

iVEC express の解説及び使用方法

iVEC express は、T7 RNA ポリメラーゼを持たせることで、T7 プロモーターからの遺伝子発現を可能にした iVEC 用大腸菌株です。iVEC3 株と同様の方法で大腸菌細胞内での DNA クローニングを行なった後、そのままクローニングした遺伝子からのタンパク質大量発現へと進めることが可能です。

T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (T7 gene1) を *lacZ* 遺伝子と置換して *lac* プロモーター下流に導入した iVEC express (*lac*) と、*araBAD* 遺伝子と置換して *araBAD* プロモーター下流に導入した iVEC express (*ara*) の 2 種類があります。

iVEC のメカニズムに関する詳細については下記論文を参照してください。

[Exonuclease III \(XthA\) enforces *in vivo* DNA cloning of *Escherichia coli* to create cohesive ends. Nozaki and Niki, J. Bacteriol., doi: 10.1128/JB.00660-18.](https://doi.org/10.1128/JB.00660-18)

iVEC express 株の遺伝型

iVEC express (*lac*): MG1655 Δ *hsdR* Δ *endA* Δ *lacZ::T7gene1*

iVEC express (*ara*): MG1655 Δ *hsdR* Δ *endA* Δ *araBAD::T7gene1*

LacI による発現抑制

iVEC express (*lac*) では、LacI による発現抑制が完全ではありません。そのため、IPTG を含まない培地でも T7 プロモーターからの遺伝子発現が起こります。この問題を解消するため、グルコースを含む培地で生育させることを推奨します。グルコースを含む培地では、T7 RNA ポリメラーゼの発現が抑制されることにより、T7 プロモーターからの遺伝子発現の漏れ出しが抑制されます。この性質を利用して IPTG を使用せずとも、グルコースを含む培地で前培養後、グルコースを含まない培地へ移すことにより遺伝子発現を誘導することもできます。

グルコースを含む培地で培養した場合、T7 プロモーターからの遺伝子発現の漏れ出しは通常は問題ないレベルですが、大腸菌に対して毒性のある遺伝子をクローニングした場合に生育しない恐れがありますのでご注意ください。

アラビノースによる発現誘導

iVEC express (ara)では、L-アラビノースにより遺伝子発現の誘導が可能です。こちらは、L-アラビノースを含まない培地での T7 プロモーターからの遺伝子発現の漏れ出しはほとんど見られません。

こちらの菌株もグルコースを含む培地において発現がさらに抑制されるため、大腸菌に対して毒性のある遺伝子をクローニングする場合は、培地にグルコースを添加しておくことを推奨します。

