

商品名： BL21(DE3) expression competent cell pack

商品番号： DS265

キット構成： 本製品は研究用試薬です

構成物	商品番号	構成
DynaCompetent Cells BL21(DE3)	DS250	5 本 (100 μ L/本) *黄色チューブ 形質転換効率: 5×10^7 cfu/ μ g (pUC19)
DynaCompetent Cells BL21(DE3)pLysS	DS260	5 本 (100 μ L/本) *透明チューブ 形質転換効率: 5×10^7 cfu/ μ g (pUC19)
SOC medium		10 本 (1 mL/本)

保存条件：

−80℃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℃の冷凍庫に移してください。

SOC mediumの保存温度は室温もしくは−80℃です。

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、過度の撹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。

1) DynaCompetent Cells BL21(DE3)

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)株に目的の蛋白質遺伝子を組み入れた T7 プロモーター発現ベクター(例: pET vector)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蛋白質遺伝子の転写を引き起こし、目的蛋白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* 外膜エノドプロテアーゼを有していません。

2) DynaCompetent Cells BL21(DE3)pLysS

BL21(DE3)pLysS は T7 リゾチームが組み込まれた pLysS プラスミドを有する BL21(DE3)です。T7 リゾチームは T7 RNA ポリメラーゼを不活化することにより、IPTG 非誘導時の目的タンパク質の発現を抑制します。この特徴は目的タンパク質が大腸菌に対して毒性を持つ場合に重要です。pLysS プラスミドは p15A 複製起点、およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を有しています。

遺伝子型：	株	遺伝子型
	BL2(DE3)	$F^- ompT hsdS(rB^- mB^-)$ <i>gal dcm</i> λ (DE3) (λ (DE3): <i>lacI</i> , <i>lacUV5</i> -T7 gene 1, <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i>)
	BL21(DE3)pLysS	$F^- ompT hsdS(rB^- mB^-)$ <i>gal dcm</i> λ (DE3) pLysS (Cam ^r) (λ (DE3): <i>lacI</i> , <i>lacUV5</i> -T7 gene 1, <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i>)

BL21 株の使い分け：

株	誘導方法	特長	注意点
BL21(DE3)	IPTG	高いレベルの発現	誘導前に少量のタンパク発現が起きる
BL21(DE3)pLysS	IPTG	非誘導時の発現を低下	BL21(DE3)よりやや発現量が少ない

● 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) 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²⁾。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。
 - b) 低コピーの T7 系ベクターを使用する。
 - 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³⁾。
2. 発現は形質転換体のクローンによって異なります。ひとつのプレート内に大きなコロニーと小さなコロニーが混在する場合、発現タンパク質が大腸菌の成長に影響を与えている可能性があります。
3. 発現タンパク質が大腸菌に対して毒性を持つ場合、形質転換体を得られないことがあります。

付属の SOC medium の組成:

20 g/L	tryptone
5 g/L	yeast extract
0.5 g/L	NaCl
0.186 g/L	KCl
2.4 g/L	MgSO ₄ , anhydrous
4 g/L	glucose

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、p3 に示す形質転換法により形質転換を実施。その後、下記抗菌薬を含む LB プレートに塗布し、37℃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 5×10^7 CFU/ μ g 以上であることを確認しています。

- ・BL21(DE3): 50 μ g/ml のアンピシリン
- ・BL21(DE3) pLysS: 50 μ g/ml のアンピシリンおよび 34 μ g/ml のクロラムフェニコール

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
*形質転換体を選択するための抗菌薬、およびpLysSでは34 μ g/mlクロラムフェニコール
- ・ 氷を入れた容器 ・ 42℃のウォーターバス ・ 滅菌済み15mlチューブ ・ 37℃の振とう器
- ・ 滅菌されたスプレッダー

● 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 過剰なコロニ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20分間静置。
4. 42℃のウォーターバスで45秒間加温。この時、液を混ぜたりチューブを振ったりしないでください。
5. 氷上で2分間静置。
6. 滅菌した15 mlチューブに0.9 mlのSOC medium (室温)を入れ、そこにコンピテントセル全量を加える。
7. 37℃で1時間振とう培養する。
8. コンピテントセルの一部を抗菌薬添加LBアガープレートに塗布する*。
*塗布量が100 μ l未満の場合は、SOC mediumを加えて100 μ lの液量にしてから塗布してください。
9. 37℃で一晩培養する。

タンパク質発現の方法:

以下は、T7 プロモーターを有する発現ベクターと BL21(DE3)または BL21(DE3)pLysS を使用した場合の一般的なプロトコルとなります。

はじめに:

1. 目的遺伝子の配列を乗せた T7 プロモーターを有する発現プラスミドを、発現用ではない大腸菌株を用いて構築する。
2. 構築した発現プラスミドを用いて、BL21(DE3)コンピテントセルまたは BL21(DE3)pLysS コンピテントセルを形質転換する。

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 3 ml の LB 液体培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養する。BL21(DE3)pLysS 株を用いる場合には pLysS プラスミドの脱落を防ぐため、培地に終濃度 34 μ g/ml のクロラムフェニコールを添加する。
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℃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)pLysS 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℃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℃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 μ l の 1 × PBS に懸濁する。
2. 一部 (例: 100 μ l) を等量の 2 × SDS サンプルバッファーと混合する。
3. 85℃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 × 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

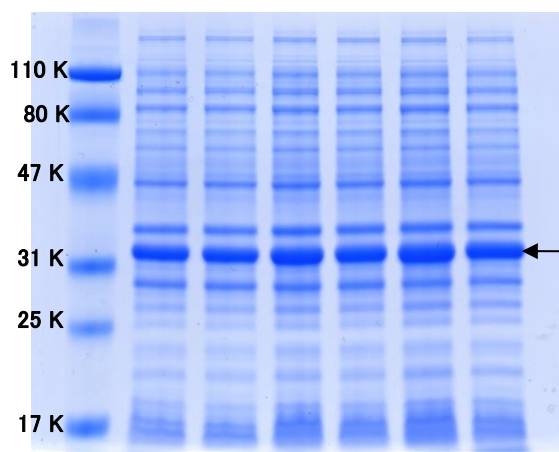


図 1. BL21(DE3)による組み換えタンパクの発現

32 KDa のタンパク質の遺伝子を T7 プロモーターを有する発現ベクターにクローニングした。BL21(DE3)をこのプラスミドを用いて形質転換し、6 クローンについて上記方法に従って発現を行った。誘導後、各クローンを SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル)に供した。ゲルを Quick Blue Protein Staining Solution (当社 #DS500)によって染色した。

レーン 1: Molecular weight marker

レーン 2–7 : BL21(DE3) クローン 1–6

矢印 : 発現したタンパク質

● 発現における注意点:

1. 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。『形質転換における注意点』の項目 1 の a, b, c をご参照ください。
2. 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:

DS240	DynaCompetent Cells BL21
DS258	DynaCompetent Cells BL21(DE3) for Electroporation
DS255	DynaCompetent Cells Zip BL21(DE3) 約 5 分で形質転換操作が終了
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.