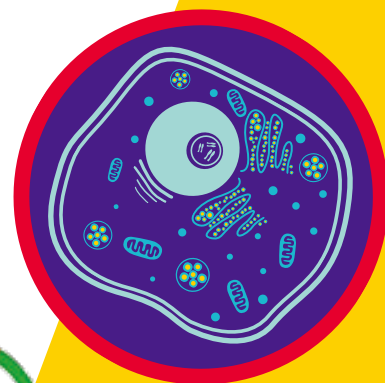
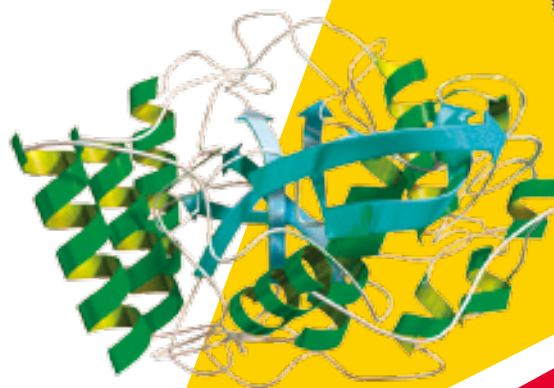
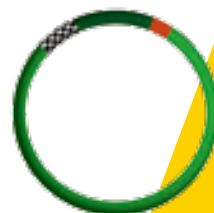


トランスフェクションから タンパク質精製までの 製品ガイド

大腸菌培地	3
プラスミド DNA 精製 (ミニプレップ).....	4
プラスミド DNA のトランスフェクション.....	7
哺乳動物細胞培養	12
抗生物質	15
タンパク質抽出	16
プロテアーゼインヒビター	20
ホスファターゼインヒビター	24
タグ融合タンパク質のアフィニティ精製	25
SDS-PAGE.....	29
免疫染色・ウェスタンブロット	30



Roche

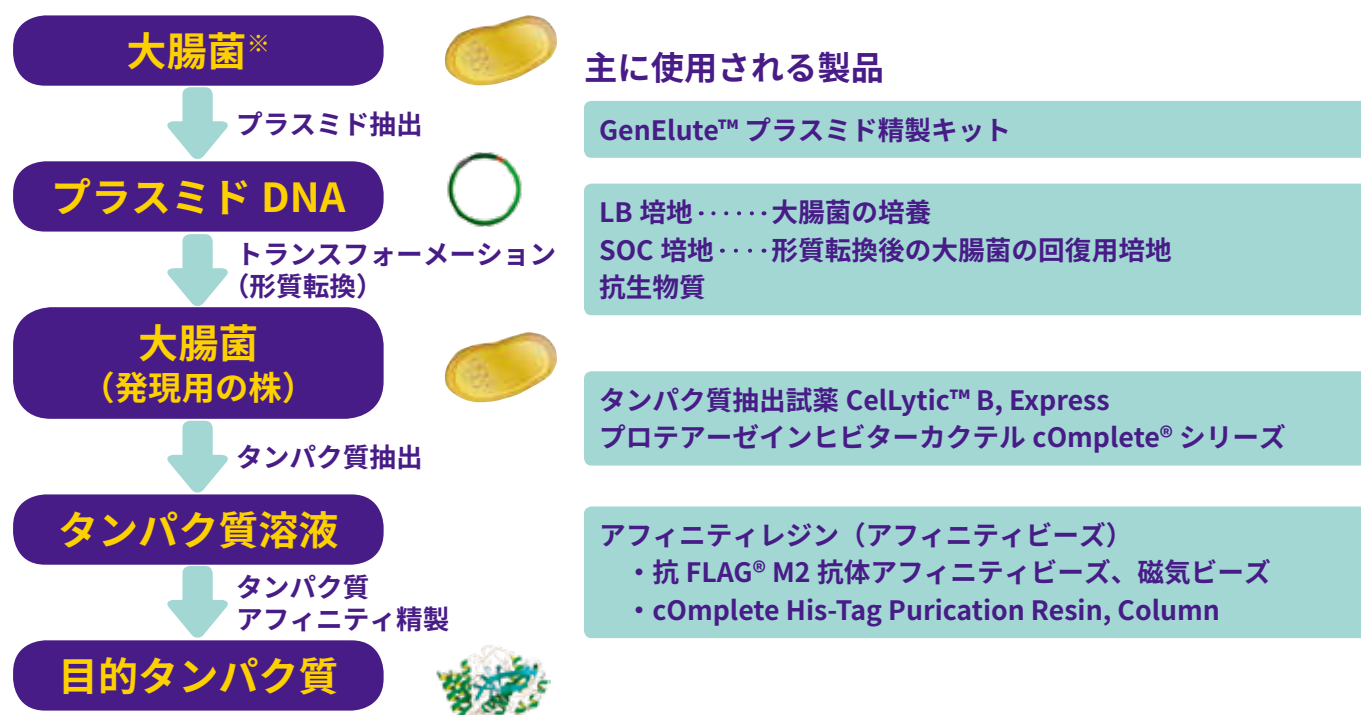
The life science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

タンパク質発現・精製のフロー

大腸菌を使ったタンパク質発現

※目的のタンパク質配列を組み込んだプラスミドを導入した大腸菌



哺乳動物細胞を使ったタンパク質発現

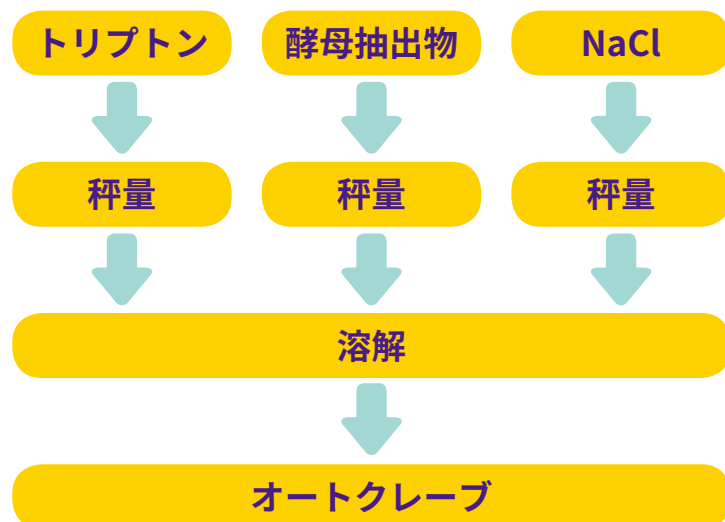
※目的のタンパク質配列を組み込んだプラスミドを導入した大腸菌



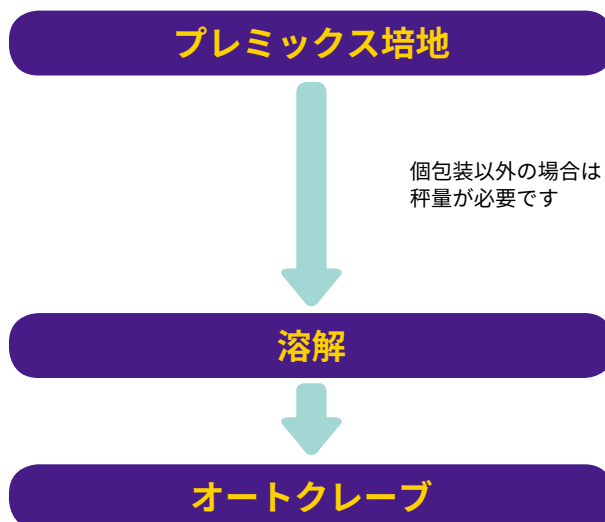
大腸菌培地

大腸菌の培養にはLB 培地などが用いられます。LB 培地はトリプトン、酵母抽出物（イーストエキストラクト）、塩化ナトリウム（NaCl）を配合して調製しますが、弊社では各成分を配合した便利なプレミックスタイプの製品をご用意しています。

従来の調製法



プレミックス培地の調製法



プレミックス培地

	製品名	製品情報	カタログ番号
LB 培地 (Lennox) 組成 10 g/L トリプトン 5 g/L 酵母抽出物 5 g/L NaCl	LB プロス粉末	粉末。培地 1 L に 20 g 使用	L3022
	LB プロス EZMix™ 粉末	粉が無い散りにくい粒子形状。1 袋（10.3 g）で培地 500 mL 分 ※ 0.6 g/L 不活性の結合剤含有	L7658
	 カタログ番号 L7658-6X500ML 1 袋を 500 mL の水に溶かしてオートクレーブするだけの便利なパッケージです		
	LB プロス錠剤	1 袋で培地 50 mL 分（48.3 mL の水に溶解） ※ 2.2 g/L 不活性の結合剤含有	L7275
LB 培地 (Miller) 組成 10 g/L トリプトン 5 g/L 酵母抽出物 10 g/L NaCl	LB プロス粉末	粉末。培地 1 L に 25 g 使用	L3522
	LB プロス溶液	そのまま使用できる調製済みの溶液 フィルター滅菌済み	L2542
SOC 培地	SOC Medium	そのまま使用できる調製済みの溶液 フィルター滅菌済み	S1797

プラスミド DNA 精製 (ミニプレップ)

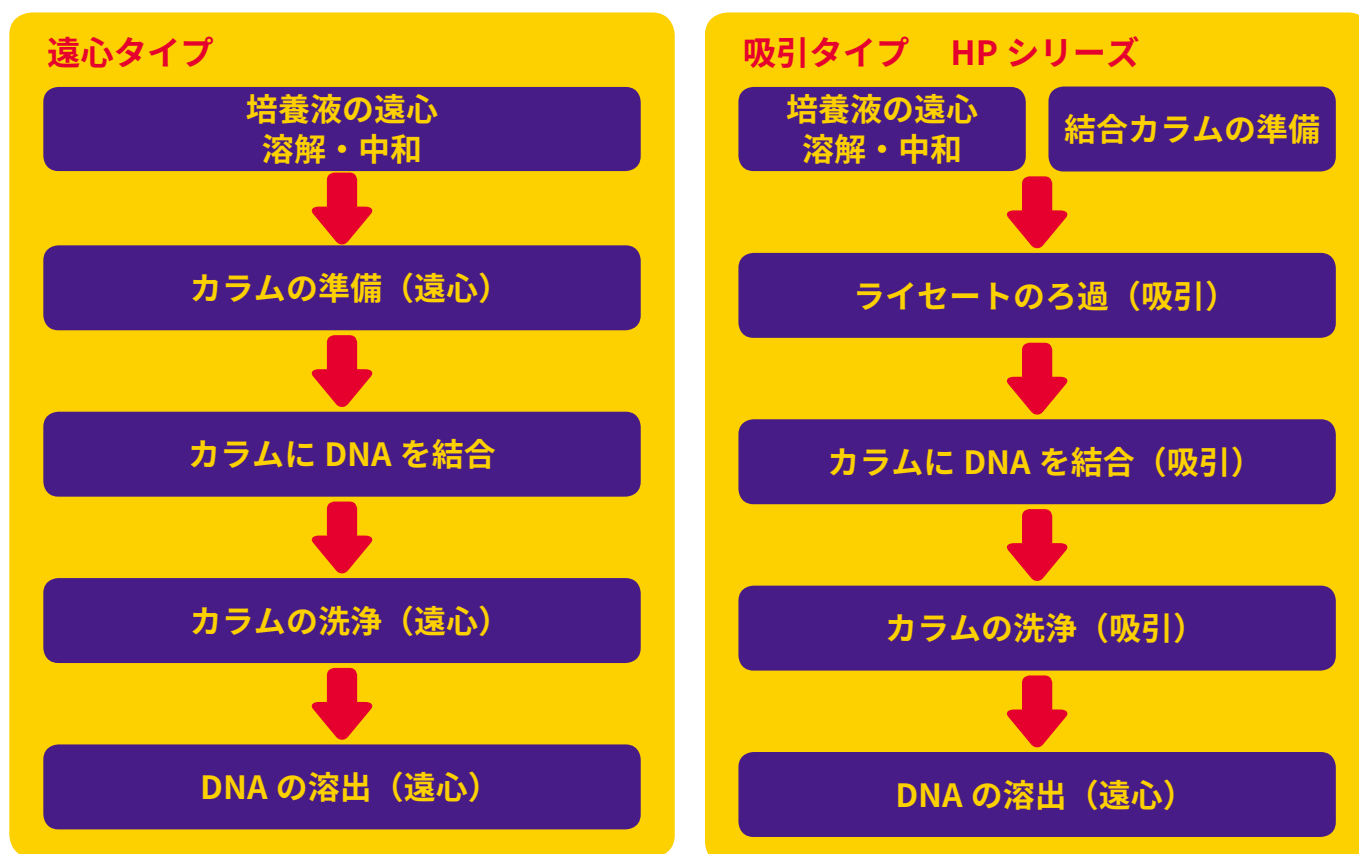
培養した大腸菌からのプラスミド抽出はアルカリ SDS 法などで行うことができますが、調製する試薬の種類が多く、フェノールやクロロホルムのような有害な物質を使用しなければなりません。そこでプラスミド抽出の作業の手間や時間、危険性を低減し、高純度のプラスミド DNA が得られるキットがよく用いられています。

大腸菌の培養量によってミニプレップ、ミディプレップ、マキシプレップなどがあり、得られるプラスミド DNA 中のエンドトキシンをほぼフリーにするキットなどいくつかのキットが作られています。エンドトキシンフリーのプラスミド精製キットは高純度のプラスミド DNA が要求される哺乳動物細胞へのトランスフェクションなどに利用されます。

ここではスタンダードなキットとして、1～5 mL の LB 培地で培養した大腸菌からアルカリ SDS 法をベースにしてプラスミド DNA を抽出し、プラスミド DNA をシリカメンブレンカラムに結合させて精製するミニプレップキットを紹介します。

遠心だけで行う従来のキット (左図) と遠心とバキュームを組み合わせる作業効率を向上させたキット (右図) があります。扱うサンプルが比較的少ない場合は左図のキットが適し、吸引器とバキュームマニホールドがあり、多数のサンプルを同時に扱う場合は右図のキットが適しています。

プラスミド DNA 精製キット (ミニプレップ)



