

# sigmania

シグマニア

Sigma-Aldrichを中心に、バイオロジー研究に役立つ新製品と注目の試薬を一気に紹介！  
すでに人気の製品から、隠れた人気製品まで。  
ぜんぶ知っているあなたはシグマニア？

## タンパク質発現系 構築のコツ



## CONTENTS

### 特集

タンパク質発現系構築のコツ . . . . . 2

 × sigmania

His タグ精製に高性能のレジン

cOmplete® His タグ精製レジン . . . . . 6

そうだったんだ！

テクニカルサービスよりよくあるご質問にお答えします！

pET システムによるタンパク質発現 . . . . . 7

タンパク質発現に注目の新製品

TurboMix™ / ReadyBlue®  . . . . . 8

創薬スクリーニングの新技术

DNA コード化ライブラリー  . . . . . 8

MilliSentials™

Lab Labeling System  . . . . . 9

がん免疫研究に遺伝子改変済み細胞株

がん抗原パネル細胞株 / HLA パネル細胞株 . 10

家族性アルツハイマー病遺伝子変異を安定的に発現

Alzheimer's In A Dish™

FAD ReNcell® VM Lines  . . . . . 11

パズルでハカセと対決！ . . . . . 12

# タンパク質発現系構築のコツ

## タンパク質発現のゴールドスタンダード Novagen®

pET ベクター、コンピテントセル、トランスフェクション試薬などタンパク質発現試薬のゴールドスタンダードとして愛され続ける Novagen® の技術、製品についてご紹介します。



## pET System とは

pET System は、大腸菌を用いた組換えタンパク質のクローニング・発現システムとして現在きわめて優れた製品です。目的遺伝子は、pET プラスミド内の強力なバクテリオファージ T7 転写・翻訳シグナルの支配下にクローニングされます。発現は、宿主菌体に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を加えることにより行います。T7 RNA ポリメラーゼは、選択性と活性がきわめて高いため、発現誘導を充分に行くと、菌体内のほぼすべての物質が目的遺伝子の発現に振り分けられます。目的タンパク質は、誘導後わずか数時間で菌体内の総タンパク質の 50% 以上に達します。本システムはきわめて強力ですが、誘導物質 (IPTG) の濃度を下げるだけで発現レベルを抑えることも可能です。タンパク質によっては、発現レベルを抑制することで可溶性画分の収量が上がる場合があります。本システムのもう 1 つの重要な利点は、非誘導時には目的遺伝子の転写を完全に抑制できる点です。まず、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持たない宿主で目的遺伝子のクローニングを行うので、宿主菌体に対して毒性を示す可能性のあるタンパク質が産生されないため、プラスミドが不安定となる恐れがありません。

クローニング用のタンパク質を発現しない宿主でプラスミドを構築したのち、タンパク質発現用宿主に λ CE6 (λ p L および p 1 プロモーターの支配下に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つファージ) を感染させる、あるいは lacUV5 の制御下に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを持つ発現宿主にプラスミドを導入することにより、目的タンパク質の発現を開始させます。後者の場合、大腸菌培地に IPTG を添加することで発現を誘導します。毒性の低いタンパク質などの場合、発現宿主にそのままクローニングできますが、一般的にはお勧めできません。Novagen® には、2 種類の T7 プロモーターと基底発現レベルの抑制制御の強さが異なる数種の宿主があります。多様な目的遺伝子の最適発現に、柔軟に対応することが可能です。すべての pET ベクターおよび関連製品は、目的タンパク質のクローニング、発現、検出、精製を簡便に行うことのできるキットとしても提供しています。pET システムには、プラスミドベクターと宿主が含まれています。

販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記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。

# タンパク質発現系構築のポイント

## 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て 4 項目を正しく選択することです。

- **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-17b	pET-14b	pET-11a-d	pET-15b	pET-16b	pET-19b
	C 末端	pET-20b (+)	pET-23 (+)	pET-21 (+)	pET-22b (+)	pET-25b (+)	pET-31b (+)
	両末端	pET-23a-d		pET-21a-d (+)	pET-32a-c (+)	pET-32 Ek/LIC	pET-32 Xa/LIC
カナマイシン耐性	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 (+)
	両末端	-		pET-30 Ek/LIC	pET-30 Xa/LIC	pET-39b (+)	pET-40b (+)
クロラムフェニコール耐性	N 末端			pET-41a-b (+)	pET-41 Ek/LIC	pET-42a-b (+)	pET-47b (+)
	C 末端			pET-48b (+)	pET-49b (+)	pET-50b (+)	
	両末端			pETcoco-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。

