

**IPTG 不要な
自動タンパク質発現誘導システム
Overnight Express™
Autoinduction Systems**

顆粒培地で簡単に…

Overnight Express™ Instant LB medium
Overnight Express™ Instant TB medium

お使いの培地に添加して…

Overnight Express™ Autoinduction system 1

構造解析には…

X 線結晶解析用

Overnight Express™ Autoinduction system 2

NMR 構造解析用

Overnight Express™ Autoinduction NMR Medium



Novagen®

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

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

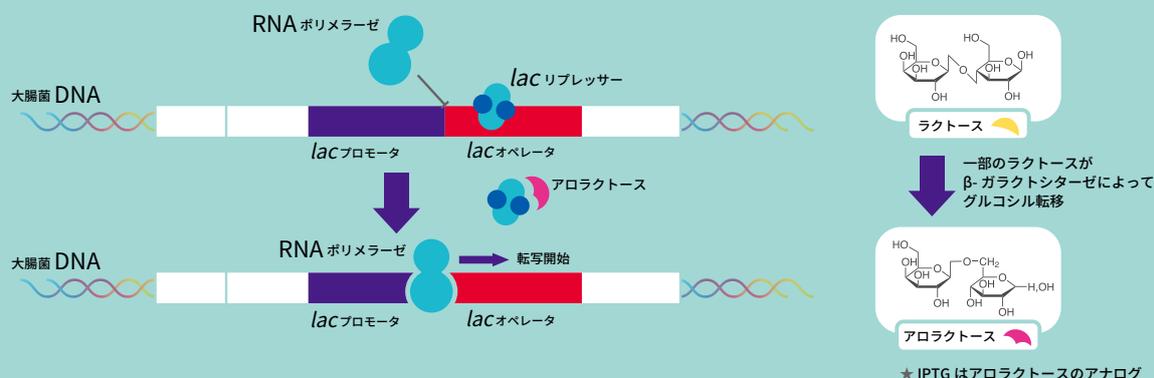
大腸菌タンパク質発現の強力なツール IPTG 不要な自動タンパク質発現誘導システム Overnight Express™ Autoinduction Systems

特長

- 培養時間が大幅に短縮
- 発現タンパク質の収量が大幅アップ
- 正しくフォールディングしたタンパク質が得られやすい
- IPTG 不要なので、OD 測定の必要なし
- pET などの T7 発現ベクターと BL21 (DE3) などの Lac operon を持つ大腸菌で使用可能

オーバーナイトエクスプレスの原理

本システムは、糖のバランスによって IPTG を添加しなくても大腸菌の増殖にしたがって自動的にタンパク質の発現誘導がかかるシステムです。このシステムにはグルコースとラクトースが含まれており、大腸菌はグルコースを炭素源として初期増殖します。グルコースが枯渇すると C 源がラクトースに切り替わり、そのラクトースがアロラクトースに変換され、lac リプレッサーと結合します。その結果リプレッサーが lac オペレータより外れて RNA ポリメラーゼがプロモータに結合し、転写が開始されてタンパク質発現がはじまります。そのため、lac permease (*lacY*) や β -galactosidase (*lacZ*) がホスト株に保持されていることが必須条件となります。*lacY* 欠損株 (Tuner など) はラクトースを効率的に細胞内に取り込めず、また *lacZ* 変異株はラクトースをアロラクトースへ変換することができないので、このシステムを使用できません。本キットご使用前にホスト株の遺伝子型をご確認いただけますようお願い申し上げます。



適合ホスト株一例 (Novagen® 推奨のホスト株)