クローニングの際の留意点

PCR 用の合成 DNA プライマーはベクター側と 20~40 bp 程度の相同的な配列、いわゆる“のりしろ”を持つように設計します。

pET28a ベクターへ *gfp* 遺伝子をクローニングする時に使用したプライマーの例を示します (図 1)。

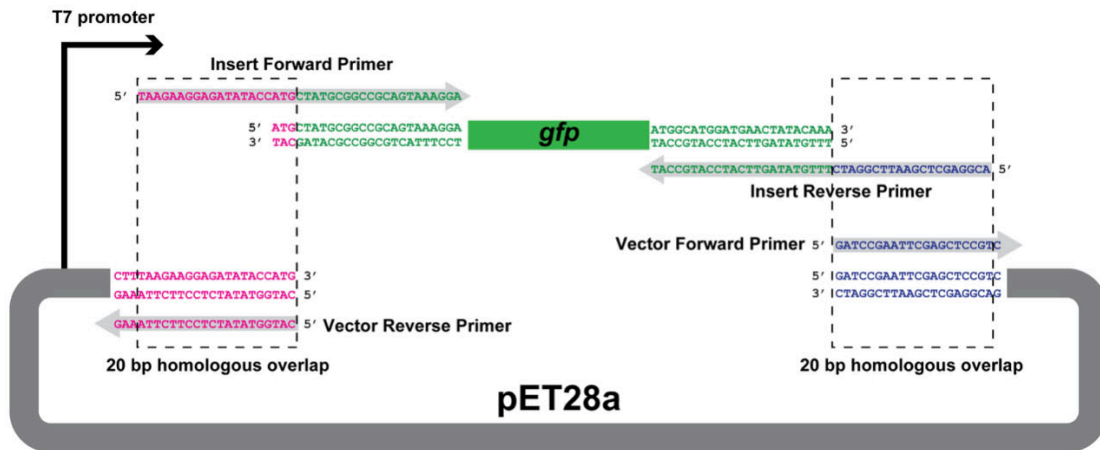


図1: pET28aベクターへのGFPのクローニング

10 kb を超えるような大きなプラスミドを構築する場合、DNA 断片の取り込みの効率の低下により成功しない場合がありますので、ご注意ください。その場合は導入する DNA の量を増やしたり、のりしろ部分を長くしたりすることで解決する可能性があります。

また、iVEC express 株は生育速度の低下を防止するために野生型の *recA* 遺伝子を保有しています。したがって、組換え反応により細胞内でプラスミドがダイマー化する場合がありますが、タンパク質の発現への影響はありません。

iVEC 株の形質転換

iVEC 株は TSS 法での *in vivo* クローニングで、その最大の性能を発揮します。後ろで紹介する TSS 法は、コンピテントセルの作製から形質転換までを 1 本のチューブで行える非常に簡便な形質転換方法です。

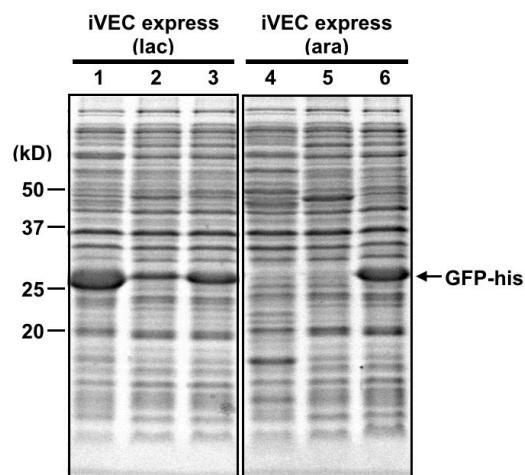
タンパク質の発現例

iVEC express 株において pET28a ベクターから GFP-his を発現させた結果を右に示します (図 2)。

iVEC express (lac) では、IPTG を含まない培地の一晩培養液においても、GFP-his が大量に発現していました (図 2, レーン 1)。これは、IPTG 非存在下でも T7 RNA ポリメラーゼの発現が漏れ出していることにより T7 プロモーター制御下の遺伝子が発現していることを示しています。

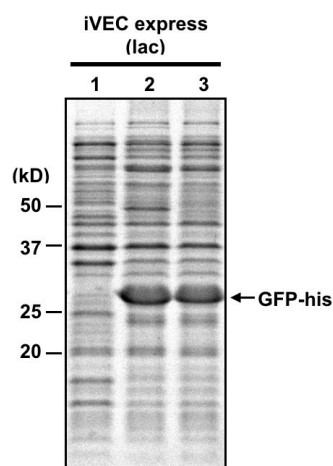
一方、iVEC express (ara) では、アラビノースを含まない培地での GFP-his の発現はほとんど見られず (図 2, レーン 4, 5)、アラビノースを含む培地でのみ GFP-his の発現が見られました (図 2, レーン 6)。

iVEC express (lac) 株における非誘導条件下での発現の漏れ出しは培地に 0.5% グルコースを添加することで顕著に抑制されました (図 3, レーン 1)。また、グルコースを含む培地で一晩培養した培養液を、グルコースを含まない L 培地へ移すことで、IPTG を使用せずに IPTG で発現誘導した場合と同等レベルの発現が確認できました (図 3, レーン 2)。