※ (+) 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。

※ Ek: Enterokinase、3C: HRV 3C、Xa: Factor Xa

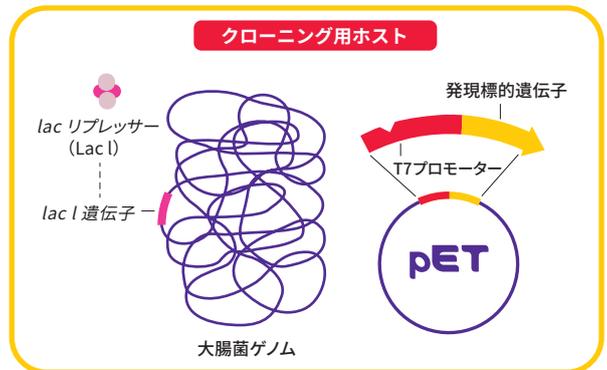
※ LIC: Ligation-independent cloning つまり、制限酵素による切断および DNA ライゲースによる結合が不要なクローニング手法です。

※ 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。

## ポイント 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、DH5  $\alpha$  や NovaBlue などがよく知られています。特に NovaBlue は、*recA*<sup>-</sup> *endA*<sup>-</sup> 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のため、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	アニマルフリー	T1およびT5ファージ耐性
NovaBlue NovaBlue GigaSingles™ NovaBlue T1 <sup>R</sup> Singles Veggie™ NovaBlue Singles	Veggie™ NovaBlue Singles	NovaBlue T1 <sup>R</sup> Singles

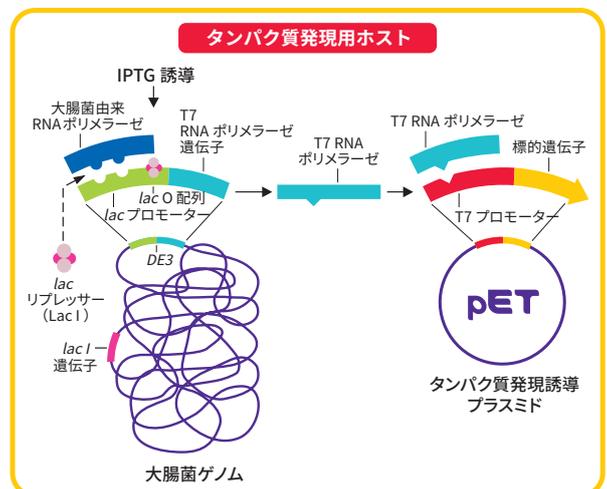


## ポイント ③ 発現用宿主株の選択

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。



# タンパク質発現誘導のポイント

## 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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; Lathop *et al.*, 1992)。上記の 2 知見から、**大腸菌内では X<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> が Leu になることはありません)。とはいえ、X<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub>		
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確認いただき、必要に応じて最適濃度をご検討ください。特に *lacYI* 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>lacYI</i> <sup>+</sup> [ラクトース透過酵素を持つ株]	T7	0.4 mM
			<i>lacYI</i> [ラクトース透過酵素変異株*]	T7lac	1.0 mM
				T7/T7lac	25 μM ~ 1.0 mM

## ポイント 2 培養条件の見直し

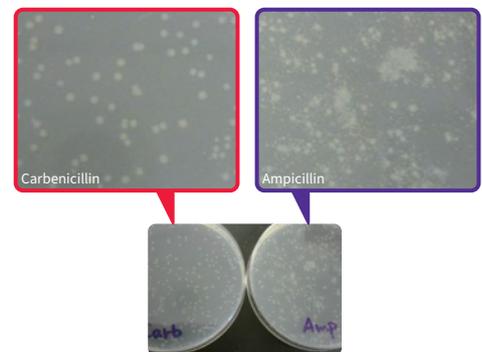
発現誘導したタンパク質の収率が上がらないという場合には、培養条件の一部を見直す必要があるかもしれません。

### 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。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<sup>7</sup> 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*<sup>R</sup> 遺伝子を持つ菌株を播種した結果。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。

## 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

## ポイント 3 基底発現の抑制

プラスミドクローニング用宿主とは異なり、タンパク質発現用宿主内の 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、微量であっても宿主に少なからずストレスを与えます。特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宿主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 (クローニング用宿主ではグルコース添加の効果はありません)。発現用宿主として 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 保有宿主の利用