ホスト株	適合	ホスト株	適合	ホスト株	適合
BL21	●	Origami B	×	RosettaBlue	×
BL21(DE3)	●	Origami B(DE3)	×	RosettaBlue(DE3)	×
BL21(DE3)pLysS	●	Origami B(DE3)pLysS	×	RosettaBlue(DE3)pLysS	×
Origami 2	×	Rosetta 2	●	Rosetta-gami 2	×
Origami 2(DE3)	×	Rosetta 2(DE3)	●	Rosetta-gami 2(DE3)	×
Origami 2(DE3)pLysS	×	Rosetta 2(DE3)pLysS	●	Rosetta-gami 2(DE3)pLysS	×

Overnight Express 適合：● 不適合：×

ご利用に際して

滅菌方法

顆粒培地タイプは、電子レンジで滅菌可能です。1 L の滅菌水に EasyPak1 袋分加え (10 mL グリセロールを添加)、2 分間電子レンジ加熱してください。オートクレーブで滅菌する際は 15-20 分、終了後はできるだけ早く圧力を下げ、培地を取り出して室温まで冷ますことをお勧めいたします。長時間の加熱により培地中の糖が褐変してしまい、タンパク質の発現量に影響する可能性があります。添加剤タイプのもは滅菌済み濃縮溶液ですので、滅菌済みの培地に加えてお使いください。

培地

添加剤タイプの System1 には、最適化された炭素源が調製されています。グルコースが多量に存在すると、カタボライト抑制によりタンパク質が発現しません。グルコースが含まれていない LB 培地や 2 × YT 培地などの基本培地にご使用ください。

用途に合わせたラインナップ！

顆粒培地で簡単に…

Overnight Express™ Instant LB medium

顆粒ですので水に溶けやすく、オートクレープ滅菌の必要がありません。

▶ p.4

Overnight Express™ Instant TB medium

お使いの培地に添加して…

Overnight Express™ Autoinduction system 1

お好みの培地に添加してお使いいただけます。

▶ p.5

構造解析には…

X 線結晶解析用

Overnight Express™ Autoinduction system 2

セレノメチオニンを加え、標識タンパク質を合成するための濃縮培地です。

▶ p.6

NMR 構造解析用

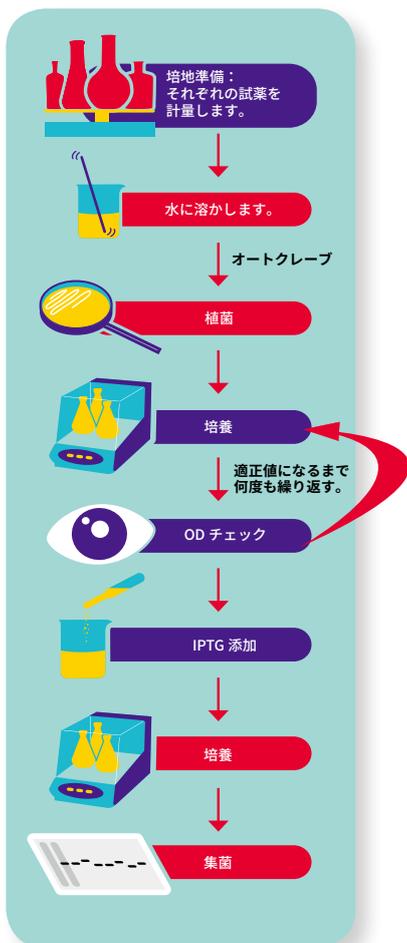
Overnight Express™ Autoinduction NMR Medium

