

Sf9昆虫培養細胞内での組み替えタンパク質発現プロトコル (Baculovirus Expression System) 及び、その精製方法

文責: Ai Kametaka, H. Masuda
更新日: 2007.06.08

本システムは、目的タンパク質をコードする遺伝子をつないだbacmidを、昆虫培養細胞株Sf9に感染させて、目的タンパク質をSf9細胞内で発現させる系である。昆虫細胞内ではリン酸化等の転写後修飾を発現タンパク質が受けるため、構造・機能を保持した真核生物種の組み換えタンパク質を得るには、大腸菌体内で作製するよりも適した系である。

方法としては、まず目的タンパク質をコードする遺伝子をpFASTBAC HTa-cベクターに組み込み、次にbacmidへの組み換えを起こす大腸菌株DH10Bacに導入して目的のインサートが入ったコロニーを選別・単離し、これより精製して得られたbacmidをSf9細胞にtransfectionにより感染させる。一回目の感染でウイルス液(細胞培養上清)を回収し、二回目の感染にこれを用いる。ウイルス液の感染効率を目的タンパク質の発現量(またはプラーク形成率)で測定し、適当な高濃度のウイルス液を得るまでウイルス液で細胞に繰り返し感染させていく。こうして得られたウイルス液を使って、目的タンパク質の発現に適した細胞当たりの添加するウイルス液量と培養時間を検討する。目的タンパク質はHisタグを利用してNi²⁺レジンに吸着させて精製する。

【bacmidの作製方法】

1. pFASTBAC HT (HTa、b、cのMCSのフレームが異なるHisタグ発現ベクターがあるので、適当なものを選択する)につないだ目的タンパク質発現ベクターを構築する。Multi-Cloning Siteの上流、下流のsequenceをもつPCR primer, pFASTBAC-F1, pFASTBAC-R1がlabの共通PCR Primer Boxにあるはず。
2. 添付の大腸菌株DH10Bac(-152°C冷凍庫) 100 µlを15 mlチューブに取り、1. のベクター 1 ngを混ぜて氷上で30分静置する。42°Cで45秒ヒートショックをかけて、再び氷冷してからSOC 900 µlを加えて37°Cのウォーターバスで4時間振とう培養する。x1、x10、x100、x1,000の希釈系列を作製し、それぞれ100 µlずつLuria Agarプレートに蒔いて、37°Cのインキュベータで24~36時間培養する。

Luria Agar プレート:	tryptone peptone	10 g	
	yeast extract	5 g	
	NaCl	10 g	
	Agar	12 g	/ 1 litre

オートクレーブ後、冷めてから以下を添加する。

50 µg/ml kanamycin
7 µg/ml gentamicin (荒神さんの実験機の正面の棚)
10 µg/ml tetracycline
100 µg/ml Bluo-gal (第2実験室-30°C 共通冷凍庫)
40 µg/ml IPTG

(ホイルで遮光の上、4°C冷蔵1ヶ月保存可能。)

3. 100~200コロニー生育してきたプレートより、大きめの白いコロニーを液体培地にてさらに培養し、Qiagen miniprepでDNAを精製する。精製DNAは凍結溶解の繰り返しを避けること。インサートチェックはPCR (M13FとRプライマー*を用いてEx Taq polymeraseにより「2430 bp+インサートの大きさ」の断片を増幅)で行える。制限酵素処理によるチェックはうまくいかなかった。

*M13F, M13R primers: M13 primer M1, RVを使う。

【Sf9細胞へのbacmidの1回目の感染法】

- 感染すると丸い形状になり、もはや底面に付着してられずコロコロと転がっている。大きさもふとつちよ。細胞数も増えていない。
- ウィルスが他の細胞へ感染しないように注意する。ウィルスを感染させた細胞の上清には高濃度のウィルスが含まれてい

るので、オートピペッターやvacuum pumpをつないだパスツールピペットで吸い込まないようにする。オートピペッター、廃液瓶やチューブの汚染が原因となって他の細胞へ感染する危険性がある。ディッシュやプレートの蓋はビニールテープで必ずシールし、ウイルス液回収後の細胞を含む15 mlチューブや感染細胞を回収した後の培養上清(ウイルス液)は、その都度オートクレーブで滅菌してから廃棄ボトルへ移すこと。