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起こらず、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。

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

## 詳細はカタログをご覧ください



### pET システムの活用のポイントを詳しく解説

- タンパク質発現系構築の3つのポイント
- タンパク質発現誘導の3つのポイント
- タンパク質抽出・精製の3つのポイント
- 実験効率化のヒント / 関連技術製品

<https://bit.ly/2UJyL2C>



### タンパク質は、必ず発現させることができる!

多くの研究者が痛感されている、「タンパク質によってはなかなか発現できないものがある」という現実をブレイクスルーするコツと様々な対処方法をまとめてご紹介。2011年に発刊され、多くのタンパク質研究者に勇気と希望を与えてきた実践的技術資料のリブランド復刻版。

<https://bit.ly/2VDmr4v>



## cOplete® His タグ精製レジン

- EDTA や還元剤の除去が不要

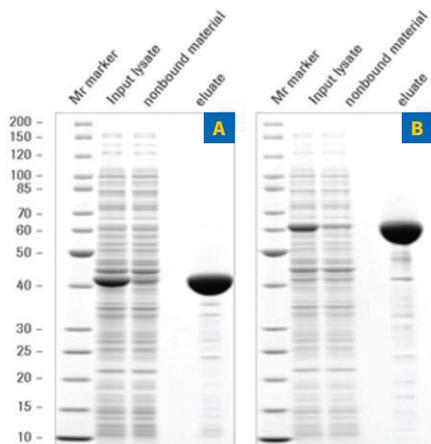
タンパク質の結合量に影響なく、EDTA などのキレート剤や DTT などの還元剤を含むバッファーを用いることができます。

- 高純度のタンパク質を大量に精製

特異性が高く、結合量が多いため、1 ステップ精製でも十分高純度のタンパク質が得られます。

- ニッケルイオンの再チャージ不要

レジンを再利用する際にニッケルイオンを再チャージする必要がないため、レジンを手軽に繰り返し使用することができます。



### 6xHis タグおよび 10xHis タグ融合タンパク質の精製結果

His6-MBP (A) または His10-T4 DNA リガーゼ (B) を含む非変性ライゼート 2 mL の各サンプルについて、50 または 40  $\mu$ L のバッファー A (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM DTT) 中の cOplete® His-Tag 精製レジンで 2 時間インキュベーションした。その後、結合していない物質をバッファー A と 400 mM のイミダゾールで洗浄した。  
結果：cOplete® His-Tag 精製レジンによって、目的のタンパク質を一回で高純度の精製をすることができた。

製品名	容量	カタログ番号
cOplete® His-Tag 精製レジン	25 mL	05 893 682 001
	200 mL	05 893 801 001

詳細はこちら

<https://bit.ly/3htVHw4>



## 関連製品

### 信頼のプロテアーゼインヒビターで より確実に cOplete® / cOplete® ULTRA

cOplete® シリーズは、細胞溶解から精製に至るプロセスにおいて、目的タンパク質の安定性と可溶性を向上させると同時に、プロテアーゼや酸化からのタンパク質の保護も容易にします。

**セレクションガイド** +はそれぞれのプロテアーゼに対する阻害の強さを表しています。

プロテアーゼインヒビターカクテル錠	セリンプロテアーゼ	システインプロテアーゼ	アスパラギン酸プロテアーゼ	メタロプロテアーゼ
cOplete® ULTRA Tablets, EDTA-free	+++	++	+	
cOplete® ULTRA Tablets	+++	++	+	+
cOplete® Tablets, EDTA-free	++	+		
cOplete® Tablets	++	+		+



詳細はこちら

<https://bit.ly/3xt8iVP>



そうだったんだ！

# テクニカルサービスより よくあるご質問にお答えします！



## pET システムによるタンパク質発現

pET ベクター・  
宿主株の選択

クローニング

形質転換

発現誘導

**Q:** クローニングできる遺伝子の最大サイズはどのくらいですか？

**A:** クローニングできる遺伝子の最大サイズは特定されていません。タンパク質の大きさでいうと Novagen® では 225 kDa のタンパク質を発現させた経験があります。

**Q:** 発現用の大腸菌はどのような株を選んだら良いですか？

**A:** pET ベクターを用いたタンパク質発現には DE3 溶原株を使ってください。名前に (DE3) と入っている株です。もっとも一般的な株は BL21 (DE3) または Rosetta2 (DE3) です。

**Q:** 大腸菌からプラスミドを抽出しましたが  
収量が低いです…

**A:** pET ベクターは細胞内でのコピー数が少ないプラスミドです (右表)。そのため pUC 系のプラスミドと比べるとプラスミドの収量は少ないです。典型的なローコピープラスミドの収量は、バクテリア培養液 1 mL あたり約 0.2 ~ 1.0 µg です。

