

製品コード 3365

研究用

---

**Takara**

**pCold™ TF DNA**

---

説明書

v201909Da

タンパク質の構造や機能の解明はポストゲノムの重要な研究対象で、効率のよいタンパク質生産システムはポストゲノム解析に必須の基盤技術です。組換えタンパク質の生産には大腸菌を宿主とする発現系が広く利用されています。しかしながら、大腸菌発現系は扱いやすく、低コストである反面、遺伝子によっては発現できない、あるいは発現タンパク質が不溶化するという問題が起こることがあります。

タカラバイオではニュージャージー医科歯科大学の井上正順教授と共同研究を行い、新規で有用な大腸菌コールドショック発現ベクター pCold DNA シリーズを開発しました。大腸菌の培養中に培養温度を低温にシフトさせると、菌の生育は一時的に停止し大部分の大腸菌タンパク質の発現は減少しますが、コールドショックタンパク質と呼ばれる一連のタンパク質は特異的に発現が誘導されます。pCold ベクターは大腸菌コールドショック遺伝子の一つである *cspA* のプロモーターを利用したコールドショック発現ベクターで、従来の大腸菌発現系と比較して、発現できる確率や発現産物の可溶性度を向上させることができます<sup>1)</sup>。低温発現のため、他の大腸菌由来のタンパク質の発現が抑えられ、純度の高い目的タンパク質を得ることが可能です。

一方で、大腸菌での異種タンパク質の発現を成功させるためには、タンパク質の折りたたみに作用するシャペロンタンパク質を共発現させることも有効です。

pCold ベクターを用いたタンパク質発現でも、シャペロンタンパク質発現プラスミド (Chaperone Plasmid Set) との併用により、pCold ベクター単独では発現しない、あるいは不溶化していた異種タンパク質の可溶性発現に成功した例が多数あります。

これらの知見をもとに開発された pCold TF DNA は、大腸菌シャペロン的一种であるトリガーファクター (trigger factor, TF) を可溶化タグとする融合型コールドショック発現ベクターです。TF は分子量 48 kDa のシャペロンタンパク質でリボソームに会合して存在し、タンパク質の翻訳と共役しながら (co-translationally)、新生ポリペプチドのフォールディングを促進します<sup>2)</sup>。TF は大腸菌由来のタンパク質であるため、他生物由来のタグに比べて大腸菌内での発現効率がよく、可溶化タグとして高い効果が期待できます。

本ベクターは、*cspA* プロモーターの下流に 5'非翻訳領域 (5' UTR)、translation enhancing element (TEE)、His タグ、TF タグ、multicloning site (MCS) などが配置されています。TEE には翻訳を促進する作用があり、His タグは発現タンパク質の精製に利用できます。また、プロモーターの下流には発現を厳密に制御するための *lac* operator が挿入されています。

さらに、TF タグと MCS の間には HRV 3C Protease、Thrombin、Factor Xa の認識配列があり、発現後の融合タンパク質からタグを除去することができます。

pCold TF DNA は大腸菌のプロモーターを用いているため、他の pCold DNA と同様に、ほとんどの大腸菌を発現用宿主として利用することができます。

pCold TF DNA を利用すれば、コールドショックベクターの高効率な組換えタンパク質発現能と TF の可溶化タグ機能およびシャペロン機能により、これまで発現が困難であった遺伝子を可溶化タンパク質として発現させることが可能となります。

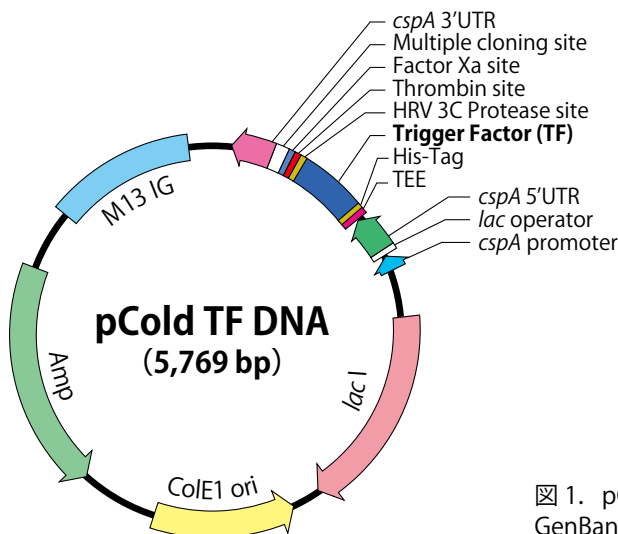


図 1. pCold TF DNA のベクターマップ  
GenBank Accession No. AB213654

---

## I. 内容

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| pCold TF DNA | 25 $\mu$ g                         |
| 【ベクターの形状】    | 10 mM Tris-HCl, pH8.0<br>1 mM EDTA |

