

PRODUCT INFORMATION

English version

商品名 : pET Expression pack (pETIK)
商品番号 : DS255IK
構成物 :



構成物	商品番号	容量
pET Expression vector pETIK	DV235	15 μ g (TE バッファーの塩を含むプラスミドの凍結乾燥物)
DynaCompetent Cells Zip BL21(DE3)	DS255	3 本 (100 μ l/チューブ) 形質転換効率: 2×10^6 cfu/ μ g (pUC19)

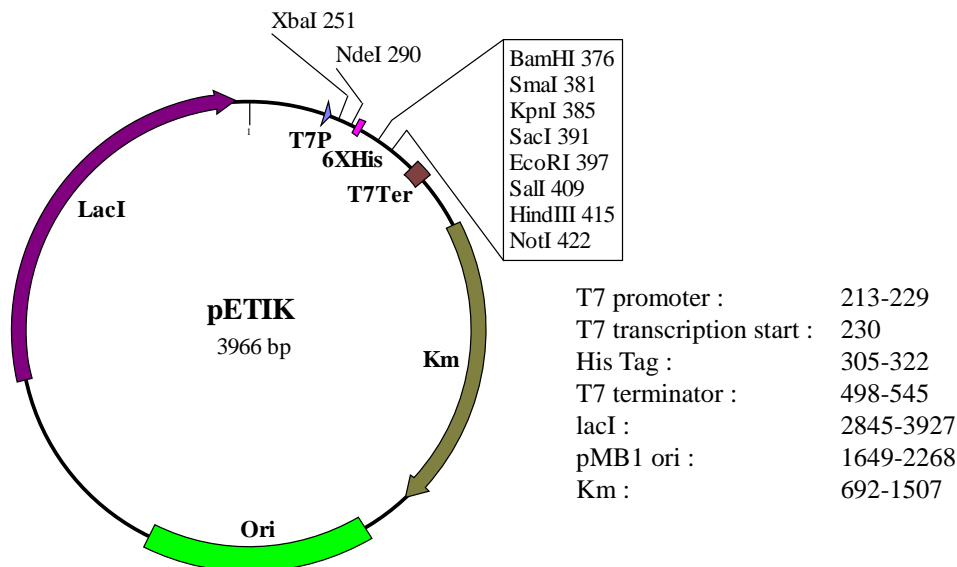
保存条件 : -80°C

製品概要:

1) pET Expression vector pETIK

pETIK は中程度のコピー数、カナマイシン耐性で、厳密に T7 発現系を制御できるベクターです。T7 発現系は最も強力な発現系の一つで、大腸菌 BL21 (DE3)株と組み合わせて広く利用されています。BL21(DE3)のゲノムには T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が挿入されており、これは lacUV5 プロモーターの制御下にあります。isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG)の存在下で T7 RNA ポリメラーゼは発現し、pETIK の T7 プロモーターからの高レベルの転写を誘導します。また、pETIK は lacI 遺伝子を有しており、IPTG の非存在下での T7 RNA ポリメラーゼの活性を阻害します。このように、lac リプレッサーは IPTG 非存在下での目的タンパク質の発現を抑制します。

| プラスミドマップ:



| 再溶解 :

pETIK 凍結乾燥品を 15 μ l の滅菌水で溶解してください。1 μ g/ μ l プラスミド(1 \times TE バッファー)となります。
 溶解後は -20°C 以下で保管してください。

Ver. 2.1

PRODUCT INFORMATION

| T7 発現ベクターの特徴

弊社では 6 種類の T7 発現ベクターを取り扱っています。これらのベクターは同じマルチクローニングサイトをもち、それぞれ以下のような特徴を有しています:

	コピー数	レプリコン	耐性	用途
pETUA	高	pUC	アンピシリン	毒性の無いタンパク質
pETBA	中	pMB1	アンピシリン	一般的な発現
pETIA	中	pMB1	アンピシリン	lac リプレッサーによる厳密な制御
pETUK	高	pUC	カナマイシン	毒性の無いタンパク質
pETBK	中	pMB1	カナマイシン	一般的な発現
pETIK	中	pMB1	カナマイシン	lac リプレッサーによる厳密な制御

2) DynaCompetent Cells Zip BL21(DE3)

