

pTip, pNit, pCpi Vector シリーズ

pTip シリーズ (製品コード : RE-0001 ~ RE-0008)

pNit シリーズ (製品コード : RE-0009 ~ RE-0016)

pCpi シリーズ (製品コード : RE-0017 ~ RE-0024)

※ 本製品は国立研究開発法人産業技術総合研究所よりライセンスを受け、北海道システム・サイエンス株式会社が製造・販売しています。

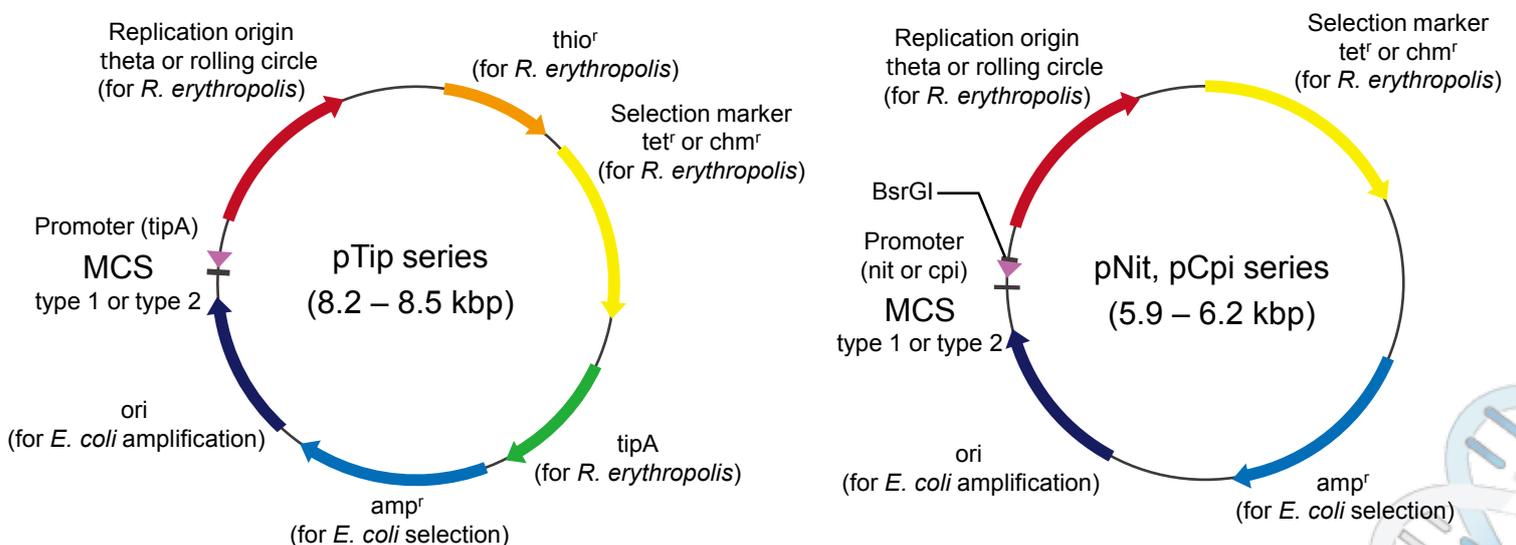
1. 製品説明

発現を制御するチオストレプトン誘導型プロモーター (pTip)、中程度の発現 (pNit)、高発現 (pCpi) の構成型プロモーターと、異なる複製開始起点 (θ -type、rolling circle-type) をもつベクターとの組み合わせで、発現レベルの制御から共発現系まで多様な実験系をカバーすることが可能です。導入タンパク質の発現実験を行う際には、*Rhodococcus erythropolis* L88 Competent Cells (製品コード : RE-L88) を宿主としてご利用頂けます。*R. erythropolis* L88 株は 4℃から 30℃で生育を示し、4℃という低温条件下で外来遺伝子のコードするタンパク質を発現産生させることが可能です。それに伴い、中高温で発現させると「宿主細胞にとって致死性があるタンパク質」、「宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質」および「封入体を形成し凝集するタンパク質」など、大腸菌では発現させることが困難であった組換えタンパク質の発現が期待できます。