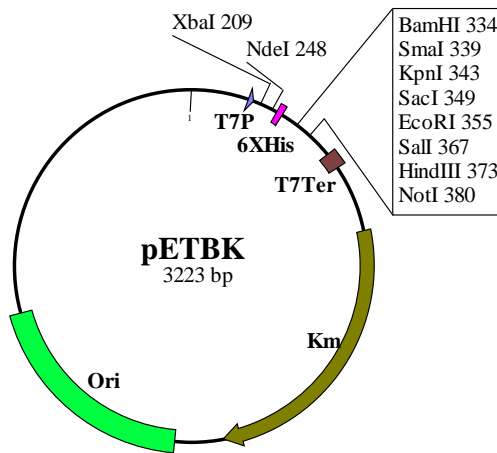


商品名： pET Expression vector pETBK
商品番号： DV230
容量： 15 μ g (TE バッファーの塩を含むプラスミドの凍結乾燥物)
保存条件： -20°C

製品概要:

pETBK は中程度のコピー数、カナマイシン耐性の T7 発現ベクターです。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- β -D-galactopyranoside (IPTG)の存在下で T7 RNA ポリメラーゼは発現し、pETBK の T7 プロモーターからの高レベルの転写を誘導します。弊社の取り扱う 6 種類の T7 発現ベクター中で、pETBK は高いタンパク質発現能を有するスタンダードなカナマイシン耐性ベクターとなります。

| プラスミドマップ:



T7 promoter :	171-187
T7 transcription start :	188
His Tag :	263-280
T7 terminator :	456-503
pMB1 ori :	1660-2279
Km :	703-1518

| 再溶解：

pETBK 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×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。

| 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持ち、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

使用方法

| pETBK 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 pETBK 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。pETBK 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。

pETBK 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 217
AspProAlaL ysLeuIleAr gLeuThrIle GlyArgProG lnArgPhePr oSerArgAsn
                NdeI                                6×His
AATTTTGTTT AACTTTAAGA AGGAGATATA CATATGCGGG GTTCTCATCA TCATCATCAT 277
AsnPheVal* **Leu***Gl uGlyAspIle HisMetArgG lySerHisHi sHisHisHis
                EK                                BamHI
CATGGTATGG CTAGCATGAC TGGTGGACAG CAAATGGGTC GGGACGATGA CGATAAGGAT
337
HisGlyMetA laSerMetTh rGlyGlyGln GlnMetGlyA rgAspAspAs pAspLysAsp
                KpnI                                EcoRI                                SalI                                NotI
CCCCGGGTAC CGAGCTCGAA TTCGATTTTCG TCGACAAGCT TAGCGGCCGC CGTTTAATCC 397
                SmaI                                SacI                                HindIII
ProArgValP roSerSerAs nSerIleSer SerThrSerL euAlaAlaAl aVal***Ser

```

EK: Enterokinase recognition sequence (AspAspAspAspLys↓)

ATG: start codon

TAA: stop codon

pETBK のマルチクローニングサイト

| pETBK の配列

DNA 配列は弊社ウェブサイトで取得いただけます。



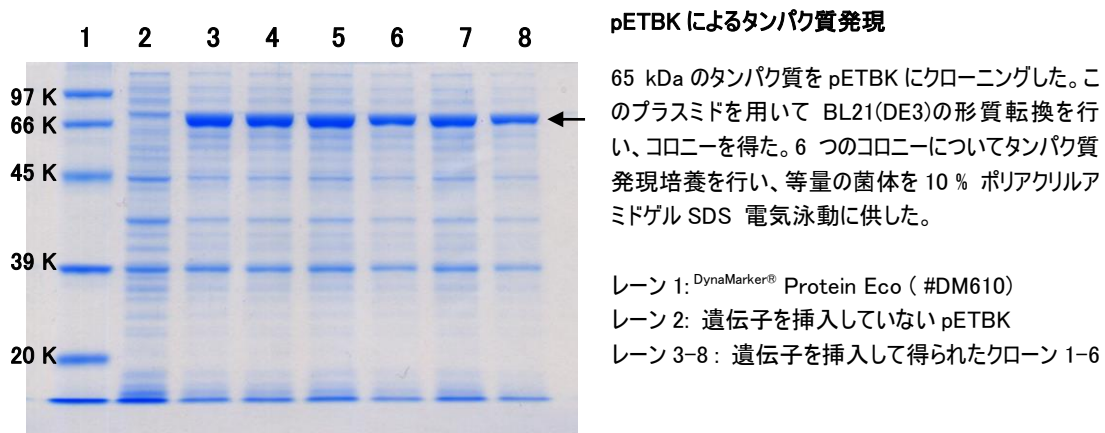
<https://www.biodynamics.co.jp/products/ex-pack/>

発現:

1. 形質転換で得られたコロニ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。

解析:

1. 菌体 (1 ml 培養液から集菌)を 200 μl の 1 × PBS に懸濁する。
2. 一部 (例: 100 μl) を等量の 2 × 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 μl)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 × SDS sample buffer : 2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol, 20 % glycerol, 0.02% BPB, 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8
・ 1 × PBS buffer.: 20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH7.4



矢印: 発現した 44 kDa のタンパク質

● 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。

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:

DS255	DynaCompetent® Cells Zip BL21(DE3) ヒートショック不要の短時間操作
DS260	DynaCompetent® Cells BL21(DE3)pLysS
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。
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。
DS850 DS860	ONEPot Immunoassay Kit <OpenGUS Method> 精製タンパク質の定量に。 ELISA より簡単 / WB より短時間で定量性が高い 任意の抗体でタンパク質を測定できる 洗浄不要のイムノアッセイ構築キット