- ウィルス液の回収はクリーンベンチ内で行うが、細胞の回収は外で(実験機で)行う。
1. 6穴プレートの1穴あたりに2 mlの液体培地で 9×10^5 個のSf9細胞を蒔き、蓋をビニールテープでシールする。底面に付着させるために約1時間27°Cのインキュベータに入れておく。
 2. bacmid DNA 1~2 μg を100 μl のSf-900 II SFMに希釈した液と、CellFECTIN 6 μl を100 μl のSf-900 II SFMに希釈した液を混合して、室温で15~45分静置する。
 3. 2. のDNA混液にSf-900 II SFMを800 μl 加えてやさしく混ぜる。
 4. 1. の細胞を2 mlのSf-900 II SFMで一回洗浄して、3. の液を滴下しよく混ぜる。
 5. 蓋をビニールテープでシールして27°Cのインキュベータで5時間培養する。
 6. 上清を吸引で除き、2 mlの液体培地に交換して、さらに72時間培養する。
 7. 培養上清を15 mlチューブに回収し、遠心で細胞を除く(底の部分は多めに残り残す)。スクリーキャップのチューブに分注して1本は冷蔵遮光保存し、残りは冷凍保存する。ここで得られる1st ウィルス液の濃度は、 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ pfu/mlだそうだ。
 8. 6穴プレートに付着した細胞は、1 X PBSで一回洗浄した後、SDS-PAGEサンプルバッファー300 μl で懸濁し、(かなり粘張なので)先端を鉋で切ったブルーチップを用いてエッペンに回収する。必要に応じ、ウェスタンブロットで目的タンパク質の発現を確認する(とりあえず冷凍保存、ゲルにアプライする前に超音波破碎すること)。

【Sf9細胞へのbacmidの2回目の感染法】

- 1回増幅をかけるとウィルスが100倍に増えるとされているが、実際には、それほど増えないようだ。
1. P15のディッシュ(直径15cmのプラスチックシャーレ)に10 mlほどの液体培地で 2×10^7 個のSf9細胞を蒔き、蓋をビニールテープでシールする。底面に付着させるために約1時間27°Cのインキュベータに入れておく。*P10のディッシュの場合、6mlの培地で 0.9×10^7 個のSf9細胞をまく。最終培地量は7 ml。
 2. 培養上清を捨て、予め温めておいた新しい液体培地を15 mlに加え、1st ウィルス液100 μl (titerが上がらない場合はもっと多く加える)を添加する。この添加するウィルス液の量は「ウィルス増幅時MOI=0.1」「1stウィルス液濃度= $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ pfu/ml」として決めた。
 3. 蓋をビニールテープでシールして、2日間27°Cのインキュベータで細胞を培養する。
 4. 培養上清を1回目と同様の方法で回収し、2nd ウィルス液とする。
 5. プレートに付着した細胞は、1回目と同様の方法で6穴プレート相当の面積分を回収する。
 6. ウェスタンブロット(抗His抗体で検出、第2実験室-30°C冷凍庫共通)で目的タンパク質の発現確認と発現量の見積もりを行う。もし薄過ぎるようなら、2回目と同じ手順で2nd ウィルス液を用いて3回目の感染を行う。

【MOIの最適化】

- 十分な濃度のウィルス液が得られたら、細胞に感染させるために添加する液量と発現させておく時間(培養時間)を決定する。
 - MOI=1、2、5、10と振る(実際はウィルスのpfu/mlを測っていないので、一定の細胞量に対して添加するウィルス液量を振った。プラークアッセイによる測定値を元に求めることもできる)。
 - 感染後培養時間を24、48、72、96時間と振る。
1. 6穴プレートの1穴あたりに2 mlの液体培地で 9×10^5 個のSf9細胞を蒔き、蓋をビニールテープでシールする。底面に付着させるために約1時間27°Cのインキュベータに入れておく。

2. 培養上清を捨て、予め温めておいた新しい液体培地を2 mlずつ加え、ウイルス液を4.5 μ l, 9 μ l, 22.5 μ l, 45 μ lと添加する。
(このウイルス液量はウイルス液濃度を 2×10^8 pfu/mlとした時のMOI=1、2、5、10に相当)
3. 蓋をビニールテープでシールして、2、3、4日間27°Cのインキュベータで細胞を培養する。
4. 上清を静かに吸引し、付着した細胞を1 x PBSで一回洗浄した後、SDS-PAGEサンプルバッファーでチューブに回収する。
冷凍保存しておき、電気泳動するときに超音波破碎してからゲルにアプライする。ウェスタンブロットにより発現タンパク質量を見積もり、適当なMOIと培養時間を決定する。