プラスミド精製ミニプレップキット

カタログ番号	回数
PLN70-1KT	70 回分
PLN350-1KT	350 回分

詳細なプロトコールはウェブサイトの各製品ページからご覧いただけます。

定番

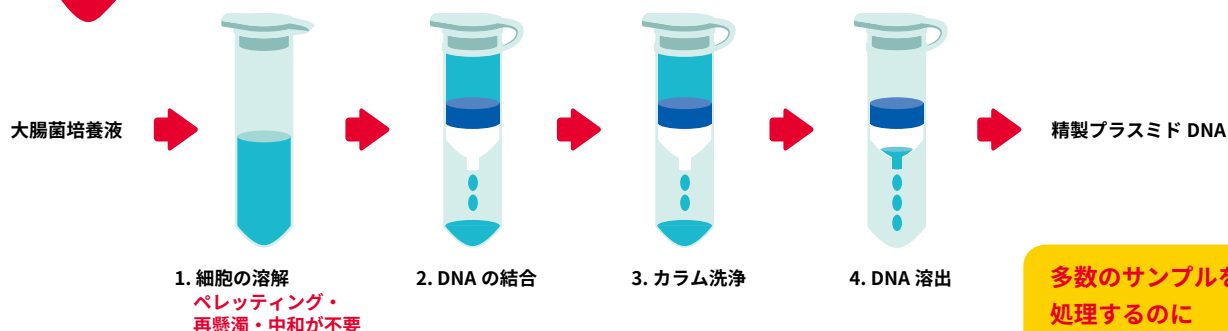
プラスミド精製ミニプレップキット HP シリーズ

カタログ番号	回数
NA0150-1KT	70 回分
NA0160-1KT	350 回分



バキュームマニホールド
カタログ番号 VM20-1SET

迅速

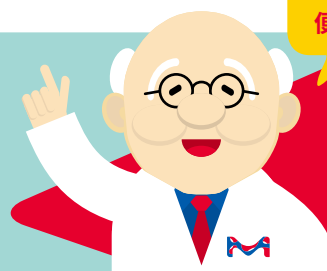


多数のサンプルを
処理するのに
便利そうじゃの

わずか 5 分のミニプレップキット

大腸菌を溶かしてそのままプラスミド精製
収量最大 5 µg
吸引、遠心法のどちらも対応

カタログ番号	回数
PFM10-1KT	10 回分
PFM50-1KT	50 回分
PFM250-1KT	250 回分

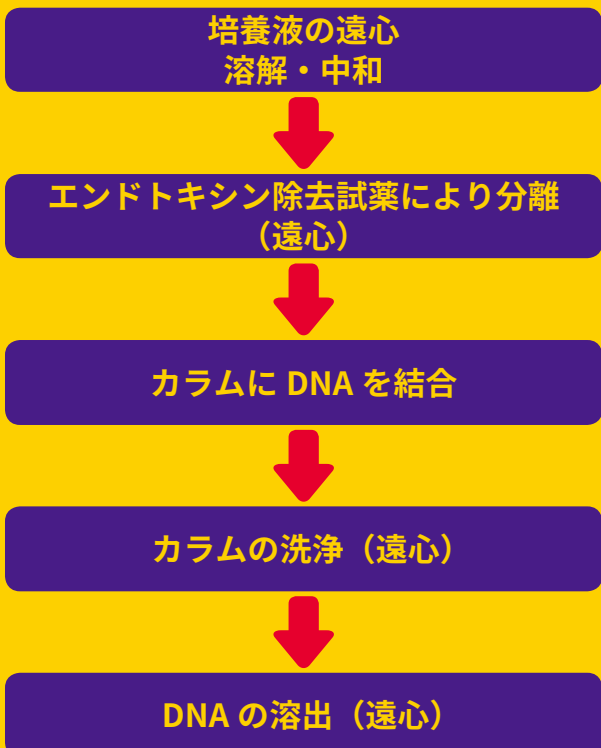


エンドキシンフリープラスミド DNA 精製キット

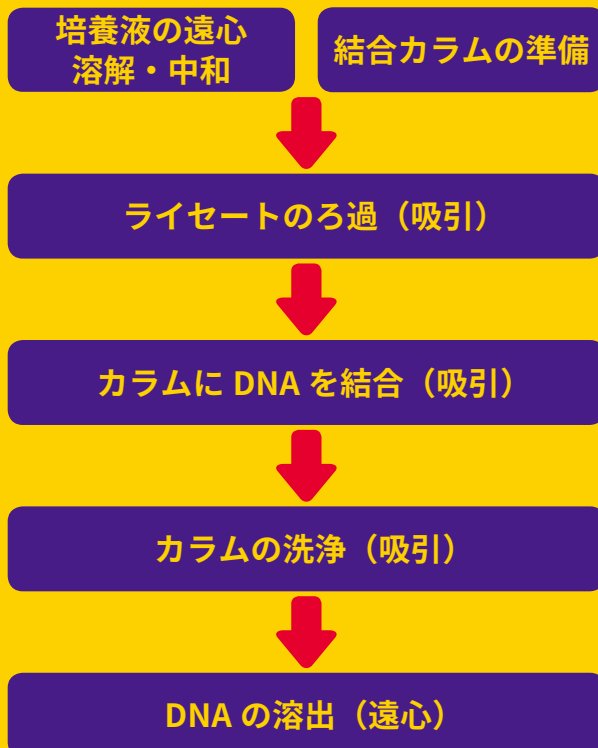
エンドトキシン（別名リポ多糖類または LPS）は、プラスミド DNA とともに精製されることが多く、エンドトキシン感受性細胞株へのトランスフェクション効率を大幅に低下させるおそれがあります。

弊社の GenElute™ Endotoxin-free シリーズは大腸菌からエンドキシンフリー（0.1 EU/µg DNA 以下）のプラスミドを精製することができます。得られたプラスミド DNA は高いトランスフェクション効率が期待できます。遠心方式または吸引方式のため、自然滴下イオン交換カラム方式より迅速に精製を行うことが可能です。

遠心タイプ



吸引タイプ HP シリーズ



プラスミド DNA 精製 (ミニプレップ)

プラスミド DNA 精製キット一覧

カタログ番号	使用回数	使用する培養量	期待される収量	標準的な精製時間	精製のタイプ	制限酵素処理	シーケンシング	PCR	クローニング	トランスフェクション※1	トランスフェクション※2
定番のミニプレップキット GenElute™ Plasmid Miniprep Kit											
PLN70-1KT	70 回分	1.5 mL	20 µg まで	30 分以内	遠心	●	●	●	●	●	
PLN350-1KT	350 回分										
バキューム方式も可能なハイパフォーマンスミニプレップキット GenElute HP Plasmid Miniprep Kit											
NA0150-1KT	70 回分	1 ～ 5 mL	25 µg まで	30 分以内	吸引または遠心	●	●	●	●	●	
NA0160-1KT	350 回分										
5 分間ミニプレップキット GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kit											
PFM10-1KT	10 回分	0.4 mL まで	5 µg まで	5 分間	吸引または遠心	●	●	●			
PFM50-1KT	50 回分										
PFM250-1KT	250 回分										
ミディプレップキット GenElute Plasmid Midiprep Kit											
PLD35-1KT	35 回分	20 ～ 40 mL	300 µg まで	45 分	遠心	●	●	●	●	●	
バキューム方式も可能なハイパフォーマンスミディプレップキット GenElute HP Plasmid Midiprep Kit											
NA0200-1KT	25 回分	50 mL	350 µg まで	30 分	吸引または遠心	●	●	●	●	●	
マキシプレップキット GenElute Plasmid Maxiprep Kit											
PLX15-1KT	15 回分	25 ～ 200 mL	1.2 mg まで	45 分	遠心	●	●	●	●	●	
ハイパフォーマンスマキシプレップキット GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit											
NA0300S-1KT	4 回分	150 mL	1.2 mg まで	30 分	吸引	●	●	●	●	●	
NA0300-1KT	10 回分										
NA0310-1KT	25 回分										
ハイパフォーマンスメガプレップキット GenElute HP Plasmid Megaprep Kit											
NA0500-1KT	5 回分	200 mL ～ 1 L	5 mg まで	90 分	吸引	●	●	●	●	●	
エンドトキシンフリーミディプレップキット GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit											
PLED35-1KT	35 回分	5 ～ 40 mL	250 µg まで	2 時間	遠心	●	●	●	●	●	●
エンドトキシンフリーマキシプレップキット GenElute Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit											
PLEX15-1KT	15 回分	25 ～ 200 mL	1.2 mg まで	2 時間	遠心	●	●	●	●	●	●
エンドトキシンフリーハイパフォーマンスマキシプレップキット GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit											
NA0400S-1KT	4 回分	150 mL	1.2 mg まで	40 分	吸引	●	●	●	●	●	●
NA0400-1KT	10 回分										
NA0410-1KT	25 回分										
エンドトキシンフリーハイパフォーマンスメガプレップキット GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Megaprep Kit											
NA0600-1KT	5 回分	200 mL ～ 1 L	5 mg まで	90 分	吸引	●	●	●	●	●	●
エンドトキシンフリーハイパフォーマンスギガプレップキット GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit											
NA0800-1KT	5 回分	1.2 ～ 2.5 L	15 mg まで	2 時間	吸引	●	●	●	●	●	●

※ 1 一般的な細胞

※ 2 センシティブな細胞

吸引タイプのキットは別途バキュームマニホールドが必要です。

カタログ番号 **VM20-1SET**



プラスミド DNA のトランスフェクション

プラスミド DNA を哺乳動物や昆虫細胞などに導入するトランスフェクションは、エレクトロポレーション法、リン酸化カルシウム沈殿法、脂質によるリポソーム系のトランスフェクション試薬、または脂質とその他の成分を配合した非リポソーム系のトランスフェクション試薬などの方法があります。トランスフェクション試薬は特殊な装置が不要で導入効率が高いことから、培養細胞への日常的なトランスフェクションによく利用されています。

ロシュ社のトランスフェクション試薬 X-tremeGENE® HP および 9 は脂質と独自の成分を配合した非リポソーム系のトランスフェクション試薬で、細胞毒性を低減させるとともに高いトランスフェクション効率を実現しています。

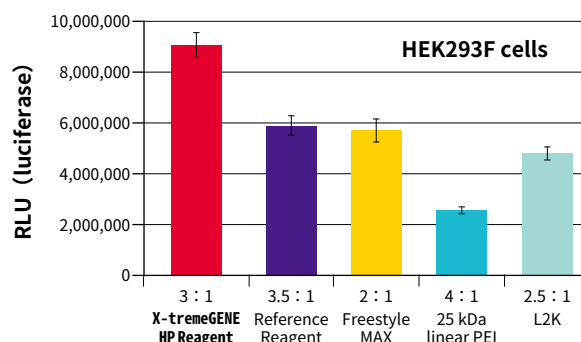
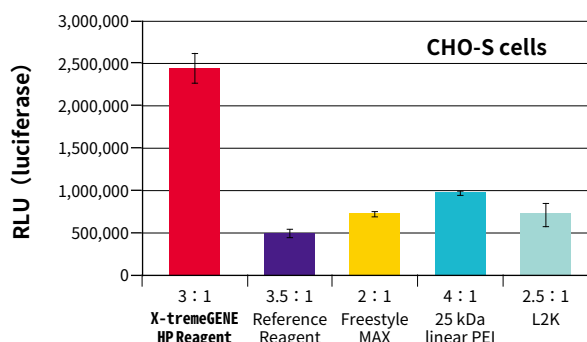
プラスミド DNA のトランスフェクション試薬

ロシュ社 X-tremeGENE HP (エクストリームジーン エイチピー) は、哺乳動物の細胞や昆虫細胞などの広範囲な真核細胞だけでなく、トランスフェクションが困難と言われている細胞にも効率よくトランスフェクションが可能です。導入効率の良からタンパク質収量の向上も期待できます。

ロシュ社 X-tremeGENE 9 (エクストリームジーン ナイン) は、非常に低毒性のトランスフェクション試薬です。通常よく使用される細胞で高効率かつ、副次的影響を与えることなくトランスフェクションが可能のため、トランスフェクション後の様々なアプリケーションに利用することができます。



	一般的な細胞	困難な細胞	プライマリー細胞	血清を含む培地での使用	ヒトおよび動物由来成分	低毒性
X-tremeGENE HP	◎	◎	◎	可能	含まない	○
X-tremeGENE 9	◎	○	△	可能	含む	◎



CHO-S と HEK293F 細胞に対して 2 mL/well の容量で図中に示した「試薬:DNA」比により、各社の説明書に従いトランスフェクションを実施。ルシフェラーゼの発現は、標準的なルシフェラーゼアッセイにより、トランスフェクション後 48 時間の時点で測定。数値は、Relative light units (RLU) にて表示。エラーバーは 2 重測定でのレンジを示している。

人気製品

製品名	特長	カタログ番号	容量
X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬	様々な細胞に利用可能 低毒性 高効率のためタンパク質収量増加も期待	06 366 244 001	0.4 mL
		06 366 236 001	1.0 mL
		06 366 546 001	5 × 1 mL
X-tremeGENE 9 DNA トランスフェクション試薬	非常に低毒性 一般的な細胞に利用可能	06 365 779 001	0.4 mL
		06 365 787 001	1.0 mL
		06 365 809 001	5 × 1 mL

X-TremeGENE® HP, 9 トランスフェクション試薬の使用例

一般的な細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数 /well	コンフルエント率	希釈に使用する Opti-MEM™	試薬 : DNA	添加量 / well
CHO-K1	X-tremeGENE HP	1.5x10 ⁴ (96 ウェル)	65-75%	200 µL	2 µL : 2 µg	10 µL
	X-tremeGENE 9	1.5x10 ⁴ (96 ウェル)	65-75%	200 µL	6 : 2	5 µL
COS-7	X-tremeGENE HP	8.0-9.0x10 ³ (96 ウェル)	75-85%	200 µL	4 : 2	10 µL
	X-tremeGENE 9	8.0-9.0x10 ³ (96 ウェル)	75-85%	200 µL	6 : 2	5 µL
HeLa	X-tremeGENE HP	1.2-1.3x10 ⁴ (96 ウェル)	70-90%	200 µL	6 : 2	10 µL
	X-tremeGENE 9	1.5x10 ⁴ (96 ウェル)	70-90%	200 µL	6 : 2	5 µL
NIH-3T3	X-tremeGENE 9	1.5x10 ⁴ (96 ウェル)	70-80%	200 µL	6 : 2	5 µL
HEK-293	X-tremeGENE HP	3.0-3.5x10 ⁴ (96 ウェル)	50-70%	200 µL	6 : 2	10 µL
困難とされる細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数 /well	コンフルエント率	希釈に使用する Opti-MEM	試薬 : DNA	添加量 / well
MCF-7	X-tremeGENE 9	1.2-1.8x10 ⁴ (96 ウェル)	70-90%	200 µL	6 µL : 2 µg	10 µL
HepG2	X-tremeGENE 9	2.0-2.5x10 ⁴ (96 ウェル)	60-70%	500 µL	30 : 10	5 µL
Neuro-2a	X-tremeGENE 9	1.0x10 ⁵ (24 ウェル)	30-40%	100 µL	8 : 2	100 µL
PC-3	X-tremeGENE HP	1.0-1.2x10 ⁴ (96 ウェル)	75-85%	200 µL	2 : 2	10 µL
HCT 116	X-tremeGENE HP	3.0-4.0x10 ⁵ (12 ウェル)	80%	100 µL	2 : 1	100 µL
A549	X-tremeGENE HP	2.8x10 ⁴ (96 ウェル)	70%	500 µL	10 : 5	15 µL
HuH-7	X-tremeGENE HP	1.0x10 ⁵ (6 ウェル)	播種 18-24 時間後	100 µL	1.5 : 1.5	100 µL
U-2 OS	X-tremeGENE HP	2.5-3.0x10 ⁴ (96 ウェル)	70-90%	200 µL	4 : 2	10 µL
プライマリー細胞・幹細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数 /well	コンフルエント率	希釈に使用する Opti-MEM	試薬 : DNA	添加量 / well
Primary MEF	X-tremeGENE HP	0.5-1.0x10 ⁵ (12 ウェル)	60%	100 µL	4 µL : 1 µg	100 µL
Human Primary Fibroblasts from Pre-Skin	X-tremeGENE HP	1.0x10 ⁵ (6 ウェル)	40-50%	200 µL	6 : 2	200 µL
Murine Mesenchymal Stem Cells EK8	X-tremeGENE HP	3.0x10 ⁴ (96 ウェル)	50%	392 µL	8 : 8	10 µL
Human Mesenchymal Stem Cells	X-tremeGENE HP	8.0x10 ⁴ (6 ウェル)	50%	200 µL	6 : 2	200 µL
パッケージング細胞・昆虫細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数 /well	コンフルエント率	希釈に使用する Opti-MEM	試薬 : DNA	添加量 / well
HEK-293T Cells for Lentiviral Production	X-tremeGENE HP	5.0x10 ⁵ (6 ウェル)	60-80%	180 µL	6 µL : 2 µg	200 µL
SF9 Insect Cells	X-tremeGENE HP	0.5x10 ⁶ (12 ウェル)	播種後すぐ	100 µL	8 : 1	100 µL

