

Sigma-Aldrich

Novagen® Calbiochem® SIGMA-ALDRICH®

大腸菌タンパク質発現系の ゴールドスタンダード pET システム活用のポイント

ご好評をいただいた発現系選択編、タンパク質発現編および
タンパク質抽出・精製編を一冊にまとめました。
タンパク質発現実験にかかわる全研究者の皆様必読の資料集です。

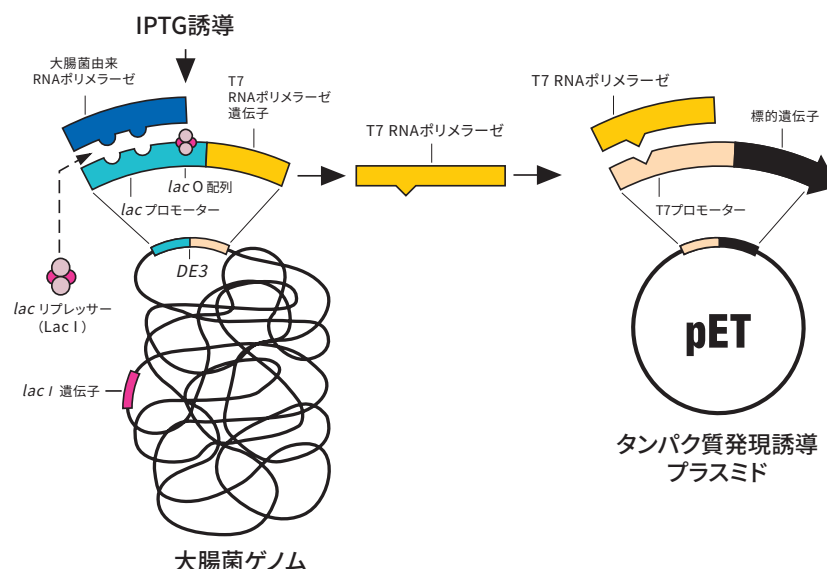


The life science business of Merck
operates as MilliporeSigma in the
U.S. and Canada

MERCK

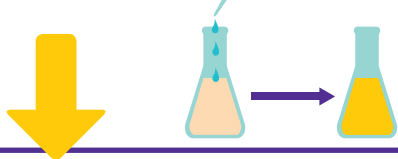
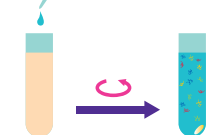
pET システムと本冊子の概要

pET システムは、*lacUV5* プロモーターに制御されアロラクトースやラクトース類似体 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で発現誘導が起こる T7 RNA ポリメラーゼが標的遺伝子の転写を行うタンパク質発現系です。使用法が簡単で、大腸菌のタンパク質発現ベクターの代表ともいえる **pET システムは、IPTG 添加の数時間後に発現タンパク質が菌体内タンパク質の 50% 以上の重量を占めるほど強力**です。



pET プラスミドを使用した発現実験は確立されたシンプルなワークフローから構成されています。そのため、簡単な条件検討を実施するだけで標的タンパク質の発現・精製に成功することも少なくありません。しかし、実験の各段階には、考慮することで標的タンパク質の収率向上につながるポイントも存在します。

この『**pET システム活用のポイント**』では、実験開始前にぜひ知っておいていただきたいポイントや、実験条件の最適化が必要になった場合に役立つポイントを、3章に分けた実験フローに沿って3つずつまとめてあります。実際の実験にご活用いただくと共に、大腸菌タンパク質発現系の奥深さを垣間見ていただければ幸いです。

実験ワークフロー	ポイント
第1章 タンパク質発現系構築	① pET プラスミドの選択
	② クローニング用ホストの選択
	③ 発現用ホストの選択
第2章 タンパク質発現誘導	① 発現実験前の確認事項
	② 培養条件の見直し
	③ 基底発現の抑制
第3章 タンパク質抽出・精製	① タンパク質の局在
	② フォールディングと可溶化
	③ 精製条件の最適化

第1章

タンパク質発現系構築の3つのポイント

ポイント

1 pET プラスミドの選択

pET ベクターの種類（pET- に続く番号）は、下記の4項目の組み合わせで決定されています。つまり、適切なプラスミド選択のポイントは実験系に合わせた4項目の正しい選択です。

- **T7 プロモーター型の選択**：野生型 T7 プロモーターまたは *lacO* 配列融合プロモーター T7*lac*
- **薬剤耐性遺伝子の選択**：アンピシリン耐性、カナマイシン耐性、またはクロラムフェニコール耐性
- **標識タグ配列使用の選択**：N 末端タグ、配列内タグ、C 末端タグ
- **プロテアーゼ切断配列使用の選択**：Enterokinase、HRV 3C、Thrombin、Factor Xa など

pET プラスミドの分類

薬剤耐性	タグ位置	プロモーター					
		T7		T7 <i>lac</i>			
アンピシリン耐性	N 末端	pET-3a-d	pET-14b	pET-11a-d	pET-15b	pET-16b	pET-19b
		pET-17b					
	C 末端	pET-20b(+)	pET-23(+)	pET-21(+)	pET-22b(+)	pET-25b(+)	pET-31b(+)
				pET-21a-d(+)	pET-32a-c(+)	pET-32 Ek/LIC	pET-32 Xa/LIC
カナマイシン耐性				pET-43.1a-b(+)	pET-43.1 Ek/LIC	pET-44a-c(+)	pET-44 Ek/LIC
	両末端	pET-23a-d		pET-45b(+)	pET-46 Ek/LIC	pET-51b(+)	pET-51 Ek/LIC
				pET-52b(+)	pET-52 3C/LIC	pETcoco-2	pETDuet-1
クロラムフェニコール耐性	N 末端	pET-9a-d		pET-24(+)	pET-26b(+)	pET-27b(+)	
	C 末端	-		pET-24a-d(+)	pET-28a-c(+)	pET-29a-b(+)	pET-30a-c(+)
				pET-30 Ek/LIC	pET-30 Xa/LIC	pET-39b(+)	pET-40b(+)
	両末端	-		pET-41a-b(+)	pET-41 Ek/LIC	pET-42a-b(+)	pET-47b(+)
T7 プロモーター型				pET-48b(+)	pET-49b(+)	pET-50b(+)	
	両末端	-		pETcoco-1			

注 1) a, b, c, d : クローニング部位の *Bam*HI 認識配列 GGATCC に対するリーディングフレームを表します。*Bam*HI 認識配列内のフレームは、a は GGA、b は GAT、c および d は ATC です。d は *Nco*I 認識配列を開始コドンのクローニングに利用できます。すべてのパターンを販売していない場合がありますので、あらかじめご確認ください。

注 2) (+) は、f1 複製機点を持つことを示します。F 因子を持つホスト内で一本鎖 DNA の複製が可能です。

注 3) Ek: Enterokinase、3C: HRV 3C、Xa: Factor Xa

注 4) LIC: Ligation-independent cloning つまり、制限酵素による切断および DNA ライゲースによる結合が不要なクローニング手法です。

注 5) pETcoco は、0.2% グルコース存在下で細胞あたり平均 1 コピーに保たれるプラスミドです。この条件では pETcoco は極めて安定で、突然変異導入確率が 0 にきわめて近く、バックグラウンドの遺伝子発現レベルは無視できる程度になります。プラスミド調製時は培地に L-アラビノースを添加することで、標的遺伝子の発現誘導を伴わずにプラスミドを細胞あたり約 40 コピーに増幅します。目的遺伝子の発現は IPTG 添加によって誘導されます。

タグ配列の特徴と pET プラスミド

pET ベクターで利用可能な標識配列	使用目的								
	該当 pET ベクター								
DsbA•Tag™	ジスフィド結合形成や異性を触媒するペリプラズム酵素を付加し、標的タンパク質の可溶化を促進する。フォールディング効率の改善も期待できる。								
DsbC•Tag™	ジスフィド結合の異性を触媒するペリプラズム酵素を付加し、標的タンパク質の可溶化を促進する。フォールディング効率の改善も期待できる。								
GST•Tag™	発現タンパク質の可溶化を促進。標的タンパク質のアフィニティ精製や定量にもよく利用される。								
His•Tag®	pET-41a-b(+)	pET-41 Ek/LIC	pET-42a-b(+)	pET-49b(+)					
	変性条件下でも標的タンパク質のアフィニティ精製が可能。ウェスタンブロットングによる検出が容易。								
	pET-14b	pET-15b	pET-16b	pET-19b	pET-20b(+)	pET-21(+)	pET-21a-d(+)	pET-22b(+)	pET-23(+)
	pET-23a-d	pET-24(+)	pET-24a-d(+)	pET-25b(+)	pET-26b(+)	pET-27b(+)	pET-28a-c(+)	pET-29a-c(+)	pET-30a-c(+)
HSV•Tag®	pET-30 Ek/LIC	pET-30 Xa/LIC	pET-31b(+)	pET-32a-c(+)	pET-32 Ek/LIC	pET-32 Xa/LIC	pET-39b(+)	pET-40b(+)	pET-41a-b(+)
	pET-41 Ek/LIC	pET-42a-b(+)	pET-43.1a-b(+)	pET-43.1 Ek/LIC	pET-44a-c(+)	pET-44 Ek/LIC	pET-45b(+)	pET-46 Ek/LIC	pET-47b(+)
	pET-48b(+)	pET-49b(+)	pET-50b(+)	pET-51b(+)	pET-51 Ek/LIC	pET-52b(+)	pET-52 3C/LIC	pETcoco-1	pETcoco-2
	pETDuet-1								
KSI	標的タンパク質のウェスタンブロットングによる検出が容易。								
Nus•Tag™	pET-25b(+)	pET-27b(+)	pET-43.1a-b(+)	pET-43.1 Ek/LIC	pET-44a-c(+)	pET-44 Ek/LIC	pETcoco-1	pETcoco-2	
	高度に疎水性の不溶性 Ketosteroidisomerase 融合タンパク質を産生させる。フォールディング不要な小タンパク質やペプチドを封入体経由で精製するために用いられる。								
S•Tag™	pET-31b(+)								
	標的タンパク質の可溶化を促進する。ウェスタンブロットングによる検出が容易。								
Signal Sequence	pET-43.1a-b(+)	pET-43.1 Ek/LIC	pET-44a-c(+)	pET-44 Ek/LIC	pET-50b(+)				
	標的タンパク質のアフィニティ精製によく利用される。								
Strep•Tag® II	pET-29a-b(+)	pET-30a-c(+)	pET-30 Ek/LIC	pET-30 Xa/LIC	pET-32a-c(+)	pET-32 Ek/LIC	pET-32 Xa/LIC	pET-39b(+)	pET-40b(+)
	pET-41a-b(+)	pET-41 Ek/LIC	pET-42a-b(+)	pET-43.1a-b(+)	pET-43.1 Ek/LIC	pET-44a-c(+)	pET-44 Ek/LIC	pET-45b(+)	pET-46 Ek/LIC
T7•Tag®	pET-47b(+)	pET-48b(+)	pET-49b(+)	pET-50b(+)	pETcoco-1	pETcoco-2	pETDuet-1		
	ペリプラズム輸送シグナルを付加し、標的タンパク質の可溶化を促進する。								
Trx•Tag™	pET-20b(+)	pET-22b(+)	pET-25b(+)	pET-26b(+)	pET-27b(+)				
	改変ストレプトアビジン (Strep•Tactin®) を組み合わせれば標的タンパク質の高精度精製が可能。溶出には天然ビオチンアナログ Desthiobiotin (2.5 mM) が使用される。ウェスタンブロットングによる検出が容易。								
T7•Tag®	pET-51b(+)	pET-51 Ek/LIC	pET-52b(+)	pET-52 3C/LIC					
	標的タンパク質のアフィニティ精製が可能。ウェスタンブロットングによる検出が容易。								
Trx•Tag™	pET-3a-d	pET-9a-d	pET-11a-d	pET-17b	pET-21a-d(+)	pET-23a-d	pET-24a-d(+)	pET-28a-c(+)	
	標的タンパク質の可溶化を促進する。ウェスタンブロットングによる検出が容易。								
T7•Tag®	pET-32a-c(+)	pET-32 Ek/LIC	pET-32 Xa/LIC	pET-48b(+)					
	MCS (Multiple Cloning Site) 1 は N 末端に His•Tag を、MCS2 は C 末端に S•Tag を融合可能なデザインです。								

2 クローニング用宿主株の選択

プラスミドを安定に保持可能なクローニング用宿主（宿主＝大腸菌）には、相同組み換えタンパク質 RecA ならびに DNA エンドヌクレアーゼ EndA を欠損している K-12 株由来の JM109、DH5α や NovaBlue などが良く知られています。特に NovaBlue は、*recA* *endA* であるだけでなく選択 F 因子を持つ菌株であり、f1 複製起点を持つプラスミドから一本鎖プラスミドを調製可能です。またこれらの宿主は、バクテリオファージ CE6 の感染による発現誘導が可能なため、高毒性タンパク質がクローニングされた pET ベクターからの発現誘導にも利用されます。