^{15}N , ^{15}N / ^{13}C ラベルタンパク質を調製するための濃縮培地です。

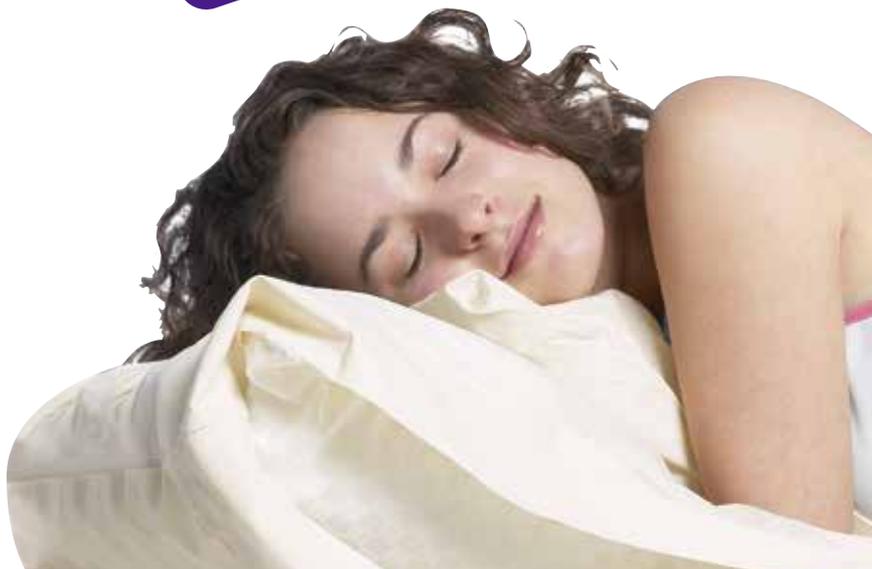
▶ p.7

従来法に比べ約半分の時間と工程！

従来法操作手順



Overnight Express 操作手順



顆粒培地で簡単に…

Overnight Express™ Instant LB/TB medium

顆粒ですので水に溶けやすく、オートクレーブ滅菌の必要がありません。

特長

- オーバーナイトエクスプレスのスタンダードタイプ
- LB 培地あるいは TB 培地の汎用的な培地タイプの自動誘導システム
- 水に溶けやすく、舞い上がりにくい顆粒状培地
- 計量不要な無菌包装のアルミパウチタイプもあります。



1L 分ずつ小分けしたアルミパウチタイプとお徳用のボトルタイプがあります。1 L の滅菌水にアルミパウチ 1 包を加え、10 mL glycerol を添加して溶かしたら、電子レンジで 2 分間沸騰させてください。オートクレーブ滅菌も可能ですが、過剰なオートクレーブは炭素源をカラメル化させる恐れがありますので、ご注意ください。

※適合ホスト株については p.2 適合ホスト株一例を参照ください。

製品名	カタログ番号	包装単位
Overnight Express Instant LB Medium	71757-3	1 L 用 (45 g 入り×1 パック)
	71757-4	5 L 用 (45 g 入り×5 パック)
	71757-5	1 kg (約 22 L 分、ボトル入り)
Overnight Express Instant TB Medium	71491-3	1 L 用 (60 g 入り×1 パック)
	71491-4	5 L 用 (60 g 入り×5 パック)
	71491-5	1 kg (約 16 L 分、ボトル入り)

user research

オーバーナイトエクスプレス >> 実験例 ①

IPTG 不要の Autoinduction 培地のパフォーマンス検証！

大腸菌の振とう培養の効率化の検証

資料提供：NPO 法人サイエンス・コミュニケーション

前段のマーカを用いた実験で、Overnight Express を使用した培地によって効率よくタンパク質が発現できる可能性が示唆されました。今回は更にルシフェラーゼとリポコルチンを実際にコードされたプラスミドを用いて実際のタンパク質が発現されるかを検証してみました。

BL21 (DE3) コンピテントセルに、pET-52 3C/LIC + Lipocortin、pET-52 3C/LIC + Rluc トランスフォーメーションし、そのコロニーを拾って IPTG induction と Overnight Express (OE) autoinduction における大腸菌の増殖曲線 (OD 測定) の変化とタンパク質発現量 (SDS-PAGE) について比較しました。