ロシュ社データ引用。

コンフルエント率はトランスフェクション時点の値。

特に記載がないものは細胞は播種から 18 ~ 24 時間後にトランスフェクションを行っています。

ロシュ社のバイオケミカル試薬お取り扱いしています

ロシュ社のゲノミクス、プロテオミクス、細胞アプリケーション用の研究用試薬・キットが弊社からご利用いただけます。

取扱い製品はこちら

www.sigmaaldrich.com/roche-jp



X-tremeGENE® HP トランスフェクション試薬 プロトコール例

細胞 HEK-293

トランスフェクション試薬 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent

フォーマット 96 ウェルプレート

A. 細胞の事前準備

1. トランスフェクションの 18-24 時間前に細胞を 96 ウェルプレートに播種します。
細胞数 $3.0\text{--}3.5 \times 10^4$ cells/well
培地 100 μL /well (血清を含む完全培地)
2. 18-24 時間培養し、50-70% コンフルエントになった状態でトランスフェクションを行います。

B. トランスフェクション試薬調製 (トランスフェクション直前)

1. X-tremeGENE HP、Opti-MEM™ などの無血清培地、およびプラスミド DNA 溶液を室温に戻します。
2. 200 μL の Opti-MEM などの無血清培地を滅菌したチューブに入れます。
3. 2 μg のプラスミド DNA をチューブに添加します (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA 溶液を 2 μL 添加)。
4. 穏やかにピペッティングしてよく混ぜます。
5. 6 μL の X-tremeGENE HP を添加します (X-tremeGENE HP : DNA=3 : 1)。
6. 穏やかにピペッティングしてよく混ぜます。
7. 室温で 15-30 分インキュベートします。

C. トランスフェクション

1. B で準備した X-tremeGENE HP とプラスミド DNA の混合液 10 μL を A で準備した細胞の各ウェルに滴下します。
2. プレートを手軽に前後・左右に揺り動かします。
3. 24-72 時間インキュベートします。新たな培地に交換する必要はありません。

X-tremeGENE 9 トランスフェクション試薬 プロトコール例

細胞 CHO-K1

トランスフェクション試薬 X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent

フォーマット 96 ウェルプレート

A. 細胞の事前準備

1. トランスフェクションの 18-24 時間前に細胞を 96 ウェルプレートに播種します。
細胞数 1.5×10^4 cells/well
培地 100 μL /well (血清を含む完全培地)
2. 24 時間培養し、65-75% コンフルエントになった状態でトランスフェクションを行います。

B. トランスフェクション試薬調製 (トランスフェクション直前)

1. X-tremeGENE 9、Opti-MEM などの無血清培地、およびプラスミド DNA 溶液を室温に戻します。
2. 200 μL の Opti-MEM などの無血清培地を滅菌したチューブに入れます。
3. 6 μL の X-tremeGENE 9 をチューブに入れます。
4. 穏やかにピペッティングしてよく混ぜます。
5. 2 μg のプラスミド DNA を添加します (X-tremeGENE 9 : DNA=3 : 1)。
6. 穏やかにピペッティングしてよく混ぜます。
7. 室温で 30 分インキュベートします。

C. トランスフェクション

1. B で準備した X-tremeGENE 9 とプラスミド DNA の混合液 5 μL を A で準備した細胞の各ウェルに滴下します。
2. プレートを手軽に前後・左右に揺り動かします。
3. 24-72 時間インキュベートします。新たな培地に交換する必要はありません。

細胞の種類によって最適な条件は異なります。播種する細胞数、トランスフェクション試薬と DNA の比率、添加する量などのパラメーターを変えて条件を検討することが重要です。

<https://bit.ly/transfection-reagents-jp>

siRNA のトランスフェクション

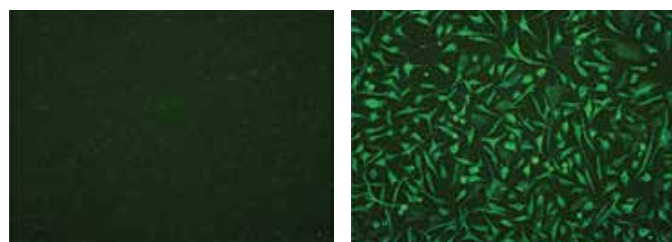
siRNA のトランスフェクション試薬

製品名	特長	カタログ番号	容量
MISSION® siRNA トランスフェクション試薬	低濃度（1 nM）の siRNA でトランスフェクション可能（実際の使用は 10-100 nM 推奨）。使用する siRNA 量が少ないためオフターゲットの低減が期待されます	S1452-100UL	0.1 mL
		S1452-1ML	1 mL
N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System	ペプチドベースのトランスフェクション試薬。脂質系とは異なる導入法のため、siRNA が細胞質内で局在しにくいことが期待されます。siRNA は 5-100 nM を推奨	N2913-120UL	0.12 mL
X-tremeGENE® siRNA トラン スフェクション試薬 (Roche 社)	非リボソーム系のトランスフェクション試薬。低毒性。動物由来成分フリー	04 476 093 001	1 mL
		04 476 115 001	5x1 mL

MISSION siRNA トランスフェクション試薬の特長

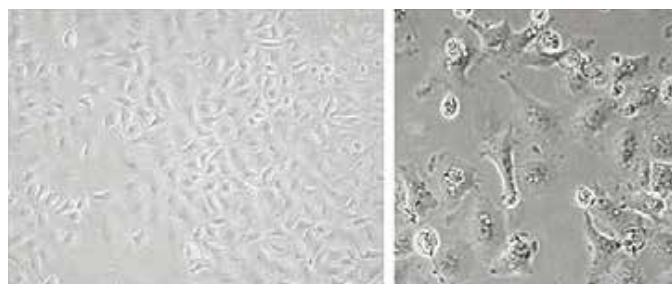
- 様々な細胞に適応
- 低い細胞毒性
- 低濃度の siRNA で有効 = オフターゲット効果を抑制

高いサイレンシング効率



Vimentin に対する siRNA (5 nM) を 3T3 細胞へ導入 (左)。右はコントロール。導入 48 時間後に抗 Vimentin 抗体を用いて検出。

優れた細胞生存性

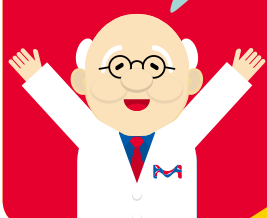


GL3 Luciferase 安定発現 A549 細胞へ Luciferase に対する siRNA (1 nM) を導入。48 時間後に細胞形態を観察。左は MISSION トランスフェクション試薬。右は他社製品。

実施例

付着細胞 (1 nM siRNA)	ターゲット遺伝子	サイレンシング効率
3LL	GAPDH	≥ 90%
A549	Luciferase	≥ 90%
Ca Ski	GAPDH/Lamin A/C	≥ 90%
HEK-293	GAPDH	≥ 90%
HeLa	GAPDH/Lamin A/C	≥ 90%
HepG2	GAPDH	60-70%
MCF7	GAPDH/LaminA /C	≥ 90%
MDA-MB-231	GAPDH	≥ 90%
NIH 3T3	Vimentin	≥ 90%
RAW 264.7	Eg5	≥ 90%
SiHa	GAPDH/Lamin A/C	≥ 90%
SK-OV-3	GAPDH	≥ 90%
初代細胞 (1 nM siRNA)		
Murine embryonic fibroblasts	GAPDH	≥ 90%
Primary human fibroblasts	GAPDH/Lamin A/C	≥ 90%
Primary human hepatocytes	GAPDH	≥ 90%
Primary human keratinocytes	GAPDH	≥ 90%
浮遊細胞 (5 nM siRNA)		
K562	GAPDH	≥ 80%
THP-1	GAPDH	≥ 80%

siRNA が欲しいのじゃ



カスタムで作成する

カタログ品から配列を選ぶ

www.sigmaaldrich.com/custom-rna-jp

www.sigmaaldrich.com/missionsirna-jp

MISSION プレデザイン siRNA

(ヒト、マウス、ラットの遺伝子から検索できます)

siRNA トランスフェクション プロトコール MISSION® siRNA トランスフェクション試薬

付着細胞へのトランスフェクション（フォワードトランスフェクション法）

トランスフェクションの前日に細胞を 30～50% コンフルエントにする必要があります。
24 ウェルプレートの場合、一般的に 15,000～35,000 個の細胞をトランスフェクションの 24 時間前にまきます。
その他の場合の目安は表 1 をご覧ください。

使用する siRNA の最適濃度を決めるために、最終濃度として 1～30 nM の範囲でテストすることが推奨されます。
24 ウェルプレートの場合、siRNA が 10 nM 以下ではトランスフェクション試薬は 1～3 μ L、siRNA が 10 nM より高濃度ではトランスフェクション試薬は 2～4 μ L が推奨されます。その他の場合の目安は表 1 をご覧ください。

以下は 24 ウェルプレートで最終濃度 10 nM の siRNA を用いるときのプロトコールです。1 ウェルあたりの量を示しています。

- 3 ピコモルの siRNA duplex を血清を含まない培地 100 μ L で希釈し、穏やかに混ぜます。
- トランスフェクション試薬（カタログ番号 S1452）2 μ L を手順 1 の siRNA 溶液に添加し、すぐに混ぜます。
- 混ぜてから 10～15 分間、室温でインキュベートします。（1 時間以内に手順 5 に進んでください）
- インキュベーション中に前培養した細胞から培地を除去し、あらかじめ温めた新しい培地（血清を含む）を 500 μ L 入れてください。トランスフェクション時に抗生物質が含まれていても構いません。
- 手順 3 で準備したトランスフェクション試薬と siRNA 混合液 100 μ L を 4 の細胞に添加し、穏やかに揺り動かすようにして混ぜます。ここで最終液量は 600 μ L になります。
- トランスフェクションした細胞を細胞培養用インキュベーターでインキュベートします。一般的にトランスフェクションから 24～96 時間後に遺伝子発現抑制の効果を測定します。
- より長時間インキュベートする場合は、適宜培地を交換します。

表 1. 付着細胞のトランスフェクション条件

プレートのウェル数	前培養時の播種細胞数	前培養の培地量	siRNA duplex (ピコモル)	トランスフェクション試薬 (siRNA 1～10 nM の場合)	トランスフェクション試薬 (siRNA >10nM の場合)	トランスフェクションの量	トランスフェクション時の培地量
384	1,250-3,750	0.1 mL	0.5	0.25-0.6 μ L	0.35-0.75 μ L	25 μ L	63 μ L
96	2,500-7,500	0.2 mL	1	0.5-1.2 μ L	0.7-1.5 μ L	50 μ L	125 μ L
24	15,000-35,000	1 mL	3	1-3 μ L	2-4 μ L	100 μ L	500 μ L
12	30,000-70,000	2 mL	7	2-6 μ L	4-8 μ L	200 μ L	1 mL
6	100,000-200,000	4 mL	12	6-10 μ L	8-16 μ L	200 μ L	2 mL

付着細胞へのトランスフェクション（リバーストランスフェクション法）

リバーストランスフェクション法ではトランスフェクションと細胞播種は同じ日に行います。siRNA とトランスフェクション試薬の混合液を準備し、細胞を入れる前の各ウェルに分注します。細胞は希望する濃度に希釈して、siRNA とトランスフェクション試薬混合液が入っているウェルに添加します。それぞれの細胞数とプレートサイズは表 2 をご覧ください。

以下は 96 ウェルプレートで siRNA の最終濃度 10 nM でトランスフェクションする場合のプロトコールです。

- トランスフェクション試薬（カタログ番号 S1452）1 μ L を各ウェルに入れます。
オートディスペンサーを用いる場合、トランスフェクション試薬と水を 1：5 で希釈し、各ウェルに 5 μ L 入れます。希釈したトランスフェクション試薬は 24 時間以内に使用してください。
- 次に 150 ピコモルの siRNA duplex を血清を含まない培地 5 mL で希釈し、穏やかにピペッティングして混合し、マスターミックスを準備します。
- 手順 2 のマスターミックス 50 μ L を手順 1 の各ウェルに添加します。
- ボルテックスして 10 秒間混ぜ、10～15 分間インキュベートします。（1 時間以内に手順 5 に進んでください）
- 細胞を 7,500 個含んでいる完全培地 100 μ L を手順 4 の各ウェルに添加し、プレートを穏やかに揺り動かすように混ぜます。ここで 1 ウェルあたり 155 μ L で siRNA の最終濃度は 10 nM になります。
- トランスフェクションした細胞を細胞培養用インキュベーターでインキュベートします。一般的にトランスフェクションから 24～96 時間後に遺伝子発現抑制の効果を測定します。より長時間インキュベートする場合は、適宜培地を交換します。

表 2. トランスフェクション時に播種する細胞数
（リバーストランスフェクション法）

プレートのウェル数	細胞数	培地量
384	1,500-2,500	50 μ L
96	5,000-10,000	125 μ L
48	10,000-20,000	250 μ L
24	30,000-50,000	500 μ L



哺乳動物細胞培養

よく使用されている液体培地 哺乳動物細胞用

DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地、Dulbecco's Modified Eagle's Medium）

高グルコース（4.5 g/L）、1x 溶液、フィルター滅菌済み

人気製品

カタログ番号	容量	炭酸水素 ナトリウム	L- グルタミン	フェノール レッド	ビルビン酸 ナトリウム	HEPES	製品情報
D5796-500ML	500 mL	●	●	●	—	—	基本的な成分がすべて含まれた DMEM 液体培地
D6429-500ML	500 mL	●	●	●	●	—	基本的な組成に栄養素としてビルビン酸が添加されています
D0819-500ML	500 mL	●	Ala-Glu	●	—	—	L- グルタミンより安定性の高い L- アラニル-L- グルタミンジ ペプチド (Ala-Glu) が使用されています
D6546-500ML	500 mL	●	—	●	●	—	使用時に L- グルタミンを 0.584 g/L 添加してください
D0422-100ML	100 mL	●	—	●	●	—	L- メチオニン、L- システイン、L- グルタミンを含まない組成
D6171-500ML	500 mL	●	—	●	—	●	HEPES 改変型。使用時に L- グルタミンを 0.584 g/L 添加して ください
D5671-500ML	500 mL	●	—	●	—	—	使用時に L- グルタミンを 0.584 g/L 添加してください
D1145-500ML	500 mL	●	—	—	—	—	使用時に L- グルタミンを 0.584 g/L 添加してください

