

■■■ 大腸菌組換え蛋白質の調製 ■■■

■ 大腸菌で組換え蛋白質を発現させるには BL21 (DE3) ないし BL21 (DE3) pLysS を用います。これらは T7 RNA polymerase promoter を持つ発現ベクターでの組換え蛋白質産生に有効ですが、T7 RNA polymerase promoter ではない発現ベクターでも利用可能です。BL21 株は OmpT と Lon protease 遺伝子の欠損株であり、組換え蛋白質の分解を抑えつつ発現させることができます。

■ 組換え大腸菌の調製

大腸菌回収後は氷上で操作します。

1. 寒天プレート上の大腸菌コロニーを 2 ml の LB (Mg)+50 ug/ml アンピシリン培地に植え、一晚培養する。
2. その培養液 200 ul を 40 ml の LB (Mg)+25 ug/ml アンピシリン培地に植える。できれば枝付きフラスコを使用する（フタを開けることなく培養中の菌濃度を測定できるので）。
3. 30°C、160 rpm で震盪培養する。
4. OD₆₀₀ がおおよそ 0.2 になったら 400 ul の 0.1 M IPTG を加える。
5. 30°C、90 rpm で震盪培養する。
6. 6 時間後、培養液を 50 ml チューブに移す。
7. 3,000 rpm、4°C、10 分の遠心により上清を分離する。
8. 沈澱を 10 ml の PBS にけん濁する。
9. 3,000 rpm、4°C、10 分の遠心により上清を分離する。
10. 沈澱を 0.6 ml の TPBS にけん濁する。
11. けん濁液を 1.5 ml チューブに移す。
12. -80°C で保存する。

■ 組換え大腸菌の破碎物の調製

保存までは氷上で操作します。

1. 保存した大腸菌けん濁液に次のものを加える。
 - 0.5 ul 1 mg/ml leupeptin
 - 0.5 ul 1 mg/ml pepstatin A
 - 10 ul 100 mM PMSF
2. [30 秒/30 秒] インターバル 3 サイクルの超音波により大腸菌を破碎する。
3. 15,000 rpm、4°C、10 分の遠心により上清を分離する。
4. 上清を 130 ul ずつ 1.5 ml チューブに取り分け (5 本)、-80°C 保存する。
5. 残っている上清の 20 ul を 1.5 ml チューブに取り分け、20 ul の 2x Laemmli sample buffer を加える。
6. 95°C、5 分間、保温し、氷上で冷却する。
7. その 2 ul を 10% アクリルアミド SDS-PAGE で電気泳動する (ゲル 2 枚分)。
8. 一方のゲルは CBB 染色により解析する。
9. もう一方のゲルから蛋白質を PVDF 膜に転写する。セミドライ法を 1.5 mA/cm² の電流で 1 時間行う。
10. 蛋白質を転写した PVDF 膜をウエスタンブロッティングで解析する。

■ 上記の手順は、用いる機器、遺伝子発現ベクター、タグの種類あるいは用いる試薬のロット等によって条件が異なる場合があります。培養時間、温度や IPTG 添加量は、目的組換え蛋白質の収量や分解度を目安に検討して下さい。超音波破碎は溶液の透明度を目安にして下さい。(T.M.)

(2006.01.30)

ReagentsTPBS

1% triton X-100 in 1x PBS.

10x Laemmli EP buffer 1 L

glycine 144.2 g

tris-base 30.2 g

SDS 10.0 g

LB (Mg) 1 LMgSO₄-7H₂O 2 g

NaCl 5 g

Bacto yeast extract 5 g

Bacto trypsin 10 g

Transfer buffer final 1L

glycine 192 mM 14.4 g

tris-base 25.2 mM 3.05 g

methanol (optional) 20% 200 ml

SDS (optional) 0.05% 0.5 g

2x Laemmli sample buffer final 5.0 ml

10% SDS 2% 1.0 ml

0.5 M tris pH 6.8 60 mM 0.6 ml

80% glycerol 10% 625 ul

1% BPB 0.01% 50 ul

2-ME 0.7 M 250 ul

=====

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

=====