Table 1: Plasmid replicons in Novagen® *E. coli* expression systems

Plasmid(s)	Replicon (source)	Copy Number
pET (all) pETDuet-1	ColE1 (pBR322)	~40
pACYCDuet-1 pLysS pLysE pLacI pRARE	P15A (pACYC184)	10-20
pRSF (all)	RSF1030	> 100
pCDF (all)	CloDF13	20-40
pETBlue™ (all) pTriEx™ (all)	ColE1 (pUC)	> 500
pETcoco™ (all)	Mini-F/RK2 (7) (pBeloBAC11, RK2)	1, amplifiable to ~40

**Q:** Origami, Rosetta-gami 系の株を形質転換して一晩経ちましたが  
コロニーが1個も出ていません…

**A:** Origami シリーズおよび Rosetta-gami シリーズ宿主は、チオレドキシニンリダクターゼ (*trxB*) / グルタチオンリダクターゼ (*gor*) 遺伝子に変異が加えられている影響で増殖が遅いです。培養時間は 18 ~ 24 時間程度必要です。一晩の培養でコロニーが出ていないときは培養時間を延長して様子を見てください。

**Q:** 発現誘導時には培地にプラスミド選択用の抗生物質に加え以下の  
抗生物質を添加しないとイケませんか？

Origami2 : テトラサイクリン、ストレプトマイシン耐性  
OrigamiB : カナマイシン、テトラサイクリン耐性

**A:** テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン耐性遺伝子はゲノム上にあるため安定です。形質転換や発現培養時には培地にプラスミド選択用の抗生物質のみを加えれば OK です。培養時には細胞を維持するためのすべての抗生物質を添加してください。

このほかにも pET システムの詳細は M-hub の記事をチェック

<https://bit.ly/3hKUL6g>



## TurboMix™

### Bis-Tris アクリルアミドゲル ハンドキャストキット

特長

- 手間削減：プレミックスキットにより試薬調製の手間を削減
- 柔軟性：希釈の割合を変えるだけで8～15%のゲルに調製可能
- 時間短縮：同等の Tris-Glycine ゲルと比較して、  
わずか 20 分という短時間で電気泳動が可能
- 保存期間：pH が中性なので安定性が向上し、3～4 週間の保管が可能



## ReadyBlue®

### 5分で染色可能なクマシーゲル染色剤

特長

- 低バックグラウンド
- 3 回までの再利用が可能
- 比色法や赤外蛍光法に対応
- 常温保存可能



製品名	容量	カタログ番号
TurboMix™ Bis-Tris Gel Casting Kit	最大ミニゲル 10 枚分	TMKIT-10
TurboMix™ Bis-Tris Gel Casting Kit	最大ミニゲル60 枚分	TMKIT-60
ReadyBlue® Protein Gel Stain	30 mL	RSB-30ML
	1 L	RSB-1L

※ TurboMix™ キットには Resolving Solution, Stacking Solution を含みます

## 創薬スクリーニングの新手法



## DNA コード化ライブラリー

DyNAbind 社とのコラボレーションにより開発された安価で手軽な DEL キットは、目的に応じて2種類からお選びいただけます！  
新製品の DYNA002 (カタログ番号) は、NGS 解析により1,000 万化合物の中からトップ 50 ヒットの構造情報が得られるキットです。

	DNA-Encoded Fragment Library	10 Million Compound DNA-Encoded Library
カタログ番号	DYNA001	DYNA002
製品コンセプト	✓ 小サイズフラグメントによるヒット可能性向上 ✓ 先進的な Y-EDCCL* による S/N 比改善	✓ 大規模ライブラリーによるヒット可能性向上 ✓ Drug-like なフラグメント
ライブラリーサイズ	✓ 約 37 万通り フラグメントペア (2d-2c 型)**	✓ 約 1,000 万通り フラグメント (1d-1c 型)**
スクリーニング化合物	✓ フラグメントペアおよび単一フラグメント ✓ Rule-of-Three 等を考慮したフラグメント構成	✓ サブフラグメント 3 種類からなるフラグメント ✓ ビルディングブロック組合せによるフラグメント構成
ヒット後の研究ステップ	✓ フラグメントペア間に高い自由度 ✓ リンカー構造設計余地あり	✓ 各サブフラグメントは結合済み ✓ 限定的な設計自由度
パッケージ	✓ 5 vials	✓ 2 vials ✓ 5 vials
構造開示	✓ Top 20 hit x 3 通り (ペア、5'、3' 鎖、無料)	✓ Top 50 hit (無料) ✓ Data Sharing Agreement (要相談)
ライセンス契約	✓ 研究開発用途では不要 ✓ 商用利用時に要相談	✓ 研究開発、商用利用問わず不要