低グルコース（1.0 g/L）、1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素 ナトリウム	L- グルタミン	フェノール レッド	ビルビン酸 ナトリウム	HEPES	製品情報
D6046-500ML	500 mL	●	●	●	●	—	基本的な成分がすべて含まれた低グルコースの組成
D5546-500ML	500 mL	●	—	●	●	—	使用時に L- グルタミンを 0.584 g/L 添加してください
D5921-500ML	500 mL	●	—	—	—	—	使用時に L- グルタミンを 0.584 g/L 添加してください
D9443-500ML	500 mL	●	●	—	—	—	アルギニン、ロイシン、リジンを含まない組成

MEM（イーグル最小必須培地、Minimum Essential Medium Eagle）

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素 ナトリウム	L- グルタミン	フェノール レッド	ビルビン酸 ナトリウム	非必須 アミノ酸	製品情報
M4655-500ML	500 mL	●	●	●	—	—	アール塩（Earle's salts）を含む基本的な組成
M2279-500ML	500mL	●	—	●	—	—	アール塩（Earle's salts）を含む基本的な組成。使用時に L- グルタミンを 0.292 g/L 添加してください
M5650-500ML	500 mL	●	—	●	—	●	アール塩（Earle's salts）を含む基本的な組成に非必須アミノ 酸を含有。使用時に L- グルタミンを 0.292 g/L 添加してくだ さい
M0446-500ML	500 mL	●	Ala-Glu	●	—	—	L- グルタミンより安定性の高い L- アラニル-L- グルタミンジ ペプチド (Ala-Glu) が使用されています
M4780-500ML	500 mL	●	●	●	—	—	ハンクス塩（Hank's salts）を含む組成。低濃度の炭酸水素 ナトリウム（0.35 g/L）
M5775-500ML	500 mL	●	—	●	—	—	ハンクス塩（Hank's salts）を含む組成。低濃度の炭酸水素 ナトリウム（0.35 g/L）。使用時に L- グルタミンを 0.292 g/L 添加してください
M2414-500ML	500 mL	●	—	●	—	—	アール塩（Earle's salts）を含む組成。低濃度の炭酸水素 ナトリウム（0.85 g/L）。L-Ala、L-Asn、L-Glu、Gly、L-Pro、 L-Ser、L-Gln が含まれていません。使用時に L- グルタミンを 0.292 g/L 添加してください

α-MEM（イーグル最小必須培地 α改変型、Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification）

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素 ナトリウム	L- グルタミン	フェノール レッド	ビルビン酸 ナトリウム	ヌクレオ シド	製品情報
M4526-500ML	500 mL	●	—	●	●	—	α改変型 MEM。使用時に L- グルタミンを 0.292 g/L 添加して ください
M8042-500ML	500 mL	●	—	●	●	●	α改変型 MEM にヌクレオシドを添加した組成。使用時に L- グルタミンを 0.292 g/L 添加してください

GMEM（グラスゴー最小必須培地、Glasgow Minimum Essential Medium）

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素 ナトリウム	L- グルタミン	フェノール レッド	ビルビン酸 ナトリウム	HEPES	製品情報
G5154-500ML	500 mL	●	—	●	—	—	L- グルタミンを 0.292 g/L、トリプトースリン酸ブロス溶液 (T8159) を 100 mL/L の割合で添加してください

よく使用されている液体培地 哺乳動物細胞用（続き）

RPMI-1640 (RPMI-1640 Medium)

1x 溶液、フィルター滅菌済み

人気製品

カタログ番号	容量	炭酸水素ナトリウム	L-グルタミン	フェノールレッド	ビルビン酸ナトリウム	HEPES	製品情報
R8758-500ML	500 mL	●	●	●	—	—	基本的な成分がすべて含まれた RPMI-1640 液体培地
R0883-500ML	500 mL	●	—	●	—	—	使用時に L-グルタミンを 0.3 g/L 添加してください
R7513-100ML	100 mL	●	—	●	—	—	メチオニン、システイン、L-グルタミンを含まない改変型
R7509-500ML	500 mL	●	—	—	—	—	使用時に L-グルタミンを 0.3 g/L 添加してください
R5886-500ML	500 mL	●	—	●	—	●	HEPES 改変型。使用時に L-グルタミンを 0.3 g/L 添加してください
R7388-500ML	500 mL	—	●	●	—	●	HEPES 改変型。使用時に炭酸水素ナトリウムを 2 g/L 添加してください
R7638-500ML	500 mL	●	—	●	—	●	Dutch 改変型。使用時に L-グルタミンを 0.3 g/L 添加してください

Ham's F-12 (栄養混合物 F-12 ハム、Nutrient Mixture F-12 Ham)

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素ナトリウム	L-グルタミン	フェノールレッド	ビルビン酸ナトリウム	HEPES	製品情報
N6658-500ML	500 mL	●	●	●	●	—	CHO 細胞の培養などに使用されます

D-MEM/Ham's F-12 (ダルベッコ改変イーグル培地 / 栄養混合物 F-12 ハム、Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham)

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素ナトリウム	L-グルタミン	フェノールレッド	ビルビン酸ナトリウム	HEPES	製品情報
D8437-500ML	500 mL	●	●	●	●	●	基本的な成分がすべて含まれた組成
D6421-500ML	500 mL	●	—	●	●	●	使用時に L-グルタミンを 0.365 g/L 添加してください
D8062-500ML	500 mL	●	●	●	●	—	HEPES を含まない組成
D6434-500ML	500 mL	●	—	—	●	●	使用時に L-グルタミンを 0.365 g/L 添加してください

IMDM (イスコフ改変ダルベッコ培地、Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	炭酸水素ナトリウム	L-グルタミン	フェノールレッド	ビルビン酸ナトリウム	HEPES	製品情報
I3390-500ML	500 mL	●	—	●	●	●	使用時に L-グルタミンを 0.584 g/L 添加してください

よく使用されている平衡塩溶液

D-PBS (ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	カルシウム	マグネシウム	製品情報
D8537-500ML	500 mL	—	—	細胞のリン酸や懸濁に用いられる一般的な組成
D8662-500ML	500 mL	●	●	
D4031-500ML	500 mL	●	●	ビルビン酸、ストレプトマイシン、カナマイシン、グルコース含有

10x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	カルシウム	マグネシウム	製品情報
D1408-500ML	500 mL	—	—	滅菌した水で 10 倍に希釈して使用
D1283-500ML	500 mL	●	●	滅菌した水で 10 倍に希釈して使用

HBSS (ハックス平衡塩類 溶液、Hanks' Balanced Salt solution)

1x 溶液、フィルター滅菌済み

カタログ番号	容量	カルシウム	マグネシウム	フェノールレッド	製品情報
H6648-500ML	500 mL	—	—	—	
H9269-500ML	500 mL	●	●	●	
H8264-500ML	500 mL	●	●	—	



細胞剥離剤

製品名		製品情報	カタログ番号
トリプシン -EDTA 溶液	0.25%	フィルター滅菌済み HBSS 溶液（フェノールレッド含有） 組成 2.5 g/L ブタトリプシン、0.2 g/L EDTA 4Na	T4049
	10x 溶液	フィルター滅菌済み 0.9% 塩化ナトリウム溶液 組成 5.0 g/L ブタトリプシン、2 g/L EDTA 4Na	T4174

抗生物質

遺伝子導入のセクション用の抗生物質は次ページをご参照ください。

名称 / 作用機序	有効菌種 (抗菌活性)	製品名	製品情報	推奨使用濃度	カタログ番号
アンホテリシン B 細胞膜透過性の阻害	酵母、カビ	Amphotericin B	純度約 80%。粉末	2.5 mg/L	A2411
		Amphotericin B solution	250 µg/mL 水溶液。フィルター滅菌済み	10 mL/L	A2942
カナマイシン 細菌の 70S サブユニットと強く結合して、タンパク質合成を阻害	グラム陽性・陰性菌	Kanamycin sulfate	粉末	100 mg/L	K1377
		Kanamycin solution	50 mg/mL 溶液 (0.9% 塩化ナトリウム溶液)。フィルター滅菌済み	2 mL/L	K0254
ゲンタマイシン リボゾームの 30S サブユニットに結合して細菌のタンパク質合成を阻害	グラム陽性・陰性菌	Gentamicin sulfate salt	粉末	50 mg/L	G1264
		Gentamicin solution	10 mg/mL 水溶液。フィルター滅菌済み	5 mL/L	G1272
ペニシリン 細菌の細胞壁合成を阻害	グラム陽性菌	Penicillin G potassium salt	粉末	100,000 U/L	P7794
		Penicillin G sodium salt	粉末	100,000 U/L	P3032
ストレプトマイシン 30S リボゾームサブユニットの S12 タンパク質に結合しタンパク質合成を阻害	グラム陽性・陰性菌	Streptomycin sulfate salt	粉末	100 mg/L	S9137
		Streptomycin sulfate salt	粉末。マウス胚テスト済み	50 mg/L (胚培養の場合)	S1277
抗生物質 - 抗真菌剤 各構成物質の作用を参照	グラム陽性・陰性菌、酵母、カビ	Antibiotic Antimycotic Solution (100 ×)	100x 濃度溶液。フィルター滅菌済み。 組成：ペニシリン 10,000 units/mL、ストレプトマイシン 10 mg/mL、アンホテリシン B 25 µg/mL	10 mL/L	A5955
ペニシリン - ストレプトマイシン溶液 各構成物質の作用を参照	グラム陽性・陰性菌	Penicillin-Streptomycin, Solution stabilized	安定性の高い溶液。フィルター滅菌済み。組成：ペニシリン 5,000 units/mL、ストレプトマイシン 5 mg/mL	20 mL/L	P4458
		Penicillin-Streptomycin Solution	0.9% 塩化ナトリウム溶液。フィルター滅菌済み。組成：ペニシリン 10,000 units/mL、ストレプトマイシン 10 mg/mL	10 mL/L	P0781
		Penicillin-Streptomycin Solution Hybri-Max™	0.9% 塩化ナトリウム溶液。フィルター滅菌済み。ハイブリドーマ試験済み。組成：ペニシリン 10,000 units/mL、ストレプトマイシン 10 mg/mL	10 mL/L	P7539
		Penicillin-Streptomycin, Solution stabilized	安定性の高い溶液（クエン酸バッファー）。フィルター滅菌済み。組成：ペニシリン 10,000 units/mL、ストレプトマイシン 10 mg/mL	10 mL/L	P4333
L- グルタミン - ペニシリン - ストレプトマイシン溶液 各構成物質の作用を参照	グラム陽性・陰性菌	L-Glutamine-penicillin-streptomycin solution	0.9% 塩化ナトリウム溶液。フィルター滅菌済み。組成：L- グルタミン 200 mM、ペニシリン 10,000 units/mL、ストレプトマイシン 10 mg/mL	10 mL/L	G1146
		L-Glutamine-penicillin-streptomycin solution, stabilized	安定性の高い溶液。フィルター滅菌済み。組成：L- グルタミン 200 mM、ペニシリン 10,000 units/mL、ストレプトマイシン 10 mg/mL	10 mL/L	G6784

抗生物質

遺伝子を導入した細胞・コロニーのセレクションによく使用される抗生物質

名称 / 用途	製品名	製品情報	カタログ番号
アンピシリン アンピシリン耐性遺伝子 (amp) のセレクションに使用されます	アンピシリンナトリウム塩	粉末。細胞培養テスト済み	A0166
	アンピシリン溶液	100 mg/mL 溶液。フィルター滅菌済み	A5354
カナマイシン カナマイシン耐性遺伝子 (kan) のセレクションに使用されます	カナマイシン硫酸塩	粉末。細胞培養テスト済み	K1377
カルベニシリン アンピシリン耐性遺伝子 (amp) のセレクションに使用されます。サテライトが生じにくいという特長があります	カルベニシリン二ナトリウム塩	粉末。細胞培養テスト済み	C3416
	カルベニシリン溶液	100 mg/mL 溶液。フィルター滅菌済み	C1613
クロラムフェニコール	クロラムフェニコール	粉末。細胞培養テスト済み	C1919
テトラサイクリン Tet-On/Off 発現誘導ベクターの発現誘導剤として使用されます	テトラサイクリン塩酸塩	粉末。細胞培養テスト済み	T7660
ドキシサイクリン Tet-On/Off 発現誘導ベクターの発現誘導剤として使用されます	ドキシサイクリン ハイクレート	粉末	D9891
ハイグロマイシン	ハイグロマイシン B	粉末。細胞培養テスト済み	H3274
	ハイグロマイシン B	粉末	H7772
	ハイグロマイシン B 溶液	フィルター滅菌済み 水溶液 (45-60 mg/mL)	H0654
	ハイグロマイシン B 溶液	フィルター滅菌済み PBS 溶液 (50 mg/mL)	10 843 555 001 (20 mL)
ピューロマイシン ピューロマイシン耐性遺伝子 (pac) を導入した細胞のセレクションに使用されます	ピューロマイシン二塩酸塩	粉末。細胞培養テスト済み	P8833
	ピューロマイシン溶液	フィルター滅菌済み 水溶液 (10 mg/mL) 細胞培養テスト済み	P9620
G418 (Geneticin®) ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を導入した細胞のセレクションに使用されます	G418 二硫酸塩	粉末。細胞培養テスト済み	A1720
	G418 二硫酸塩	粉末	G5013
	G418 溶液	フィルター滅菌済み 水溶液 (50 mg/mL) 細胞培養テスト済み	G8168
			04 727 878 001 (20 mL)
	G418 溶液	フィルター滅菌済み 水溶液 (50 mg/mL)	04 727 894 001 (100 mL)

タンパク質抽出

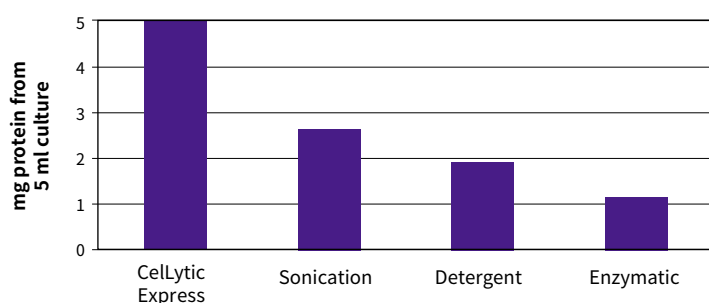
タンパク質抽出用試薬 微生物用（大腸菌など）

- グラム陽性菌、グラム陰性菌を溶解
- 抽出液はアフィニティ精製、免疫沈降、ウエスタンブロットなどに使用可能
- 非変性条件での細胞溶解によりタンパク質活性を保持

名称	製品名	製品情報	カタログ番号
微生物用タンパク質抽出試薬 CellLytic™ B 両性イオン界面活性剤を配合	CellLytic B Cell Lysis Reagent	標準的なタンパク質抽出用試薬。 使用目安は大腸菌 1.5 mL 培養液あたり 0.4 mL	B7435
	CellLytic B Cell Lysis Reagent, 2 × concentrate	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したい場合に適しています	B7310
	CellLytic B Cell Lysis Reagent, 10 × concentrate	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できます	C8740
	CellLytic B Plus Kit	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です。 ペレット湿重量 1 g あたり溶解試薬 10 mL	CB0050 (50 mL 入り) CB0500 (500 mL 入り)

