

pEFkベクターを用いたEGFPの発現

EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) は、オワンクラゲが持つ緑色蛍光タンパク質の改変体で、タンパク質のイメージングやレポーター遺伝子として広く利用されています。EGFPはβバレル構造をとるタンパク質で、その内側に蛍光を発する発色団 (励起波長: 488 nm、蛍光波長: 507 nm) を形成します (図1)。pEFk及びpEFaは、弊社で開発した大腸菌用タンパク質発現ベクターです。pEFk及びpEFaはhigh copy plasmidでありながら、一般的なタンパク質発現ベクター (pET) と同様なタンパク質発現が可能です。本実験では、pEFkにEGFP遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いたEGFPの発現を行いました。また、一般的なpETベクターとのEGFP発現量の比較を行いました。

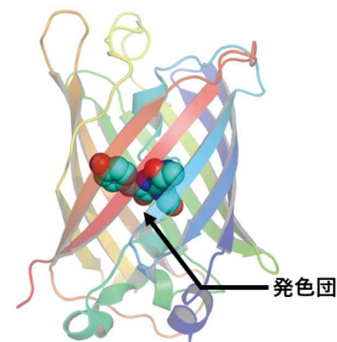


図1 EGFPの構造

方法

pET24のNdeI-XhoIサイトにEGFP遺伝子を挿入し、C末端にHisタグを有するEGFPの発現系 (pET24-EGFP-CHis) を構築しました。その後、C末端Hisタグ付きEGFPの遺伝子をpEFkベクターのNdeIサイトにサブクローニングしました (pEFk-EGFP-CHis) (図2)。作製した発現ベクターを用いて、タンパク質発現用大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、EGFPの発現試験を行いました。25 ug/mLのカナマイシンを添加したLB培地を用い、600 nmにおける濁度が0.6~0.8になるまで形質転換した大腸菌を37°Cで培養しました。その後、終濃度が0.5 mMになるようにIPTGを添加し、室温 (21°C) で一晩培養しました。培養した菌体を破碎後遠心し、不溶性画分を除去しました。その後、488 nmにおける吸光度 (EGFP由来の吸光) を測定することによりEGFPの発現量を測定しました。また、SDS-PAGEを行い、EGFPの発現を確認しました。

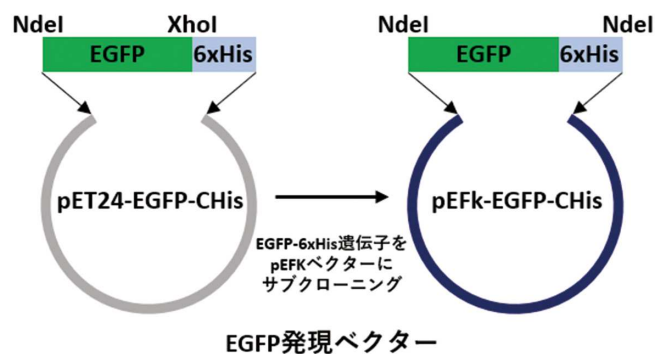


図2 EGFPの発現系

結果

蛍光タンパク質の一種であるEGFPの遺伝子をpEFkベクターにクローニングし、大腸菌で発現させたところ、pETベクターで発現させた場合と同等以上のEGFPを得ることができました (図3、4)。pEFk及びpEFaベクターは多くのタンパク質発現実験にご利用いただけます。

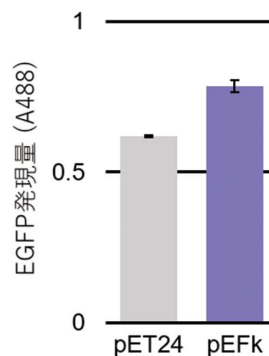


図3 EGFPの発現量

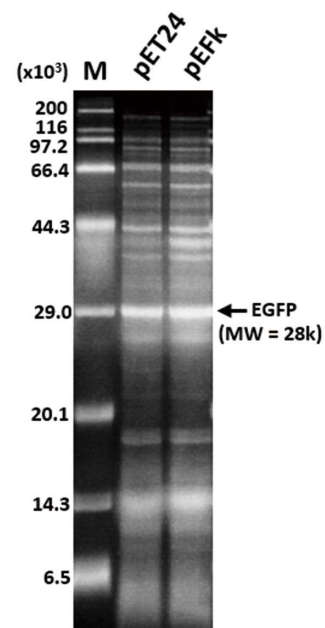


図4 SDS-PAGE解析