Blue/White セレクション

NovaBlue
NovaBlue GigaSingles™
NovaBlue T1^R Singles™
Veggie™ NovaBlue Singles™

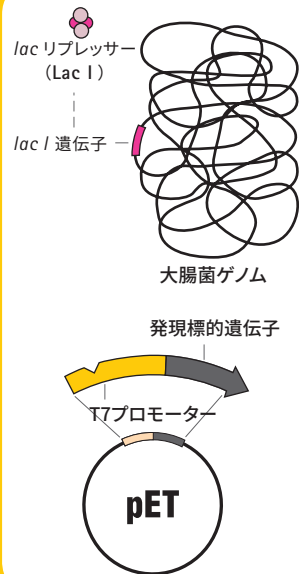
T1およびT5ファージ耐性

NovaBlue T1^R Singles

アニマルフリー

Veggie NovaBlue Singles

クローニング用宿主



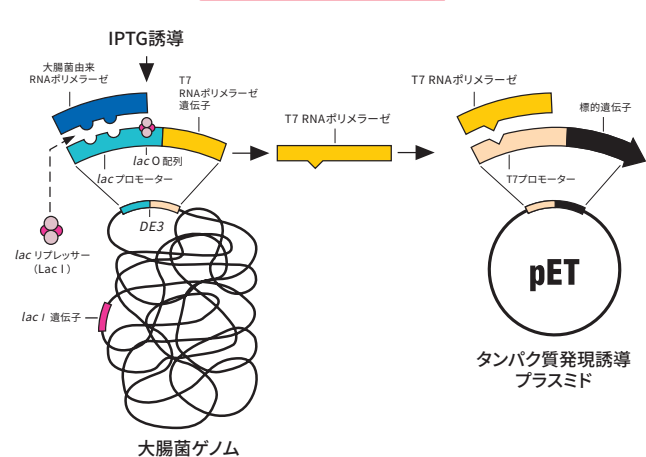
3 発現用宿主株の選択

pET ベクターからのタンパク質発現誘導には、T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な宿主が必要です。**タンパク質発現用宿主株は菌株名に (DE3) が付されており、容易に判別可能**です。すなわち、pET ベクター発現宿主株は、*lacI* 遺伝子、*lacUV5* プロモーター、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が *int* 遺伝子内に安定的に挿入されたバクテリオファージ DE3 溶原菌です。

タンパク質発現用宿主には B 株由来の菌株と K-12 株由来の菌株があります。とりわけ B 株由来の宿主は、プロテアーゼである Lon および OmpT タンパク質を欠損しているため、目的タンパク質の安定化に寄与しやすいことが知られています。

効率の良い発現実験を実施するためには、適切な宿主を選択するとともに、必要に応じて非発現宿主（ネガティブコントロール：(DE3) ではない同種菌株）を使用してください。また、プラスミドの薬剤耐性と宿主の薬剤耐性が重複しない組み合わせを選択することも重要なポイントです。

タンパク質発現用宿主



一般的なタンパク質発現

BL21 は、pET ベクターからのタンパク質発現誘導に広く利用されている宿主株です。

			カタログ番号
BL21(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし	69450-3 69450-4

タンパク質不溶化やフォールディング異常の改善①

Origami 2、Rosetta-gami 2、Rosetta-gami B は、*trxB* および *gor522* 変異を持つため、ジスルフィド結合形成能が高い株です。ジスルフィド結合形成効率が低い場合のフォールディング効率の改善が期待できます。詳細は 12 ページをご覧ください。

			カタログ番号
Origami™ 2(DE3)	K-12 株由来	ストレプトマイシン耐性、テトラサイクリン耐性	71345-3 71345-4
Rosetta-gami™ 2(DE3)	K-12 株由来	ストレプトマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	71351-3 71351-4
Rosetta-gami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	71136-3 71136-4

タンパク質不溶化やフォールディング異常の改善②

ラクトース透過酵素 *lacY* に変異を持つ Tuner や Rosetta-gami B は、IPTG 濃度依存性の発現量変化を示します。これらのホストの使用は、毒性が強いタンパク質の発現レベルに依存してフォールディング効率や可溶化度が落ちている場合に有効な選択です。詳細は 8 ページをご覧ください。

			カタログ番号
Tuner™ (DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし	70623-3 70623-4
Origami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	70837-3 70837-4
Rosetta-gami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	71136-3 71136-4

毒性タンパク質の発現①

下記のホストを用いて基底発現を抑制することで、細胞毒性が高いタンパク質の回収率が向上する場合があります。とくに pLysS を持つ株は T7 RNA ポリメラーゼ阻害剤である T7 リゾチームを常に微量生産するため、T7 プロモーター依存性の基底発現が限りなく低く抑制されます。また、ベクターに pETcoco を使用することも一つの手段です。詳細は 10 ページをご覧ください。

			カタログ番号
Tuner(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし	70623-3 70623-4
NovaBlue(DE3)	K-12 株由来	テトラサイクリン耐性	69284-3 69284-4
すべての (DE3) pLacI 株	B あるいは K-12 株由来	薬剤耐性は菌株によって異なる	お問い合わせください
すべての (DE3) pLysS 株	B あるいは K-12 株由来	薬剤耐性は菌株によって異なる	お問い合わせください

毒性タンパク質の発現②

非発現宿主とバクテリオファージ CE6（カタログ番号 69390-3 および 69390-4）の組み合わせによる発現誘導系では、基底発現による発現が起こりません。したがって、基底発現レベルでも菌体に大きなストレスを与えるような、高い毒性を持つタンパク質の発現が可能です。詳細は 10 ページをご覧ください。

			カタログ番号
全ての非発現宿主	B あるいは K-12 株由来	薬剤耐性は菌株によって異なる	お問い合わせください

完全長のタンパク質が得られない

Rosetta シリーズは、大腸菌ではほとんど使用されないコドンに対する tRNA の発現量を高く保っているホストです。詳細は 9 ページをご覧ください。

			カタログ番号
Rosetta(DE3)	B 株由来	クロラムフェニコール耐性	70954-3 70954-4
Rosetta 2(DE3)	B 株由来	クロラムフェニコール耐性	71397-3 71397-4
Rosetta-gami 2(DE3)	K-12 株由来	ストレプトマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	71351-3 71351-4
Rosetta-gami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	71136-3 71136-4
RosettaBlue™(DE3)	K-12 株由来	テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性	71059-3 71059-4

発現用プラスミドの安定化

反復配列を持つ標的遺伝子などの挿入が原因でプラスミドが不安定化し、タンパク質の発現量が不安定な場合は、下記 *recA*⁻ のホストによってプラスミドの安定性を向上させることが可能です。

			カタログ番号
BLR(DE3)	B 株由来	テトラサイクリン耐性	69053-3 69053-4
HMS174(DE3)	K-12 株由来	リファンピシン耐性	69453-3 69453-4
NovaBlue(DE3)	K-12 株由来	テトラサイクリン耐性	69284-3 69284-4

標的タンパク質のラベリング

発現タンパク質のラベルには、³⁵S-Met がタンパク質に確実に取り込まれるメチオニン要求性株 B834 が推奨されます。

			カタログ番号
B834(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし	69041-3 69041-4
B834(DE3)pLysS	B 株由来	クロラムフェニコール耐性	69042-3 69042-4

アニマルフリー

Veggie は、動物由来成分を含まないコンピテントセルです。

			カタログ番号
Veggie BL21(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし	71252-3 71252-4

vector	Amp ^R	Kan ^R	T7	T7/lac	His • Tag	T7 • Tag	S • Tag	Trx • Tag	KSI	HSV • Tag	Dsb • Tag	GST • Tag	Nus • Tag	Strep • Tag II	タグ切断配列	Signal Seq.
pET-3a-d	●		●			N										
pET-9a-d		●	●			N										
pET-11a-d	●			●		N										
pET-14b	●		●		N										T	
pET-15b	●			●	N										T	
pET-16b	●			●	N										X	
pET-17b	●		●			N										
pET-19b	●			●	N										E	
pET-20b (+)	●		●		C											●
pET-21a-d (+)	●			●	C	N										
pET-22b (+)	●			●	C											●
pET-23a-d (+)	●		●		C	N										
pET-24a-d (+)		●		●	C	N										
pET-25b (+)	●			●	C					C						●
pET-26b (+)		●		●	C											●
pET-27b (+)		●		●	C					C						●
pET-28a-c (+)		●		●	N, C	I									T	
pET-29a-b (+)		●		●	C		N								T	
pET-30a-c (+)		●		●	N, C		I								T, E	
pET-30 Ek/LIC		●		●	N, C		I								T, E	
pET-30 Xa/LIC		●		●	N, C		I								T, X	
pET-31b (+)	●			●	C				N							
pET-32a-c (+)	●			●	I, C		I	N							T, E	
pET-32 Ek/LIC	●			●	I, C		I	N							T, E	
pET-32 Xa/LIC	●			●	I, C		I	N							T, X	
pET-39b (+)			●	●	I, C		I				N				T, E	●
pET-40b (+)		●		●	I, C		I				N				T, E	●
pET-41a-c (+)		●		●	I, C		I					N			T, E	
pET-41 Ek/LIC		●		●	I, C		I					N			T, E	
pET-42a-c (+)		●		●	I, C		I					N			T, X	
pET-43.1a-c (+)	●			●	I, C		I			C			N		T, E	
pET-43.1 Ek/LIC	●			●	I, C		I			C			N		T, E	
pET-44a-c (+)	●			●	N, I, C		I			C			I		T, E	
pET-45b (+)	●			●	N		C								E	
pET-46 Ek/LIC	●			●	N		C								E	
pET-47b (+)		●		●	N		C								H, T	
pET-48b (+)		●		●	I		C	N							H, T	
pET-49b (+)		●		●	I		C					N			H, T	
pET-50b (+)		●		●	N, I		C						I		H, T	
pET-51b (+)	●			●	C									N	E	
pET-51 Ek/LIC	●			●	C									N	E	
pET-52b (+)	●			●	C									N	H, T	
pET-52 3C/LIC	●			●	C									N	H, T	
pETcoco -1	※			●	N					C					E	
pETcoco -2	●			●	N					C					E	

C: C 末端タグ (オプション)

E: Enterokinase

H: HRV 3C

I: 配列内タグ

LIC: Ligation-independent cloning

N: N 末端タグ

Signal Seq.: ペリプラズム輸送配列

T: Thrombin

X: Factor Xa

※ pETcoco -1 はクロラムフェニコール耐性です

宿主株	由来	遺伝子型	説明	抗生物質への耐性
B834	B	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i>	メチオニン要求株、BL21 の親株、非発現用宿主	none
B834 (DE3)	B	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3)</i>	メチオニン要求株、BL21 の親株、一般的な発現用宿主、 ³⁵ S-Met ラベルに最適	none
B834 (DE3) pLysS	B	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3) pLysS (Cam^R)</i>	メチオニン要求株、BL21 の親株、厳密な発現制御宿主、 ³⁵ S-Met ラベルに最適	Chloramphenicol (34 µg/mL)
BL21	B834	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i>	コントロール用非発現用宿主	none
BL21 (DE3)	B834	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	一般的な発現用宿主	none
BL21 (DE3) pLysS	B834	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)</i>	厳密な発現制御宿主	Chloramphenicol (34 µg/mL)
BLR	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (srlrecA) 306::Tn10 (Tet^R)</i>	プラスミドを安定化させる <i>recA⁻</i> 非発現用宿主、反復配列を含むプラスミド用への使用を推奨	Tetracycline (12.5 µg/mL)
BLR (DE3)	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) (srlrecA) 306::Tn10 (Tet^R)</i>	プラスミドを安定化させる <i>recA⁻</i> 発現用宿主、反復配列を含むプラスミド用への使用を推奨	Tetracycline (12.5 µg/mL)
BLR (DE3) pLysS	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) (srlrecA) 306::Tn10 pLysS (Tet^R)</i>	プラスミドを安定化させる <i>recA⁻</i> 厳密な発現制御宿主、反復配列を含むプラスミド用への使用を推奨	Chloramphenicol (34 µg/mL) Tetracycline (12.5 µg/mL)
HMS174	K-12	<i>F⁻ recA1 hsdR (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) (Rif^R)</i>	コントロール用非発現用宿主	Rifampicin (200 µg/mL)
HMS174 (DE3)	K-12	<i>F⁻ recA1 hsdR (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) (DE3) (Rif^R)</i>	プラスミドを安定化させる <i>recA⁻</i> K-12 派生株 発現用宿主	Rifampicin (200 µg/mL)
HMS174 (DE3) pLysS	K-12	<i>F⁻ recA1 hsdR (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) (DE3) pLysS (Cam^R, Rif^R)</i>	プラスミドを安定化させる <i>recA⁻</i> 厳密な発現制御宿主、K-12 派生株	Chloramphenicol (34 µg/mL) Rifampicin (200 µg/mL)
NovaBlue	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac F' [proA⁺ B⁺ lacI^q Z Δ M15 ::Tn10] (Tet^R)</i>	非発現用宿主、一般的なクローニング宿主、プラスミド調製への使用を推奨	Tetracycline (12.5 µg/mL)