名称	製品名	製品情報	カタログ番号
微生物用タンパク質抽出試薬 CellLytic Express 大腸菌培養液に直接添加するだけの簡単抽出試薬	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するとタンパク質が抽出されます C1990-25ML は 25 mL の大腸菌培養液用の粉末、C1990-10X25ML は 10 袋入り、C1990-6X500ML は 500 mL の大腸菌培養液用の粉末が 6 袋入り	C1990
	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するとタンパク質が抽出されます C5491-25EA は 25 錠、C5491-100EA は 100 錠入り	C5491

迅速



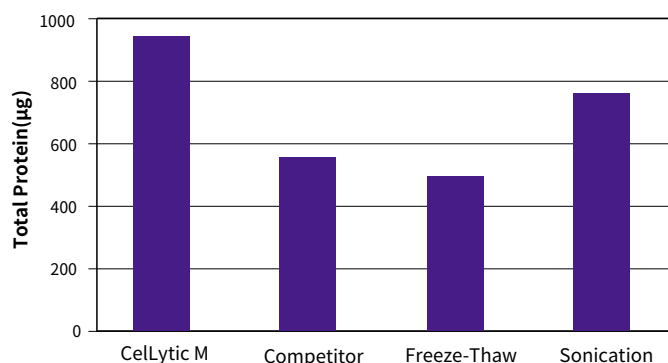
CellLytic Express によるタンパク質抽出

5 mL の微生物培養液から各種の方法で抽出したタンパク質をブラッドフォード法によって測定。

名称	製品名	製品情報	カタログ番号
封入体溶解試薬 CellLytic IB 封入体からタンパク質を抽出する試薬	CellLytic IB Inclusion Body Solubilization Reagent	CellLytic B などで細菌を溶解したときに形成される封入体（タンパク質凝集体）を可溶化するための溶液です 封入体 1 g あたり試薬 8 mL 使用	C5236

タンパク質抽出用試薬 哺乳動物細胞・組織用

- CellLytic™ M, MT はヒトやマウスなどの細胞および組織に最適な界面活性剤を混合
- 免疫沈降、タンパク質精製、ウェスタンブロットティングなどに利用可能



CellLytic M によるタンパク質抽出

2x10⁷ COS 細胞からの各種の方法による溶解液を BCA 法でタンパク質量を測定。



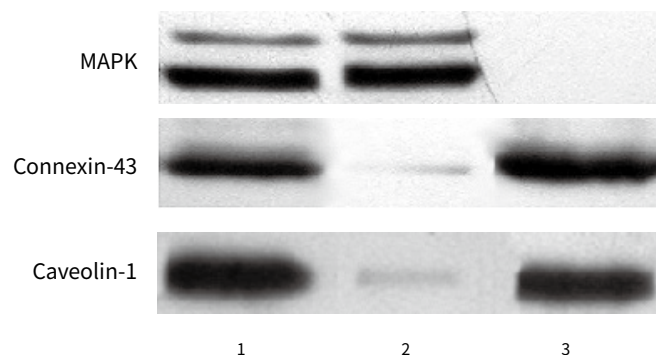
CellLytic MT で抽出したタンパク質のゲルシフトアッセイ

³²P でラベルした 2 本鎖の Oct-1 結合モチーフオリゴヌクレオチドを CellLyticMT を用いた抽出液（総タンパク質量 4 μg）とインキュベーション。矢印は Oct-1-DNA 複合体および結合しなかったフリーのプロープ。

名称	製品名	製品情報	カタログ番号
哺乳動物細胞用タンパク質抽出試薬 CellLytic M マイルドな界面活性剤を含むタンパク質抽出用の溶液	CellLytic M 	浮遊細胞および付着細胞を溶解しタンパク質を抽出することができます 付着細胞の場合、100 mm プレートに 0.5 ~ 1 mL を添加します	C2978
哺乳動物組織用タンパク質抽出試薬 CellLytic MT 透析除去可能な界面活性剤を含むタンパク質抽出用の溶液	CellLytic MT	界面活性剤、ピシン、150 mM NaCl を含むタンパク質抽出用の溶液です 哺乳動物組織または細胞を溶解しタンパク質を抽出することができます 組織 1 g あたり 20 mL 使用。ラット脳・腎・筋・心臓・肝・脾臓、マウス脳・腎・筋などに使用可能	C3228
RIPA バッファー 一般的な細胞溶解用の溶液	RIPA Buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% IGEPAL® CA-630、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS 含有 免疫沈降やウェスタンブロット用のタンパク質溶解に適しています 付着細胞の場合、100 mm プレートに約 1 mL 添加します	R0278
哺乳動物細胞溶解キット	Mammalian Cell Lysis Kit	試薬のセットなので、カスタマイズした細胞溶解試薬を調製できます コンポーネント：5 × バッファー (Tris-EDTA)、5 × NaCl、5 × SDS、5 × デオキシコール酸、5 × IGEPAL CA-630、プロテアーゼインヒビターカクテル 1 キットで約 250 回分 (100 mm プレートの細胞)	MCL1

膜タンパク質抽出

名称	製品名	製品情報	カタログ番号
膜タンパク質抽出キット	CellLytic™ MEM Protein Extraction Kit	哺乳動物細胞から膜タンパク質（疎水性のラフト結合タンパク質）を抽出するためのキットです 細胞膜を単離することなく膜タンパク質溶液を分離します HeLa、HEK-293、NIH 3T3、COS、CHO などの細胞に使用可能 1 キットで $10^6 \sim 10^7$ cell の抽出約 80 回分	CE0050

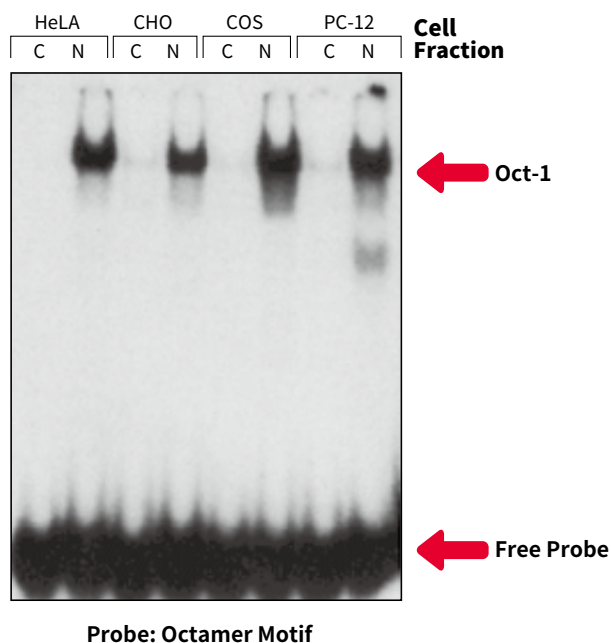


膜タンパク質抽出キットで抽出したタンパク質のウェスタブロット

CellLytic MEM Extraction Kit を用いた HeLa 細胞抽出物の分離により、膜疎水性タンパク質は親水性タンパク質から分離された。レーン 1 総細胞抽出物。レーン 2 親水性層。レーン 3 疎水性層。マーカータンパク質として MAP キナーゼ (MAPK) は細胞質タンパク質、Connexin-43 は膜タンパク質、Caveolin-1 はラフト結合タンパク質。総細胞抽出物に 3 種類のマーカーが見られ、MAPK は親水性層、Connexin-43 および Caveolin-1 は疎水性層に抽出される。

核タンパク質抽出

名称	製品名	製品情報	カタログ番号
核タンパク質抽出キット	CellLytic NuCLEAR™ Extraction Kit	哺乳動物の組織または培養細胞から核タンパク質を抽出するためのキットです HeLa、CHO、COS、PC-12、Jurkat、BAEC などの細胞に使用可能 1 キットで $10^6 \sim 10^7$ cell の抽出約 100 回分	NXTRACT



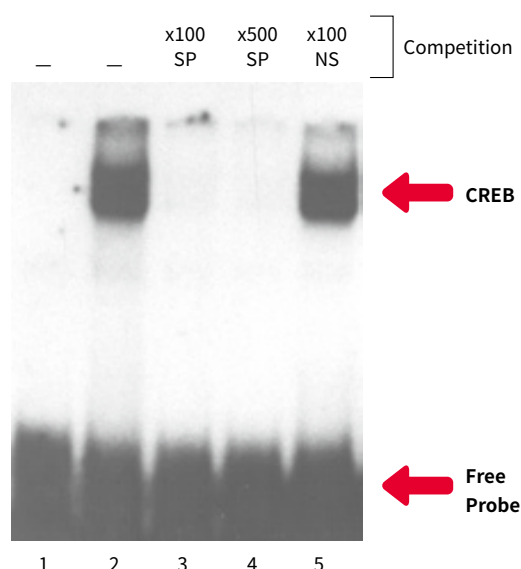
核タンパク質抽出キットで抽出したタンパク質のゲルシフトアッセイ

^{32}P でラベルした 2 本鎖の Oct-1 結合モチーフオリゴヌクレオチドを CellLytic Nu-Clear Extraction Kit を用いて HeLa、CHO、COS、PC-12 細胞から調製した細胞質抽出液 (C) または核抽出液 (N) とインキュベーション。

タンパク質抽出用試薬 植物用

- タバコ、トマト、ホウレンソウ、シロイヌナズナなど植物の葉からタンパク質抽出可能
- 核タンパク質抽出用キットも利用可能

製品名	製品情報	カタログ番号
CellLytic™ P 細胞溶解試薬 植物用	非イオン性界面活性剤をベースとした植物細胞のタンパク質抽出用の溶液です。1 mL あたり植物の葉 0.5 ~ 1 g。タバコ、トマト、ホウレンソウ、シロイヌナズナなどの凍結または生の葉に使用可能	C2360
CellLytic PN 植物核タンパク質抽出キット	植物の葉から核を精製し核タンパク質を迅速に抽出するキットです。核タンパク質抽出液はゲルシフトアッセイによるタンパク質-DNA 相互作用の検出、DNase I フットプリントアッセイ、ウェスタンブロットなどに適しています	CELLYTPN1



ホウレンソウ葉から CellLytic P を用いて抽出したタンパク質によるゲルシフトアッセイ
二本鎖の ^{32}P 標識 CREB オリゴヌクレオチドプローブを 28 μg の全細胞抽出物でインキュベート (レーン 2-5)、または全細胞抽出物を含まずインキュベート (レーン 1)。競合オリゴヌクレオチドなし [-] (レーン 1、2)、x100 または x500 余剰の CREB 結合モチーフ未標識オリゴヌクレオチド (特異的競合 [SP] レーン 3、4)、x100 余剰の未標識オリゴヌクレオチド (非特異的競合 [NS] レーン 5)。結合反応は非変性 6% ポリアクリルアミドゲルで泳動、乾燥後、X 線フィルムで感光。CREB-DNA 複合体およびフリープローブを矢印で表示。

タンパク質抽出用試薬 酵母用

- リン酸を含まない酵母細胞溶解試薬
- 特別な装置やガラスビーズ不要

製品名	製品情報	カタログ番号
CellLytic Y 細胞溶解試薬 酵母用	マイルドな界面活性剤を含むタンパク質抽出用の溶液です 酵母細胞 1 g あたり 2.5 ~ 5 mL	C4482
CellLytic Y PLUS キット	試薬のセットなので、カスタマイズした細胞溶解試薬を調製できます コンポーネント：反応バッファー、DTT、Lyticase、抽出バッファー、Triton X-100、プロテアーゼインヒビターカクテル 1 キットで酵母細胞 10 ~ 40 g 分	CYP1

プロテアーゼインヒビターカクテル

プロテアーゼインヒビター（タンパク質分解阻害剤）はタンパク質抽出や分析時の意図しないタンパク質分解を防ぐ目的や、特定のタンパク質分解による制御の研究の際に用いられます。

プロテアーゼについて考えるとき、一般的にタンパク質分解酵素は主に4種類に分類されます。セリンプロテアーゼはおそらくもっとも特性が知られ、トリプシンやキモトリプシン、エラスターゼが含まれます。システインプロテアーゼはパパインやカテプシン、リソソームカテプシンが含まれ、アスパラギン酸プロテアーゼ（酸性プロテアーゼ）はペプシンやレニンが含まれ、メタロプロテアーゼ（金属プロテアーゼ）はサーモリシンやカルボキシペプチダーゼAが含まれます。

タンパク質の抽出や精製、分析の際に目的のタンパク質がこれらのプロテアーゼによって分解されるのを防ぐため、プロテアーゼインヒビターの混合物やカクテルが開発されました。



哺乳動物細胞・組織、一般的な生物種にオススメのプロテアーゼインヒビターカクテル

製品	使用方法	特長
Roche® cOmplete™ (錠剤)	1錠をタンパク質抽出液 50 mL に直接添加 25x ストック溶液作成 (1錠を 2 mL に溶解※) → ライセートに 1/25 量添加	- 抽出液に直接添加するだけのため大量のサンプル処理に最適 - ストック溶液も作成可能 - 哺乳動物細胞、大腸菌、酵母の抽出に使用可能
Roche cOmplete, Mini (錠剤)	1錠をタンパク質抽出液 10 mL に直接添加 7x ストック溶液作成 (1錠を 1.5 mL に溶解※) → ライセートに 1/7 量添加	小サイズの錠剤
一般用 #P2714 (粉末)	バッファーまたは水で 10 mL に溶解 → タンパク質抽出液で 100 mL に希釈	幅広い生物種に利用可能な組成 (組成はウェブで公開)
哺乳動物用 #P8340 (溶液)	ライセートに 1/100 量添加	- DMSO 溶液のため少量ずつの使用に便利 - 哺乳動物サンプルに最適化された組成 (組成はウェブで公開)

※ 水または 100 mM リン酸バッファー pH7.0 で溶解
ストック溶液は、冷蔵で 1-2 週間、-20°C で 12 週間保存可能

さらに広範囲のプロテアーゼ阻害に cOmplete ULTRA

製品	使用方法	特長
Roche cOmplete ULTRA (錠剤)	1錠をタンパク質抽出液 50 mL に直接添加 (Mini の場合は 10 mL) 2x ストック溶液作成 (1錠を 25 mL に溶解※) → ライセートに 1/2 量添加	- 従来の cOmplete にアスパラギン酸（酸性）プロテアーゼ阻害剤を追加 - 酸性条件のタンパク質操作に適

※ 水または 100 mM リン酸バッファー pH 7.0 で溶解。Mini の場合は 5 mL に溶解 (2x ストック溶液)
ストック溶液は、冷蔵で 4 週間、-20°C で 4 週間保存可能

主な哺乳動物用、一般用プロテアーゼインヒビターカクテルの阻害特性比較

	セリンプロテアーゼ	システインプロテアーゼ	金属プロテアーゼ	アスパラギン酸（酸性） プロテアーゼ
cOmplete®（Mini も同様）	阻害	阻害	阻害	
cOmplete ULTRA（Mini も同様）	阻害	阻害	阻害	阻害
一般用 #P2714	阻害	阻害	阻害	
哺乳動物用 #P8340	阻害	阻害	阻害※	阻害