\* Y-EDCCL = Y-Shaped DNA-Encoded Dynamic Combinational Chemical Library. DyNAbind 社の特長な技術による次世代 DEL。

\*\* 1d-1c 型 / 2d-2c 型 = 1 つのフラグメント構成の種類。1DNA-1 化合物によるフラグメント / 2DNAs-2 化合物によるフラグメント。

技術詳細は SigMania 2020 年 7 月 Vol.06 をチェック

<https://bit.ly/3klEw1q>



販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記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。

# MilliSentials™ Lab Labeling System



Millipore®

Preparation, Separation,  
Filtration & Monitoring Products

MilliSentials™ ラボラベリングシステムは、ラボのラベリングワークフローを合理化する直感的なラベリングのソリューションです。ラボ内の様々な条件で使用可能なラベル、コンパクトな WiFi プリンター、およびカスタム開発されたソフトウェアを組み合わせたシステムです。

## このようなニーズにお応えします！

- ✓ サンプルの取り違えや長期保管によるラベルの欠損をなくしたい
- ✓ ラボの安全性を高めたい (感染性や危険性のあるサンプルを扱う場合)
- ✓ 実験の精度と効率を高めたい
- ✓ サンプルの記録をしっかり残したい



### プリンター本体

- 卓上コンパクトサイズ：幅 20.3 cm × 高さ 19.1 cm × 奥行 26.7 cm
- WiFi 対応
- 簡単操作

### 専用ソフトウェア

- ラボ用容器に適合した各種テンプレート
- テンプレートは保存管理可能
- モバイルデバイスからアクセス可能

### ラベルシール

- 耐熱性 (-196°C から 100°C)：液体窒素、ディープフリーザー、ヒートショックサンプルのラベルも可能
- 幅広い耐薬品性：水、エタノール、キシレン、ブリーチ、DMSO など
- あらゆるラボ用容器に適合したラベル：  
0.5、0.6 mL チューブ、1.0、2.0 mL チューブ、ペトリ皿、スライド、クライオバイアル、ファルコンチューブ

製品名

MilliSentials™ Lab Labeling System

カタログ番号

MISELLABSJ



## それ以外にも、ラベルにまつわる身近な実験トラブルを解消します

- ✓ 液体窒素から取り出したチューブの霜を拭いたらラベルが消えた！
- ✓ ディープフリーザーのアラームと闘いながらサンプル検索している
- ✓ ラボメンバーの書いた文字が読めない…
- … etc.

製品に関するお問い合わせ：メルクテクニカルサービス  
デモのご依頼：メルクテクニカルサービスもしくは  
弊社販売店にお知らせください

## メルクは今年も JASIS WebExpo® に出展します

オンラインでいつでも、純水装置、フィルター関連製品、分析関連製品などの最新情報や技術情報を御確認いただけます。みなさまのお越しをお待ちしております！

### 見どころ

- ご存じですか？ HPLC や LC/MS に水質が及ぼす影響。最新の Milli-Q® 情報も動画でチェック
- 必見！最新の分析製品の情報一挙公開 (HPLC カラム、熱脱離チューブ、技能試験標準物質、簡易試験紙・テストキット、SPME ファイバー)
- ミリポアブランドのフィルターの基礎から各種アプリケーション (製薬 / 工業 / 環境など) まで



会期：2021年9月8日(水) 10:00 ~  
2022年3月15日(火) 17:00

JASIS WebExpo URL : <https://www.jasiswebexpo.jp>

※ ブースの閲覧には最初に JASIS WebExpo® への登録が必要です

【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

Email : [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com)

<シグマ製品> TEL : 03-6756-8245

Email : [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com)

# がん免疫研究に 遺伝子改変済み細胞株

NEW

CompoZr™ ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) テクノロジーと MISSION™ レンチウイルステクノロジーを利用し、生体関連の細胞株で個々の抗原が発現するパネル細胞株を作製しました。これらの細胞株は創薬研究開発全体に渡って利用可能です。