<利用できる大腸菌発現系>

大腸菌に由来する *cspA* プロモーターにより転写されるので殆どすべての大腸菌株を発現用宿主として利用できます。

## II. 保存

− 20℃

※適切に保存し、受け取り後2年を目途にご使用ください。

## III. 使用方法

### 目的遺伝子の発現方法

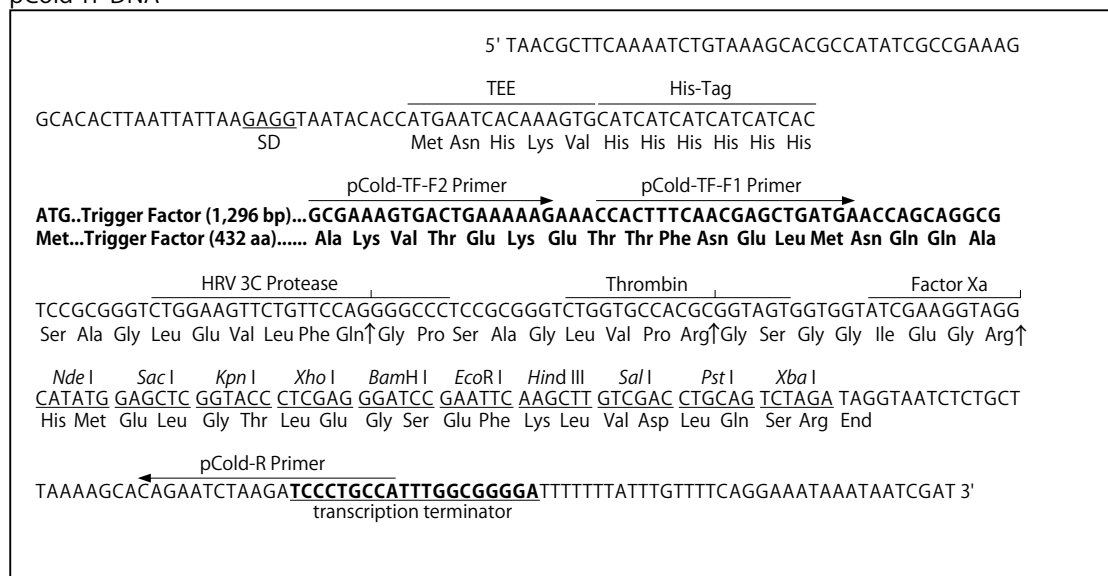
- (1) コールドショックベクター pCold TF DNA のマルチクローニングサイトに目的遺伝子を挿入して発現用プラスミドを作製する。<sup>\*1</sup>  
\* 1：発現プラスミドの構築については VII. Appendix (7 ページ) をご参照ください。
- (2) 発現用プラスミドで宿主大腸菌<sup>\*2</sup> を形質転換し、アンピシリンを含む選択培地プレート上で形質転換体を選択する。  
\* 2：本製品を用いる場合、目的遺伝子は大腸菌に由来する *cspA* プロモーターにより発現されるので、ほとんど全ての大腸菌株を発現用宿主として利用できます。
- (3) 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地に形質転換体を植菌し、37℃で振とう培養する。
- (4) 培養液の OD<sub>600</sub> が 0.5 程度となった時点で培養液をすみやかに 15℃に冷却し、30 分間放置する。
- (5) 終濃度 0.1 ~ 1.0 mM となるように IPTG を添加し 15℃で 24 時間振とう培養する。
- (6) 培養終了後、SDS-PAGE や活性測定などにより目的産物の有無、発現量や可溶性を確認する。

発現用宿主大腸菌、培養・誘導条件（培地、培養温度、通気攪拌条件、誘導のタイミング、誘導物質の濃度、誘導後の培養条件と温度など）を至適化することにより発現量、可溶化度を改善することができます。

なお、His タグを利用した融合タンパク質の精製には、クロンテックの TALON® His タグ融合タンパク質精製樹脂、His60 Ni Superflow Resin 等の製品をお勧めします。  
N 末端側のタグ配列は Factor Xa、Thrombin、HRV 3C Protease（製品コード 7360）で切断・除去できます。

#### IV. マルチクローニングサイト周辺の塩基配列

pCold TF DNA



## V. 実施例

pCold TF DNA を用いた発現系を、pCold I DNA 単独発現系およびトリガーファクターを発現するシャペロンプラスミド pTf16 と pCold I DNA の共発現系、あるいは、T7 プロモーター発現系 (他の可溶性タグとの融合発現例を含む) と比較した。コールドショック発現は、発現用宿主として BL21 株を使用して、使用方法に記載した目的遺伝子の発現方法に従って、培養・発現誘導を行った。T7 プロモーターによる発現は、発現宿主として BL21 株 (DE3) を用い、常法通り IPTG を添加後 37°C で培養することにより行った。