- 1 - 3: iVEC express (lac)
- 4 - 6: iVEC express (ara)
- 1, 4: Over night culture in L medium
- 2, 5: Non-induced culture in L medium
- 3: Induced culture in L + 0.5 mM IPTG
- 6: Induced culture in L + 0.2 % L-arabinose

図2: iVEC express株を用いたGFP-hisの発現



- 1: Overnight culture in L + 0.5 % glucose
- 2: Culture transferred to L medium without glucose
- 3: Induced culture in L + 0.5 mM IPTG

図3: iVEC express (lac)株でのグルコースによる発現の抑制

iVEC 用形質転換

使用試薬

- TSS 溶液組成 50 ml (約 500 回分)

L 培地	25 ml
2xTSS 溶液	20 ml
DMSO	5 ml

4°Cで保存可能

- 2xTSS 溶液組成 (20 ml)

PEG8000	4 g
1M MgSO ₄	2 ml
80 % glycerol	5 ml
L 培地	to 20 ml

オートクレーブ 120°Cで 15 分

よく混ぜてから使用する。

4°Cで保存可能

- L 培地組成 (1,000 ml)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	to 1,000 ml

5N NaOH で pH を 7.0 に調整

オートクレーブ 120°Cで 15 分

iVEC クローニングする DNA の準備

- ・ ベクターとインサートの両端の“のりしろ”となる相同配列は、15 から 40bp 程度が必要。出現するコロニー数は、20bp だと 15bp の 2 倍、25bp だとさらにその 2 倍程度増加する。
- ・ PCR 産物の濃度は 100 ng/ μ l 程度あれば良いが、5 kb を超えるような DNA を導入する場合はさらに濃い方が良い。
- ・ PCR 反応液中のベクターテンプレート DNA 量が 50 pg/ μ l 以下であれば、空ベクターの入ったハズレのコロニーは数個程度しか出ないため、PCR 産物は特に精製せずに使用することも可能である。
- ・ ベクターテンプレート DNA 量を減らせない場合は、PCR 後に DpnI 処理などをして鋳型ベクターを不活性化させておくと当たりコロニーの割合が上昇する。

コンピテントセルの作製及び形質転換のプロトコル

一日目 コンピテントセルの準備 (所要時間約 3分)

準備するもの

- ・ L 培地
- ・ 滅菌爪楊枝または滅菌チップ
- ・ 37°Cのインキュベーター

1. 寒天培地上の iVEC 株のコロニーを滅菌した爪楊枝でつつく。(ごく少量で良い。) またはグリセロールストックを滅菌した爪楊枝でかきとる。
2. 1ml の L 培地を加えた 1.5 ml チューブ中で軽くかき混ぜて植菌する。
3. 蓋を閉めた状態で、37°Cで 20 時間 (16–24 時間でも可能) 静置培養する。

二日目 コンピテントセルの作製及び形質転換 (所要時間約 80分、実作業時間 5分程度)

準備するもの

- ・ 小型冷却遠心機
- ・ 37°Cのウォーターバスインキュベーター
- ・ 液体窒素
- ・ PCR で線状化したベクターとインサート DNA。PCR 直後の未精製の状態でも可能。

1. 一晩培養した 1.5 ml チューブを、氷上で 5~10 分程度静置する。
2. 4°Cに冷やした遠心機で、5,000 g で 1 分間遠心
3. 上清を素早く除き、氷上へ置く。
4. 氷冷した TSS 溶液 100 μ l に PCR で増幅したベクターおよびインサート DNA を 1~2 μ l ずつ加え、氷上で静置しておく。※操作 1 から 2 の間にや