*R. erythropolis* L88 株の形質転換効率は 1×10^4 colonies/ μ g 以上であり、高い形質転換効率を示します。本製品はシャトルベクターであり、クローニングやコンストラクトの際には大腸菌を宿主として使用することができます。大腸菌を宿主とした場合、高コピーベクター (コピー数 : 300-500) として機能します。また、抗生物質耐性はアンピシリン (50 μ g/ml) となります。pTip Vector シリーズはチオストレプトン誘導型プロモーターを有しており、チオストレプトン添加により濃度依存的に発現誘導を行うことが可能です。培養温度 28℃における誘導条件として、OD600 が 0.6 ~ 0.8 の培養液 (pTip ベクター導入シングルコロニー由来) に、終濃度 0.1 ~ 0.2 μ g/ml のチオストレプトンを添加し、16 時間の振盪培養を行うことで多くの場合は誘導遺伝子産物の最大細胞内蓄積量を得ることができます。さらに、両末端 (あるいはそのいずれか一方) にヒスチジンタグが付加できるベクター構造となっているため、汎用カラムによる簡易精製にて、目的タンパク質を容易に精製することができます。

2. 製品内容

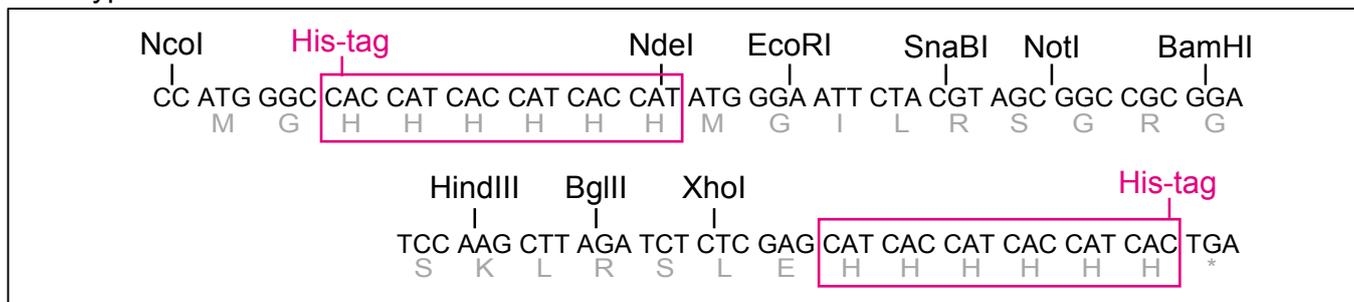
容量 : 10 μ g	溶媒 : T10E1
体積 : 100 μ l	保存 : -20℃
濃度 : 100 ng/ μ l	