宿主株	由来	遺伝子型	説明	抗生物質への耐性
NovaBlue (DE3)	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac (DE3) F' [proA⁺B⁺ lacI^q Z ΔM15 ::Tn10] (Tet^r)</i>	<i>recA</i> , <i>endA</i> に変異を入れた、高品質プラスミドの収率が上がる <i>lacI^q</i> K-12 派生株 発現用宿主、Nova-Tope® System とのご使用を推奨	Tetracycline (12.5 μg/mL)
NovaBlue T1 ^R	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac tonA F' [proA⁺B⁺ lacI^q Z ΔM15 ::Tn10] (Tet^r)</i>	非発現用宿主、一般的なクローニング宿主、T1 および T5 ファージ耐性	Tetracycline (12.5 μg/mL)
Origami 2	K-12	<i>Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lacI^q pro] gor522 ::Tn10 trxB (Str^r, Tet^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主、カナマイシン感受性	Streptomycin (50 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Origami 2 (DE3)	K-12	<i>Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lacI^q pro] (DE3) gor522 ::Tn10 trxB (Str^r, Tet^r)</i>	一般的な発現用宿主、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化される株、カナマイシン感受性	Streptomycin (50 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Origami 2 (DE3) pLysS	K-12	<i>Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lacI^q pro] (DE3) gor522 ::Tn10 trxB pLysS (Cam^r, Str^r, Tet^r)</i>	厳密な発現制御宿主、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化される株、カナマイシン感受性	Chloramphenicol (34 μg/mL) Streptomycin (50 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Origami™ B	Tuner™ (B strain)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 trxB (Kan^r, Tet^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主	Kanamycin (15 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Origami B (DE3)	Tuner™ (B strain)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan^r, Tet^r)</i>	一般的な発現用ホスト、IPTG の濃度調節によって、発現量を調節することを可能にする BL21 の <i>lacY</i> 変異体株で、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化されています	Kanamycin (15 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Origami B (DE3) pLysS	Tuner™ (B strain)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysS (Cam^r, Kan^r, Tet^r)</i>	基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、IPTG の濃度調節によって、発現量を調節することを可能にする BL21 の <i>lacY</i> 変異体株で、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化されています	Chloramphenicol (34 μg/mL) Kanamycin (15 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta™	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE (Cam^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主	Chloramphenicol (34 μg/mL)
Rosetta (DE3)	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam^r)</i>	一般的な発現用ホスト、6 つのレアコドン tRNA を供給	Chloramphenicol (34 μg/mL)
Rosetta (DE3) pLysS	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^r)</i>	基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、6 つのレアコドン tRNA を供給	Chloramphenicol (34 μg/mL)
Rosetta 2	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE2 (Cam^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主	Chloramphenicol (34 μg/mL)
Rosetta 2 (DE3)	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^r)</i>	一般的な発現用ホスト、7 つのレアコドン tRNA を供給	Chloramphenicol (34 μg/mL)
Rosetta 2 (DE3) pLysS	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam^r)</i>	基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、7 つのレアコドン tRNA を供給	Chloramphenicol (34 μg/mL)
RosettaBlue™	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac F' [proA⁺B⁺ lacI^q Δ Z M15 ::Tn10] pRARE (Cam^r, Tet^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主	Chloramphenicol (34 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
RosettaBlue (DE3)	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac (DE3) F' [proA⁺B⁺ lacI^q Δ Z M15 ::Tn10] pRARE (Cam^r, Tet^r)</i>	<i>recA⁺ endA⁺</i> K-12 <i>lacI^q</i> 一般的な発現用ホスト、6 つのレアコドン tRNA を供給	Chloramphenicol (34 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
RosettaBlue (DE3) pLysS	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac (DE3) F' [proA⁺B⁺ lacI^q Δ Z M15 ::Tn10] pLysSRARE (Cam^r, Tet^r)</i>	<i>recA⁺ endA⁺</i> K-12 <i>lacI^q</i> 基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、6 つのレアコドン tRNA を供給	Chloramphenicol (34 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta-gami™ 2	Origami (K-12)	<i>Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lacI^q pro] gor522 ::Tn10 trxB pRARE2 (Cam^r, Str^r, Tet^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主	Chloramphenicol (34 μg/mL) Streptomycin (50 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta-gami 2 (DE3)	Origami (K-12)	<i>Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F' [lac⁺ lacI^q pro] gor522 ::Tn10 trxB pRARE2 (Cam^r, Str^r, Tet^r)</i>	一般的な発現用ホスト、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化され、また 7 つのレアコドン tRNA を供給します。カナマイシン感受性株	Chloramphenicol (34 μg/mL) Streptomycin (50 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS	Origami (K-12)	<i>Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F' [lac⁺ lacI^q pro] gor522 ::Tn10 trxB pLysSRARE2 (Cam^r, Str^r, Tet^r)</i>	基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化され、また 6 つのレアコドン tRNA を供給します。カナマイシン感受性株	Chloramphenicol (34 μg/mL) Streptomycin (50 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta-gami B	Tuner™ (B strain)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 trxB pRARE (Cam^r, Kan^r, Tet^r)</i>	コントロール用の非発現用宿主	Chloramphenicol (34 μg/mL) Kanamycin (15 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta-gami B (DE3)	Tuner™ (B strain)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pRARE (Cam^r, Kan^r, Tet^r)</i>	一般的な発現用ホスト、IPTG の濃度調節によって、発現量を調節することを可能にする BL21 の <i>lacY</i> 変異体株で、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化され、また 6 つのレアコドン tRNA を供給します	Chloramphenicol (34 μg/mL) Kanamycin (15 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Rosetta-gami B (DE3) pLysS	Tuner™ (B strain)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^r, Kan^r, Tet^r)</i>	基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、IPTG の濃度調節によって、発現量を調節することを可能にする BL21 の <i>lacY</i> 変異体株で、 <i>trxB</i> と <i>gor</i> 遺伝子に変異を持ったため、細胞質中でのシスルフィド結合が大幅に強化され、また 6 つのレアコドン tRNA を供給します	Chloramphenicol (34 μg/mL) Kanamycin (15 μg/mL) Tetracycline (12.5 μg/mL)
Tuner™	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i>	コントロール用の非発現用宿主	none
Tuner (DE3)	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3)</i>	一般的な発現用ホスト、IPTG の濃度調節によって、発現量を調節することを可能にする BL21 の <i>lacY</i> 変異体株です	none
Tuner (DE3) pLysS	BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 pLysS (DE3) (Cam^r)</i>	基底発現を厳密に制御する発現用ホスト、IPTG の濃度調節によって、発現量を調節することを可能にする BL21 の <i>lacY</i> 変異体株です	Chloramphenicol (34 μg/mL)

第2章

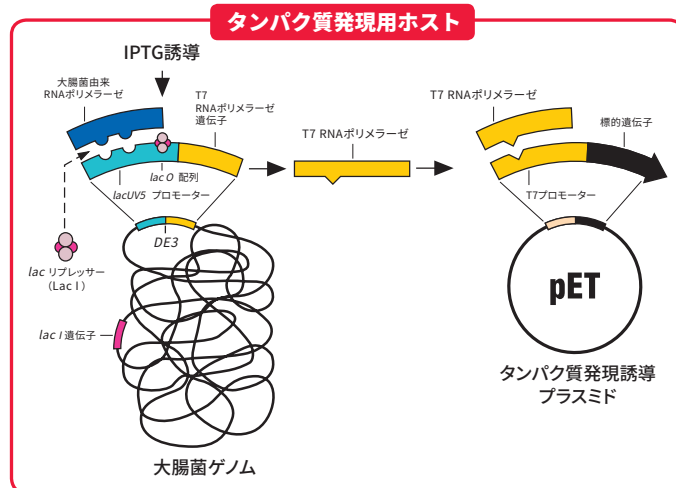
タンパク質発現誘導の3つのポイント

ポイント

1

発現実験前の確認事項

pET システムは多くの条件最適化手段を伴ったタンパク質発現誘導系です。しかし、クローニング前や発現実験前にあらかじめ考慮しておく点もあります。



N-end Rule とメチオニンアミノペプチダーゼの影響

大腸菌内では、フォルミルメチオニン (fMet) 以外の N 末端を持つタンパク質は、不安定なグループ（半減期約 2 分）と比較的に安定なグループ（半減期 10 時間以上）に大別されます (Tobias *et al.*, 1991)。また、2 番目のアミノ酸 X_2 が大きな側鎖を持つ場合は、側鎖の立体障害がメチオニンアミノペプチダーゼによる fMet- X_2 間の分解を阻害しますが、それ以外では 16 ~ 97% が分解されます (Hirel *et al.*, 1989; Lathrop *et al.*, 1992)。上記の 2 知見から、**大腸菌内では X_2 が Leu の場合、タンパク質が分解を受けやすい**と推定されます。NdeI サイトを用いて pET ベクターに遺伝子をクローニングをする場合、 X_2 が Leu にならないよう配慮する必要があります (NcoI を使用する場合は第 2 コドンの開始が G になるため X_2 が Leu になることはありません)。とはいえ、 X_2 が Leu のタンパク質をクローニングする際にアミノ酸置換を行うことは、費用対効果を考えるとあまり推奨できません。そのような場合は、N 末端にタグ配列を付加可能なベクターへの遺伝子クローニングをお勧めします。

タンパク質を不安定化する N 末端 (半減期約 2 分)			メチオニンアミノペプチダーゼ 抵抗性の X_2		
Arg			Arg	Gln	Glu
	Leu				
	Lys		His	Lys	Met
Phe	Trp	Tyr	Phe	Trp	Tyr

最適 IPTG 濃度は 1 mM とは限りません

pET ベクターからのタンパク質発現誘導における**推奨最終 IPTG 濃度は、ホスト株の遺伝子型とプロモーターの種類に依存**します。実験開始前に下表で推奨濃度をご確認いただき、必要に応じて最適濃度をご検討ください。とくに *lacY1* 変異株では、事前に IPTG の最適濃度を確認する必要があります。簡単な IPTG 濃度最適化法には、(1) 下表の推奨濃度を目安に調製した抗生物質不含 IPTG プレートに菌体を塗布し、プラスミドの欠落が起こりにくい IPTG 濃度を検索する方法 (Kagawa N., 2013) や、(2) IPTG 希釈系列中で誘導される LacZ 濃度の定量から最適濃度を決定する方法などが挙げられます。

IPTG ストック溶液濃度	保存温度	滅菌方法	発現用ホスト遺伝子型	プロモーター	推奨 IPTG 濃度
100 mM (238 mg/ 水 10 mL)	-20°C	ろ過滅菌 (孔径 0.22 μm)	<i>lacY1</i> ⁺ [ラクトース透過酵素を持つ株]	T7	0.4 mM
			<i>lacY1</i> [ラクトース透過酵素変異株※]	T7lac	1.0 mM
				T7/T7lac	25 μM ~ 1.0 mM

代表的な *lacY1* 変異株

Tuner(DE3) Competent Cells (カタログ番号 70623-3、70623-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。ラクトース透過酵素 <i>lacY</i> に変異を持つため、IPTG 濃度依存性の発現量変化を示します。
Origami B(DE3) Competent Cells (カタログ番号 70837-3、70837-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。 <i>tnb</i> および <i>gor522</i> 変異によりジスルフィド結合生成能が高く、ジスルフィド結合形成率が低いタンパク質のフォールディング効率の改善が期待できます。ラクトース透過酵素 <i>lacY1</i> に変異を持つため、IPTG 濃度依存性の発現量変化を示します。
Rosetta-gami B(DE3) Competent Cells (カタログ番号 71136-3、71136-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。 <i>tnb</i> および <i>gor522</i> 変異によりジスルフィド結合生成能が高く、ジスルフィド結合形成率が低いタンパク質のフォールディング効率の改善が期待できます。ラクトース透過酵素 <i>lacY1</i> に変異を持つため、IPTG 濃度依存性の発現量変化を示します。大腸菌でほとんど使用されないレアコドンに対する 6 種類の tRNA の発現量が高いため、完全長のタンパク質を得やすいという特性もあります。

参考文献

Hirel P. H. *et al.*, 1989, *PNAS* **86**(21), p.p.8247-8251. (PMID: 2682640)
Lathrop B. K. *et al.*, 1992, *Protein Expr. Purif.* **3**(6), p.p.512-517. (PMID: 1336691)
Kagawa N., 2013, " 生化学者のひとりごと ", <http://kagawap450.blogspot.jp/2013/01/iptg.html>
Tobias J. W. *et al.*, 1991, *Science* **254**(5036), p.p.1374-1377. (PMID: 1962196)

2 培養条件の見直し

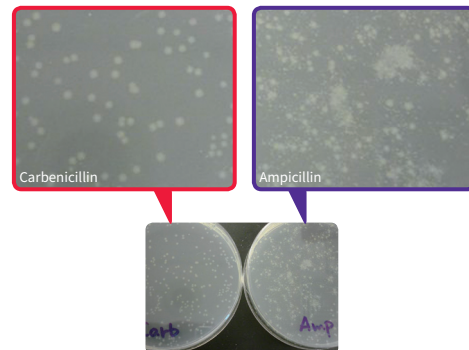
発現誘導したタンパク質の収率が上がらないという場合には、培養条件の一部を見直す必要があるかもしれません。

アンピシリンの意外な落とし穴

選択用抗生物質として一般的なアンピシリンには、**酸性条件下で加水分解を受けやすい**という注意すべき弱点があります。このコーナーをお読みの皆様も、アンピシリンプレート上のサテライトコロニーに悩まされた経験は一度や二度ではないはずです。大腸菌の代謝は、培地を酸性に傾かせるとともに、培養液中のβ-ラクタマーゼ（アンピシリン耐性遺伝子の産物）濃度を上昇させます。培地の pH 低下とβ-ラクタマーゼ蓄積はアンピシリンの分解を加速し、培養後期のある時点から、**プラスミドを持たない細胞が増殖できる環境**を作り出します。