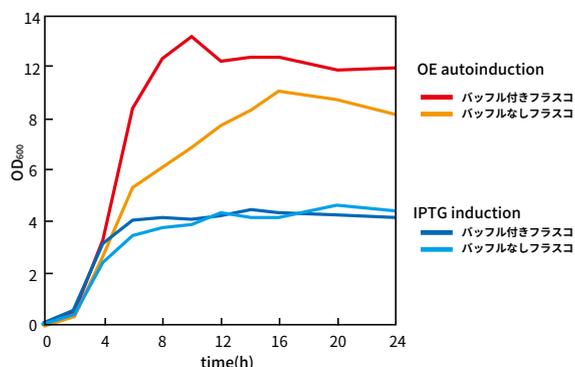


図1：IPTG induction と OE autoinduction での増殖曲線の変化

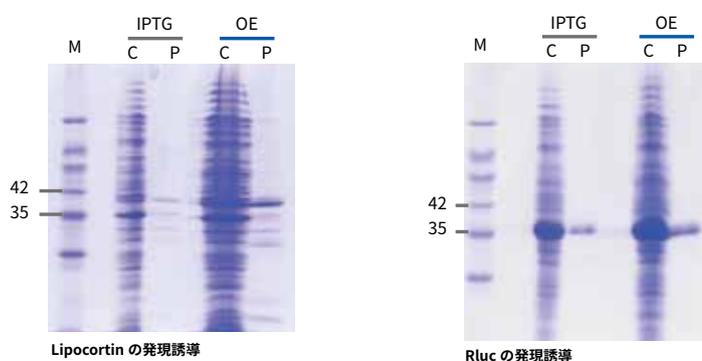


図2：Lipocortin と Rluc の発現誘導による発現量の比較

お使いの培地に添加して…

Overnight Express™ Autoinduction System 1

2xYT や SOC など、お好みの培地に添加してお使いいただけます。

特長

- オーバーナイトエクスプレスの液体添加剤タイプ
- お好きな培地の添加してご使用いただける自動誘導システム
- 滅菌済みですので、培地にそのまま加えてお使いいただけます
- 培養量に合わせて添加量を調節できます

大腸菌をご使用の培地に植菌する際に添加してお使いください。炭素源のバランスをコントロールしているので、培地はグルコースフリー培地をご使用ください(2xYT や SOC、LB など)。この System 1 には以下の 3 種類の液が入っています。

製品名	カタログ番号	包装単位
Overnight Express	71300-3	1 L 用
Autoinduction system 1	71300-4	5 L 用

システムに含まれる試薬

		71300-3	71300-4
Overnight Express solution 1	炭素源 (大腸菌増殖のための栄養・発現誘導)	20 mL × 1 本	20 mL × 5 本
Overnight Express solution 2	濃縮バッファー / 窒素源 (代謝酸による pH 低下を防ぐ)	50 mL × 1 本	250 mL × 1 本
Overnight Express solution 3	マグネシウム源 (高い OD を維持)	1 mL × 1 本	1 mL × 5 本

※適合ホスト株については p.2 適合ホスト株一例を参照ください。

user research

オーバーナイトエクスプレス >> 実験例 ②

Overnight Express™ Autoinduction System1 を用いた糖加水分解酵素の改変研究

資料提供：新潟大学農学部 北岡 本光 教授

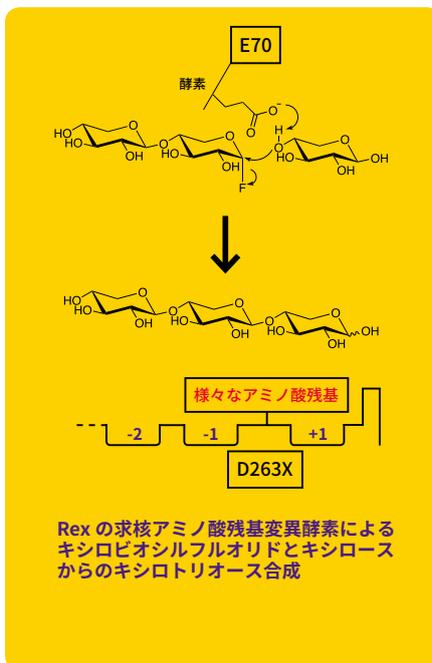
糖質を加水分解する酵素は、反応メカニズムからアノマー保持型・反転型の二種類に分類される。アノマー保持型酵素は糖転移活性を持ちグリコシド合成にも用いられるが、アノマー反転型酵素は糖転移活性がないためグリコシド合成に用いることができなかった。そこで、アノマー反転型酵素をグリコシド合成酵素に変換することを目指した。