※ ベスタチンによるアミノペプチダーゼ特異的な阻害

哺乳動物用、一般用プロテアーゼインヒビターカクテル製品一覧

製品	製品情報	カタログ番号	容量	セリン プロテアーゼ	システイン プロテアーゼ	金属 プロテアーゼ	アスパラギン酸 プロテアーゼ
cOmplete	錠剤。抽出液 50 mL に 1 錠添加 またはストック溶液を調製して 添加	11 697 498 001	20 錠	阻害	阻害	阻害	
		11 836 145 001	3 × 20 錠				
		04 693 116 001	20 錠 (個包装 EASYpack)				
cOmplete, Mini	錠剤。抽出液 10 mL に 1 錠添加 またはストック溶液を調製して 添加	11 836 153 001	25 錠	阻害	阻害	阻害	
		04 693 124 001	30 錠 (個包装 EASYpack)				
cOmplete, ULTRA	錠剤。抽出液 50 mL に 1 錠添加 またはストック溶液を調製して 添加	05 892 988 001	2 × 10 錠	阻害	阻害	阻害	阻害
		06 538 304 001	6 × 10 錠				
cOmplete, ULTRA, Mini	錠剤。抽出液 10 mL に 1 錠添加 またはストック溶液を調製して 添加	05 892 970 001	30 錠 (個包装 EASYpack)	阻害	阻害	阻害	阻害
一般用	粉末。1 本で 100 mL の 1x インヒビ ター溶液を調製	P2714-1BTL	100 mL 分	阻害	阻害	阻害	
	動物由来成分フリー。粉末。1 本で 100 mL の 1x インヒビター溶液を 調製	I3911-1BO	100 mL 分				
	錠剤。抽出液 100 mL に 1 錠添加	S8820-2TAB	2 錠				
		S8820-20TAB	20 錠				
哺乳動物用	溶液。抽出液 100 mL に 1 mL 添加。 EDTA フリー	P8340-1ML	1 mL	阻害	阻害	阻害※	阻害
		P8340-5ML	5 mL				
	動物成分由来フリー。溶液。抽出液 10 ~ 100 mL に対して 1 mL 添加。 EDTA フリー	I3786-1ML	1 mL				
		I3786-5ML	5 mL				
培地添加用	溶液。培地 200 ~ 800 mL に 1 mL 添加。培地中で 48 時間効果持続。 EDTA フリー	P1860-1ML	1 mL	阻害	阻害	阻害※	阻害

※ ベスタチンによるアミノペプチダーゼ特異的な阻害

培地添加用のプロテアーゼインヒビターカクテル (P1860-1ML) は細胞外に分泌させたタンパク質の分解を防ぐために有用です。添加から 48 時間後においても、A431、CHO、COS、HepG2、HeLa などの接着細胞株や、Jurkat、HL-60 などの浮遊細胞株への毒性は見られません。

個別包装の EASYpack

ロシュ社のプロテアーゼインヒビターカクテル錠は開封しやすいブリストアパック (EASYpack) の製品も選べいただけます。



EDTA フリープロテアーゼインヒビターカクテル

His タグ（ポリヒスチジンタグ）を融合させたタンパク質を発現させた大腸菌などからタンパク質を抽出する際、EDTA が含まれていると精製ステップで使用するニッケルなどの金属レジンに金属がキレートされ、His タグ融合タンパク質の精製に影響を与えることがあります。

そのためタンパク質抽出液に EDTA フリーのプロテアーゼインヒビターカクテルが用いられます。

製品	使用方法	特長
Roche® cOmplete®, EDTA-free (錠剤)	1 錠をタンパク質抽出液 50 mL に直接添加 25x ストック溶液作成 (1 錠を 2 mL に溶解※ ¹)  ライセートに 1/25 量添加	- 抽出液に直接添加するだけのため大量のサンプル処理に最適 - ストック溶液も作成可能 - 哺乳動物細胞、大腸菌、酵母の抽出に使用可能
Roche cOmplete, EDTA-free, Mini (錠剤)	1 錠をタンパク質抽出液 10 mL に直接添加 7x ストック溶液作成 (1 錠を 1.5 mL に溶解※ ¹)  ライセートに 1/7 量添加	小サイズの錠剤
Roche cOmplete ULTRA, EDTAfree (錠剤)	1 錠をタンパク質抽出液 50mL に直接添加 (Mini の場合は 10mL) 2x ストック溶液作成 (1 錠を 25 mL に溶解※ ²)  ライセートに 1/2 量添加	阻害されるプロテアーゼの種類を増加
His タグ用 (EDTA-free) #P8849 (溶液)	ライセートに 1/100 量添加	- DMSO 溶液のため少量ずつの使用に便利 - 大腸菌、ヨトウガ細胞に使用可能

※ 1 水または 100 mM リン酸バッファー pH 7.0 で溶解

ストック溶液は、冷蔵で 1-2 週間、-20°C で 12 週間保存可能

※ 2 水または 100 mM リン酸バッファー pH 7.0 で溶解。Mini の場合は 5 mL に溶解（2x ストック溶液）

ストック溶液は、冷蔵で 1 日、-20°C で 4 週間保存可能

EDTA フリー プロテアーゼインヒビターカクテルの阻害特性比較

	セリン プロテアーゼ	システイン プロテアーゼ	金属 プロテアーゼ	アスパラギン酸（酸性） プロテアーゼ
cOmplete EDTA free (Mini も同様)	阻害	阻害		阻害
cOmplete ULTRA EDTA free (Mini も同様)	阻害	阻害		阻害
His タグ用 #P8849	阻害	阻害	阻害※	阻害

※ EDTA 不含。ホスホラミドンによりサーモリシン、コラゲナーゼを阻害

EDTA
フリー

EDTA フリー プロテアーゼインヒビターカクテル一覧

製品	製品情報	カタログ番号	容量	セリン プロテアーゼ	システイン プロテアーゼ	金属 プロテアーゼ	アスパラギン酸 プロテアーゼ
cOmplete™, EDTA フリー	錠剤。抽出液 50 mL に 1 錠 添加またはストック溶液を 調製して添加	11 873 580 001	20 錠	阻害	阻害		
		05 056 489 001	3 × 20 錠				
		04 693 132 001	20 錠 (個包装 EASYpack)				
cOmplete, EDTA フリー, Mini	錠剤。抽出液 10 mL に 1 錠 添加またはストック溶液を 調製して添加	11 836 170 001	25 錠	阻害	阻害		
		04 693 159 001	30 錠 (個包装 EASYpack)				
cOmplete, ULTRA, EDTA フリー	錠剤。抽出液 50 mL に 1 錠 添加またはストック溶液を 調製して添加	05 892 953 001	2 × 10 錠	阻害	阻害		阻害
		06 538 282 001	6 × 10 錠				
cOmplete, ULTRA, EDTA フリー, Mini	錠剤。抽出液 10 mL に 1 錠 添加またはストック溶液を 調製して添加	05 892 791 001	30 錠 (個包装 EASYpack)	阻害	阻害		阻害
His タグ用 (EDTA フリー)	溶液。抽出液 100 mL に 1 mL 添加	P8849-1ML	1 mL	阻害	阻害	阻害※	阻害
		P8849-5ML	5 mL				
	錠剤。抽出液 100 mL に 1 錠添加	S8830-2TAB	2 錠				
		S8830-20TAB	20 錠				

※ EDTA 不含。ホスホラミドンによりサーモリシン、コラゲナーゼを阻害

その他の生物種用プロテアーゼインヒビターカクテル

生物種に応じて最適な組成のプロテアーゼインヒビターを配合したカクテルをご用意しています。

製品	製品情報	カタログ番号	容量	セリン プロテアーゼ	システイン プロテアーゼ	金属 プロテアーゼ	アスパラギン酸 プロテアーゼ
バクテリア用	DMSO で溶解後、水で希釈 して調製。抽出液 20 mL に 対して 1 mL 添加	P8465-5ML	5 mL	阻害	阻害	阻害	阻害
		P8465-25ML	25 mL				
真菌・酵母用	溶液。抽出液 100 mL に 1 mL 添加	P8215-1ML	1 mL	阻害	阻害	阻害	阻害
		P8215-5ML	5 mL				
植物用	溶液。抽出液 100 mL に 1 mL 添加	P9599-1ML	1 mL	阻害	阻害	阻害	阻害



ホスファターゼインヒターカクテル

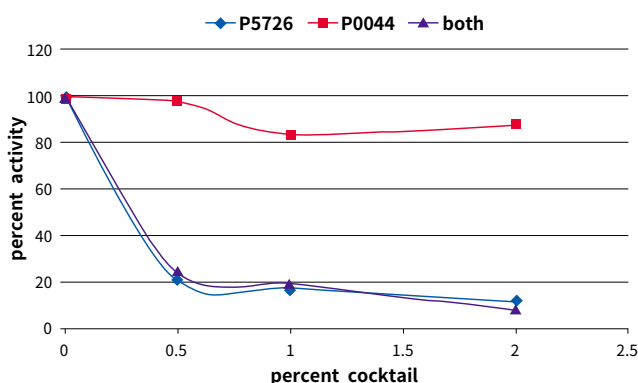
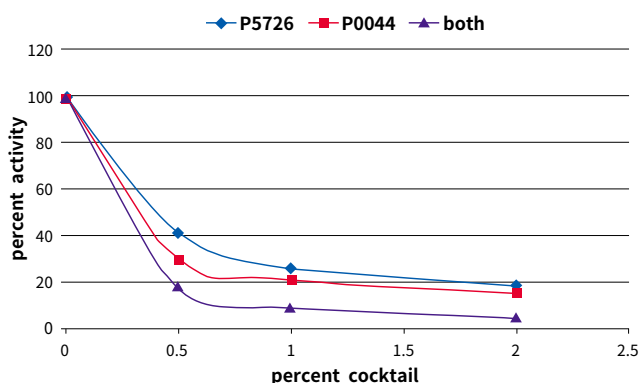
タンパク質の精製プロセスで脱リン酸化を防ぐためホスファターゼインヒターが用いられます。幅広いホスファターゼに対応するホスファターゼインヒターカクテルをご用意しています。

製品	形状	チロシン ホスファターゼ (PTP)	セリン/スレオニン ホスファターゼ (PP1、PP2A)	酸性 ホスファターゼ	アルカリ ホスファターゼ	成分
Roche® PhosSTOP®	錠剤	阻害	阻害	阻害	阻害	非公開
ホスファターゼ インヒターカクテル 2 #P5726	水溶液	阻害		阻害	阻害	オルトバナジン酸ナトリウム、 モリブデン酸ナトリウム、酒石 酸ナトリウム、イミダゾール
ホスファターゼ インヒターカクテル 3 #P0044	DMSO 溶液		阻害		阻害 (L アイソ フォーム)	カンタリジン、p-プロモレバ ミゾール、カリクリン A

脱リン酸化をストップ

製品	製品情報	カタログ番号	容量
Roche PhosSTOP	タンパク質抽出液 10 mL に 1 錠添加	04 906 845 001	10 錠 (個包装)
	セリン / スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼを阻害	04 906 837 001	20 錠 (個包装)
ホスファターゼ インヒターカクテル 2	タンパク質抽出液 100 mL に 1 mL 添加 酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、チロシンホスファターゼを阻害	P5726-1mL	1 mL
		P5726-5mL	5 mL
ホスファターゼ インヒターカクテル 3	タンパク質抽出液 100 mL に 1 mL 添加 セリン / スレオニンホスファターゼ、アルカリホスファターゼ (L アイソザイム) を阻害	P0044-1mL	1 mL
		P0044-5mL	5 mL

弊社のホスファターゼインヒターカクテルは 2 と 3 を併用することで、さらに幅広く脱リン酸化を抑えることができます。



ウシ肝臓抽出物中のアルカリフォスファターゼ (AP) 様活性の阻害

アルカリホスファターゼはアイソザイムの種類によって阻害剤は異なります。カクテル 3 (カタログ番号 P0044) はアルカリホスファターゼ L アイソザイムに高い阻害活性を持ち、またカクテル 2 (カタログ番号 P5726) と共に使用することでシナジー効果が見られました (左図)。カクテル 3 (カタログ番号 P0044) はヒト胎盤に豊富に含まれるアルカリホスファターゼ P アイソザイムに対する阻害効果は低いことから (右図)、両者を使用したときの P アイソザイム阻害効果はカクテル 2 (カタログ番号 P5726) により得られています。

His タグ（ポリヒスチジンタグ）

6xHis タグなどのポリヒスチジンタグを融合させたタンパク質の精製にはニッケルを結合したレジン（ニッケルレジン、ニッケルアフィニティゲル）などの金属レジンが用いられます。

ポリヒスチジンタグ融合タンパク質の精製は比較的低コストで行えるため広く行われていますが、一般的なニッケルレジン EDTA の存在下では使用できず、再使用時にニッケルの再チャージが必要というデメリットがあります。

ロシュ社の cOmplete® His-Tag Purification Resin および Column は、独自に開発したニッケルの強力な固定化によってニッケルイオンが担体から外れにくい、再チャージの必要がなく繰り返し使用でき、EDTA や DTT の存在下でも用いることが可能です。

His タグ精製用レジン cOmplete His-Tag Purification Resin

● 再チャージ不要

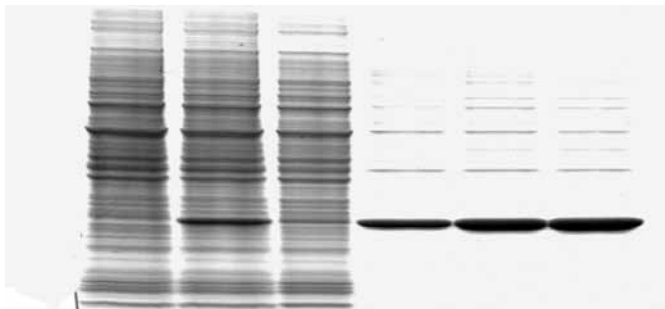
ニッケルを再チャージすることなく再利用することができます。

● EDTA、DTT 使用可能

精製するタンパク質溶液中に EDTA や DTT が含まれていてもタンパク質結合能が保たれます。

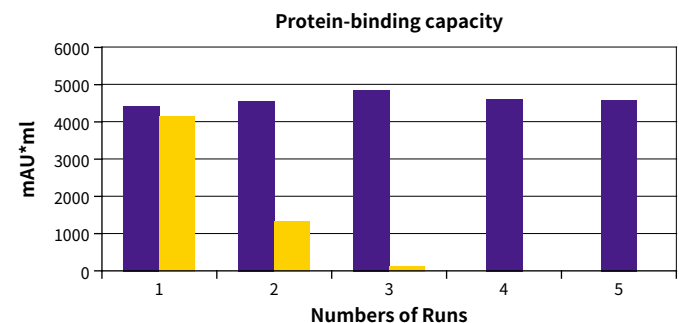
製品	カタログ番号	容量
cOmplete His-Tag 精製用レジン	05 893 682 001	25 mL
cOmplete His-Tag 精製用カラム	05 893 801 001	200 mL
cOmplete His-Tag 精製用カラム	06 781 543 001	5 x 1 mL
cOmplete His-Tag 精製用カラム	06 781 535 001	1 x 5 mL