たとえば pBR322 系プラスミドでは、菌体がおおよそ 10^7 細胞/mL を超えた時点でアンピシリンが効果を示さなくなり、プラスミド保持が菌体の増殖を相対的に遅らせる場合は特に、菌体濃度の上昇がプラスミドを持たない菌の増殖を促進します。

選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子の使用が必須な場合は、より安定性の高いβ-ラクタム系抗生物質「カルベニシリン」の使用が推奨されます。また、より安定な選択系や GMP グレードの実験環境ではカナマイシンの使用が推奨されます。



カルベニシリンとアンピシリンの性能比較

同濃度のカルベニシリン（左）とアンピシリン（右）を含むプレートに、*amp^r* 遺伝子を持つ菌株を接種した結果。アンピシリンプレートでは培養後期になるとサテライトコロニーが出現するが、カルベニシリンプレートではサテライトコロニーが観察されない。

抗生物質名	ストック溶液濃度	保存温度	推奨使用濃度	溶媒	滅菌方法	作用機序
アンピシリン (Na 塩)	25 mg/mL (500X)	-20°C	50 µg/mL (1 ヶ月以内に使用)	イオン交換水、超純水	ろ過滅菌 (孔径 0.22 µm)	細胞壁合成を阻害する
カルベニシリン (2Na 塩)	50 mg/mL (1,000X)	-20°C	50 µg/mL	イオン交換水、超純水	ろ過滅菌 (孔径 0.22 µm)	細胞壁合成を阻害する
カナマイシン (硫酸塩)	30 mg/mL (1,000X)	-20°C	30 µg/mL (<i>kan^r</i> プラスミドを保持する株) 15 µg/mL (染色体上に <i>kan^r</i> 遺伝子を有する株)	イオン交換水、超純水	ろ過滅菌 (孔径 0.22 µm)	30S リボソームに作用し、タンパク質合成を阻害する
クロラムフェニコール	34 mg/mL (1,000X)	-20°C	34 µg/mL	エタノール	ろ過滅菌 (孔径 0.22 µm)	ペプチジルトランスフェラーゼ反応を妨げ、タンパク質合成を阻害する

抗生物質の滅菌にも ろ過滅菌の定番「滅菌マイレクス」



抗生物質をはじめとする有機化合物を活性を下げずに滅菌するには、ろ過滅菌が最適です。水溶液のろ過滅菌には、コスト面で有利な「滅菌マイレクス GS」や、分子が吸着しにくい「滅菌マイレクス GV」をお勧めします。また、DMSO やエタノールなどの有機系溶媒に溶けた薬剤の滅菌には、多くの化学薬品に適合性を持つ「滅菌マイレクス LG」をご使用ください。

レアコドンの補充の重要性

あるアミノ酸を規定するコドンが 2 種類以上存在する状況は「縮重」と呼ばれます。たとえば Met は AUG の 1 種類で規定され縮重していませんが、Leu は 4 種類のコドン (CUA、CUC、CUG、CUU) に規定され縮重しています。縮重している各コドンは生物種ごとに使用頻度が異なり、使用頻度と tRNA 発現量には正の相関があると考えられています。コドン使用頻度データベースは、かずさ DNA 研究所の Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) が有名です。

タンパク質発現実験においては、コドン使用頻度が翻訳効率および収率のボトルネックになる場合があります。この問題を解決するには、次の二つの選択肢があります。

- 1 発現宿主のコドン使用頻度に合わせて標的遺伝子配列を最適化する
- 2 発現宿主内で発現量が少ない tRNA を補充する

このうち①は、たった一つの遺伝子に対してでさえ、かなりの労力を要する作業が必要です。

一方②はそれほど難しい手段ではありません。もっとも簡単な解決策は、Rosetta 系ホスト（下表）の使用です。Rosetta 系のホストが保有している pRARE 系のプラスミド上には tRNA をコードする領域があり、大腸菌でほとんど使用されない tRNA の発現量がよく保たれています。

アミノ酸	コドン	全遺伝子 ^{*1}	Class II 遺伝子 ^{*2}	Rosetta 系 補充コドン	Rosetta2 系 補充コドン
Arg	AGA	0.039	0.006	✓	✓
	AGG	0.022	0.003	✓	✓
	CGG	0.098	0.008		✓
	CGA ^{*3}	0.065	0.011		
	CGU	0.378	0.643		
	CGC	0.398	0.33		
Gly	GGA	0.109	0.02	✓	✓
	GGC	0.403	0.428		
	GGG	0.151	0.044		
	GGU	0.337	0.508		
Ile	AUA	0.073	0.006	✓	✓
	AUC	0.42	0.659		
	AUU	0.507	0.335		

アミノ酸	コドン	全遺伝子 ^{*1}	Class II 遺伝子 ^{*2}	Rosetta 系 補充コドン	Rosetta2 系 補充コドン
Leu	CUA	0.037	0.008	✓	✓
	CUC	0.104	0.08		
	CUG	0.496	0.767		
	CUU	0.104	0.056		
	UUA	0.131	0.055		
	UUG	0.129	0.034		
Pro	CCA	0.191	0.153		
	CCC	0.124	0.016	✓	✓
	CCG	0.525	0.719		
	CCU	0.159	0.112		

^{*1} 大腸菌ゲノム上のタンパク質をコードしている 4290 遺伝子 (Nakamura Y. et al., 2000)

^{*2} 大腸菌の対数増殖期に安定した高い発現が認められる 195 遺伝子 (Henaut A. & Danchin A., 1996)

^{*3} CGA も大腸菌中のレアコドンですが、CGA に対応する tRNA の補充はタンパク質の翻訳効率にほとんど影響を与えないことが知られています (未発表社内データ)。そのため、Rosetta や Rosetta2 では CGA 以外のレアコドンに対する tRNA が補充されています。

代表的な Rosetta 系タンパク質発現用ホスト

Rosetta(DE3) Competent Cells (カタログ番号 70954-3、70954-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。大腸菌でほとんど使用されない 6 種類のレアコドンに対する tRNA の発現量が高いため、完全長のタンパク質を得やすいという特性もあります。
Rosetta 2(DE3) Competent Cells (カタログ番号 71397-3、71397-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。大腸菌でほとんど使用されない 7 種類のレアコドンに対する tRNA の発現量が高いため、完全長のタンパク質を得やすいという特性もあります。
Rosetta-gami B(DE3) Competent Cells (カタログ番号 71136-3、71136-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。txb および gor522 変異によりジスルフィド結合生成能が高く、ジスルフィド結合形成率が低いタンパク質のフォールディング効率の改善が期待できます。大腸菌でほとんど使用されない 6 種類のレアコドンに対する tRNA の発現量が高いため、完全長のタンパク質を得やすいという特性もあります。ラクトース透過酵素 lacY1 に変異を持つため、IPTG 濃度依存性の発現量変化を示します。
Rosetta-gami 2(DE3) Competent Cells (カタログ番号 71351-3、71351-4)	IPTG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼを発現可能な発現用ホストです。txb および gor522 変異によりジスルフィド結合生成能が高く、ジスルフィド結合形成率が低いタンパク質のフォールディング効率の改善が期待できます。大腸菌でほとんど使用されない 7 種類のレアコドンに対する tRNA の発現量が高いため、完全長のタンパク質を得やすいという特性もあります。

参考文献

Henaut A. & Danchin A., 1996, " In Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology" , p.p.2047–2066.

Nakamura Y. et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28(1), p.292. (PMID: 10592250)

ポイント

3 基底発現の抑制

プラスミドクローニング用ホストとは異なり、タンパク質発現用ホスト内の T7 プロモーター下流の遺伝子は、IPTG 非存在下であってもわずかに転写されています（基底発現）。大腸菌内に存在しないタンパク質の発現は、微量であってもホストに少なからずストレスを与えます。とくに発現タンパク質が毒性を発揮する場合は、基底発現がプラスミドの不安定化やホストの増殖阻害を引き起こし、収率低下の要因となります。そのため、基底発現を可能な限り低く抑制する下記技術の検討は、**標的タンパク質の収率を保つ上で重要なポイント**です。

グルコース含有培地の利用

DE3 溶原化株は、培地へ 0.5 ～ 1% のグルコースを添加すると、グルコースが優先的に分解される期間 lacUV5 プロモーターからの T7 RNA ポリメラーゼの発現が抑制される性質を持っています（クローニング用ホストではグルコース添加の効果はありません）。発現用ホストとして DE3 溶原化株を使用する場合は IPTG 添加前の前培養段階では、グルコース含有培地による基底発現の抑制をお勧めします。

T7lac プロモーターの利用

T7lac プロモーターを持つ pET ベクターを DE3 溶原化株に導入すると、lac リプレッサー LacO が lacUV5 プロモーター下流の T7 RNA ポリメラーゼだけでなく T7lac プロモーターも同時に抑制するため、標的タンパク質の基底発現が野生型 T7 プロモーターを持つ pET ベクター（pET-3a-d など）よりも低く保たれます。プロモーターの分類は 3 ページをご覧ください。

pLysS あるいは pLacI 保有ホストの利用

T7 リゾチームをコードするプラスミド pLysS は、同様のタンパク質をコードするプラスミド pLysE とは異なり、細胞の増殖にあまり影響を与えません。pLysS 保有菌株では、T7 リゾチームによる T7 RNA ポリメラーゼの分解により、標的タンパク質の基底発現が抑制されます。また、pLysS 保有株は凍結融解や 0.1% Triton-X の添加で T7 リゾチームによる溶菌が起こるため、発現タンパク質の抽出効率の向上も期待できます。一方、Lac リプレッサーをコードするプラスミド pLacI 保有菌株では、細胞内 LacI 濃度が高く保たれるために T7 RNA ポリメラーゼの発現が抑制され、標的タンパク質の基底発現が抑えられます。

低コピー数ベクターの利用

pETcoco は 0.2% グルコース存在下で細胞あたり平均 1 コピーに保たれる低コピープラスミドです。1 コピーに保たれた pETcoco では、突然変異（組換え、欠失）発生率と基底発現が無視できる程度になります。pETcoco を利用したタンパク質発現では、培地への L-アラビノース添加により細胞あたり約 40 コピーにプラスミドを増幅後、IPTG 添加によって目的遺伝子の発現を誘導します。

非発現宿主とバクテリオファージ CE6 の組み合わせによる発現誘導

非発現宿主（非 DE3 溶原株）は標的遺伝子の基底発現がおらず、上記のどの方法でも維持できない極めて毒性の高いタンパク質をコードしたプラスミドを維持可能です。非発現宿主にバクテリオファージ CE6 を感染させて T7 RNA ポリメラーゼを導入すれば、T7 プロモーター下流の高毒性タンパク質の効率的な発現誘導が実現します。

第3章

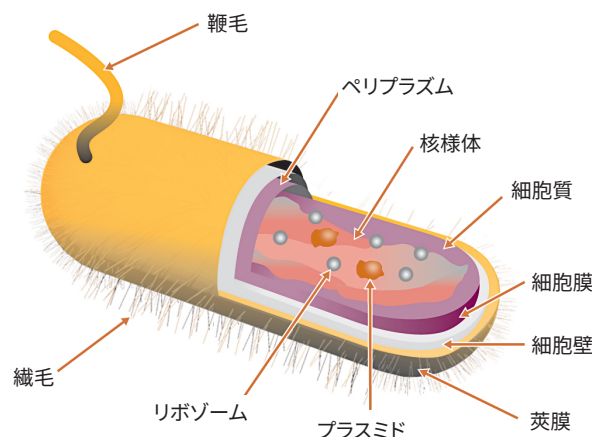
タンパク質抽出・精製の 3つのポイント

ポイント

1 タンパク質の局在

発現タンパク質は大腸菌細胞中に一様に分布するわけではなく、細胞質、ペリプラズムなど特定のコンパートメントに局在します。

標的タンパク質の発現そのものは、全細胞タンパク質画分（菌体を SDS サンプルバッファー等で処理した試料）で確認可能ですが、発現した標的タンパク質を効率よく回収（抽出）する場合は、標的タンパク質が存在するおもな画分をあらかじめ把握する必要があります。発現タンパク質は、通常次の 4 画分のいずれかに存在します。各画分の分離法は pET System Manual（日本語版）などの実験プロトコルをご参照ください。



1. 培地（細胞外）画分

誘導時間を延長した場合や標的タンパク質の細胞外への分泌・漏出が予想される場合は、培地画分における標的タンパク質の存在量の確認が必要です。

2. ペリプラズム画分

標的タンパク質がペリプラズム分泌シグナル（Signal Sequence、DsbA・Tag、DsbC・Tag など）を持つ場合、ペリプラズム画分から標的タンパク質を調製する必要があります。標的タンパク質のペリプラズムへの分泌を促進するタグについては、3 ページをご覧ください。

※ペリプラズム画分の調製は、浸透圧ショックプロトコル（Ausubel *et al.*, 1989）が容易です。しかし、pLysS（または pLysE）を保有するホストでは T7 リゾチームが細胞壁の崩壊を引き起こすため、浸透圧ショックによるペリプラズム画分の調製は推奨されません。

3. 可溶性画分

可溶性画分からの標的タンパク質の抽出には、細胞壁の破碎あるいは分解が必要です。よく用いられるフレンチプレスや超音波による物理的破碎は熱や酸化によるタンパク質変性を引き起こす可能性があり、注意が必要です。一方、リゾチーム処理と凍結融解を組み合わせた破碎や界面活性剤処理による破碎は、標的タンパク質の活性を損ないにくく、収率を高く保つ方法のひとつです。

※界面活性剤による細胞壁の破碎には BugBuster Protein Extraction Reagent（14 ページ）の利用が便利です。

4. 不溶性画分（封入体）

細胞質由来の不溶性画分は、細胞残渣と封入体（inclusion body：正しくフォールディングされていない標的タンパク質の不溶性凝集体）から構成されます。変性バッファーを用いれば、精製された封入体から標的タンパク質を可溶化できます。封入体には非標的タンパク質や核酸が混入するため、通常は精製封入体から標的タンパク質を可溶化し、再精製する必要があります。

※精製封入体は多くの場合において標的タンパク質に対する抗体作製時の抗原として使用可能です（Harlow & Lane, 1988）。

※標的タンパク質が封入体に取り込まれずに不溶性画分に分配される場合もあります。

※不溶性画分中の核酸の分解には、プロテアーゼフリーの核酸分解酵素 Benzonase Nuclease（14 ページ）の使用を推奨します。

参考文献

Ausubel F. M. *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Inc.
Harlow E. & Lane D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press.