Zip Competent Cell BL21(DE3)は短時間で形質転換ができるコンピテントセルです。ヒートショックやヒートショック後の培養は不要で、形質転換作業は約 5 分で終了します。

大腸菌株 BL21(DE3)はタンパク発現に用いられる最も一般的な大腸菌株の一つです。BL21(DE3)は BL21 株の染色体に λ DE3 遺伝子が組み込まれた大腸菌株で、 λ DE3 遺伝子上には *lacUV5* プロモーターの制御下に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が配置されています¹⁾。BL21(DE3)株に目的のタンパク質遺伝子を組み入れた T7 プロモーター発現ベクターを導入すると、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 添加で、*lacUV5* プロモーターにより T7 RNA ポリメラーゼが誘導され、この T7 RNA ポリメラーゼが T7 プロモーターからの目的タンパク質遺伝子の転写を引き起こし、目的タンパク質の強力な発現がおこなわれます。¹⁾ BL21(DE3)は大腸菌 B 株由来の菌株であり、発現タンパクを劣化させる *lon* プロテアーゼや *ompT* 外膜エンドプロテアーゼを有していません。

| 大腸菌株 BL21(DE3)の遺伝子型 :

$F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal dcm \lambda$ (DE3) (λ (DE3): *lacI*, *lacUV5-T7 gene 1*, *ind1*, *sam7*, *nir5*)

| Zip Competent Cell BL21(DE3)の保存条件 :

-80°Cで保管してください。納品から12カ月間は形質転換効率の低下はありません。
コンピテントセルは温度の変化によって品質が低下します。納品時にはドライアイス同梱の容器から直接 -80°Cの冷凍庫に移してください。

| コンピテントセルの取り扱いについて:

- ・ コンピテントセルは機械的刺激に弱いため、過度の攪拌はしないでください。
- ・ コンピテントセルを氷上で融解し、放置すると、形質転換効率は徐々に低下します。形質転換はコンピテントセルを氷上で融解した直後に行ってください。
- ・ 融解後に再凍結したコンピテントセルの使用は推奨されません。

| Zip Competent Cell BL21(DE3)の品質検査:

0.2 ng のスーパーコイル状態の pUC19 プラスミドを用いて、p2 に示す形質転換法により形質転換を実施。その後 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレートに塗布し、37°Cで一晩インキュベート。得られたコロニー数により形質転換効率は 2×10^6 CFU/ μ g 以上であることを確認しています。

PRODUCT INFORMATION

Product Usage

| pETIK への遺伝子クローニング:

組み換えタンパク質を正しく発現させるために、目的の遺伝子を pETIK の N 末端ペプチドと同じフレームで繋ぐことが必要です。pETIK の開始コドンは下記マルチクローニングサイトで **ATG** で示されています。

pETIK を適切な制限酵素で完全に切断し、挿入遺伝子とのライゲーションに用いてください。使用する制限酵素が 1 つの場合、ベクターの脱リン酸化を推奨します。ライゲーションの方法については市販のライゲース等のプロトコルに従ってください。ライゲーション後の形質転換には発現用ではない大腸菌株(DH5α や JM109 等)を用いてください。形質転換後の大腸菌は 15-25 μg/ml のカナマイシンを含む LB プレートで選択してください。高濃度のカナマイシンは大腸菌の生育を遅らせることがあります。得られたクローンはコロニーPCR、精製プラスミドの制限酵素処理等で遺伝子の挿入を確認してください。また、得られたプラスミドのシーケンス確認が推奨されます。

```

                T7 promoter                                XbaI
GATCCCGCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAAAT 259
AspProAlaL ysLeuIleAr gLeuThrIle GlyArgProG lnArgPhePr oSerArgAsn
                NdeI                                6×His
AATTTTGT TTT AACTTTAAGA AGGAGATATA CATATGCGGG GTTCTCATCA TCATCATCAT 319
AsnPheVal* **Leu***Gl uGlyAspIle HisMetArgG lySerHisHi sHisHisHis
                EK                                BamHI
CATGGTATGG CTAGCATGAC TGGTGGACAG CAAATGGGTC GGGACGATGA CGATAAGGAT
379
HisGlyMetA laSerMetTh rGlyGlyGln GlnMetGlyA rgAspAspAs pAspLysAsp
                KpnI                                EcoRI                                SalI                                NotI
CCCCGGGTAC CGAGCTCGAA TTCGATTTTCG TCGACAAGCT TAGCGGCCGC CGTTTAATCC 439
                SmaI                                SacI                                HindIII
ProArgValP roSerSerAs nSerIleSer SerThrSerL euAlaAlaAl aVal***Ser
```