3. ベクターマップ

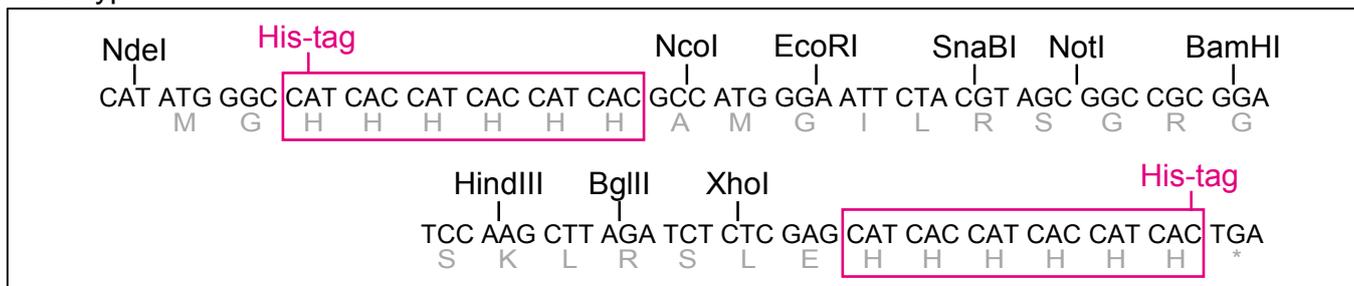


4. マルチクローニングサイト

MCS type 1



MCS type 2



5. 取り扱いベクターラインナップ

pTip Vector series

Name	Promoter	Selection	Replication	MCS	Size (bp)	Accession	Product code
pTipQT1	tipA (inducible)	tetracycline	theta type	type1	8207	AB127592.1	RE-0001
pTipQT2	tipA (inducible)	tetracycline	theta type	type2	8211	AB127593.1	RE-0002
pTipRT1	tipA (inducible)	tetracycline	rolling circle	type1	8275	AB127596.1	RE-0003
pTipRT2	tipA (inducible)	tetracycline	rolling circle	type2	8279	AB127597.1	RE-0004
pTipQC1	tipA (inducible)	chloramphenicol	theta type	type1	8343	AB127590.1	RE-0005
pTipQC2	tipA (inducible)	chloramphenicol	theta type	type2	8388	AB127591.1	RE-0006
pTipRC1	tipA (inducible)	chloramphenicol	rolling circle	type1	8452	AB127594.1	RE-0007
pTipRC2	tipA (inducible)	chloramphenicol	rolling circle	type2	8456	AB127595.1	RE-0008

pNit Vector series

Name	Promoter	Selection	Replication	MCS	Size (bp)	Accession	Product code
pNitQT1	nit(constitutive)	tetracycline	theta type	type1	5984	AB127600.1	RE-0009
pNitQT2	nit(constitutive)	tetracycline	theta type	type2	5988	AB127601.1	RE-0010
pNitRT1	nit(constitutive)	tetracycline	rolling circle	type1	6058	AB127604.1	RE-0011
pNitRT2	nit(constitutive)	tetracycline	rolling circle	type2	6062	AB127605.1	RE-0012
pNitQC1	nit(constitutive)	chloramphenicol	theta type	type1	6153	AB127598.1	RE-0013
pNitQC2	nit(constitutive)	chloramphenicol	theta type	type2	6157	AB127599.1	RE-0014
pNitRC1	nit(constitutive)	chloramphenicol	rolling circle	type1	6227	AB127602.1	RE-0015
pNitRC2	nit(constitutive)	chloramphenicol	rolling circle	type2	6231	AB127603.1	RE-0016

pCpi Vector series

Name	Promoter	Selection	Replication	MCS	Size (bp)	Accession	Product code
pCpiQT1	Cpi(constitutive)	tetracycline	theta type	type1	5923	-	RE-0017
pCpiQT2	Cpi(constitutive)	tetracycline	theta type	type2	5926	-	RE-0018
pCpiRT1	Cpi(constitutive)	tetracycline	rolling circle	type1	5997	-	RE-0019
pCpiRT2	Cpi(constitutive)	tetracycline	rolling circle	type2	6000	-	RE-0020
pCpiQC1	Cpi(constitutive)	chloramphenicol	theta type	type1	6092	-	RE-0021
pCpiQC2	Cpi(constitutive)	chloramphenicol	theta type	type2	6095	-	RE-0022
pCpiRC1	Cpi(constitutive)	chloramphenicol	rolling circle	type1	6166	-	RE-0023
pCpiRC2	Cpi(constitutive)	chloramphenicol	rolling circle	type2	6169	-	RE-0024

AAGCTT
AAAGGATACAACAAAAGGGAAGAAGCTTAGA
ATCTCTATTTCTGATATAATTCTCTAGAAA



6. 操作手順 (*R. erythropolis* L88 株を宿主とした場合)

pTip Vector シリーズを用いた組換えタンパク質の誘導方法

<seed 培養>

1. 発現ベクター導入シングルコロニーを適当な抗生物質を含む LB 培地に植菌
抗生物質終濃度：・テトラサイクリン 5 µg/ml ・クロラムフェニコール 20 µg/ml
2. 28℃にて定常期に入るまで振盪培養（通常 2～3 日）

<本培養>

1. よく懸濁した seed 培養液 1 mL を 9 mL の新たな LB 培地に植菌
※ *R. erythropolis* L88 株は培養中に凝集しやすいため、バツフル付きフラスコを用いることが望ましい
2. OD600 が 0.6～0.8 に達するまで 28℃にて振盪培養
3. 終濃度 0.1～0.2 µg/mL となるようにチオストレプトンを添加
※チオストレプトンストック溶液の作成
DMSO に 10 mg/mL チオストレプトンを溶解し、-20℃で保存
4. 28℃にて 16 時間の振盪培養を継続

pNit, pCpi Vector シリーズを用いた組換えタンパク質の誘導方法

<seed 培養>

1. 発現ベクター導入シングルコロニーを適当な抗生物質を含む LB 培地に植菌
抗生物質終濃度：・テトラサイクリン 5 µg/ml・クロラムフェニコール 20 µg/ml
2. 28℃にて定常期に入るまで振盪培養（通常 2～3 日）

