

Q&A

◆◆◆ 大腸菌コールドショック発現系(発現・精製)特集 ◆◆◆

Q1 pCold® DNA を用いて発現したタンパク質が不溶化した。何を検討したらいいか？

最適な培養条件、誘導条件は目的タンパク質によって異なります。誘導のタイミング(対数期初期～対数期後期)、IPTG濃度(0.1～1 mM)、15℃での培養時間(12～48時間；通常24時間が最適)などの検討で発現が改善する場合がありますが、発現タンパク質の不溶化に対しては、宿主大腸菌やベクターの変更や抽出方法の検討が有効な手段となります。以下の点を参考にご検討ください。

・ベクターの種類を変更：

トリガーファクター(TF)またはProtein S由来の可溶性タグ(ProS2)と融合発現を行うpCold® TF DNA(製品コード 3365)やpCold® ProS2 DNA(製品コード 3371)が有効です。

・シャペロンの利用や宿主大腸菌の変更を検討：

Chaperone Plasmid Set(製品コード 3340)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™ 2など)をお試しください。

・抽出方法を変更：

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)を加えて超音波処理を行うのも有効です。

Q2 pCold® DNA シリーズの選択基準は？

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。Hisタグ配列をもつpCold® I、II DNA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末端に余分なアミノ酸配列が付加される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、可溶性タグと融合発現を行うpCold® TF DNAやpCold® ProS2 DNAをお試しください。

Q3 Chaperone Plasmid Setを利用した共役発現を検討する場合、5種類あるシャペロンプラスミドの選択の目安は？

シャペロンとの相性は目的タンパク質によって異なりますので、5種類すべてで検討を行うことをお勧めします。しかしながら、pCold® ベクターを用いた発現系では、通常、tig配列を含むシャペロンチームとの共役発現でより良い結果が得られる傾向があります。まず、pG-Tf 2またはpTf16との共役発現からご検討ください。

Q4 pCold® DNA とシャペロンプラスミドとの共役発現系から、発現したシャペロンを除く方法は？

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。

Q5 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？

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 Cell 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 Cell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T7 RNAポリメラーゼの溶原菌であり、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。

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/ref_info.asp?unitid=U100004327

Q6 誘導のため、37℃から15℃に冷却するが、温度は急に下げたほうがいいか？

37℃から15℃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℃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℃に達した後、さらに30分間放置してください。

Q7 pCold® TF DNAで融合発現させた目的タンパク質で、プロテアーゼ処理後のSDS-PAGEでは切断が確認できたにも関わらず、目的タンパク質からTFタグが離れない。

目的タンパク質の性状によっては、プロテアーゼで切断後も目的タンパク質とTFタグが相互作用するケースがあります。不溶性になりやすいタンパク質では特にこの傾向が強いです。解決法としては、切断時に可溶性度を改善する試薬を加えることが考えられます。候補には1% Triton X-100、0.5 M アルギニン、5 mM DTT、20 mM CHAPSなどがあります。万能な条件はありませんので、目的タンパク質にあわせてご検討ください。ただ、目的タンパク質とTFの相互作用が強固な場合は、両者が解離せず、目的タンパク質を単離できないこともあります。

なお、Protein S由来のProS2可溶性タグをもつpCold® ProS2 DNAでは、ProS2タグと目的タンパク質との相互作用が弱いため、プロテアーゼ処理後の目的タンパク質とProS2タグの分離が比較的容易です。

Q8 pCold® TF DNAやpCold® ProS2 DNAで発現した融合タンパク質を用いて抗体作製を行いたい？

抗体作製用タンパク質の発現にはpCold® ProS2 DNAをご利用ください。ProS2融合タンパク質をウサギに免疫し、抗血清を調製することも可能ですが、プロテアーゼでProS2タグを切断した目的タンパク質を抗原として利用することをお勧めします。

一方、TF融合タンパク質をウサギに免疫すると、抗血清がTFタグに対して非常に強い反応性を示す場合があります。TF融合タンパク質に対する抗体を調製する場合には、免疫動物としてモルモットの使用をお勧めします。

プロテアーゼ処理でTFタグを切断し、タグを含まない目的タンパク質を精製すれば、ウサギへの免疫にも使用できますが、Q7のようにTFタグの除去が難しい場合がありますのでご注意ください。

Q9 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。

Clontech社のIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (製品コード 639616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に簡単・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やpCold® ProS2 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。

Q10 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？

Clontech社のTALON®レジンはCo²⁺ベースのレジンで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⁺ベースのレジンで、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。

pCold® DNAシリーズのご購入に際してはライセンス確認書の提出が必要です。

(詳細はタカラバイオウェブサイトをご覧ください)

TakaRa テクニカルサポートライン
製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。
Tel. 077-543-6116 Fax. 077-543-1977