EK: Enterokinase recognition sequence (AspAspAspAspLys↓)

ATG: start codon

TAA: stop codon

pETIK のマルチクローニングサイト

| pETIK の配列

DNA 配列は弊社ウェブサイトで取得いただけます。



https://www.biodynamics.co.jp/prd_dv200.htm

PRODUCT INFORMATION

| 形質転換の手順 :

- ご用意いただくもの
 - ・ 抗菌薬を添加したLBプレート
 - ・ 氷を入れた容器
 - ・ 滅菌されたスプレッター

● 形質転換

1. コンピテントセルを氷上で融解する(コンピテントセルはチューブ1本あたり100 μ lです)。
2. DNA試料^{*1, *2}をコンピテントセルに加え、タッピングで液を混合する。
 - *1 DNA試料の液量はコンピテントセル液量の5%を越えないようにしてください。
(例: 100 μ lのコンピテントセルに対して5 μ l以下)。
 - *2 過剰なコピーが生成することが予想される場合には、DNA試料を希釈してください。
3. 氷上で5分間静置。
4. 100 μ lの形質転換体を37°Cであらかじめ温めておいた抗菌薬添加LB寒天培地に塗布。
5. 37°Cで一晩培養。

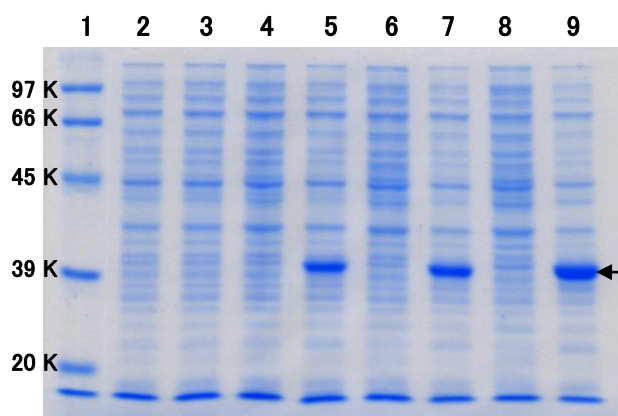
| 発現:

1. 形質転換で得られたコピーを抗菌薬添加済みのLB液体培地 3 ml に植菌し、37°Cで一晩振とう。
2. 翌朝、0.5 ml の培養菌液を抗菌薬添加済みの 10 ml のLB液体培地に加える。OD₆₀₀ が 0.5 になるまで 37°C で振とう培養を行う^{*1, *2}。
 - *1 約 2 時間での OD₆₀₀ = 0.5 となることが多いものの、培養時間は発現プラスミドに依存します。
 - *2 BL21(DE3)pLys 株を使用する場合、短時間の培養であればクロラムフェニコール添加の必要はありません。
3. OD₆₀₀ が 0.5 に達したら、一部(例: 1 ml)を分取して遠心を行い、集菌し、解析を行うまで-80°Cで保存する。
 - 残りの菌体に IPTG を終濃度 1 mM になるように加え、37°C で 3 時間振とう培養する*。
 - *IPTG 濃度と誘導時間は一般的な目安であり、目的タンパクによっては条件を最適化することをお勧めします。
4. 3 時間後、菌体回収前に発現を確認する。菌体の一部(例: 1 ml) を分取し、遠心して集菌する。

PRODUCT INFORMATION

| 解析:

1. 菌体 (1 ml 培養液から集菌)を 200 μ l の 1 \times PBS に懸濁する。
 2. 一部 (例: 100 μ l) を等量の 2 \times SDS サンプルバッファーと混合する。
 3. 85°C で 5 分間加熱した後、10,000 g で 10 分間遠心する。
 4. 上清 (例: 5-25 μ l) を SDS-PAGE で解析する*。
*ウェスタンブロットリングも目的タンパク質の発現を解析する上で有用です。
- ・ 2 \times SDS sample buffer : 2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol, 20 % glycerol, 0.02% BPB, 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8
 - ・ 1 \times PBS buffer.: 20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH7.4