2 フォールディングと可溶化

IPTG の添加による発現誘導は、IPTG が *lacUV5* プロモーターを直接活性化するため誘導の立ち上がりが早い半面、タンパク質産生の偏りから菌体にストレスがかかり、フォールディング異常が起こりやすいという短所があります。また、ジスルフィド結合は通常ペリプラズム内で形成され、還元的な大腸菌の細胞質内では正しいフォールディングが起こりにくいことが知られています。これらに起因する**フォールディング異常は、標的タンパク質の可溶化度を低下させ、収率を下げる**場合があります。標的タンパク質のフォールディング異常は、下記の方法により改善が期待されます。

1. 大腸菌の増殖に伴う緩やかな発現誘導系の採用

Overnight Express Autoinduction System (13 ページ) は、複数の糖が最適な比率で混合された発現誘導用培地です。培養開始時はグルコースが選択的に消費され、基底発現を抑制しながら菌体が増殖します。菌体密度が一定以上になると、ラクトースがアロラクトースに代謝され、*lac* プロモーターからの遺伝子発現が誘導されます。増殖に伴って緩やかに発現誘導が起こるため、菌体に対するストレスが低く、IPTG による発現誘導と比較して、高細胞密度下における高収量の発現が実現するタンパク質発現誘導方法です。

※ Overnight Express Autoinduction System は細胞がアロラクトースを取りこむ能力を持っている場合のみ使用可能です。ラクトース透過酵素をコードする *lacY1* の変異株では使用できません。

※ Overnight Express Autoinduction System は pET システム以外の IPTG 発現系にも最適な培地です。

2. 標的タンパク質のペリプラズム局在化

ペリプラズム酵素やペリプラズム輸送シグナルを持つ pET ベクター（下表および 3 ページ）に標的タンパク質をクローニングすると、発現誘導されたタンパク質のペリプラズムへの局在化が実現し、ジスルフィド結合形成と共に正しいフォールディングが促進されます。ただし、ペリプラズムに局在すると毒性が発揮される LacZ などのタンパク質も知られており、ペリプラズム局在化はフォールディング改善の万能策ではないことにも注意が必要です。

3. *trxB* および *gor522* 変異株と標的タンパク質の細胞質局在化の組み合わせ

細胞質に分布する還元酵素に変異が起こると、細胞質内でのジスルフィド結合形成能力が高くなります。標的タンパク質の細胞質内での可溶化度を高めるタグ（下表）と、*trxB* および *gor522* 変異株（Origami 2、Rosetta-gami 2、Rosetta-gami B）を組み合わせることで、細胞質内において正しくフォールディングされたタンパク質の割合を高めることが可能です。

目的	タグ	タグの特徴	使用可能な pET ベクター
標的タンパク質のペリプラズム内での可溶化の促進	Signal Sequence	ペリプラズム輸送シグナルを融合。	pET-20b(+) pET-22b(+) pET-25b(+) pET-26b(+) pET-27b(+)
	DsbA-Tag™	ジスフィルド結合形成を触媒するペリプラズム酵素を融合。	pET-39b(+)
	DsbC-Tag™	ジスフィルド結合の異性化を触媒するペリプラズム酵素を融合。	pET-40b(+)
標的タンパク質の細胞質内での可溶化の促進	GST-Tag™	標的タンパク質のアフィニティ精製や定量が容易。	pET-41a-b(+) pET-41 Ek/LIC pET-42a-b(+) pET-49b(+)
	Nus-Tag™	可溶化度が低いタンパク質の可溶化度を上げやすい。	pET-43.1a-b(+) pET-43.1 Ek/LIC pET-44a-c(+) pET-44 Ek/LIC pET-50b(+)
	Trx-Tag™	LaVallie の変法 (LaVallie <i>et al.</i> , 1993) によるタンパク質抽出も可能。	pET-32a-c(+) pET-32 Ek/LIC pET-32 Xa/LIC pET-48b(+)

4. *lacY* 変異株の利用

ラクトース透過酵素 *lacY1* に変異を持つ Tuner(DE3) および Tuner(DE3) 由来株は、IPTG 濃度に高く依存したタンパク質発現誘導応答を示します。そのため、毒性の強いタンパク質の発現誘導系において低濃度の IPTG 条件で緩やかにタンパク質を発現させ、可溶化度の向上やフォールディング異常の改善につなげることが可能です。IPTG 濃度の最適化に関する詳細は 8 ページをご覧ください。

参考文献

LaVallie E. R. *et al.*, 1993, *Biotechnology* (N Y), 11(2), p.p.187-193. (PMID: 7763371)

3 精製条件の最適化

pET システムでは標的タンパク質が大腸菌内に大量に産生されるため、通常はイオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過によって十分な精製度の標的タンパク質を調製可能です。また標的タンパク質がタグ配列を持つ場合は、タグに対応するアフィニティ精製の実施により、ワンステップで単一のタンパク質精製物を得ることが可能です。それらの方法では精製度が十分ではない場合でも、下表のいずれかまたはそれらを組み合わせた手法により、標的タンパク質の精製度をさらに向上させることが可能です。

手法	期待される改善点
His・Tag 融合タンパク質の Ni-NTA レジンによる精製	Ni-NTA レジンにトラップされたタンパク質は溶出バッファー中のイミダゾール濃度に依存して溶出されるため、最適溶出濃度の検討によって標的タンパク質の精製度が向上する。
タグ切断プロテアーゼによる溶出	標的タンパク質がタグとの間にプロテアーゼ（エンテロキナーゼ、トロンビンなど）の標的配列をもつ場合、プロテアーゼ処理によってバックグラウンドとしてトラップされる非標的タンパク質の溶出を低減させ、標的タンパク質の精製度を向上させることが可能。
N 末端タグと C 末端タグの併用	タンパク質の末端にタグが融合するデザインの発現ベクターを用いると、不完全長タンパク質は両端にタグを持たないため、タンパク質の両端にあるタグを利用して精製することで、完全長タンパク質のみを精製可能。
多段階精製	複数のタグを利用した精製およびタグ切断プロテアーゼ等による溶出を繰り返すことで、バックグラウンドとしてトラップされる非標的タンパク質の溶出を可能な限り低減させ、標的タンパク質の精製度を大幅に向上させることが可能。

実験効率化のヒント ①

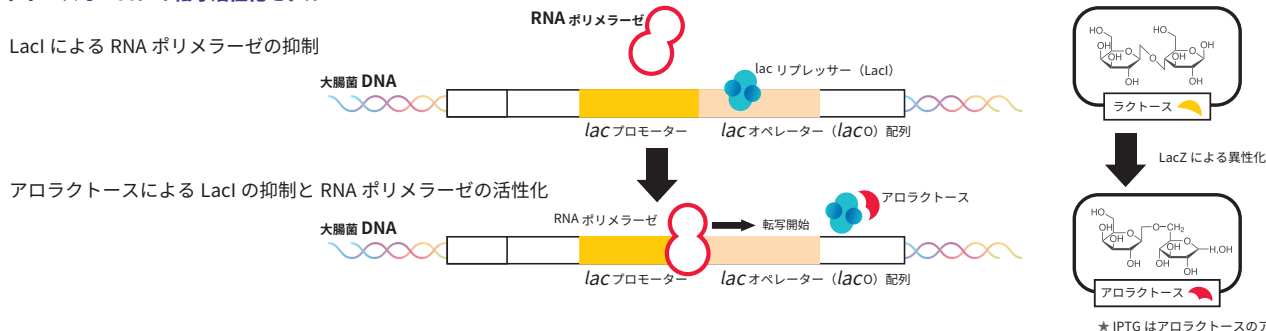
IPTG 添加が不要な自動タンパク質発現誘導システム Overnight Express™ Autoinduction System

特長

- IPTG 添加タイミングを知るための菌体 OD 測定が不要
- 菌体にストレスを与えにくいため、高細胞密度下でタンパク質高収量を実現
- pET システム以外の IPTG 発現誘導系にも適合※1

※1 ラクトースがアロラクトースに変換されることで発現誘導が始まるため、ラクトース透過酵素 (*lacY*) や β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) 遺伝子を保持しているホストが必要です。

ラクトースオペロンの転写活性化モデル



オーバーナイトエクスプレスの原理

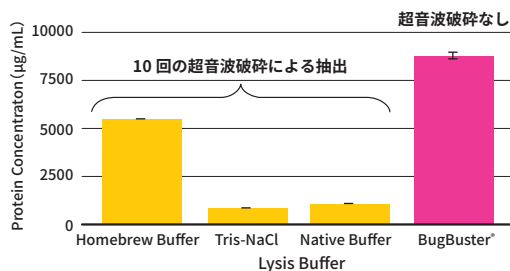
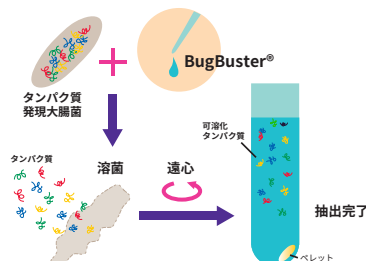
Overnight Express は、炭素源として複数の糖を含有するタンパク質発現誘導用培地です。培養初期は大腸菌がグルコースを選択的に利用するので、標的タンパク質の基底発現が抑制されます (8 ページ)。グルコースが枯渇すると炭素源の転換が起こり、標的タンパク質の発現量が自動的かつ緩やかに上昇します。IPTG 添加による強制的な発現誘導と比較して外来タンパク質の発現による細胞へのストレスが低いため、フォールディング効率や可溶化度の改善も期待できます。

※ご注文情報は 17 ページをご覧ください。

界面活性剤ベースの試薬が穏やかで効率的なタンパク質抽出を実現 BugBuster® Protein Extraction Reagent

- 特長**
- タンパク質変性が少なく、活性を高く維持した抽出を実現
 - 可溶性画分は、調製後にそのままアフィニティ精製に使用可能
 - 不溶性画分からの封入体の精製にも使用可能

操作手順



大腸菌からのタンパク質抽出効率の比較

BugBuster Protein Extraction Reagentは超音波破碎によってタンパク質を抽出する従来法と比べ、高い抽出効率を持っていることが示された。(n=3)

※ご注文情報は 18 ページをご覧ください。

タンパク質サンプルからの確実な核酸除去に Benzonase® Nuclease

- 特長**
- 幅広い反応条件で活性を保持
 - DNA も RNA も分解するエンドヌクレアーゼ
 - プロテアーゼフリー & アニマルフリー

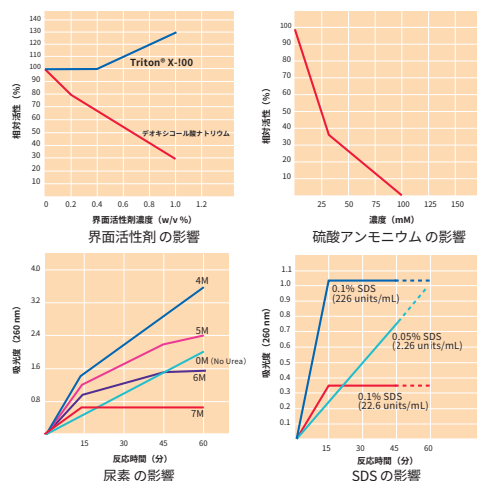
ベンゾナーゼの反応条件

条件	最適条件	活性保持条件
Mg ²⁺ 濃度	1 – 2 mM	1 – 10 mM
pH	8.0 – 9.2	6.0 – 10.0
温度	37 °C	0 – 42°C
ジチオスレイトール (DTT)	0 – 100 mM	> 100 mM
βメルカプトエタノール	0 – 100 mM	> 100 mM
一価の陽イオン (Na ⁺ , K ⁺)	0 – 20 mM	0 – 150 mM
PO ₄ ³⁻ 濃度	0 – 10 mM	0 – 100 mM

※最適条件：90%以上の活性を示します。活性保持条件：15%以上の活性を示します。

※ご注文情報は 18 ページをご覧ください。

タンパク質変性剤存在下のベンゾナーゼ活性比較



付録 汎用培地

pET システムを利用したタンパク質発現誘導によく使用される大腸菌用培地は LB、TB、M9、M9ZB です。0.4% グルコース含有培地 M9 や M9ZB は、基底発現の抑制に便利です。