材料と実験方法

アノマー反転型酵素である還元末端特異性エキソオリゴキシラーゼ (REX) の求核触媒アミノ酸残基である Asp をサチュレーションミュータジェネシスにより改変したライブラリーを pET28b ベクター上で作成した。ライブラリーから任意に選抜した 120 コロニーを 1 mL の Overnight Express Autoinduction System1 (LB 培地使用) 中で 25°C、18 時間培養することにより変異酵素の発現を行った。遠心により菌体を分離後、BugBuster HT を用いて発現蛋白を抽出し、Nickel NTA spin column を用いて精製した。

結果

キシロピオシルフルオリドとキシロースを基質として酵素反応を行い、キシロトリオースを生成 (図) する変異酵素を TLC により選抜した。その結果、120 クローン中 56 クローンにキシロトリオース合成活性が検出された。活性型変異酵素の弛緩アミノ酸残基の同定を行ったところ 8 種類のアミノ酸が得られた。最も活性の高い変異酵素の置換アミノ酸残基は Cys であった。



結論・考察

特異的に特定の糖質を加水分解する酵素は、その特定の糖質を合成する触媒として期待される。しかしながら現在まではアノマー反転型酵素での糖質合成は困難であった。今回の結果は、アノマー反転型糖質加水分解酵素をグリコシド結合の合成に利用できるように改変した世界初の例である。この技術は他のアノマー反転型にも応用可能であり、将来糖鎖合成に使用されることも期待できる。今回の検討ではライブラリーから十分数のクローンを培養し酵素の発現を行う必要があった。多検体を同時に扱う場合、IPTG による誘導はかなり煩雑な操作になる。その点 Overnight Express を用いて培養を行えば、誘導操作が不要になり多数のクローンの同時培養を手早く行うことが容易であった。また、酵素の抽出も BugBuster を用いることにより手早くかつ均質に酵素の抽出を行うことができた。

参考文献: 1) The First Glycosynthase Derived from an Inverting Glycoside Hydrolase Yuji Honda and Motomitsu Kitaoka J. Biol. Chem., Jan 2006; 281: 1426 - 1431.

X線結晶解析には…

Overnight Express™ Autoinduction system 2

セレノメチオニンを加え、標識タンパク質を合成するための濃縮培地です。

特長

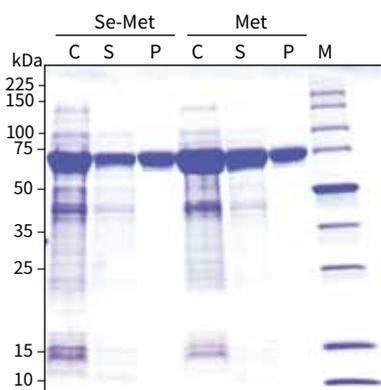
- 結晶化タンパク質のX線解析用にセレノメチオニンラベルに最適
- 滅菌水で調整可能な、滅菌済み液体濃縮培地
- 培養量に合わせて使用量を調節できます

メチオニンフリー培地を含むシステムです。セレノメチオニン (別売 カタログ番号 561505-1GM) を加え、標識タンパク質を作成します。この System 2 には以下の6種類の液が入っています。

製品名	カタログ番号	包装単位
Overnight Express	71366-3	1 L 用
Autoinduction system 2	71366-4	5 L 用