っておくと良い。

5. TSS-DNA 溶液(100 μ l)で細胞をピペッティングにより素早くけん濁する。
6. すぐに液体窒素で凍らせる。
※ **重要** 液体窒素での凍結を推奨。-80°Cまたは-30°Cのフリーザーに20分置いて凍らせた場合では、出現するコロニー数が1/20程度に減少する。
7. 完全に凍結したチューブを氷上に10分間置いて溶かす。
8. 溶けたら1秒間ボルテックスで軽く混ぜて、すぐに氷上へ戻し、さらに10分間氷上で静置する。
9. 氷上から取り出して、1 mlのL培地(室温)を加えて転倒混和。
10. 37°Cのウォーターバスインキュベーターで45分間静置する。※ヒートショックは必要ない。
11. 5,000 g、室温で1分遠心後、上清を100 μ l程度残して捨てて、沈殿した細胞を残った上清でけん濁する。
12. 全量を寒天培地に塗り広げて、37°Cで一晩培養する。

凍結保存用コンピテントセル作製プロトコル

iVEC 用のコンピテントセルを、一度に作成し、凍結保存しておくことができます。この方法でも、用時調整したコンピテントセルと同じぐらい高い形質転換効率が期待できます。

使用試薬

● 2xTSS 溶液組成 (20 ml)

PEG8000	4 g
1M MgSO ₄	2 ml
80 % glycerol	5 ml
L 培地	to 20 ml

オートクレーブ 120°C で 15 分

よく混ぜてから使用する。

4°C で保存可能

● DMSO

iVEC クローニングする DNA の準備

- ・ ベクターとインサートの両端の“のりしろ”となる相同配列は、15 から 40bp 程度が必要。出現するコロニー数は、20bp だと 15bp の 2 倍、25bp だとさらにその 2 倍程度増加する。
- ・ PCR 産物の濃度は 100 ng/μl 程度あれば良いが、5 kb を超えるような DNA を導入する場合はさらに濃い方が良い。
- ・ PCR 反応液中のベクターテンプレート DNA 量が 50 pg/μl 以下であれば、空ベクターの入ったハズレのコロニーは数個程度しか出ない。
- ・ ベクターテンプレート DNA 量を減らせない場合は、PCR 後に DpnI 処理などをして鑄型ベクターを不活性化させておくと当たりコロニーの割合が上昇する。

凍結保存用コンピテントセル作製プロトコル

一日目

1. 寒天培地上のコロニーまたはグリセロールストックをかきとり、3ml の L 液体培地に植菌する。
2. 37°C で一晩 (16 時間程度) 振とう培養する。

二日目

1. 1 ml の一晩培養液を 60ml の 37 °C に暖めておいた L 液体培地に植菌して、37 °C で 90 分振とう培養する。これで通常は、 $OD_{600} = 0.4 - 0.5$ 程度になる。
2. 培養を止め水中で冷やす。以降の操作はすべて冷やした状態で行う。
3. 5000 g、4° C で 5 分間遠心後、上清を捨てる。
4. 大腸菌のペレットを 2 ml の氷冷した L 液体培地に懸濁する。
5. 1.6 ml の氷冷した 2xTSS 溶液を加えて混ぜる。
6. 0.4 ml の DMSO (この時の DMSO は凝固するため室温で OK) を加えて混ぜる。
7. 0.1 ml ずつ氷上で分注する。
8. 液体窒素で凍結後、-80 °C で保存する。

凍結保存用コンピテントセルによる形質転換

1. 凍結したコンピテントセルを氷上に置いて溶かす。
2. ベクターとインサートの PCR 産物を 1~2 μ l ずつコンピテントセルに加えて、優しくピペティングして混ぜる。
3. 氷上で 20 分静置する。
4. 1 ml の L 培地 (室温) を加えて転倒混和。
5. 37°C のウォーターバスインキュベーターで 45 分間静置する。※ヒートショックは必要ない。
6. 5,000 g、室温で 1 分遠心後、上清を 100 μ l 程度残して捨てて、沈殿した細胞を残った上清でけん濁する。
7. 全量を寒天培地に塗り広げて、37°C で一晩培養する。