピー数をコントロールと比較してみてください。著しくコピー数が減少している場合は、pNY326 ベクターを用いたり、培地を変更したり、抗生物質濃度を上げてみる（400 µg/ml）などの策を試してみてください。
- 目的タンパク質が分泌生産に適さない場合がありますので、そのような場合はpNI シリーズの菌体内発現用ベクターを用い、菌体内発現にトライしてみてください。微量の生産しか得られない場合は、硫酸沈殿や限外膜による濃縮を試みてください。

IV-7-2. 生産が認められない場合

「生産量が低い場合」と同様の試験を行ってみてください。それでも改善されない場合は以下のような可能性が考えられます。

- mRNA の 2 次構造を確認してみてください。高エネルギーのパリンドローム構造を有する場合は翻訳に異常をきたす場合があります。このような場合は、リピート配列上に変異を導入し、スタッキングを解除する必要があります。
- シグナル切断部位近傍の配列が不適な場合、分泌生産に影響を及ぼす場合があります。N 末端に付加配列を設けても目的タンパク質の活性に問題がない場合は、精製タグや検出タグを導入したり、PCR によってランダムな配列を導入し、高発現の配列をスクリーニングするなどのアプローチが考えられます。

IV-8. 目的タンパク質の精製

精製方法は目的タンパク質の種類によって、それぞれ異なります。目的タンパク質が分泌生産された場合は、除菌操作によって、清澄な液を得る事ができるため、後の精製に有利です。pNC-His シリーズを使った場合、TALON® Metal Affinity Resin（製品コード 635501）や His60 Ni Superflow Cartridges（製品コード 635675）などの市販の His タグ融合タンパク質精製樹脂を用いることにより簡単に目的タンパク質を精製することができます。また、精製後付加された His タグを除去したい場合には、それぞれの認識配列に対応したプロテアーゼ（Enterokinase、Factor Xa または Thrombin）で処理することにより容易に目的を達することができます。His タグ融合タンパク質精製樹脂による精製及びプロテアーゼ処理の条件についてはそれぞれの製品に添付された使用マニュアルをご参考にしてください。

なお、2SY 培地で培養したサンプルを直接 Ni-chelate カラムにアプライすると Ni が担体から脱落する場合がありますのでご注意ください。この場合はサンプルを透析後、カラムにアプライすると問題なく精製できます。なお、Ni Sepharose Fast Flow（GE ヘルスケア社）を用いた場合は、サンプルの透析なしでも精製が可能です。

IV-9. 培地組成

- 2SY 液体培地

成分

グルコース*	20.0 g/L
Bacto Soytone	40.0 g/L
BactoYeast Extract	5.0 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.15 g/L

NaOH で pH7.2 に調整する。

*：グルコースと CaCl₂ は混合し、培地とは別に滅菌をしてください。滅菌後に混合してください。

- 2SY Nm 液体培地

ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μg/ml になるように 2SY 液体培地に添加してください。

- TM 液体培地

成分

グルコース*	10.0 g/L
ファイトンペプトン	10.0 g/L
35%エルリッヒ カツオエキス	5.75 g/L
酵母エキス 青ラベル	2.0 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg/L

NaOH で pH7.0 に調整する。

*：グルコースと培地は別滅菌してください。滅菌後に混合してください。

- TMNm 液体培地

ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μg/ml になるように TM 液体培地に添加してください。

- MT 液体培地

MgCl₂ を 20 mM になるように TM 液体培地に添加してください。

- MTNm プレート

500 ml の MT 液体培地に 7.5 g の寒天を懸濁し、オートクレーブで滅菌してください。約 50°C まで放冷後、ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μg/ml になるように添加し、緩やかに混合後、プレートに分注します。

2SY 液体培地、TM 液体培地の下記の成分については、下記のメーカーの製品をご利用ください。

Bacto Soytone	(Becton Dickinson 社、Code. 243620)
Bacto Yeast Extract	(Becton Dickinson 社、Code. 212750)
ファイトンペプトン	(Becton Dickinson 社、Code. 211906)
35% エルリッヒ カツオエキス	(極東製薬、Code. 551-01212-5)
酵母エキス 青ラベル	(オリエンタル酵母工業)

V. 実験例：pNC-HisT を用いた *Bacillus licheniformis* 由来 α アミラーゼ (BLA) の発現と精製

pNC-HisT に BLA 遺伝子を導入し、TMNm 培地を用いて試験管スケールで発現試験(30℃、48 時間)を行い、SDS-PAGE 分析を行ったところ、培養上清に約 0.2 mg/ml の高生産が確認された(図 2)。次に、遠心分離により培養上清を回収し、TALON Metal Affinity Resin を用いて His タグ融合 BLA の精製を行い、SDS-PAGE 分析を行った(図 3A)。その結果、ほぼ 100% の回収率での高純度精製を確認できた。続いて Thrombin プロテアーゼ消化を行い、SDS-PAGE での移動度の変化から His タグが除去されたことを確認した(図 3B)。なお、ウェスタンブロットリングで His タグ抗体に反応しないことも確認している(データ省略)。