### (1) 発現が可能となった遺伝子の例

酵素タンパク質 A (推定分子量 29 kDa) は、pCold I DNA (単独発現、シャペロン共発現) を用いた場合および T7 プロモーターを用いた発現系では、目的タンパク質の推定分子量 29 kDa 付近には明確なバンドは認められなかった。一方で、pCold TF DNA を用いた場合のみ、目的タンパク質 (29 kDa+52 kDa) の発現が確認され、その大部分は可溶性であった (図 1)。この酵素タンパク質 A においては、融合タンパク質のままでも酵素活性があることを確認している。

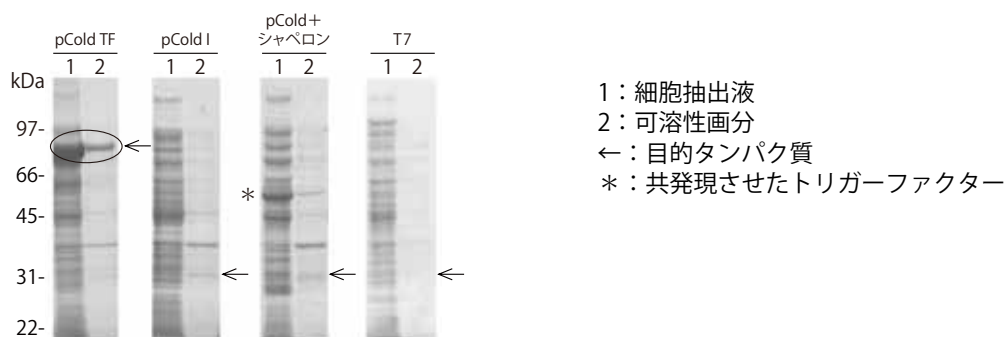


図 1. 酵素タンパク質 A の発現

### (2) 可溶性発現量が増大した遺伝子の例

酵素タンパク質 B (推定分子量 63 kDa) は、pCold I DNA (単独発現、シャペロン共発現) および他の可溶性タグを持つ T7 発現ベクターを用いた場合は、ほとんど可溶性発現が認められなかった。一方、pCold TF DNA を用いた場合は、目的タンパク質の大部分が可溶性画分に得られ、その可溶性度は他のタグと比較して著しく高かった (図 2) (それぞれタグが融合発現しているため、目的タンパク質の分子量は 63 kDa より大きくなっている)。

