

Cold Shock 発現ベクター

- 改訂版 -



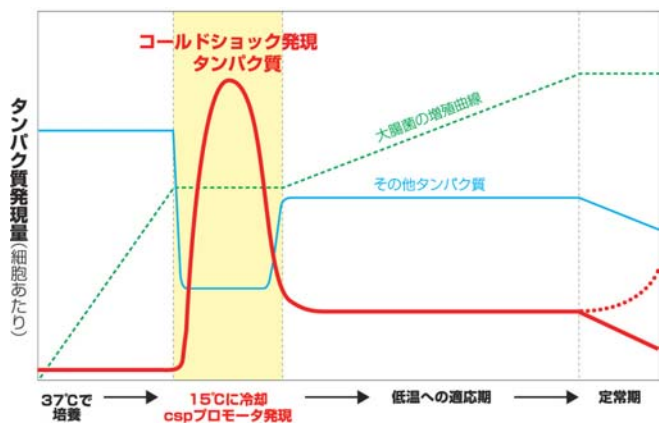
タンパク質可溶化発現の
切り札

発現タンパク質の不溶化でお困りではありませんか？

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的に停止し、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。

大腸菌のコールドショック応答



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OD₆₀₀が0.4 ~ 0.5となった時点で培養液を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

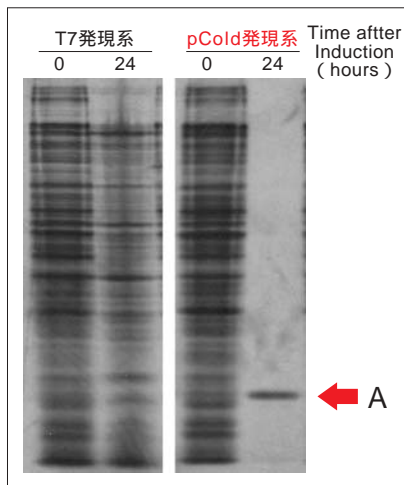
最適な培養・誘導条件(培地、培養温度、通気攪拌条件、誘導のタイミング、誘導物質の濃度、誘導後の培養時間)は目的タンパク質によって異なりますので、必要に応じて条件検討を行ってください。

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い発現が可能

低温培養により大腸菌由来のタンパク質発現は低下するため、目的タンパク質発現の割合が高く、最大で新生タンパク質の90%に達します。
目的タンパク質の精製が容易になり、また同位体標識に利用すると効率的なラベリングが可能です(図1)。

図1 パルスラベルによる標識例
ヒト遺伝子A(約12 kDa)



高い生産効率

低温培養のため夾雑プロテアーゼ等の活性が低く、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。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ます。

可溶性発現が向上

低温発現により、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ケースが数多く見られます(図2,3)。

Chaperone PlasmidやChaperone Competent Cellとの併用でさらに可溶性発現が向上します。

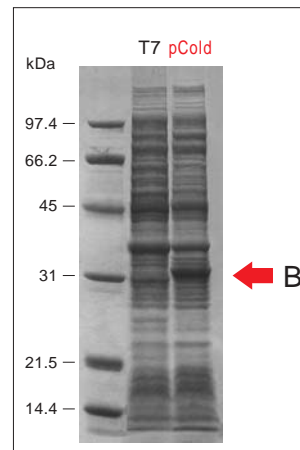


図2 発現が可能となった例
ヒト遺伝子B(約31 kDa)
(全タンパク質画分のCBB染色)

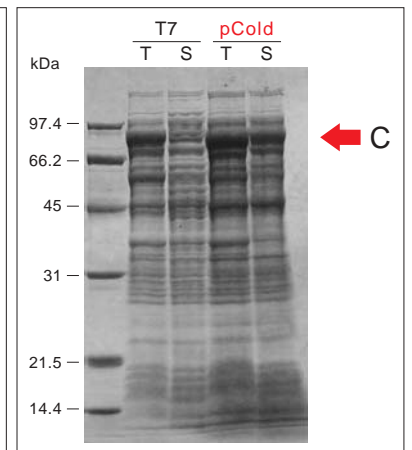


図3 可溶性発現量が増大した例
ヒト遺伝子C(約80 kDa)
(T:全タンパク質画分、S:可溶性画分)

是非、コールドショック発現系をお試しください!