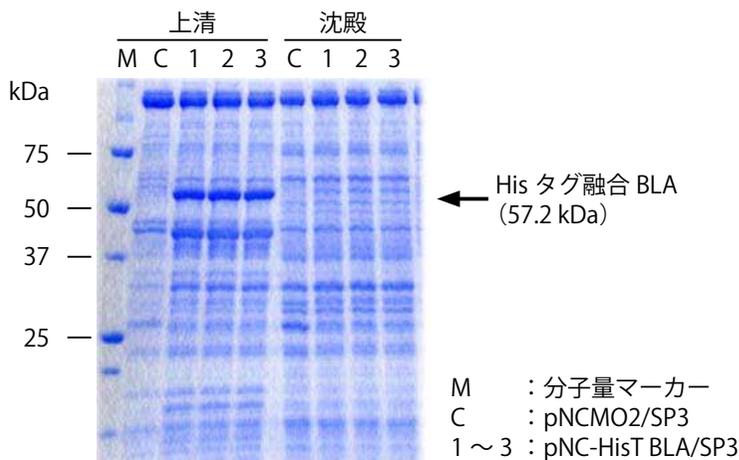
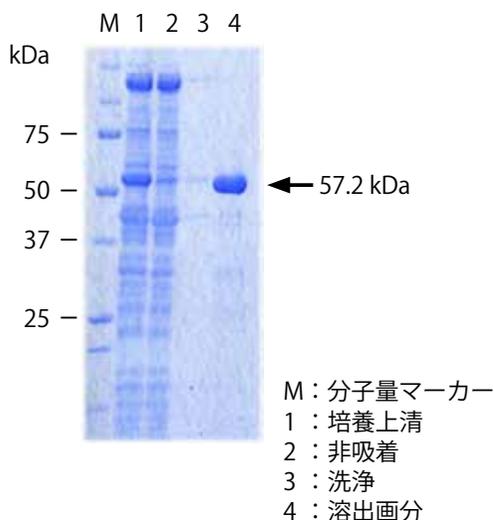


図 2. pNC-HisT を用いた α アミラーゼ (BLA) の分泌発現

A. TALON 樹脂精製



B. His タグ除去

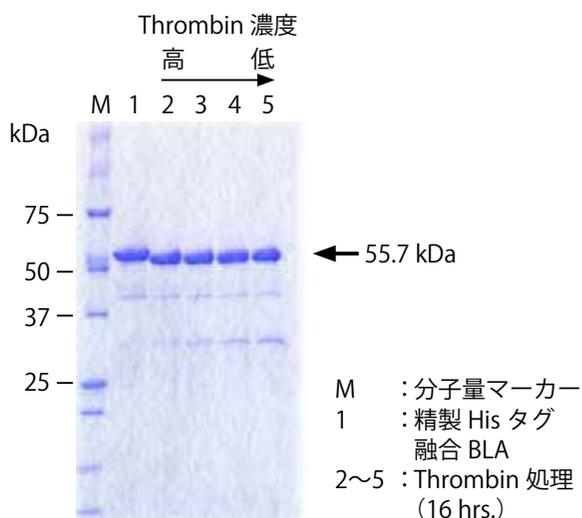


図 3. pNC-HisT で発現させた α アミラーゼ (BLA) の精製

pNC-HisF、pNC-HisE を用いて BLA を発現・精製し、さらに Factor Xa または Enterokinase で消化を行った場合も、図 2、図 3 と同様の良好な結果が得られた(データ省略)。

VI. 関連製品

[ブレビバチルス分泌発現システム]

BIC System (製品コード HB300)
pBIC DNA Set (製品コード HB310)
Brevibacillus Expression System II (製品コード HB200)
Brevibacillus Competent Cells (製品コード HB116)
pNCMO2 DNA (製品コード HB112)

[菌体内発現ベクター]

pNI DNA (製品コード HB131)
pNI-His DNA (製品コード HB132)

[His タグ融合タンパク質精製]

HisTALON™ Superflow Cartridge Purification Kit (製品コード 635649)
HisTALON™ Superflow Cartridges (製品コード 635650)
HisTALON™ Buffer Set (製品コード 635651)
TALON® Metal Affinity Resin (製品コード 635501/635502/635503/635504)
His60 Ni Superflow Cartridges (製品コード 635675/635680/635679)

[その他]

In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 など)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
E. coli JM109 Electro-Cells (製品コード 9022)
DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023)
PrimeSTAR® MAX DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
PBS Tablets (製品コード T900)

VII. 参考文献

- 1) H. Takagi, K. Kadowaki, and S. Udaka. Screening and Characterization of Protein-Hyperproducing Bacteria without Detectable Exoprotease Activity. *Agric Biol Chem.* (1989) **53**(3): 691-699.
- 2) T. Takano, A. Miyauchi, H. Takagi, K. Kadowaki, K. Yamane, and S. Kobayashi. Expression of the Cyclodextrin Glucanotransferase Gene of *Bacillus macerans* in *Bacillus brevis*. *Biosci Biotech Biochem.* (1992) **56**(5): 808-809.
- 3) H. Tojo, T. Asano, K. Kato, S. Udaka, R. Horinouchi, and A. Kakinuma. Production of Human Protein Disulfide Isomerase by *Bacillus brevis*. *J Biotechnol.* (1994) **33**(1): 55-62.
- 4) H. Yamagata, K. Nakahama, Y. Suzuki, A. Kakinuma, N. Tsukakoshi, and S. Udaka. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1989) **86**: 3589-3593.
- 5) K. Yashiro, J. W. Lowenthal, T. E. O'Neil, S. Ebisu, and H. Takagi. High-Level Protein Production of Recombinant Chicken Interferon- γ by *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Expression and Purification.* (2001) **23**: 113-120.

VIII. 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。
- 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。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。

※本製品はヒゲタ醤油株式会社が開発・製造し、タカラバイオ株式会社が販売しています。

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