ターゲット同定

ターゲット評価

リード探索

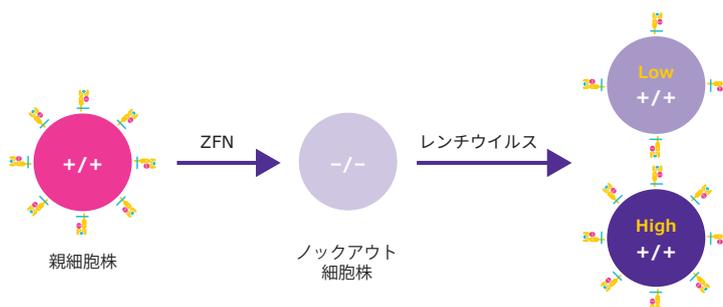
リード最適化

非臨床試験

## がん抗原パネル細胞株

CAR / TCR 治療スクリーニング、チェックポイント阻害剤開発の理想的なセルベースアッセイ、または臨床研究開発における有効性分析の標的細胞株となりえます。

- 細胞表面のがん抗原をノックアウトした細胞株、低レベルで発現する細胞株、高レベルで発現する細胞株をセットでご提供
- CAR/TCR 療法開発や、チェックポイント阻害剤開発のセルベースアッセイによるスクリーニングに理想的
- 研究用途の場合はライセンス不要

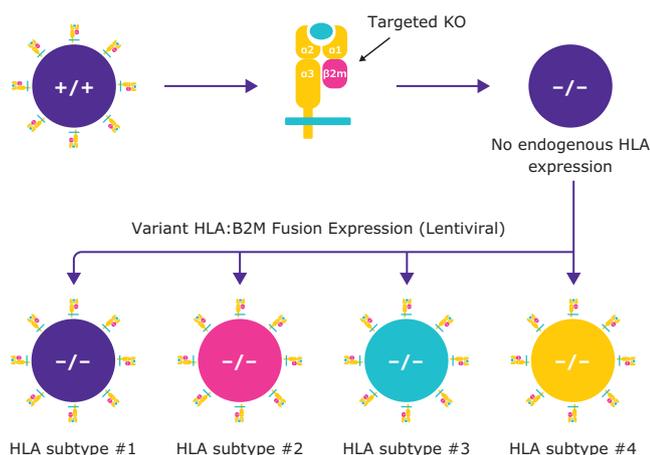


製品名	親細胞株	ターゲットタンパク質	カタログ番号
Raji CD19 パネル細胞株 (KO-Low-High)	Raji	CD19	ATG001-1KT
A549 EGFR パネル細胞株 (KO-Low-High)	A549	EGFR	ATG002-1KT
A375 NY-ESO-1 パネル細胞株 (KO-Low-High)	A375	NY-ESO-1/CTAG1B	ATG004-1KT
A549 EGFRvIII パネル細胞株 (KO-High)	A549	EGFRvIII	ATG005-1KT

## HLA パネル細胞株

TCR / HLA 結合研究、がんワクチン開発、および新たな抗原の探索に利用できる理想的なセルベースアッセイです。

- MHC クラス I 分子 HLA を構成する  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2M$ ) をノックアウトした細胞株、 $\beta 2M$  ノックアウト後に各 HLA サブタイプを発現する細胞株をセットでご提供
- TCR と HLA の結合研究、がんワクチン開発のセルベースアッセイによるスクリーニングに理想的
- 研究用途の場合はライセンス不要



### HLA パネル構成例

- $\beta 2M$  KO
- HLA-A\*02:01
- HLA-A\*01:01
- HLA-A\*03:01
- HLA-A\*11:01
- HLA-A\*24:02
- HLA-B\*15:10
- HLA-B\*07:02
- HLA-B\*08:01
- HLA-B\*35:01
- HLA-B\*40:01

(詳細は各製品の web ページをご覧ください)

製品名	親細胞株	HLA タイプ	カタログ番号
HLA サブタイプパネル細胞株 Raji	Raji	B2M KO, A*02:01 など (各製品の web サイトをご覧ください)	HLA001-1KT
HLA サブタイプパネル細胞株 Jurkat	Jurkat	B2M KO, A*02:01 など (各製品の web サイトをご覧ください)	HLA002-1KT
HLA サブタイプパネル細胞株 A549	A549	B2M KO, A*02:01 など (各製品の web サイトをご覧ください)	HLA003-1KT