各ベクターの特長

コールドショック発現ベクターには、TEE配列¹⁾、Hisタグ配列、Factor Xa切断配列の有無が異なる4種類のベクター(pCold® I~IV DNA)と、上記配列に加えて可溶性タグ配列(Trigger Factor²⁾またはProtein S³⁾)を搭載したpCold® TF DNAおよびpCold® ProS2 DNAがあります。ベーシックなpCold® I~IV、最大級の可溶性発現が期待できるpCold® TF DNA、可溶性発現の増大と切断後のタグの効率的分離が可能なpCold® ProS2 DNAまで、目的に合わせて最適なベクターを選択してください。

1) translation enhancing elementの略称で、翻訳を促進する機能を有します。

2) 大腸菌シャペロンの研究から発見されたタンパク質で、リボソームに結合して翻訳開始時に働き、タンパク質のフォールディング・可溶化を促進します。

3) グラム陰性の粘液細菌 *Myxococcus xanthus* 由来のタンパク質で、融合タンパク質の安定性、可溶性の向上が期待できます。発現ベクターでは、本タンパク質のN-terminal domainをタンデムに2つ繋いだProS2を可溶性タグとして使用しています。

製品名	GenBank Accession No.	Trigger Factor	Protein S 配列	TEE 配列	Hisタグ 配列	Factor Xa 切断配列
pCold® TF DNA	AB213654		×			
pCold® ProS2 DNA	-	×				
pCold® I DNA	AB186388	×	×			
pCold® II DNA	AB186389	×	×			×
pCold® III DNA	AB186390	×	×		×	×
pCold® IV DNA	AB186391	×	×	×	×	×

pCold® ProS2 DNA についての詳細は、別途チラシまたは弊社ウェブサイトをご覧ください。

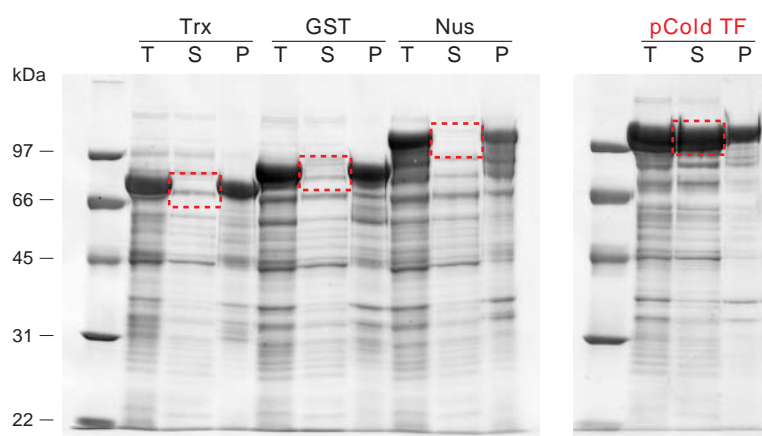
Trigger Factorを融合して発現! 可溶性率がさらに大幅アップ!

pCold® TF DNA

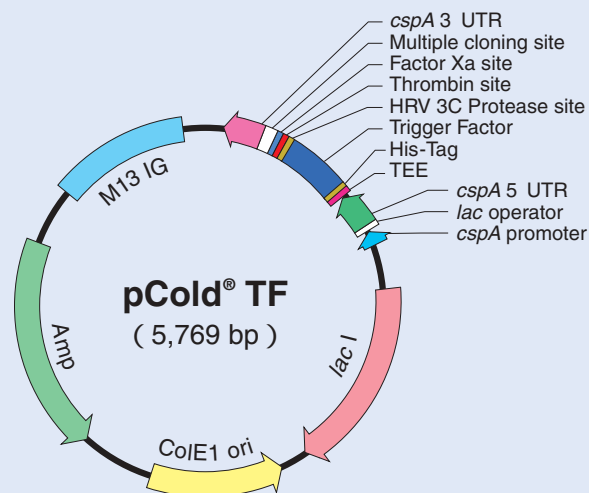
Pick up!