<本培養>

1. よく懸濁した seed 培養液 1 mL を 9 mL の新たな LB 培地に植菌
※ *R. erythropolis* L88 株は培養中に凝集しやすいため、バツフル付きフラスコを用いることが望ましい
2. 28℃にて 24～48 時間の振盪培養

細胞破碎方法

1. 培養にて得られた 10 mL の培養液を 4℃, 3000 x g にて 10 分間遠心
2. 上清を捨て菌体ペレットを回収 ※回収後、凍結融解操作を実施することで溶菌効率が向上する
3. 1 mL のリン酸バッファー (pH8.0) に懸濁
4. 終濃度 1 mg/mL 以上となるようにリゾチームを添加
※ リゾチーム濃度が高いほど溶菌効率が向上する
5. 氷上で 1 時間放置
6. 超音波法やガラスビーズ法により細胞を破碎
※時間・出力等は機種に依存
※試料温度が高くなるように注意する
7. 4℃, 20,000 x g にて遠心し、上清を細胞破碎液として回収

使用上の注意事項

- ・ *R. erythropolis* L88 株の形質転換効率は一般的な大腸菌と比べて低いことから、ベクター構築等のクローニング用宿主として使用することができません。ベクター構築の際は、大腸菌を宿主として発現ベクターを構築し、精製したプラスミドを *R. erythropolis* L88 株に導入されることを推奨致します。
- ・ 本製品は宿主とする大腸菌株によってはプラスミドが不安定になる場合がございます。推奨株は、DH5aおよびXL1-blue となります。
- ・ 大腸菌を宿主とした場合、抗生物質耐性はアンピシリン (50 µg/ml) となります。
- ・ 上記培養及び細胞破碎方法は一例であり、組換えタンパク質の必要量に応じて適宜培養スケールを増減させることが可能です。
- ・ 共発現系を構築する際には、複製開始起点の異なるベクターを 2 種同時に形質転換せず 1 種ずつ細胞に導入することを推奨致します。

7. 参考文献

- 1) Nakashima and Tamura. "A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35 °C." *Biotechnology and bioengineering* 86.2 (2004): 136-148.
- 2) 田村具博, 田村範子. "Rhodococcus 属細菌を利用した宿主 - ベクター系の開発 (特集総説 Rhodococcus のバイオロジーとバイオテクノロジー)." *環境バイオテクノロジー学会誌* 7.1 (2007): 3-10.
- 3) Nakashima and Tamura. "Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression." *Applied and environmental microbiology* 70.9 (2004): 5557-5568.
- 4) Kagawa et al. "Identification of a methanol-inducible promoter from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and its use as an expression vector." *Journal of bioscience and bioengineering* 113.5 (2012): 596-603.

8. 注意点

- ・本製品の再販、改変、商用製品の製造をすることは禁止させていただきます。
- ・弊社の許可なく、本製品を第三者に譲渡することは禁止させていただきます。
- ・基礎研究用途以外の目的で本製品のご利用はおやめください。
- ・ご注文に際しまして、別途「ライセンス同意書」をご提出頂く必要がございます。

9. 関連製品

- ・ *Rhodococcus erythropolis* L88 Competent Cells (製品コード：RE-L88)

 Hokkaido System Science Co., Ltd.

〒001-0932 札幌市北区新川西2条1丁目2-1

 0120-613-190

TEL:011-768-5901 FAX:011-768-5951

Email:goods@hssnet.co.jp

URL:<http://www.hssnet.co.jp>

AAGCTTGGAAATATTAAGTGAACAGGCA
AAAGGATACAACAAAAGGGAAGAAGCTTAGAG
ATGCTATTTCCTGATATAATTCTCTAGAAA
R-150528-01