矢印: 発現した 40 kDa のタンパク質
誘導を行ったものでのみ 40kDa のタンパク質の発現を認めた。

pETIK によるタンパク質発現

40 kDa のタンパク質を pETIK にクローニングした。このプラスミドを用いて BL21(DE3) の形質転換を行い、コロニーを得た。コロニーを 2 本のチューブ(#1, #2) で液体培養した。OD₆₀₀ が 0.5 に達した時点で、#2 のチューブに IPTG を添加した。各段階で OD₆₀₀ を測定し、等量の菌体を 10 % ポリアクリルアミドゲル SDS 電気泳動に供した。

レーン 1: DynaMarker Protein Eco (#DM610)
レーン 2, 3: 誘導前の#1, 2
レーン 4: OD₆₀₀=0.5 に達してから 1 時間後の#1
レーン 5: 誘導開始後 1 時間の#2
レーン 6: OD₆₀₀=0.5 に達してから 2 時間後の#1
レーン 7: 誘導開始後 2 時間の#2
レーン 8: OD₆₀₀=0.5 に達してから 4 時間後の#1
レーン 9: 誘導開始後 4 時間の#2

● 発現における注意点

1. T7 発現系は、強力な発現系であるため、IPTG 非誘導時でも低レベルの目的タンパク質の発現が起きます。この低レベルでの発現は、目的タンパク質が大腸菌に対して毒性を有する場合、問題となることがあります。その場合、非誘導時の発現を減らすために以下の方法が必要となることがあります。
 - a) pETUA, pETUK ではなく、コピー数の少ない pETBA, pETBK を使用する。
 - b) 厳密な発現の制御ができる pETIA, pETIK を使用する。
 - c) グルコース(0.5 - 1%)を含む液体培地や寒天培地を使用する*。
*グルコースは *lacUV5* プロモーターからの転写を低下させることが知られています²⁾。
 - d) BL21(DE3)株の代わりに、BL21(DE3)pLysS 株を使用する*。
*pLysS プラスミドにコードされる T7 リゾチームは T7 RNA ポリメラーゼに結合し、不活性化します³⁾。これにより、目的タンパク質の非誘導時の発現が低下します。
2. 一晚培養した BL21(DE3)菌液(0.5 ml)を LB 液体培地(10 ml)に加えて培養した際、OD₆₀₀ が 0.5 に達する迄に長時間(5 時間以上)を要する場合、目的のタンパク質が大腸菌に対して毒性を有する可能性があります。
3. BL21(DE3)菌体が IPTG による誘導後に溶ける場合、目的のタンパク質が大腸菌に対して毒性を有する可能性があります。

PRODUCT INFORMATION

参考文献:

- 1) Studier, F.W. and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 113–130.
- 2) Moffatt, B.A. and Studier, F.W., *Cell* 49 (1987) 221–227
- 3) Pan, S. and Malcom, B.A., *BioTechniques* 29 (2000), 1234–1238

一般的な参考文献

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

関連製品:

DS260	DynaCompetent Cells BL21(DE3)pLysS
DS258	DynaCompetent Cells BL21(DE3) for Electroporation
DS230	DynaCompetent Cells JetGiga DH5 α 分注可能・迅速操作・高形質転換効率のクローニング用コンピテントセル お好みの容量に分注・再凍結して使用可能(※)です。
DS520	AllView PAGE Buffer [®] 泳動バッファーを本品に変えるとグラジエントゲルのような分離が可能。15 分の高速泳動。
DM660	DynaMarker [®] Protein MultiColor Stable II 4℃保存可能な着色済みタンパク質分子量マーカー
DS500	QuickBlue Staining Solution SDS-PAGE でのタンパク質染色試薬。洗浄・脱色を含めた染色全操作は約 90 分。

● ご購入に関する注意点

本製品は T7 発現システムに基づく製品です。T7 発現システムに関する米国特許は Brookhaven Science Associates, LLC (BSA)に帰属しています。本製品は米国およびその領土外でのみ使用できます。本製品および T7 発現システムを用いて作製された物質を BSA のライセンスなしに米国およびその領土で販売することはできません。T7 発現システムのライセンスに関する情報については以下にお問い合わせください。Office of Intellectual Property and Sponsored Research, Brookhaven National Laboratory, Building 185, P.O. Box 500, Upton, New York 11973-5000, USA.