Trigger FactorをN末端側に融合して発現することで、タンパク質の正しい折りたたみを促進します(シャペロン効果)。コールドショック発現系との相乗効果で可溶性が大幅に向上した最も発現効率・可溶性発現確率の高いベクターです。

pCold® TF DNAにより可溶性が向上した実験例



T : 全タンパク質画分 S : 可溶性画分 P : 不溶性画分
 Trx : Trxタグを付加したT7発現系
 GST : GSTタグを付加したT7発現系
 Nus : Nusタグを付加したT7発現系
 pCold TF : 本製品



製品リスト

製品名	製品コード	容量	価格(税別)
pCold® TF DNA	3365	25 µg	¥99,000
pCold® ProS2 DNA	3371	25 µg	¥96,000
pCold® I DNA	3361	25 µg	¥50,000
pCold® II DNA	3362	25 µg	¥50,000
pCold® III DNA	3363	25 µg	¥50,000
pCold® IV DNA	3364	25 µg	¥50,000
pCold® Vector Set	3360	pCold® I~IV 各5 µgのセット	¥101,000

使用上の注意

pColdベクターはNew Jersey医科大学よりライセンスを受け、タカラバイオ(株)が製造、販売しています。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の際は、別途、商業利用契約を締結します。

また、本製品、その構成部分またはその誘導体、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)できません。

製品ご購入に際しては、ライセンス同意書に必要事項を記入の上、ご注文の際に弊社特約店までお渡しください。本同意書が添付されていない場合は製品の出荷ができませんのでご注意ください。詳しくは弊社ウェブサイトをご覧ください。

ライセンスに関するご質問は、タカラバイオ(株)営業部 営業企画担当(TEL: 077-543-7231 FAX: 077-543-9254)にお問い合わせください。

関連製品

シャペロン共発現コンピテントセル* およびシャペロンプラスミドセット

* シャペロンプラスミドセットに含まれる5種類のシャペロンプラスミドでそれぞれ形質転換した大腸菌BL21株のコンピテントセルです。目的タンパク質を共発現させることにより、発現タンパク質の可溶化を促進できます。コールドショックベクターシリーズと組み合わせてご使用いただくと一層効果的です。

製品名	製品コード	容量	価格(税別)
Chaperone Competent Cells BL21 Set	9120	100 µl × 3本 × 6種類	¥62,000
Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21	9121	100 µl × 10本	¥31,000
Chaperone Competent Cell pGro7/BL21	9122	100 µl × 10本	¥31,000
Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21	9123	100 µl × 10本	¥31,000
Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21	9124	100 µl × 10本	¥31,000
Chaperone Competent Cell pTf16/BL21	9125	100 µl × 10本	¥31,000
TaKaRa Competent Cell BL21	9126	100 µl × 10本	¥31,000
Chaperone Plasmid Set	3340	1キット	¥21,000

Chaperone Plasmidおよびその関連製品ご購入に際しては、ライセンス同意書に必要事項を記入の上、ご注文の際に弊社特約店までお渡しください。本同意書が添付されていない場合は製品の出荷ができませんのでご注意ください。詳しくは弊社ウェブサイトをご覧ください。

* This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,981,280, 6,686,174, 6,333,191 and their foreign counterpart patent claims, assigned to the UMDNJ. This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 6,479,260, 6,897,042 and their foreign counterpart patent claims.

* This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,284,933, 5,310,663 and their foreign counterpart patent claims. Protein Purification Technology of His Tag used in some of pCold vectors is licensed from Hoffmann La Roche, Inc., Nutley, NJ and/or Hoffmann La Roche Ltd., Basel, Switzerland and is provided only for the use in research. Information about licenses for commercial use is available from QIAGEN GmbH, Qiagen Strasse 1, D 40724 Hilden, Germany.

* This product is the subject of the pending U.S. patent application and its foreign counterparts.

* This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 6,479,260 and its foreign counterpart patent claims.

* 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。

* 本パンフレットの内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。 ・本パンフレット記載の価格は2009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

東日本販売課 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

西日本販売課 TEL 077-543-7297 FAX 077-543-7293

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

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店