細胞株製品の詳細はこちら

<https://bit.ly/3wJl2q2>



販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記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。

## 家族性アルツハイマー病遺伝子変異を安定的に発現

## Alzheimer's In A Dish™ FAD ReNcell® VM Lines

Alzheimer's In A Dish™ FAD ReNcell® VM Lines は、複数の家族性アルツハイマー病 (Familial Alzheimer's Disease; FAD) 変異を持つアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) 遺伝子を安定的に発現する、不死化された単一細胞由来のクローンヒト神経前駆細胞株です。この FAD 神経前駆細胞は、異なる量の総アミロイドβタンパク質 (Amyloid-β Protein; Aβ) を分泌し、Aβ 42/40 の比率が異なります。また、アミロイドβ前駆体タンパク質 (Amyloid-β Precursor Protein; APP) の発現レベルと病原性 Aβ のレベルが複数回の継代を経ても同質で比較的安定していることが特徴です。Alzheimer's In A Dish™ は、AD の phospho-tau の蓄積と神経原線維変化の病態を制御する Aβ 42/40 比の役割を直接評価することができる細胞株です。

## 家族性アルツハイマー病遺伝子変異研究の有用性

アルツハイマー病患者の脳では、Aβ 斑や神経原線維変化が重要な病理学的特徴として観察されます。家族性早期発症型 AD (FAD) は、常染色体優性遺伝により発症するため、重要な変異が病気の進行や病態に及ぼす影響を研究することにより、疾患の根底にあるメカニズムの一端を明らかにすることができ、将来の AD の理解と治療に役立つものと考えられています<sup>1</sup>。これまでに、アミロイドβ前駆体タンパク質 (APP) やプレセニリン 1 (PSEN1) に生じた FAD の変異は約 200 件報告されており<sup>2</sup>、また最近では、FAD 変異を過剰に発現させた遺伝子改変ヒト神経幹細胞を用いた 3D モデルが、AD の 2 つの病理学的特徴である Aβ の蓄積異常と神経原線維変化を再現することが報告されています<sup>3,4,5</sup>。重要なのは、単一細胞由来のクローン FAD 神経幹細胞を用いて、Aβ 42/40 比が高いことが、Aβ 総量ではなく、不溶性 Aβ 凝集体の加速的な蓄積や病原性の phospho-tau レベルと直接関連していることを示したことです<sup>5</sup>。

## Alzheimer's In A Dish™ FAD ReNcell® VM Lines の特徴

各細胞株はウイルス感染のレポーターとしての蛍光タンパク質とともに、全長のβアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の FAD 変異のうち、K670N/M671L (Swedish 変異) と V717I (London 変異) の両方の変異 (APP (Swe/Lon))、および/または Δ E9 変異の PSEN1 (PS1 (Δ E9))、APP (Swe/Lon) /PS1 (Δ E9) を発現させたレンチウイルスを用いて、ReNcell® VM ヒト神経幹細胞でトランスフェクトしました<sup>3,4,5</sup>。FAD 神経幹細胞は、GFP や mCherry のシグナルに基づいて FACS による 96 ウェルシングルセルソーティングで選択し、ウェスタンブロットや ELISA を用いて Aβ の分泌量を調べました<sup>5</sup>。各クローンの変異と Aβ 42/40 比は表をご覧ください。

製品名, クローン名	発現遺伝子	Aβ 42/40 比	カタログ番号
HReN-mGAP, Clone A4H1		3 番目に Aβ 42/40 比高い	SCC008FAD1
ReN-mGAP10, Clone D4		2 番目に Aβ 42/40 比高い	SCC008FAD2
ReN-G2, Clone B2		ネガティブ・コントロール - FAD 変異なし	SCC008FAD3
ReN-GA2, Clone 3C1		Aβ 42/40 比低いが APP の産生量は Clone A5 より高い	SCC008FAD4
ReN-GA2, Clone A5		Aβ 42/40 比低い	SCC008FAD5
ReN-mAP4, Clone E6F4		総 Aβ の種類のレベルは高いが、Aβ 42/40 比低い	SCC008FAD6
ReN-mGAP2, Clone H10		最も Aβ 42/40 比高い	SCC008FAD7