☆(初めのウイルス液が薄かったので3rdまで行った上で)P15ディッシュ1枚の細胞に対して、3rdウイルス液を100 μ l~200 μ l添加して3日間培養する、という条件に決めた。プラークアッセイは失敗に終わったのでMOIはわからない(MOI=2~5相当?)。

【目的タンパク質の発現】

1. P15のディッシュに10 mlほどの液体培地で 2×10^7 個のSf9細胞を蒔き、蓋をビニールテープでシールする。底面に付着させるために約1時間27°Cのインキュベータに入れておく。
2. 培養上清を捨て、予め温めておいた新しい液体培地を15 ml加え、適当なMOIになるウイルス液量を添加する。
3. 蓋をビニールテープでシールして、適当な時間27°Cのインキュベータで細胞を培養する。
4. 上清を静かに吸引し、付着した細胞を1 x PBSで一回洗浄した後、セルリフターでディッシュからはがし、デカントでチューブに回収し、遠心で細胞を落とす。沈殿がゆるいのでデカントで上清を捨て、1 x PBSに再懸濁してエッペンに分注し再び遠心する。チップで上清を捨て、細胞を液体窒素で凍結して冷凍保存する。

【目的タンパク質の精製方法】

- Hisタグタンパク質なので、Ni²⁺レジン(Probond resin (Invitrogen life technologies社))を用いて特異的に吸着して精製する。
- 細胞溶解液の組成については、各自の目的タンパク質の性質と精製後の使用目的を考慮すること。以下は核タンパク質KiCの精製に用いた条件。
- バッファーは全て予め冷却する。遠心機も4°Cに冷却する。

1. P15ディッシュ1枚分の凍結細胞を1 mlの溶解バッファーに懸濁して氷上で超音波破碎し、15,000 rpmで10分間遠心して上清を取り分ける。

溶解バッファー: 50 mM HEPES-KOH (pH7.5)
1 M NaCl
10 mM MgCl₂
2 mM 2-ME (DTTはレジンのNi²⁺イオンを還元してしまうので使用不可)
10% glycerol
1 x protease inhibitor cocktail

2. 予め洗浄バッファーで2回洗浄しておいたレジン100 μ lと1. の上清を混ぜ、4°Cで1時間攪拌する。
洗浄バッファー: 溶解バッファーからprotease inhibitor cocktailを加える前のもの
3. レジンを遠心で落とし、上清を除き、1 mlの洗浄バッファーに再懸濁する。これを4回繰り返す。
4. もう一度レジンを遠心で落とし、上清を除き、今度は溶出①バッファー200 μ lに懸濁する。3分インキュベートしてからレジンを遠心で落とし、上清を新しいエッペンに回収する。再び溶出①バッファーへの懸濁、遠心、上清回収を行う。
5. 溶出②~⑥バッファーに関しても、①と同様に2回ずつ操作を行う。

溶出バッファー: 溶解バッファーにimidazoleを加えたもの

- ①は50 mM
- ②は100 mM
- ③は150 mM
- ④は200 mM
- ⑤は250 mM

⑥は300 mM

6. CBB染色とウェスタンブロットにより目的タンパク質の溶出と精製の確認を行う。1. での溶解バッファーの懸濁液と遠心後の上清と沈殿、3. での遠心後の上清と最終洗浄後のレジン、4. 5. での回収した溶出液、5. での⑥の2回目後のレジンをサンプルとする。溶出バッファーのうち、目的タンパク質以外の吸着タンパク質の溶出が認められる低いimidazole濃度を実際の洗浄バッファーに採用し、目的タンパク質が効率よく溶出される濃度を実際の溶出バッファーに採用する。

☆CBB染色で、①では余計なバンドがたくさんあったが、②では目的サイズのバンドがはっきり見え、④以上ではそれに加えて別の位置のバンドが出ていた。それに一致してウェスタンブロットでも、②③で目的のバンドが見えた。よって、①の濃度で洗浄して③の濃度で溶出することに決めた。

添付資料: 「Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems」Invitrogen life technologies社

「Cellfectin Reagent」Invitrogen life technologies社

「Probond resin」Invitrogen life technologies社

(「sf9.suppl」フォルダに各々のPDFファイルあり)