レジンをカラムにプレパックした cOmplete His-Tag Purification Column は GE 社製の AKTA クロマトグラフィースystem にそのまま使用できます。



cOmplete His-Tag Purification Resin による His-tag 修飾 GFP の精製
全量 100 mL の発現セルライン FreeStyle 293-F に pCMV6-ACGFP 発現プラスミドを X-tremeGENE HP Reagent を用いてトランスフェクションした。細胞溶解中は、cOmplete EDTA-free により、タンパク質のプロテアーゼによる分解を防止した。上図は、cOmplete His-Tag Purification Resin による His-tag 修飾 GFP の精製結果を示す。

L:細胞溶解液、FT:フロースルー、E3:150 mM イミダゾール溶出フラクション、E4、E5:200 mM イミダゾール溶出フラクション。染色はクマシーブルーにて行った（ロシュ社データ転載）。



His6 CFP のタンパク質結合性能

紫グラフ：cOmplete Resin を 10 mM DTT、EDTA 存在下でニッケルイオン再チャージなしで使用。

黄グラフ：他社製 Resin G を 1 mM EDTA と 5 mM DTT 存在下で説明書に指示されている方法にて使用。なお他社製品 Q についてはタンパク質が結合しなかった（データ非掲載）。

結果：cOmplete Resin におけるタンパク質結合能は、ニッケルイオンの再チャージなしで、高濃度の DTT、EDTA 存在下であっても保ち続けられた（ロシュ社データ転載）。

ポリヒスチジンタグ（His タグ）融合タンパク質検出

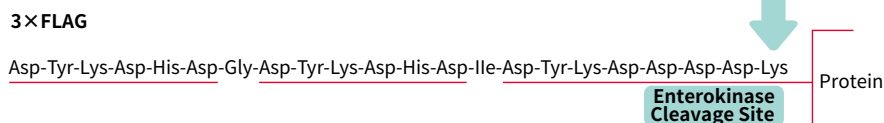
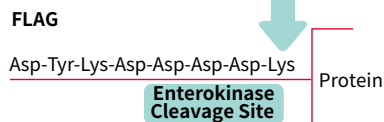
製品名	抗原	免疫動物	抗体の精製	カタログ番号	WB	免疫染色	免疫沈降	ELISA
モノクローナル抗ポリヒスチジン抗体	ポリヒスチジンタグ融合タンパク質	マウス	腹水	H1029	●	●		●
モノクローナル抗ポリヒスチジン抗体 - ペルオキシダーゼ (HRP) 標識	ポリヒスチジンタグ融合タンパク質	マウス	精製イムノグロブリン	A7058	●			●
モノクローナル抗ポリヒスチジン抗体 - アルカリフォスファターゼ標識	ポリヒスチジンタグ融合タンパク質	マウス	精製イムノグロブリン	A5588	●			●

イミダゾール

製品名	製品情報	カタログ番号
イミダゾール	粉末。ニッケルレジンで His タグ融合タンパク質を精製する際のバッファーに利用されます	I5513

FLAG タグ

FLAG 発現システムは組み換え融合タンパク質の発現、精製、検出用に確立されたシステムです。ウェスタンブロット、免疫組織化学、免疫沈降、フローサイトメトリー、タンパク質精製やタンパク質間相互作用、細胞の微細構造、タンパク質同定等、多くのアプリケーションで実績を残しています。このスモールサイズの親水性タグを使えば、特異性と感度にすぐれた弊社の ANTI-FLAG 抗体での組み換え融合タンパク質の検出、精製がさらに容易になります。



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。

FLAG タグ精製 製品リスト

FLAG タグ融合タンパク質のアフィニティー精製に弊社の FLAG M2 抗体アフィニティーゲル（レジン）がもっともよく利用されています。

アフィニティーゲルに結合させた FLAG タグ融合タンパク質は、FLAG ペプチドによる競合的作用やグアニジン塩酸塩などで溶出することができます。FLAG ペプチドを使うと穏やかな条件下で溶出が可能になります。

製品名	製品情報	適用	カタログ番号
抗 FLAG M2 抗体アフィニティービーズ（アフィニティーレジン）	N 末端、C 末端の FLAG タグ（DYKDDDDK）を認識するマウスモノクローナル抗 FLAG M2 抗体を共有結合させたアガロースビーズ。FLAG タグ融合タンパク質は FLAG ペプチドまたは 3xFLAG ペプチドなどで溶出することができます	FLAG、3xFLAG 融合タンパク質の精製、免疫沈降	A2220 人気製品
抗 FLAG M2 抗体磁気ビーズ	担体の 4% アガロースビーズが磁気を帯びているため、磁石によって分離することができます	FLAG、3xFLAG 融合タンパク質の精製、免疫沈降	M8823
FLAG ペプチド	抗 FLAG M2 抗体アフィニティーレジンに結合させた FLAG タグ融合タンパク質の競合的溶出に用いられます。一般的な使用濃度 100 µg/mL。3xFLAG タグ融合タンパク質の溶出には不適です	FLAG 融合タンパク質の溶出	F3290
3xFLAG ペプチド	抗 FLAG M2 抗体アフィニティーレジンに結合させた 3xFLAG タグ融合タンパク質の競合的溶出に用いられます。一般的な使用濃度 100 µg/mL	3xFLAG 融合タンパク質の溶出	F4799

FLAG タグ検出 製品リスト

結合力が比較的高い抗 FLAG M2 抗体（カタログ番号 F3165）と M2 抗体をアフィニティー精製した比較的特異性が高い抗体（カタログ番号 F1804）をご用意しています。

製品名	抗原	免疫動物	抗体の精製	交差性	カタログ番号	WB	免疫染色	免疫沈降	ELISA
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	F3165 人気製品	◎	○	○	○
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体	DYKDDDDK	マウス	アフィニティー精製	N 末端、C 末端の FLAG タグおよび 3xFLAG タグ	F1804 人気製品	○	◎	○	
ポリクローナル抗 FLAG 抗体	DYKDDDDK	ウサギ	アフィニティー精製	N 末端、C 末端の FLAG タグおよび 3xFLAG タグ	F7425	○	○	○	
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体 - ペルオキシダーゼ (HRP) 標識	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	A8592	◎			◎
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体 - アルカリフォスファターゼ標識	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	A9469				◎
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体 - FITC 標識	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	F4049		○		
モノクローナル抗 FLAG M2 抗体 - ビオチン標識	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	F9291	○	○		

FLAG タグ融合タンパク質精製 哺乳動物細胞プロトコル例

培養

FLAG 融合タンパク質を発現している哺乳動物細胞を培養

抽出

付着細胞の場合

1. 培地を除去してから PBS バッファーで細胞を 1 回リンスし、PBS バッファーを捨てます。
2. CellLytic™ M (カタログ番号 C2978)*を添加します (100 mm プレートあたり CellLytic M を 0.5-1 mL)。
3. シェーカーで 15 分間振とう。
4. 細胞をスクレイパーなどを用いて回収します。

浮遊細胞の場合

1. 細胞をコニカル遠心チューブに入れて 5 分間 450 x g で遠心します。
2. 上清をデカントで捨て、PBS バッファーを入れて再懸濁し、5 分間 450 x g で遠心し、PBS をデカントで捨てます。
3. CellLytic M (カタログ番号 C2978)*を添加します (10^6 - 10^7 細胞あたり CellLytic M を 0.125 μ L)。
4. シェーカーで 15 分間振とう。

※必要な場合、プロテアーゼインヒビター・ホスファターゼインヒビターカクテルを CellLytic M に添加しておきます

5. CellLytic M を添加した細胞を 10 分間 12,000-20,000 x g で遠心し、細胞片を沈殿させます。
6. 上清 (ライセート) を新しい冷えたチューブに回収し、すぐに使用するか冷凍保管します。

結合 ここではチューブ内でインキュベートするバッチ法をご紹介します。少量のライセートで行う場合はカラム方式もよく行われます。

以下はライセートが 0.2-1 mL のときの使用例です。ライセートの量により適宜変更してください。

1. 抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲル (レジン) (カタログ番号 A2220) を穏やかにビペッティングして懸濁させた液を 40 μ L 取り、新しいマイクロ遠心チューブに移します (懸濁した溶液にはレジンは約 20 μ L 含まれています。レジン 10 μ L あたり FLAG 融合タンパク質は約 1 μ g 以上結合します)。
2. 5,000-8,200 x g で 30 秒間遠心してレジンを沈殿させ、上清を捨てます。
3. 0.5 mL の TBS バッファーを加えてレジンをリンスし、5,000-8,200 x g で 30 秒間遠心して上清を捨てます。
4. 手順 3 のリンスをもう一度行います。
5. 0.2-1 mL のライセートを添加します。
6. 軽く振とうまたは回転させながら 2-8°C で 1-2 時間 (あるいは一晩) インキュベートします。
7. 5,000-8,200 x g で 30 秒間遠心してレジンを沈殿させ、上清を取り除きます。
8. 0.5 mL の TBS バッファーを加えてレジンをリンスし、5,000-8,200 x g で 30 秒間遠心して上清を捨てます。この作業を 3 回行います。

溶出

FLAG ペプチドによる溶出の場合

1. FLAG ペプチド*を TBS に溶解し、100 μ g/mL または 150 μ g/mL の溶液を調製します。
※ FLAG タグを発現させた場合は FLAG ペプチド、3xFLAG タグを発現させた場合は 3xFLAG ペプチドを用います
2. 100 μ L の FLAG ペプチド溶液をレジンに加え、軽く振とうしながら 2-8°C で 30 分間インキュベートします。
3. 5,000-8,200 x g で 30 秒間遠心して上清 (溶出液) を回収します。

塩酸グリシンによる溶出の場合

1. 0.1 M グリシン塩酸塩溶液 pH 3.5 を調製します。
2. 100 μ L の溶液をレジンに加え軽く振とうしながら室温で 5 分間インキュベートします。
3. 新しいチューブに 1.5 M NaCl を含む 0.5 M Tris 塩酸バッファー pH 7.4 を 10 μ L 入れておきます。
4. 5,000-8,200 x g で 30 秒間遠心して上清 (溶出液) を回収して手順 3 のチューブに入れます。

詳細なプロトコルは各製品のデータシート (Product Information Sheet または Bulletin) をご参照ください。
上記プロトコル例は FLAG M Purification Kit (カタログ番号 CELLMM2) のデータシートを元に記載しております。

GST タグ精製・検出 製品リスト

製品名	製品情報	適用	カタログ番号
グルタチオンアガロース	グルタチオンを共有結合させたアガロースビーズ。製品は粉末状。水で膨潤させて使用します(約70 mgの粉末でゲル1 mL分)。GST タグ融合タンパク質は還元型グルタチオン (カタログ番号G4251) 溶液などで溶出することができます	GST (グルタチオン S- トランスフェラーゼ) 融合タンパク質などの精製	G4510
グルタチオンアガロースカラム	グルタチオンを共有結合させたアガロースビーズ (カタログ番号G4510) の懸濁液をカラムに入れた製品	GST (グルタチオン S- トランスフェラーゼ) 融合タンパク質などの精製	G3907
還元型グルタチオン	粉末。グルタチオンアガロースからのグルタチオン S- トランスフェラーゼ (GST) の溶出には 5~10 mM で用います		G4251

製品名	抗原	免疫動物	抗体の精製	交差性	カタログ番号	WB	免疫染色	免疫沈降	ELISA
ポリクローナル抗 GST 抗体	リコンビナント GST	ウサギ	精製 イムノグロブリン	GST 融合タンパク質	G7781	●			●
モノクローナル抗 GST 抗体	リコンビナント GST	マウス	腹水	GST 融合タンパク質	G1160	●			●
ポリクローナル抗 GST 抗体 - ペルオキシダーゼ (HRP) 標識	リコンビナント GST	ウサギ	精製 イムノグロブリン	GST 融合タンパク質	A7340	●			●
ポリクローナル抗 GST 抗体 - アルカリフォスファターゼ標識	リコンビナント GST	ウサギ	精製 イムノグロブリン	GST 融合タンパク質	A5838	●			●

HA タグ精製・検出 製品リスト

製品名	製品情報	適用	カタログ番号
抗 HA 抗体アフィニティーゲル (アフィニティレジン)	N 末端、C 末端の HA タグ融合タンパク質を認識するモノクローナル抗 HA 抗体を共有結合させたアガロースビーズ。HA タグ融合タンパク質は HA ペプチドなどで溶出することができます	HA 融合タンパク質の精製、免疫沈降	A2095
HA ペプチド	HA ペプチド (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) の凍結乾燥粉末		I2149

製品名	抗原	免疫動物	抗体の精製	交差性	カタログ番号	WB	免疫染色	免疫沈降	ELISA
モノクローナル抗 HA 抗体	HA 合成ペプチド (YPYDVPDYA) の KLH 結合体	マウス	腹水	N 末端、C 末端の HA タグ融合タンパク質	H9658	●	●	●	●
モノクローナル抗 HA 抗体	HA 合成ペプチド (YPYDVPDYA) の KLH 結合体	マウス	精製 イムノグロブリン	N 末端、C 末端の HA タグ融合タンパク質	H3663	●	●	●	
ポリクローナル抗 HA 抗体	HA 合成ペプチド (YPYDVPDYA) の KLH 結合体	ウサギ	アフィニティ精製	N 末端、C 末端の HA タグ融合タンパク質	H6908	●	●	●	

c-Myc タグ精製・検出 製品リスト

製品名	製品情報	適用	カタログ番号
抗 c-Myc 抗体アフィニティーゲル	N 末端、C 末端の c-Myc タグ融合タンパク質を認識するポリクローナル抗 c-Myc 抗体を共有結合させたアガロースビーズ	c-Myc 融合タンパク質の精製、免疫沈降	A7470
c-Myc ペプチド	c-Myc ペプチド (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) の凍結乾燥粉末		M2435

製品名	抗原	免疫動物	抗体の精製	交差性	カタログ番号	WB	免疫染色	免疫沈降	ELISA
モノクローナル抗 c-Myc 抗体	c-Myc 合成ペプチド	マウス	腹水	N 末端、C 末端の c-Myc タグ融合タンパク質	M5546	●	●	●	●
ポリクローナル抗 c-Myc 抗体	c-Myc 合成ペプチド	マウス	精製 イムノグロブリン	N 末端、C 末端の c-Myc タグ融合タンパク質	M4439	●	●	●	●
ポリクローナル抗 c-Myc 抗体	c-Myc 合成ペプチド	ウサギ	アフィニティ精製	N 末端、C 末端の c-Myc タグ融合タンパク質	C3956	●	●	●	
ポリクローナル抗 c-Myc 抗体 - ペルオキシダーゼ (HRP) 標識	c-Myc 合成ペプチド	ウサギ	アフィニティ精製	N 末端、C 末端の c-Myc タグ融合タンパク質	A5598	●			
ポリクローナル抗 c-Myc 抗体 - アルカリフォスファターゼ標識	c-Myc 合成ペプチド	ウサギ	精製 イムノグロブリン	N 末端、C 末端の c-Myc タグ融合タンパク質	A5963	●	●		●

タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドとビスアクリルアミド (N,N'-methylenebisacrylamide) から形成される高度に架橋したゲルマトリクスです。このゲルは電荷によって移動するタンパク質のふるいとして役割を果たします。ネイティブのタンパク質は全体として正または負の電荷を帯びているため電荷が釣り合う等電点まで移動します。変性したタンパク質は一律に負の電荷を帯びているため、正の電極に向かって移動し、それぞれのサイズに応じて分離します。

SDS-PAGE タンパク質電気泳動によく使用される試薬

	製品	製品情報	カタログ番号
アクリルアミドゲル作成関連	30% アクリルアミド / ビスアクリルアミド 29 : 1 溶液	アクリルアミドゲルの作製に便利な溶液です	A3574
	10% SDS 溶液	DNase、RNase フリー	71736
	10% 過硫酸アンモニウム溶液	電気泳動用	A3678
泳動関連	TEMED (N,N,N',N'- テトラメチルエチレンジアミン)	電気泳動用	T9281
	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 分間ボイルして電気泳動に用います	S3401
	トリス - グリシン - SDS バッファー (10x 泳動バッファー)		T7777
汎用試薬	Trizma base (トリス塩基)	DNase、RNase、Protease フリー トリスバッファーの調製によく使われています	T6066

分子量マーカー

	製品	製品情報	カタログ番号
着色済み分子量マーカー	ColorBurst™ Electrophoresis Marker	8,000-220,000 Da Tris- グリシンまたは Tris- トリシン SDS-PAGE 用 ミニゲルで約 50 回分	C1992
	Color Marker Ultra-low Range (低分子量用)	1,060-26,600 Da Tris- トリシン SDS-PAGE 用。ミニゲルで約 20 回分	C6210
分子量マーカー	SigmaMarker™, wide range	6,500-200,000 Da ミニゲルで 20 ~ 30 回分	S8445
	SigmaMarker, low range	6,500-66,000 Da ミニゲルで 20 ~ 30 回分	M3913
未変性電気泳動用	Kit for Molecular Weights 14,000-500,000 Non-denaturing	未変性電気泳動用分子量マーカー用の 5 種類のタンパク質のセット	MWND500

染色試薬

	製品	製品情報	カタログ番号
クマシー染色 (CBB)	EZBlue™ ゲル染色液	微量タンパク質の検出が可能 そのまま使える調製済み 1x 溶液 (ブリリアントブルー G-250 含有)	G1041
	Brilliant Blue G 濃縮液	1 L 調製用の濃縮液 希釈後の濃度 0.1% ブリリアントブルー G、 25% メタノール、5% 酢酸	B8522
	Brilliant Blue R 濃縮液	1 L 調製用の濃縮液 希釈後の濃度 0.25% ブリリアントブルー R、 40% メタノール、7% 酢酸	B8647
銀染色	ProteoSilver™ 銀染色キット	SDS-PAGE、二次元電気泳動のどちらにも使用可能 タンパク質検出限界 0.1 ng/mm ²	PROTSIL1 (25 回分)
	ProteoSilver Plus 銀染色キット	ProteoSilver 銀染色キットに脱色用試薬を追加 グルタルアルデヒド不含 ゲル内トリプシン消化、MALDI-MS 解析に有用	PROTSIL2 (25 回分)

蛍光染色

	製品	製品情報	カタログ番号
SYPRO™	SYPRO Orange Protein Gel Stain	λex 300, 470 nm、λem 570 nm	S5692
	SYPRO Red Protein Gel Stain	λex 300, 550 nm、λem 630 nm	S5817
	SYPRO Ruby Protein Gel Stain	二次元 SDS-PAGE 用 λex 280, 450 nm、λem 610 nm	S4942

免疫染色・ウェスタンブロット

免疫染色・ウェスタンブロッティングによく使われている試薬

用途	製品名	製品情報	カタログ番号
バッファー	TBS (トリス緩衝生理食塩水)、pH 8.0	粉末。1 袋を 1 L の純水に溶解すると 1xTBS、pH 8.0 になります	T6664
	TBS (トリス緩衝生理食塩水)、pH 7.6	錠剤。1 錠を 15 mL の純水に溶解すると 1xTBS、pH 7.6 になります	T5030
	PBS (リン酸緩衝生理食塩水)、pH 7.4	粉末。1 袋を 1 L の純水に溶解すると 1xPBS、pH 7.4 になります	P3813
		錠剤。1 錠を 200 mL の純水に溶解すると 1xPBS、pH 7.4 になります	P4417
透過・固定	Triton™ X-100	細胞の透過処理に使用されます	T9284
	パラホルムアルデヒド	細胞の固定に使用されます	P6148
			HT5011 (15 mL x 48 本)
	中性緩衝 10% ホルマリン	4% ホルムアルデヒド溶液。組織固定に使用されます	HT5012 (60 mL x 24 本)
			HT501128 (4 L x 1 本)
ブロッキング	TWEEN®20	一般的にウェスタンブロットのブロッキングに 0.05% の濃度で使用されます	P1379
	BSA (ウシ血清アルブミン)	一般的にウェスタンブロットのブロッキングに約 5% の濃度で使用されます。脂肪酸およびグロブリンフリーのため ELISA のブロッキングにも最適	A7030
		一般的にウェスタンブロットのブロッキングに約 5% の濃度で使用されます	A9647
	ウサギ血清	非特異的結合を防ぐ目的で一次抗体の希釈液に約 1% 添加します	R9133
	マウス血清	非特異的結合を防ぐ目的で一次抗体の希釈液に約 1% 添加します	M5905
	ヤギ血清	非特異的結合を防ぐ目的で一次抗体の希釈液に約 1% 添加します	G9023
	ラット血清	非特異的結合を防ぐ目的で一次抗体の希釈液に約 1% 添加します	R9759
免疫染色関連	ヘキスト 33258 (bisBenzimide H 33258)	蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーで使用される DNA、染色体、核の蛍光色素です	B2883
	DAPI	核酸の蛍光染色に用いられます	D9542
	PI (ヨウ化プロピジウム) 溶液	1.0 mg/mL 水溶液。核酸の蛍光染色に使用されます	P4864
	FITC 標識キット FluoroTag™	タンパク質の FITC 標識に必要な試薬とカラムのキット。1 キット 5 回標識分	FITC1
	水性封入剤 Fluoromount™	そのまま使える蛍光染色用封入剤	F4680
ウェスタンブロット検出	BCIP™ /NBT	そのまま使用できる調製済み溶液 アルカリホスファターゼ基質。青色～紫色に呈色します。ELISA 法には適していません	B1911
		便利な錠剤タイプ。1 錠を 10 mL の脱イオン水に溶解して使用します	B5655
	3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB)	すぐに使用できる溶液タイプ。ペルオキシダーゼ基質。褐色に呈色します。免疫組織化学にも適しています	D6815
		便利な錠剤タイプ。1 錠を 5 mL の脱イオン水に溶解して使用します 免疫組織化学にも適しています	D4293

二次抗体

抗体そのものに標識などされていない場合、目的のタンパク質に結合した抗体はそのまま検出や可視化することができません。そこで、抗体を認識する抗体、つまりイムノグロブリンに対する抗体に標識をして、最初の抗体を検出する方法が非常によく利用されています。目的のタンパク質に対する抗体は一次抗体、一次抗体に対する抗体（抗イムノグロブリン抗体）は二次抗体と呼ばれます。

一般的に発色系の場合はアルカリホスファターゼ（AP）やホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）といった酵素標識が用いられ、検出用の試薬を与えると標識された酵素と反応して発色が起こります。ビオチン標識はストレプトアビジンを介して AP や HRP による発色の増幅に利用されています。また蛍光色素として FITC、ローダミン、TRITC、Cy3 や R- フィコエリスリン（R-PE）などが一般的ですが、そのほかに様々な波長の蛍光色素が利用されています。

二次抗体を選ぶ基本ポイント

- 一次抗体の宿主動物（免疫動物）
- 二次抗体の標識の種類
検出する方法に応じて標識を選びます
- アプリケーション
二次抗体の製品情報に書かれている使用可能なアプリケーションを参考にして、目的の用途に応じて選びます

選び方の例

一次抗体の宿主	二次抗体
ウサギ（ポリクローナル抗体）	抗ウサギ IgG 抗体
ニワトリ（ポリクローナル抗体）	抗ニワトリ IgY 抗体
ラット（ポリクローナル抗体）	抗ラット IgG 抗体

一次抗体の宿主	一次抗体のアイソタイプ	二次抗体
マウス （モノクローナル抗体）	IgG1	抗マウス IgG 抗体
	IgG2a	
	IgG2b	
	IgG3	
	IgA	抗マウス IgA（α鎖）抗体
	IgM	抗マウス IgM（μ 鎖）抗体

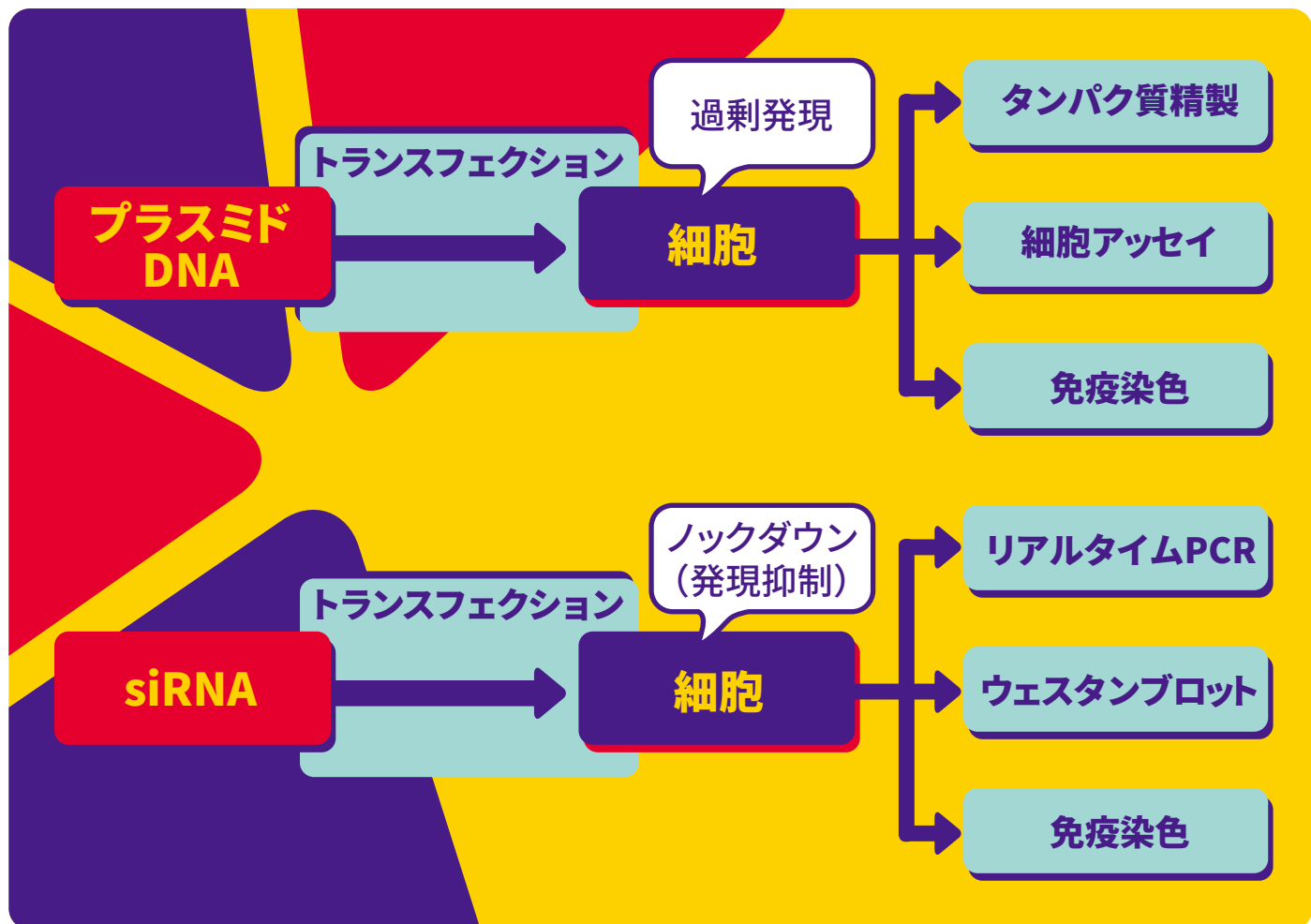
よく使われている二次抗体

製品	抗原	免疫動物	製品の特性	標識	カタログ番号	適用
抗ウサギ IgG 抗体	ウサギ IgG	ヤギ	すべてのウサギ免疫グロブリンと交差 ヒト IgG で吸収済み	アルカリホスファターゼ	A9919	ELISA, IHC, WB
				FITC	F9887	IF
				ペルオキシダーゼ	A0545	ELISA, IHC, WB
抗ラット IgG 抗体	ラット IgG	ウサギ	すべてのラット免疫グロブリンと交差 ヒト IgG で吸収済み	アルカリホスファターゼ	A6066	ELISA, IHC, WB
				FITC	F1763	IF
				ペルオキシダーゼ	A5795	ELISA, IHC, WB
抗マウス IgG 抗体	マウス IgG	ヤギ	マウス IgG, IgA, IgM と交差	アルカリホスファターゼ	A3562	ELISA, IHC, WB
		ウサギ	マウス IgG, IgA, IgM と交差	FITC	F0257	IF
				ペルオキシダーゼ	A9044	ELISA, IHC, WB
抗ヒツジ IgG 抗体	ヒツジ IgG	ロバ	すべてのヒツジ免疫グロブリンと交差	アルカリホスファターゼ	A5187	ELISA, WB
				FITC	F7634	IF
				ペルオキシダーゼ	A3415	ELISA
抗ヤギ IgG 抗体	ヤギ IgG	ウサギ	すべてのヤギ免疫グロブリンと交差	アルカリホスファターゼ	A4187	ELISA, IHC, WB
				FITC	F7367	IF
				ペルオキシダーゼ	A5420	ELISA, IHC, WB
抗ニワトリ IgY 抗体	ニワトリ IgY	ウサギ	すべてのニワトリ IgY と交差	アルカリホスファターゼ	A9171	ELISA, IHC, WB
				FITC	F8888	IF
				ペルオキシダーゼ	A9046	ELISA, IHC, WB

IHC: 免疫組織化学（免疫染色）

IF: 免疫蛍光染色

WB: ウェスタンブロット



目指せ実験上手!! まとめて読めばコンプリート

遺伝子基礎じっけんレシピ集

<https://www.sigmaaldrich-jp.com/catalog/?freeword=RBM209>

Protein Expression タンパク質研究ガイド

<https://www.sigmaaldrich-jp.com/catalog/?freeword=RBM142>

メルク ウェスタンブロットングカタログ

<https://www.sigmaaldrich-jp.com/catalog/?freeword=LSM026>

詳しくは

カタログファインダー

検索

www.sigmaaldrich-jp.com/catalog/

カタログファインダーで
検索じゃ



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
**カタログ
ファインダー**



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.com/wm



メルクライフサイエンス公式
SNS、動画コンテンツをご覧ください。

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。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年12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. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン 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.sigmaaldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

RBM210-2012-PDF-H