

蛋白質高発現試薬 TG-Sure Expression (IR/MAR)

哺乳動物細胞を宿主とした蛋白質発現系は、適切な立体構造や翻訳後修飾を必要とするような蛋白質の生産の目的で利用されています。しかしながら、他の発現系と比べて、哺乳動物発現系の生産性は決して高いものではありません。そのため高い蛋白質の生産性が要求される場合には、遺伝子増幅法による発現細胞の構築が行われています。遺伝子増幅法で構築した発現細胞では、多コピーに増幅された目的遺伝子が染色体上に導入されます。

IR/MAR 遺伝子増幅法は、癌細胞株で見られる遺伝子増幅メカニズムの研究過程において発見された新しい原理に基づく遺伝子増幅技術です。哺乳動物複製開始領域 (IR)と核マトリックス結合領域 (MAR) を持つプラスミドは、細胞内で効率よく遺伝子増幅を起こします。従って、本品 (IR/MAR 配列を持つ DNA)と共に発現ベクターを適当な宿主細胞株にトランスフェクションすることにより、遺伝子増幅された発現株を作製することができます。トランスフェクション後は通常の薬剤選抜により、安定発現株を取得することができます。

内容	7.5 kbp DNA フラグメント
容量	10 µg DNA/vial, 20 µL TE (sterilized)
保管方法	-20℃以下 溶解後はヌクレアーゼの混入等による分解にご注意ください。

DNA試薬の構造



BSR : Blasticidin S deaminase from *Escherichia coli*
IR : Mammalian replication initiation region
MAR : Matrix Attachment Region

製造元


株式会社トランスジェニック

〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-14

TEL: 078-306-0295 FAX: 078-306-0296

 URL: <http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp

【操作方法】**1. 発現ベクターの準備**

目的蛋白質の発現ベクターをご準備下さい。発現ベクターには任意の市販製品をお使いいただけます。発現ベクターは適当な制限酵素サイトで直鎖化したのち精製してください。

2. トランスフェクション

トランスフェクション前日に、任意の宿主細胞を 6 ウェルプレートに播種してください。

市販のリポフェクション試薬のプロトコールに従い、直鎖化した発現ベクター 1.0 μg ~2.0 μg と本 DNA 試薬 1.0 μg ~2.0 μg を混和し、70~80%コンフルエントの宿主細胞に共導入してください。宿主細胞の播種密度、トランスフェクションの方法や効率等については、別途ご検討の上、至適化を行ってください。

対照として、本 DNA 試薬を含まないトランスフェクションを行うことにより、IR/MAR 遺伝子増幅法の効果を判定することができます。

3. 薬剤選抜

トランスフェクションの翌日~翌々日に 10cm Dish プレートに継代し、発現ベクターの選択マーカーとブラストサイジン S によるダブルセレクションを開始してください。各薬剤の有効濃度は、あらかじめ宿主細胞ごとに決定しておいてください。

選抜開始の数日後から、ブラストサイジン S 濃度を 5~20 倍程度高濃度にするにより、より多コピーに遺伝子増幅したクローンを選抜することができます。通常、1 ヶ月ほどの薬剤選抜により、安定発現株を取得することができます。