LB 培地 (Miller)	
Tryptone (トリプトン)	10 g
Yeast Extract (酵母エキス)	5 g
NaCl (塩化ナトリウム)	10 g
1 L にメスアップし、1N NaOH によって pH 7.5 に調製 オートクレーブ滅菌	
M9 培地	
滅菌水	930 mL
20X M9 Salts (M9 塩)	50 mL
20% Glucose (グルコース、滅菌済)	20 mL
1M MgSO ₄ (硫酸マグネシウム)	1 mL
NaCl (塩化ナトリウム)	0.5 g
100 mM K Phosphate	
KH ₂ PO ₄ (リン酸二水素カリウム)	23.1 g
K ₂ HPO ₄ (リン酸水素ナトリウム)	125.4 g
1 L にメスアップ オートクレーブ滅菌	

LB 培地 (Lennox)	
Tryptone (トリプトン)	10 g
Yeast Extract (酵母エキス)	5 g
NaCl (塩化ナトリウム)	5 g
1 L にメスアップし、1N NaOH によって pH 7.5 に調製 オートクレーブ滅菌	
M9ZB 培地 (Studier et al., 1990)	
N-Z-amine A (Quest) (NZ アミン)	10 g
NaCl (塩化ナトリウム)	5 g
1 L にメスアップ オートクレーブ滅菌後、速やかに冷却	
10X M9 Salts (M9 塩、滅菌済)	100 mL
1 M MgSO ₄ (硫酸マグネシウム、滅菌済)	1 mL
40% Glucose (グルコース、滅菌済)	10 mL
20X M9 Salts (M9 塩)	
NH ₄ Cl (塩化アンモニウム)	20 g
KH ₂ PO ₄ (リン酸二水素カリウム)	60 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O (リン酸水素ナトリウム 7 水和物)	120 g
1 L にメスアップ オートクレーブ滅菌	

TB 培地 (Sambrook et al., 1989)	
Deionized Water (脱イオン水)	900 mL
Tryptone (トリプトン)	12 g
Yeast Extract (酵母エキス)	24 g
Glycerol (グリセロール)	4 mL
1 L にメスアップ オートクレーブ滅菌後、速やかに 60°C に冷却	
K Phosphate (リン酸カリウム、滅菌済)	100 mL
10X M9 Salts (M9 塩)	
NH ₄ Cl (塩化アンモニウム)	10 g
KH ₂ PO ₄ (リン酸二水素カリウム)	30 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O (リン酸水素ナトリウム 7 水和物)	60 g
1 L にメスアップ オートクレーブ滅菌	

pET システムは 特許ライセンスフリーです

pET システムは、米ブルックヘイブン国立研究所（Brookhaven National Laboratory）の付属機関 Brookhaven Science Associates が所有する T7 発現システムの特許 3 件に基づきます。

- US Patent number 4,952,496（2007 年まで）
- US Patent number 5,693,489（2014 年まで）
- US Patent number 5,869,320（2004 年まで）

上記 3 件の特許は 2015 年 1 月以降すべて有効期間が終了しており、pET システムは特許ライセンスフリーです。

ただし、本システムは試験研究用であり、営利目的使用については別途商業利用ライセンスを取得いただく必要が生じる場合があります。

下記に該当する場合を含め、営利目的での使用については弊社テクニカルサポートまでご相談ください。

- Genetics Institute, Inc. がライセンスを保有する pET-32 および pET-48 ベクターを営利目的で使用する場合。
- QIAGEN GmbH がライセンスを保有する His-Tag 技術を営利目的で使用する場合。
- IBA GmbH がライセンスを保有する Strep-Tag 技術および Strep-Tactin 技術を営利目的で使用する場合。
- 米国、欧州、オーストラリアにおいて特許保護されている GST-Tag 技術を営利目的で使用する場合。
- pET システムを商業サービスや商業情報の提供に利用、あるいは医療用品を含む商用製品の製造原料として利用する際に、弊社が公開している製品仕様以上の情報が必要な場合。
- 販売店契約に基づく弊社製品の販売権を有せずに、pET システムあるいはその構成部品を販売する場合。

GILSP リストに掲載されている pET システムの宿主およびベクター

大腸菌宿主株	ベクター	大腸菌宿主株	ベクター
BL21 (DE3) ※1	pET-15b	BL21 (DE3) pLysS ※1	pET-21a (+)
	pET-16b		pET-28a (+)
	pET-19b		pET-3a
	pET-21a (+)		pET-11a
	pET-21b (+)	Rosetta (DE3) ※1	pET-30a (+)
	pET-21d (+)		pET-32a (+)
	pET-23b (+)		pET-3a
	pET-23d (+)		pET-22b (+)
pET-28b (+)	pET-28b (+)	B および B 由来株 ※2	pET-28a (+)
	pET-30a (+)		
	pET-50b (+)		

※1 経済産業大臣が定める GILSP 遺伝子組み換え生物リスト（平成 26 年 12 月 9 日最終改正版）に掲載されています。

※2 厚生労働大臣が定める GILSP 遺伝子組み換え生物リスト（平成 23 年 11 月 11 日最終改正版）に掲載されています。

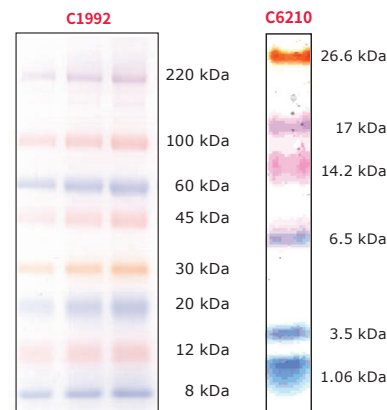
注）上の表は、遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の別表第一号に記載されている宿主およびベクターです。GILSP 遺伝子組換え微生物として認められるためには、上掲の宿主株、ベクターと同省令別表第二号に記載されている任意の挿入 DNA を組み合わせる必要があります。

タンパク質発現誘導実験 関連製品一覧

電気泳動実験の必需品 DNA タンパク質サイズマーカー

製品名	特長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
ColorBurst™ Electrophoresis Marker	8,000-220,000 Da Tris-グリシンまたは Tris-トリシン SDS-PAGE 用	50 回分 50 回分 × 5 本	C1992-1VL C1992-5X1VL	¥34,000 ¥147,800	S S
Color Marker Ultra-low Range (低分子量用)	1,060-26,600 Da Tris-トリシン SDS-PAGE 用	20 回分	C6210-1VL	¥31,000	S
SigmaMarker™, wide range	6,500-200,000 Da	20 回分 20 回分 × 10 本	S8445-1VL S8445-10VL	¥6,000 ¥19,500	S S
SigmaMarker, low range	6,500-66,000 Da	20 回分 20 回分 × 10 本	M3913-1VL M3913-10VL	¥4,400 ¥21,000	S S
Kit for Molecular Weights Non-denaturing	14,000-500,000 Da	5 種類のタンパク質各 1 mg	MWND500-1KT	¥43,100	S
DirectLoad 50 bp DNA Step Ladder		100 回分	D3812-1VL	¥22,000	S
DirectLoad PCR 100 bp Low Ladder	そのままローディングできる 分子量マーカー	75 回分	D3687-1VL	¥17,300	S
DirectLoad 1 kb DNA Ladder		100 回分	D3937-1VL	¥18,000	S
DirectLoad Wide Range DNA Marker		100 回分	D7058-1VL	¥28,700	S

製品名	特長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
6X DNA Gel Loading Buffer	Bromphenol Blue, Xylene Cyanol FF, Ficoll	5 mL	69046-3	¥9,100	M
6X Loading Buffer	Orange G, Xylene Cyanol FF, Glycerol	5 mL	69180-3	¥9,100	M
Gel Loading Buffer	Bromphenol Blue (0.05% w/v), sucrose (40% w/v), EDTA (0.1 M, pH 8.0), SDS (0.5% w/v)	5 mL	G2526-5ML	¥4,200	S
4X SDS Sample Buffer	DTT 含有 (2X での使用可)	2 mL	70607-3	¥5,200	M
2x Laemmli サンプルバッファー	サンプルと本製品を 1:1 に混ぜ、 2-5 分間ボーイルして電気泳動に 用います。	10 × 6 mL	S3401-10VL	¥6,500	S



ゲル電気泳動後のアガロースゲルから DNA および RNA バンドの抽出ツール x-tracta

製品名	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
x-tracta Gel Extraction Tool	100 個	Z722390-100EA	¥14,600	S

販売取扱について： カタログ番号を青で表記および販売取扱に M と記載している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記および販売取扱に S と記載している製品の取扱いはシグマ アルドリッチジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】 <メルク製品>

TEL : 03-4531-1140 FAX : 03-5434-4859 Email : bioinfo@merckgroup.com

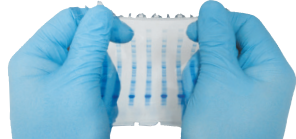
<シグマ アルドリッチ製品>

TEL : 03-6756-8245 FAX : 03-6756-8302 Email : sialjpts@sial.com



SDS-PAGE 用 Precast Gel **TruPAGE™**

特長 ■高い耐久性 ■長い有効期限 ■各社の電気泳動槽で使用可能



製品名	サイズ	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
TruPAGE™ Precast Gels Precast Gels for SDS-PAGE, Precast Polyacrylamide Gels	10 × 10 cm	10%	PCG2001-10EA	¥22,100	S
		12%	PCG2002-10EA	¥22,100	S
		4-12% グラジエント	PCG2003-10EA	¥22,100	S
		4-20% グラジエント	PCG2004-10EA	¥22,100	S
		10%	PCG2005-10EA	¥22,100	S
		12%	PCG2016-10EA	¥22,100	S
	10 × 8 cm	10%	PCG2007-10EA	¥22,100	S
		12%	PCG2008-10EA	¥22,100	S
		4-12% グラジエント	PCG2009-10EA	¥22,100	S
		4-20% グラジエント	PCG2010-10EA	¥22,100	S
		10%	PCG2011-10EA	¥22,100	S
		12%	PCG2012-10EA	¥22,100	S
	10 × 10 cm	10%	PCG2013-10EA	¥22,100	S
		12%	PCG2014-10EA	¥22,100	S
		4-12% グラジエント	PCG2015-10EA	¥22,100	S
		4-20% グラジエント	PCG2016-10EA	¥22,100	S
		10%	PCG2017-10EA	¥19,800	S
		12%	PCG2019-10EA	¥19,800	S

製品名	特 長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
TruPAGE 用 LDS サンプルバッファー	4x 溶液	10 mL	PCG3009-10ML	¥3,300	S
TruPAGE 用 TEA-MOPS SDS Express 泳動バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3003-500ML	¥14,700	S
TruPAGE 用 TEA-Tricine SDS 泳動バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3001-500ML	¥14,700	S
TruPAGE 用 DTT サンプル還元剤	10x 溶液	1 mL	PCG3005-1ML	¥7,000	S
TruPAGE 用 泳動バッファー酸化防止剤	800x 溶液	10 mL	PCG3007-10ML	¥7,000	S
TruPAGE 用 転写バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3011-500ML	¥9,200	S

製品名	特 長	包装容量	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
30% アクリルアミド / ビスアクリルアミド 29:1 溶液		100 mL	A3574-100ML	¥10,700	S
		5 × 100 mL	A3574-5X100ML	¥23,300	S
		5 L	A3574-5L	¥82,500	S
SDS Tablets	1 錠に 0.5 g 含有	50 錠	428029-1EA	¥10,100	M
10% SDS 溶液	DNase、RNase フリー	100 mL	71736-100ML	¥10,200	S
	DNase、RNase フリー	100 mL	71736-500ML	¥23,100	S
10% 過硫酸アンモニウム溶液	電気泳動用	25 g	A3678-25G	¥3,700	S
	電気泳動用	100 g	A3678-100G	¥5,500	S
	電気泳動用	25 mL	T9281-25ML	¥5,800	S
	電気泳動用	50 mL	T9281-50ML	¥10,300	S
TEMED (N,N,N',N' - テトラメチルエチレンジアミン)	電気泳動用	100 mL	T9281-100ML	¥19,200	S
N,N,N',N' - テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)		100 mL	1.10732.0100	¥8,400	M
トリス - グリシン - SDS バッファー (10x 泳動バッファー)	10x 溶液	1 L	T7777-1L	¥15,000	S

LacZ 発現の検出・定量関連製品

製品名	用 途	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	β- ガラクトシダーゼの発色基質	1 g	203782-1GM	¥18,200	M
X-gal	LacZ (β- ガラクトシダーゼ) 活性の検出	50 mg	B4252-50MG	¥6,400	S
		100 mg	B4252-100MG	¥8,100	S
		250 mg	B4252-250MG	¥14,200	S
		500 mg	B4252-500MG	¥24,500	S
		1 g	B4252-1G	¥37,500	S
		5 g	B4252-5G	¥146,300	S
X-Gal Solution (40 mg/mL)	LacZ (β- ガラクトシダーゼ) 活性の検出	3 mL	71077-3	¥17,200	M
BetaRed™ β-Galactosidase Assay Kit	LacZ (β- ガラクトシダーゼ) 活性の高感度 (ONPG 法の 10 倍) 定量	500 回分	70978-3	¥78,900	M
β-Galactosidase, <i>E. coli</i> (≥ 600 units/mg)	LacZ (β- ガラクトシダーゼ) 活性定量のための酵素標品	5 mg	345788-5MG	¥33,400	M