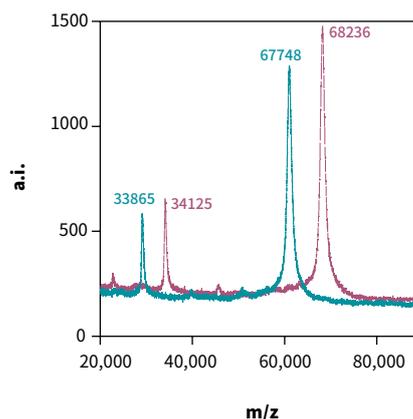
システムに含まれる試薬

		71366-3	71366-4
Overnight Express solution 1	炭素源 (大腸菌増殖のための栄養・発現誘導)	20 mL × 1 本	20 mL × 5 本
Overnight Express solution 2	濃縮バッファー / 窒素源 (代謝酸による pH 低下を防ぐ)	125 mL × 1 本	50 mL × 2 本
Overnight Express solution 3	マグネシウム源 (高い OD を維持)	1 mL × 1 本	1 mL × 5 本
Overnight Express solution 4	金属源	1 mL × 1 本	1 mL × 5 本
Overnight Express solution 5	メチオニンフリーアミノ酸源	20 mL × 1 本	100 mL × 1 本
Overnight Express solution 6	メチオニン源	20 mL × 1 本	100 mL × 1 本



Analysis of crude, soluble, and purified proteins from cultures grown in Overnight Express Autoinduction System 2 medium

pET-44b(+) plasmids expressing a His-Tag[®]/NusA fusion protein were transformed into B834(DE3) cells and grown for 16 h at 37°C in Overnight Express System 2 medium containing Se-Met (125 µg/ml) or Met (OnEx Solution 6). Cultures were centrifuged and cells were resuspended in Ni-NTA Bind Buffer containing AEBSF Hydrochloride, Benzamidine Hydrochloride, and Lysonase™ Bioprocessing Reagent. The suspension was sonicated and centrifuged at 12,000 xg for 10 min. Soluble cell extracts were processed by Ni-NTA His-Bind[®] chromatography. Two micrograms of purified protein (P), 5 µl of soluble extract (S), and a sample of crude extract (C; standardized to harvest OD₆₀₀) were analyzed by SDS-PAGE (10–20% gradient gel) and Coomassie blue staining. The predicted molecular mass for the pET-44b(+) protein is 67.8 kDa. Lane M: Perfect Protein™ Markers, 10–225 kDa.



Mass spectra

Mass spectroscopy analysis shows Se-Met incorporation into target proteins with Overnight Express System 2 autoinduction as described in figure at left. (Spectra provided by the Mass Spectrometry/Bioanalytical Facility at the University of Wisconsin Biotechnology Center.)

関連製品

大腸菌からの発現タンパク質抽出 BugBuster® シリーズ

Novagen®

製品名	カタログ番号	包装単位
▼スタンダードタイプより確実な溶菌が可能		
BugBuster® Master Mix	71456-3	100 mL
BugBuster、Benzonase、rLysozyme の混合製品。 グラム陰性・陽性菌どちらからもタンパク質の抽出が可能です。 <i>E.coli</i> 1g あたり 5 mL が標準使用量です。	71456-4	500 mL
▼BugBuster と核酸分解酵素とのセット製品		
BugBuster® Plus Benzonase® Nuclease	70750-3	1 kit
BugBuster 500 mL と Benzonase Nuclease 10,000 U (カタログ番号 70746-3) とのセット製品です。		
▼BugBuster と核酸分解酵素のプレミックスタイプ		
BugBuster® HT Protein Extraction Reagent	70922-3	100 mL
BugBuster と Benzonase があらかじめ混合されています。ハイスループットなタンパク質精製にも最適です。	70922-4	500 mL
	70922-5	1 L
▼BugBuster (スタンダードタイプ)		
BugBuster® Protein Extraction Reagent	70584-3	100 mL
BugBuster のスタンダードタイプ。標準使用量は <i>E.coli</i> 1g あたり 5 mL です。	70584-4	500 mL
▼BugBuster (濃縮タイプ)		
BugBuster® 10X Protein Extraction Reagent	70921-3	10 mL
バッファー成分を含まない濃縮タイプです。お好みのバッファーで希釈してご使用ください。	70921-4	50 mL
	70921-5	100 mL