表. クローン神経幹細胞で発現させたレンチウイルス DNA コンストラクトの一覧。APPSL (\*) の発現量は総 Aβ 量を決定し、PS1 Δ E9 (\*\*) の発現量は PS1/γ-セクレターゼ複合体を変化させることで Aβ 42/40 比に影響を与えることがわかった。APPSL-PS1 Δ E9 コンストラクト (\*\*\*) を用いた NSCs の場合、APPSL と PS1 Δ E9 の両方の転写が単一の CMV プロモーターによって制御されているため、Aβ 42/40 比は変化しない。高い Aβ 42/40 比を持つ FAD 神経幹細胞クローン (SCC008FAD2 および SCC008FAD7) は、界面活性剤不溶性の Aβ 42 凝集体と phospho-tau の強固な蓄積を示し、神経細胞死の増加を示す Caspase-3 のレベルが上昇していた<sup>5</sup>。

**細胞株のライセンス:** いずれの細胞株も、大学などの非営利組織のお客様は基礎研究用途の場合、ライセンス契約は不要です。応用研究以降はライセンス契約が必要になります。企業など営利組織のお客様は、基礎研究用、応用研究以降を問わず、ご購入前のライセンス契約が必須です。

## 参考文献

- Ryan, et al. 2010. "Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype." *Biomark Med.* 4 (1) : 99-112. <https://dx.doi.org/10.2217/bmm.09.92>
- D'Avanzo, et al. 2015. "Alzheimer's in 3D culture: challenges and perspectives." *Bioessays* 37 (10) : 1139-48. <https://doi.org/10.1002/bies.201500063>
- Choi et al. 2014. "A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease." *Nature* 515 (7526) : 274-278. <https://doi.org/10.1038/nature13800>
- Kim, et al. 2015. "A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease." *Nature Protocol* 10 (7) : 985-1006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.065>
- Kwak, et al. 2020. "Amyloid-β 42/40 ratio drives tau pathology in 3D human neural cell culture models of Alzheimer's disease." *Nature Commun.* 11 (1) : 1377. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15120-3>

3D 培養の手法などの詳細はこちら

<https://bit.ly/3dV5rNB>



【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  
<シグマ製品> TEL : 03-6756-8245

Email : [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com)  
Email : [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com)

# パズルでハカセと対決!

盤面に含まれない  
ベクターの名前は?



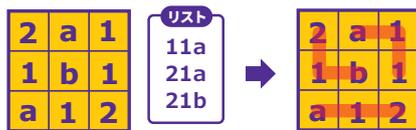
a	0	c	2	3	b	1	4	b
4	3	2	3	b	7	2	3	1
9	a	b	b	4	4	b	2	8
b	9	2	0	3	4	8	b	c
2	9	3	4	2	b	4	7	2
a	b	0	c	3	2	a	b	8
8	b	5	0	b	c	4	4	b
2	5	4	a	2	4	a	1	4

制作: ASOBIDEA (アソビディア)

## 問題

リストにある「pET ベクター名」で盤面を分けてください。ベクター名はマス目をタテヨコにつなげて読める必要があります。向きはどの向きでも OK です。リストにあるベクター名は1つを除いて盤面に含まれます。  
盤面に含まれない1つのベクターの名前を教えてください。

【分割例】



- ※ 当選者は厳正な抽選の上決定し、発表は賞品の発送をもって代えさせていただきます。
- ※ 住所・転居先不明などにより賞品をお届けできない場合には、当選を無効とさせていただきます。
- ※ 当選賞品の交換、換金、返品はできませんので予めご了承ください。

個人情報の保護について: ご提供いただきました情報につきましては、賞品の発送や、弊社の製品やサービスに関する情報をお客様に提供する以外の目的では利用いたしません。お客様からお預かりした個人情報はメルク株式会社で管理し、弊社 Web サイトにて公表している個人情報保護方針に従い取り扱いをいたします。(http://www.merck.co.jp/ja/privacy\_statement/privacystatement.html)



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2021年10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. ©2021 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](http://www.merckmillipore.com/bio)  
E-mail: [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com) Tel: 03-4531-1140

RBM269-2110-20K-H

## リスト

27b	29b	32a	42a	45b
28a	30a	32b	42b	47b
28b	30b	32c	44a	48b
28c	30c	41a	44b	49b
29a	31b	41b	44c	50b

応募期間:

10月1日(金)～  
11月30日(火)まで!

正解者の中から抽選で計5名様に、  
メルクオリジナル「レトロな昭和の  
おもちゃ」をプレゼントいたします。  
ぜひご応募ください。

応募  
待ってるぞ!



ご応募はこちらから

<https://bit.ly/SigMania11>

Sigmania Vol.10 の正解: 「SIGNAL (シグナル)」