タンパク質抽出の必需品

プロテアーゼインヒビターカクテル **cOmplete™**



製品名	適用	阻害するターゲット		容量	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Mini	動物細胞 / 組織 植物細胞 / 組織 酵母 細菌	セリン プロテアーゼ	システイン プロテアーゼ	1 錠を 10 mL に溶解	30 錠	04693159001	¥23,600	S
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail					25 錠	11836170001	¥19,600	S
					20 錠 (個包装 EASYpack)	04693132001	¥38,000	S
					20 錠	11873580001	¥37,100	S
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Mini					3 × 20 錠	05056489001	¥100,000	S
					20 錠 (個包装 EASYpack)	04693124001	¥23,600	S
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail					25 錠	11836153001	¥19,600	S
					20 錠 (個包装 EASYpack)	04693116001	¥38,000	S
					20 錠	11697498001	¥37,100	S
cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini					3 × 20 錠	11836145001	¥100,000	S
	30 錠	05892970001	¥24,400	S				
cOmplete™ ULTRA Tablets	動物細胞 植物細胞 酵母 細菌	アスパラギン酸 プロテアーゼ	1 錠を 50 mL に溶解	2 × 10 錠	05892988001	¥38,100	S	
cOmplete™ ULTRA Tablets, EDTA-free				6 × 10 錠	06538304001	¥103,100	S	
				2 × 10 錠	05892953001	¥38,100	S	
				6 × 10 錠	06538282001	¥103,100	S	

※ 金属キレートクロマトグラフィー用サンプル調製には EDTA フリー製品をご使用ください。

O.D. 測定をせずに IPTG 発現 (誘導) よりも高い発現効率と収率を実現する Overnight Express™

製品名	特長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
Overnight Express Instant LB Medium ※	LB 培地と TB 培地から選択可能な、水に溶けやすい顆粒タイプ	1 × 45 g	71757-3	¥9,100	M
		5 × 45 g	71757-4	¥33,400	M
		1 kg	71757-5	¥81,000	M
		1 × 60 g	71491-3	¥9,300	M
Overnight Express Instant TB Medium ※		5 × 60 g	71491-4	¥33,900	M
		1 kg	71491-5	¥82,500	M
		1 L 用	71300-3	¥14,700	M
Overnight Express Autoinduction System 1	ご使用の培地に添加いただく、添加剤タイプ	5 L 用	71300-4	¥48,600	M

※ サンプルの提供が可能です。お気軽にお問い合わせください。

大腸菌培養用プレミックス培地

製品名	特 長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
LB Broth, Miller	LB 培地 (Miller) の調製 (25 g/L)、顆粒	1 L 用 × 25 パック	71753-4	¥33,400	M
		500 g	71753-5	¥13,200	M
	LB 培地 (Miller) の調製 (25 g/L)、粉末	250g (10 L 分)	L3522-250G	¥6,400	S
		1 kg (40 L 分)	L3522-1KG	¥19,500	S
LB Broth, Lennox	調製済み溶液	500 mL	L2542-500ML	¥3,900	S
	LB 培地 (Lennox) の調製 (20 g/L)、粉末	250 g (12.5 L 分)	L3022-250G	¥6,400	S
		1 kg (50 L 分)	L3022-1KG	¥25,600	S
	1 錠で培地 50 mL 分 (48.3 mL の水に溶解)、錠剤	100 錠 (5 L 分)	L7275-100TAB	¥14,100	S
		500 錠 (25 L 分)	L7275-500TAB	¥47,800	S
	1 袋 (10.3 g) で培地 500 mL 分、顆粒	500 mL × 6 パック	L7658-6X500ML	¥5,700	S
2 × 5 L 分		L7658-2X5L	¥11,500	S	
1 kg (48.5 L 分)		L7658-1KG	¥33,800	S	
LB Broth with agar (Miller)	LB プレート (Miller) の調製 (40 g/L)	250 g	L3147-250G	¥9,800	S
		1 kg	L3147-1KG	¥29,000	S
LB Broth with agar (Lennox)	LB プレート (Lennox) の調製 (35.6 g/L)、顆粒	500 mL × 6 パック	L7533-6X500ML	¥7,800	S
		1 kg	L7533-1KG	¥49,800	S
	LB プレート (Lennox) の調製 (35 g/L)、粉末	250 g	L2897-250G	¥11,700	S
1 kg		L2897-1KG	¥42,200	S	
Terrific Broth	TB 培地の調製 (47.6 g/L)、顆粒	500 g	71754-3	¥12,100	M
		500 mL × 6 パック	T9179-6X500ML	¥7,900	S
	TB 培地の調製 (48.2 g/L)、顆粒	2 × 5 L 分	T9179-2X5L	¥18,800	S
		1 kg (48.5 L 分)	T9179-1KG	¥29,000	S
2xYT Medium, EZMix™	調製済み溶液	500 mL	T5574-500ML	¥11,300	S
		1 kg	Y2627-1KG	¥34,300	S
SOC 培地 溶液	調製済み溶液、フィルター滅菌済み	10 × 5mL	S1797-10X5ML	¥13,400	S
		100 mL	S1797-100ML	¥16,900	S

セレクション用抗生物質 & タンパク質発現誘導用 IPTG

製品名	状 態	CAS 番号	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
アンピシリン	ナトリウム塩	69-52-3	5 g	A0166-5G	¥5,300	S
			25 g	A0166-25G	¥17,600	S
	溶液 (100 mg/mL)		100 g	A0166-100G	¥47,100	S
			10 mL (1 g)	A5354-10ML	¥21,400	S
カルベニシリン	2 ナトリウム塩	4800-94-6	5 g	69101-3	¥46,600	M
			250 mg	C3416-250MG	¥8,700	S
			1 g	C3416-1G	¥21,800	S
			5 g	C3416-5G	¥65,800	S
			10 g	C3416-10G	¥124,800	S
			溶液 (100 mg/mL)	1 mL (0.1 g)	C1613-1ML	¥43,400
カナマイシン硫酸塩	固体	25389-94-0	5 g	420311-5GM	¥12,700	M
クロラムフェニコール	粉末	56-75-7	25 g	420311-25GM	¥39,500	M
			25 g	220551-25GM	¥12,100	M
			100 g	220551-100GM	¥36,400	M
テトラサイクリン塩酸塩	固体	64-75-5	10 g	58346-10GM	¥8,300	M
			25 g	58346-25GM	¥11,300	M
			50 g	58346-50GM	¥17,500	M
ドキシサイクリンヒクラー	固体		1 g	324385-1GM	¥14,200	M
ドキシサイクリン	粉末	24390-14-5	1 g	D9891-1G	¥10,100	S
			5 g	D9891-5G	¥24,300	S
			10 g	D9891-10G	¥40,600	S
			25 g	D9891-25G	¥78,900	S
			100 g	D9891-100G	¥264,800	S
			1 g	420322-1GM	¥7,100	M
IPTG	Dioxane-Free, ≥ 98%	367-93-1	5 g	420322-5GM	¥17,700	M
			10 g	420322-10GM	¥27,300	M
			25 g	420322-25GM	¥65,300	M
			溶液 (200 mM)	5 mL	I1284-5ML	¥12,200

ろ過滅菌用シリンジフィルターの定番 滅菌マイレクス

製品名	製品写真	膜材質	特 長	直径	孔径	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
滅菌マイレクス (Millex) -GS		セルロース混合エステル	低コスト	33 mm	0.22 μm	50 個	SLGS033SS	¥12,700	M
滅菌マイレクス (Millex) -HA						250 個	SLGS033SB	¥55,700	M
滅菌マイレクス (Millex) -GP		親水性 PES (傾斜孔径)	高流量・低吸着	33 mm	0.45 μm	50 個	SLHA033SS	¥12,700	M
滅菌マイレクス (Millex) -HP						250 個	SLHA033SB	¥55,700	M
滅菌マイレクス (Millex) -VV		親水性 PVDF (デュラポア)	タンパク質極低吸着	33 mm	0.22 μm	50 個	SLVP033RS	¥15,600	M
滅菌マイレクス (Millex) -GV					0.45 μm	50 個	SLGV033RS	¥15,200	M
滅菌マイレクス (Millex) -HV					0.45 μm	50 個	SLHV033RS	¥15,600	M
滅菌マイレクス (Millex) -LG		親水性 PTFE (オムニポア)	DMSO やアルコール溶液の滅菌	25 mm	0.2 μm	50 個	SLLG025SS	¥17,600	M

販売取扱について： カタログ番号を **青** で表記および販売取扱に **M** と記載している製品の取扱いは **メルク株式会社**、**赤** で表記および販売取扱に **S** と記載している製品の取扱いは **シグマ アルドリッチジャパン合同会社** となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

最適なコンピテントセルの選択に便利な コンピテントセルセット

製品名	用途	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
(DE3) Competent Cell Set 1	ホストの条件検討 (BL21、BLR、HMS174、NovaBlue、Tuner)	0.2 mL × 5 種類	71207-3	¥40,500	M
(DE3) Competent Cell Set 2	ホストの条件検討 (Origami 2/B、Rosetta 2、RosettaBlue、Rosetta-gami 2/B)	0.2 mL × 6 種類	71208-3	¥39,500	M
(DE3) pLysS Competent Cell Set 1	ホストの条件検討 (BL21、BLR、HMS174、Tuner)	0.2 mL × 4 種類	71209-3	¥40,500	M
(DE3) pLysS Competent Cell Set 2	ホストの条件検討 (Origami 2/B、Rosetta 2、RosettaBlue、Rosetta-gami 2/B)	0.2 mL × 6 種類	71210-3	¥40,500	M
Origami 2 Competent Cell Set			71431-3	¥41,500	M
Origami B Competent Cell Set			70911-3	¥39,500	M
Rosetta 2 Competent Cell Set			71405-3	¥38,500	M
RosettaBlue Competent Cell Set			71079-3	¥39,500	M
Rosetta-gami 2 Competent Cell Set	ホストの条件検討 (コントロール用非発現宿主、(DE3)、(DE3) pLysS)	(2 × 0.2 mL) × 3 種類	71432-3	¥38,500	M
Rosetta-gami B Competent Cell Set			71177-3	¥38,500	M
BL21 Competent Cell Set			70232-3	¥38,500	M
HMS174 Competent Cell Set			70234-3	¥39,500	M
Tuner Competent Cell Set			70726-3	¥39,500	M

強毒性タンパク質の発現誘導なら バクテリオファージ CE6

製品名	用途	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
Bacteriophage CE6	T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の導入による T7/T7lac プロモーターの活性化	0.2 mL	69390-3	¥21,300	M
		10 mL	69390-4	¥76,900	M

効率のよい発現タンパク質の抽出に
PopCulture® BugBuster® rLysozyme™ Benzonase® CellLytic™

製品名	特長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
PopCulture Reagent	集菌せずに大腸菌培養液から直接タンパク質を抽出。	15 mL	71092-3	¥10,100	M
		75 mL	71092-4	¥43,500	M
		250 mL	71092-5	¥119,000	M
BugBuster Protein Extraction Reagent	BugBuster のスタンダードタイプ、非イオン性および両性イオン性界面活性混合溶液。一般的な溶菌用、細胞ペレット 1 g あたり 5 mL 使用。	100 mL	70584-3	¥13,200	M
		500 mL	70584-4	¥52,600	M
		10 mL	70921-3	¥13,200	M
BugBuster 10X Protein Extraction Reagent	BugBuster のスタンダードタイプの 10 倍濃縮液、一般的な溶菌用。	50 mL	70921-4	¥52,600	M
		100 mL	70921-5	¥92,100	M
		100 mL	71456-3	¥34,400	M
BugBuster Master Mix *	Benzonase および rLysozyme の混合品で、グラム陰性菌、陽性菌いずれにも使用可能。スタンダードタイプよりも確実な溶菌を実現。細胞ペレット 1 g あたり 5 mL 使用。	500 mL	71456-4	¥138,000	M
		100 mL	70923-3	¥13,200	M
		500 mL	70923-4	¥52,600	M
BugBuster (Primary Amine-Free) Extraction Reagent	タンパク質の固定や架橋を 1 級アミンが干渉してしまう場合に最適な 1 級アミン不含組成。	300 KU	71110-3	¥7,100	M
		1200 KU	71110-4	¥20,200	M
		6000 KU	71110-5	¥91,100	M
rLysozyme Solution	ニフトリ卵白リゾチームの約 250 倍の活性を持ち、大腸菌ペレット 1 g あたり 40 ~ 60 KU で菌体を直接溶解。	2.5 KU	70746-4	¥8,100	M
		10 KU	70746-3	¥23,100	M
		10 KU	70664-3	¥28,300	M
Benzonase Nuclease, Purity > 90%	幅広い条件で DNA および RNA を 2 ~ 5 nt のオリゴヌクレオチドに分解。	50 mL	B7435-50ML	¥10,700	S
Benzonase Nuclease, Purity > 99%	エンドキシナーゼ。幅広い条件で DNA および RNA を 2 ~ 5 nt のオリゴヌクレオチドに分解。	500 mL	B7435-500ML	¥54,500	S
CellLytic B 細胞溶解試薬	両性イオン界面活性剤を配合したタンパク質抽出用溶液。1.5 mL 培養液あたり 0.4 mL 使用。	50 mL	B7310-50ML	¥20,200	S
CellLytic B 2X 細胞溶解試薬	CellLytic B の 2 倍濃縮タイプ。全体の液量を減らしたい場合やタンパク質の濃度を高くない場合に最適。1.5 mL 培養液あたり 0.2 mL 使用。	250 mL	B7310-250ML	¥69,100	S
CellLytic B 10X 細胞溶解試薬	CellLytic B の 10 倍濃縮タイプ。バッファー成分を含んでいないため、目的に応じたバッファーで希釈して使用可能。バッファーで 5、10、20 倍などに希釈し、細胞ペレットに添加。	10 mL	C8740-10ML	¥16,900	S
		50 mL	C8740-50ML	¥55,300	S
		100 mL	C8740-100ML	¥95,600	S
CellLytic B plus キット	グラム陰性菌および溶解が難しいグラム陽性菌の溶解に必要な試薬のセット。ペレット湿重量 1 g あたり 10 mL。	50 mL	CB0050-1KT	¥38,900	S
		500 mL	CB0500-1KT	¥129,700	S
		25 mL 分	C1990-25ML	¥5,600	S
CellLytic Express 粉末	大腸菌培養液に粉末をそのまま加えてインキュベートしてタンパク質を抽出。	10 × 25 mL 分	C1990-10X25ML	¥28,900	S
		6 × 500 mL 分	C1990-6X500ML	¥189,300	S
		25 錠 (25 mL 分)	C5491-25EA	¥15,600	S
CellLytic Express 錠剤	大腸菌培養液 1 mL あたり 1 錠をそのまま加えてインキュベートしてタンパク質を抽出。	100 錠 (100 mL 分)	C5491-100EA	¥47,600	S
		25 mL	C5236-25ML	¥15,000	S
CellLytic IB 封入体可溶性試薬	CellLytic B など細菌を溶解したときに形成される封入体可溶性溶液。封入体 1 g あたり試薬 8 mL 使用。	100 mL	C5236-100ML	¥43,300	S