BugBuster® 関連製品

▼安定な組み換えリゾチーム		
rLysozyme™ Solution	71110-3	300 KU
組換えリゾチーム。BugBuster と併用すると抽出効率が上がります。BugBuster と併用するときは <i>E.coli</i> 1g あたり 3,000 ~ 5,000 U が標準使用量です。	71110-4	1200 KU
	71110-5	6000 KU
▼核酸分解酵素		
Benzonase® Nuclease, Purity > 90%	70746-4	2.5 KU
<i>Serratia marcescens</i> 由来のエンドヌクレアーゼです。DNA と RNA を分解しますが、タンパク質には影響しません。BugBuster と併用するときは <i>E.coli</i> 1g あたり 5 µL (125 U) が標準使用量です。	70746-3	10 KU

●無償サンプルのご請求は、弊社または弊社製品取り扱い代理店までお気軽にご連絡ください。

抗生物質

製品名	カタログ番号	包装単位	Calbiochem®	Novagen®
Ampicillin, Sodium Salt	171254-5GM	5 g		
形状：粉末、純度：≥ 90% (anhydrous)、分子量：371.4、保存：4°C、CAS:69-52-3、溶解性：H ₂ O (1 mg/mL)	171254-25GM	25 g		
Ampicillin, Sodium Salt, Sterile-Filtered Aqueous Solution, Cell Culture Tested	171257-10ML	10 mL		
形状：液体、分子量：371.4、保存：-20°C、CAS:69-52-3、100 mg/mL 水溶液。				
Ampicillin, Sodium Salt, Sterile, Tissue Culture Grade	171255-20ML	20 mL		
形状：粉末、分子量：371.4、保存：4°C、CAS:69-52-3、20 mL H ₂ O で溶解すると 10 mg/mL のストック溶液になります。				
Carbenicillin	C9231-5G	5 g		
形状：粉末、分子量：422.4、保存：+4°C、CAS：4800-94-6、溶解性：H ₂ O (10 mg/mL)				
Kanamycin Sulfate, <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	420311-5GM	5 g		
形状：粉末、分子量：582.6、保存：室温、CAS：25389-94-0、溶解性：H ₂ O (10 mg/mL)	420311-25GM	25 g		
Puromycin, Dihydrochloride, Cell Culture-Tested	540411-25MG	25 mg		
形状：粉末、純度：≥ 98% byTLC、分子量：544.4、保存：-20°C、CAS：58-58-2、溶解性：H ₂ O (50 mg/mL) および MeOH (20 mg/mL)	540411-100MG	100 mg		
Blasticidin S, Hydrochloride, <i>Streptomyces griseochromogenes</i>	203350-25MG	25 mg		
形状：粉末、純度：≥ 98% byHPLC、分子量：458.9、保存：+4°C、CAS：3513-03-9、溶解性：H ₂ O (20 mg/mL)				
Blasticidin S, Hydrochloride, <i>Streptomyces sp.</i> , Sterile-Filtered Aqueous Solution, Cell Culture	203351-10ML	10 mL		
形状：液体、分子量 458.9、保存：-20°C、CAS：3513-03-9、製品番号 203350 のろ過滅菌済 10mg/mL (20 mM HEPES pH7.5) 溶液です。				



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。記載内容は2019年9月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2019 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ事業部

〒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.com/bio

E-mail: jpts@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859

RBM140-1909-PDF-H