4. 高発現株の単離

得られた安定発現株は、限界希釈などの方法でクローニングすることにより、高発現株(モノクローン)を単離することができます。

高発現株のスクリーニングは、目的遺伝子のコピー数や mRNA 発現量を定量 PCR で測定する等の方法で行うことができます。

【参考文献】

N.Shimizu *et al.* *Cancer Res* **61**, 6987-6990, 2001

N.Shimizu *et al.* *Cancer Res* **63**, 5281-5290, 2003

N.Shimizu *et al.* *Exp Cell Res* **302**(2), 233-2433, 2005

N.Shimizu *et al.* *Nucleic Acids Res* **33**(19), 6296-6307, 2005

T.Hashidume *et al.* *J Cell Biochem* **101**, 552-565, 2007

【ライセンス条項】

本製品並びに IR/MAR 遺伝子増幅法技術は、特許 3755028 号、特許 3882042 号、特願 2011-019563 により保護されています。

本製品は、ご購入者の自施設における研究目的のみにご使用いただけます。

本製品の複製、または第三者への譲渡・配布・再販はご遠慮ください。

本製品のご購入の際には、別途、ライセンス確認同意書のご提出をお願いしております。

【実施例】

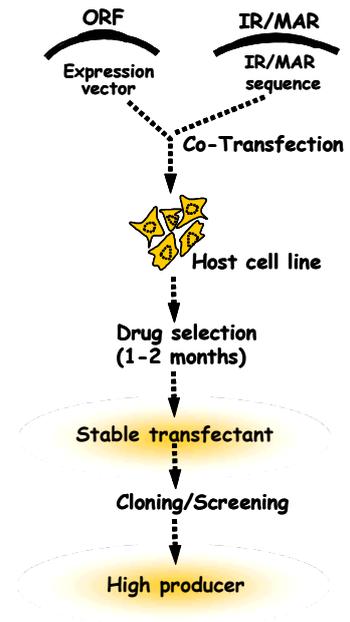
1. 発現細胞株の構築例

6ウェルプレートに播種しサブコンフルエントに生育した HEK293 細胞に、直鎖化した発現ベクター (Neomycin 耐性) と本 DNA 試薬を 2.0 μg ずつ混和した DNA 液を調製しトランスフェクションを行った。

トランスフェクションには、市販のリポフェクション試薬を用いた。

トランスフェクションの翌日にウェルから細胞を回収し、10cm Dish に播種した。培地は Neomycin (0.5 mg/mL) と Blasticidin S (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む DMEM+10%FBS を用いた。

およそ 4-7 日ごとに継代を繰り返し、安定発現株を取得した。なお、2 回目の継代からは、Blasticidin S の添加濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

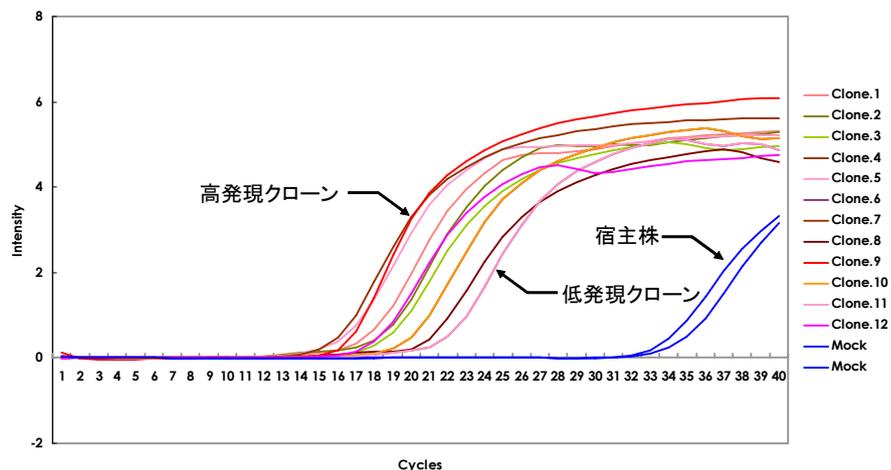


2. RealTime-PCR による高発現株のスクリーニング例

CHO 株を宿主として作製した安定発現株から、限界希釈法により 12 クローンを単離した。

各クローンの細胞ペレットから mRNA を回収し、その相対発現量を RealTime-PCR により定量した。内部標準には、マウス β -Actin 遺伝子を用いた。

各クローンについて、比較 Ct 法で導入遺伝子の相対発現量を算出したところ、低発現クローンの 235 倍の発現量を示す高発現クローンを取得することができた。



遺伝子増幅クローンの mRNA 相対発現量のスクリーニング
導入遺伝子の mRNA 発現を RealTime-PCR で定量したときの増幅曲線を示した。