※ サンプルの提供が可能です。お気軽にお問い合わせください。

精製済み核酸ペレットを見易くする共沈剤 Pellet Paint® Co-Precipitant

製品名	特 長	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
Pellet Paint Co-Precipitant 	PCR 産物の回収から RNA 精製まで幅広い用途に使用可能	125 回分	69049-3	¥17,200	M
		1000 回分	69049-4	¥97,200	M
		125 回分	70748-3	¥16,200	M
Pellet Paint NF Co-Precipitant	シーケンシングに使用可能な非蛍光色素タイプ	1000 回分	70748-4	¥97,200	M

菌体に熱や圧力のダメージを与えないプレーティング用ビーズ ColiRollers™

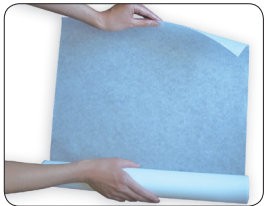
製品名	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
ColiRollers™ Plating Beads	60-80 回分	71013-3	¥3,000	M
	60-80 回分 × 5	71013-4	¥10,100	M

ご存知ですか？ DTT よりも酸化されにくく高効率なジスルフィド結合還元剤

製品名	CAS 番号	分子量	純度	保管条件	溶解性または温度	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
BMS	概要								
	145626-87-5	186.3	≥ 99% (滴定)	-20℃	DMSO, EtOH, MeOH, or H ₂ O (水では：1.8 mg/mL、要加温)	1 g	203325-1GM	¥34,400	M
DTT よりも強力にタンパク質中の天然ジスルフィド結合を還元する水溶性試薬。pH 7 (非変性条件) で、免疫グロブリンおよびトリブシノーゲン内のアクセスしやすい位置のジスルフィド結合を DTT より 5-7 倍速く、α-キモトリブシノーゲン A 中の比較的アクセスしにくい位置のジスルフィド結合を DTT より 2.3 倍速く還元する能力を持つ。									
TCEP, Hydrochloride	51805-45-9	286.7	≥ 98% (元素分析)	2℃ - 8℃、除湿	H ₂ O (5 mg/mL)	1 g	580560-1GM	¥15,700	M
	酸化されやすい DTT と比較して安定で反応効率が高い、無臭の水溶性ジスルフィド結合還元剤。pH 1.5-8.5 の範囲で還元剤として機能し、pH4.5 で極めて安定な水溶性アルキルジスルフィドでさえも 5 分以内に還元する能力を持つ。								
	51805-45-9	286.65	≥ 98%	2℃ - 8℃	H ₂ O (50 mg/mL)	2 g	C4706-2G	¥11,000	S
						10 g	C4706-10G	¥40,000	S
TCEP, Neutral	4706-17-6	208.2	≥ 80% (NMR)	2℃ - 8℃、遮光、除湿	H ₂ O (20 mg/ml)	1 g	598250-1GM	¥13,700	M
						5 mL	71194-3	¥6,600	M
THP	4706-17-6	208.2	≥ 80% (NMR)	-20℃	H ₂ O (0.5 M)	1 mL	71194-4	¥26,300	M
0.5M THP Solution	4706-17-6	208.2	≥ 80% (NMR)	-20℃	H ₂ O (0.5 M)	1 mL	71194-3	¥6,600	M
Tris (hydroxypropyl) phosphine	4706-17-6	208.24	≥ 80% (NMR)	-20℃	H ₂ O (0.5 M)	1 mL	71194-4	¥26,300	M
水溶性、無臭のジスルフィド結合還元剤。DTT より空気酸化に耐性があり、高い還元効率を発揮。									
Tris (hydroxypropyl) phosphine	4706-17-6	208.24	≥ 80% (NMR)	-20℃	H ₂ O (0.5 M)	1 g	777854-1G	¥6,300	S
						5 g	777854-5G	¥20,000	S

オートクレーブ可能な汎用不織布 Miracloth

- 特長
- プラスミド調製等におけるセルライゼートからの残渣除去に実績多数。
 - 細胞懸濁液からの動物細胞、プロトプラストや、菌体・胞子等の効率の良い回収が可能。
 - 食品関連研究での様々な過に、チーズクロスの代替としても使用可能。



製品名	特長	材質	孔径 (公称)	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
Miracloth	オートクレーブ可能で目詰まりしにくく、様々な過用途に適合	レイヨン・ポリエステル・アクリル	22 ~ 25 μm	1 ロール (46 cm × 15 m)	475855-1R	¥15,500	M

融合タンパク質から特異的に切断
Protease for Tag Fusion Protein Cleavage

- 特長
- 対照実験用の標準タンパク質添付
 - 10X 反応バッファー添付
 - 高切断効率



製品名	認識配列	50 μg コントロールタンパク質を切断するために必要なユニット数	CAS 番号	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
特長							
Biotinylated Thrombin	LeuValProArg ↓ GlySer	0.05 U		50 U	69672-3	¥49,600	M
ストレプトアビジンを用いて酵素反応液から酵素を簡単に除去可能。							
Factor Xa, Restriction Grade, Bovine Plasma	IleGluGlyArg ↓	1 U		100 μg	69036-3	¥22,700	M
ラッセルクサリヘビ毒により活性化済み。認識配列の C 末端側を切断。							
HRV 3C Protease	LeuGluValLeuPheGln ↓ GlyPro	0.5 U		500 U	71493-3	¥23,800	M
4℃で至適活性を示し、His・Tag を持つため、反応後 His・Bind レジンに吸着させて除去可能。							
Recombinant Enterokinase	AspAspAspAspLys ↓	1 U		50 U	69066-3	¥28,900	M
ウシのエンテロキナーゼ触媒サブユニットの高純度リコンビナント。天然由来の酵素より高い特異性を示す。							
Thrombin, Restriction Grade	LeuValProArg ↓ GlySer	0.05 U	9002-04-4	50 U	69671-3	¥22,700	M
比活性が高く、他のプロテアーゼと比較して少量で大量に処理が可能。融合タンパク質を用いて活性測定済み。							

発現タンパクの検出に
GST・TagTM / His・Tag[®] / HSV・Tag[®] / S・TagTM / T7・Tag[®] / Trx・TagTM 抗体

組み換えタンパク質の発現確認には、メルク ライフサイエンスのタグ抗体が便利です。

製品名 (抗原)	免疫動物 / タイプ	推奨希釈倍率	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
GST・Tag Monoclonal Antibody (220-aa GST protein)	マウス / モノクローナル IgG ₁	1:10,000	50 μg	71097-3	¥36,100	M
			250 μg	71097-4	¥134,090	M
His・Tag Monoclonal Antibody (HisHisHisHisHis)	マウス / モノクローナル IgG ₁	1:1,000 ~ 1:2,000	100 μg	70796-3	¥110,000	M
			3 μg	70796-4	¥10,100	M
HSV・Tag Monoclonal Antibody (GlnProGluLeuAlaProGluAspProGluAsp)	マウス / モノクローナル IgG ₁	1:5,000 ~ 1:10,000	40 μg	69171-3	¥33,900	M
			200 μg	69171-4	¥90,600	M
S・Tag Monoclonal Antibody (LysGluThrAlaAlaAlaKysPheGluArgGlnHisMetAspSer)	マウス / モノクローナル IgG _{2b}	1:5,000	50 μg	71549-3	¥31,900	M
T7・Tag Monoclonal Antibody (MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGly)	マウス / モノクローナル IgG _{2b}	1:5,000 ~ 1:10,000	50 μg	69522-3	¥36,400	M
			250 μg	69522-4	¥128,000	M
Trx・Tag Monoclonal Antibody (109-aa TrxA protein)	マウス / モノクローナル IgG _{2b}	1:5,000	50 μg	71542-3	¥39,500	M

販売取扱について： カタログ番号を青で表記および販売取扱に M と記載している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記および販売取扱に S と記載している製品の取扱いはシグマ アルドリッチジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

【製品の技術的なお問い合わせ (テクニカルサービス)】 <メルク製品> TEL: 03-4531-1140 FAX: 03-5434-4859 Email: bioinfo@merckgroup.com
<シグマ アルドリッチ製品> TEL: 03-6756-8245 FAX: 03-6756-8302 Email: sialjpts@sial.com

抗 FLAG M2 抗体が CiteAb 2017 Award を受賞しました

SIGMA-ALDRICH®



論文引用に基づく抗体検索エンジン "CiteAb" (<https://www.citeab.com/>) にて 2016 年世界で最も引用された抗体として the CiteAb Antibody Awards "Most cited antibody of the year" 部門でシグマアルドリッチの Monoclonal Anti-FLAG® M2 (カタログ番号 F1804) が選出されました！

FLAG タグ

DYKDDDDK のペプチドからなる FLAG タグを融合させたタンパク質は抗 FLAG 抗体によって容易に検出・精製可能です。FLAG システムはタンパク質の検出、精製、局在解析、相互作用解析等、多くのアプリケーションで実績を残しています。FLAG 配列に対して高い特異性と高感度検出を可能にする抗 FLAG 抗体を使うことで、FLAG 融合タンパク質の検出、精製が容易におこなえます。

FLAG

Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys
Enterokinase Cleavage Site
Protein

3xFLAG

Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Ile-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys
Enterokinase Cleavage Site
Protein

FLAG タグと 3xFLAG タグのアミノ酸配列

N 末端 FLAG タグ (アミノ酸 8 個) と 3 × FLAG タグ (アミノ酸 22 個) は、タグの C 末端にある Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 配列の下流でエンテロキナーゼに切断されます。

製品名	抗原	免疫動物	抗体への処理	交差性	適用	カタログ番号	希望販売価格	販売取扱
抗 FLAG M2 抗体アフィニティビーズ (アフィニティレジン)	DYKDDDDK	マウス	アガロースビーズへの共有結合			A2220-1ML A2220-5ML A2220-10ML A2220-25ML	¥33,000 ¥98,000 ¥198,000 ¥439,000	S S S S
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体	DYKDDDDK	マウス	精製イムノグロブリン	N 末端、C 末端の FLAG タグおよび 3xFLAG タグ	FLAG、3xFLAG 融合タンパク質の精製、免疫沈降	F3165-2MG F3165-1MG F3165-5MG F1804-50UG F1804-200UG	¥38,600 ¥76,800 ¥213,000 ¥12,000 ¥38,000	S S S S S
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体	DYKDDDDK	マウス	アフィニティ精製			F1804-1MG F1804-5MG	¥72,000 ¥116,000	S S

製品検索方法 Sigma.com に アクセス



製品名、カタログ番号などを入力

検索結果画面の説明や、より高度な検索方法はこちらをご覧ください

カスタムオリゴ DNA ならシグマ ジェノシス

長年のノウハウに基づき、高品質なカスタムオリゴ DNA をご提供しています。最適な修飾の組み合わせのご提案や、難易度の高いオリゴ DNA 合成もお任せください。

- プライマー合成 : Oligo@SIGMA-PCR
- 各種精製、修飾、特殊塩基、ロング、大量スケール : Oligo@SIGMA-Select
- リアルタイム PCR 用両末端修飾プローブ : Oligo@SIGMA-DLP
- プレート単位の発注 : Oligo@SIGMA-Plate

製品詳細はこちら

<https://goo.gl/Jq9PCV>



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA または Sigma-Aldrich Co. LLC の登録商標もしくは商標です。cOplete is a trademark of Roche. 本紙記載の内容は 2017 年 5 月時点の情報です。© 2017 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ & バイオロジー

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報は [こちら www.merckmillipore.jp/bio](http://www.merckmillipore.jp/bio)

お問合せ ▶ E-mail: bioinfo@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859