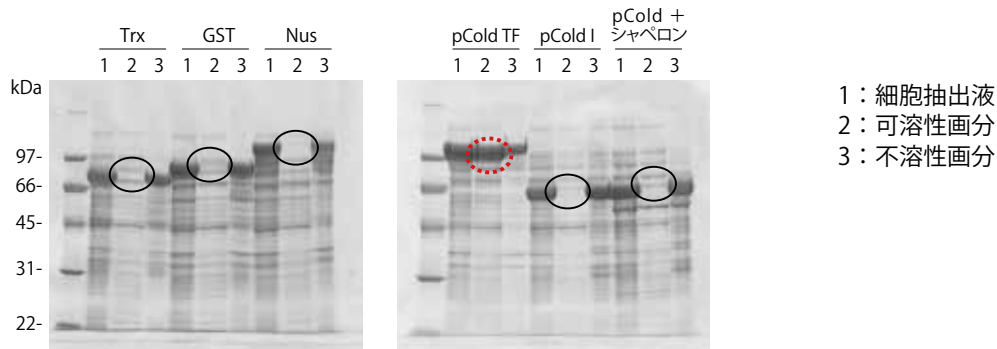


図 2. 酵素タンパク質 B の発現

---

## VI. Q & A

- Q1. 発現タンパク質が不溶化した場合、何を検討すればいいか？
- A1. 最適な培養・誘導条件は目的タンパク質によって異なります。下記の点を参考に  
して培養・誘導条件を検討してください。
- ・誘導のタイミングを変更する(対数期初期から後期までの範囲で検討する)。
  - ・誘導物質 (IPTG) の濃度を変更する (0.1 ~ 1 mM)。
  - ・誘導後の培養温度、培養時間を検討する (通常 15°C、24 時間が最適)。
  - ・通気、攪拌条件を変更する。
- Q2. 全く発現しない、あるいは発現量が少ない場合の検討方法は？
- A2. 培養・誘導条件の検討を行う (Q1 参照) か、宿主大腸菌を変更することをお勧め  
します。
- Q3. 使用実績のある宿主大腸菌は？
- A3. 弊社販売の BL21 株、Merck 社の Rosetta、Origami などです。
- ・ BL21 株は、最も一般的な発現用宿主です。
  - ・ Rosetta は、大腸菌で使用頻度が少ないコドンに対応する tRNA を供給するプ  
ラスミドを含むため、大腸菌のコドンの使用頻度の制約を受けていた遺伝子に対  
しても "Universal" な翻訳が可能です。
  - ・ Origami は、*txi/gor* 遺伝子欠損株で細胞質内でのジスルフィド結合形成が高レ  
ベルでおこります。発現したタンパク質の可溶化と refolding が促進されます。
- Q4. pCold TF ベクターに目的遺伝子を挿入したプラスミドを保持する大腸菌は、プレ  
ート上で 4°C 保存できるか？
- A4. プレート上で 4°C 保存することはお勧めできません。目的遺伝子を挿入した pCold  
TF ベクターによる形質転換体をプレート上で 4°C 保存すると、目的タンパク質が  
leak する可能性があります。できるだけ早くピックアップして -80°C 保存 (グリセ  
ロールストック) することをお勧めします。
- Q5. サイズの大きな遺伝子も発現できるか？
- A5. ヒト遺伝子 125 kDa で良好に可溶化発現した実績があります。  
(CBB 染色で、125 kDa + 52 kDa バンドが確認された。)
- Q6. pCold TF DNA で融合発現させた目的タンパク質で、プロテアーゼ処理後の SDS-  
PAGE では切断が確認できたにも関わらず、目的タンパク質から TF タグが離れない。
- A6. 目的タンパク質の性状によっては、プロテアーゼで切断後も目的タンパク質と TF  
タグが相互作用するケースがあります。不溶性になりやすいタンパク質では特にこ  
の傾向が強いようです。解決法としては、切断時に可溶性度を改善する試薬を加え  
ることが考えられます。候補には 1% Triton X-100、0.5 M アルギニン、5 mM DTT、  
20 mM CHAPS などがあります。万能な条件はありませんので、目的タンパク質に  
あわせてご検討ください。
- ただ、目的タンパク質と TF の相互作用が強固な場合は、両者が解離せず、目的タ  
ンパク質を単離できないこともあります。
- なお、Protein S 由来の ProS2 可溶化タグをもつ pCold ProS2 DNA (製品コード  
3371) では、ProS2 タグと目的タンパク質との相互作用が弱いため、プロテアーゼ  
処理後の目的タンパク質と ProS2 タグの分離が比較的容易です。
- Q7. pCold TF DNA や pCold ProS2 DNA で発現した融合タンパク質を用いて抗体作製を  
行いたい？
- A7. 抗体作製用タンパク質の発現には pCold ProS2 DNA (製品コード 3371) をご利用く  
ださい。ProS2 融合タンパク質をウサギに免疫し、抗血清を調製することも可能ですが、  
プロテアーゼで ProS2 タグを切断した目的タンパク質を抗原として利用すること  
をお勧めします。

一方、TF 融合タンパク質をウサギに免疫すると、抗血清が TF タグに対して非常に強い反応性を示す場合があります。TF 融合タンパク質に対する抗体を調製する場合には、免疫動物としてモルモットの使用をお勧めします。

プロテアーゼ処理で TF タグを切断し、タグを含まない目的タンパク質を精製すれば、ウサギへの免疫にも使用できますが、Q6 のように TF タグの除去が難しい場合がありますのでご注意ください。

## VII. Appendix

### 発現プラスミドの構築

発現プラスミドを構築するには、(1) 目的タンパク質をコードするインサート DNA が pCold TF DNA の読み取りフレームに合うように考慮して制限酵素サイトを選択し、(2) インサートの調製、(3) ベクターの制限酵素切断を行い、(4) 切断したベクターとインサートを連結後、適当な大腸菌を形質転換して、(5) 得られたコロニーよりプラスミドを調製して正しくインサートが入ったものを選択する必要があります。

インサート DNA の調製法としては PCR を用いる方法や、プラスミドにクローニングされた遺伝子を制限酵素消化によって切り出す方法、合成遺伝子を用いる方法があります。

pCold TF DNA は、pCold I ~ IV DNA および pCold ProS2 DNA のマルチクローニングサイトと配列が同じですので、制限酵素による乗せ替えをスムーズに行うことができます。

また、クロンテックの In-Fusion® HD Cloning Kit を用いると、適切な制限酵素サイトが存在しない場合でも、簡単・迅速にディレクショナルクローニングが行えるので便利です。

ここでは、一般的な方法として PCR を用いた実験例を示します。

### [大腸菌チオレドキシンをコードする遺伝子の発現用プラスミド調製例]

#### (1) 制限酵素サイトの選択とプライマーの設計

##### ・プライマー設計時の手順と注意点

1. マルチクローニングサイトにある制限酵素の中から目的配列を切断しない 2 種類の制限酵素を選ぶ。ただし、隣り合う制限酵素サイトは切断できないことがあるので避けるようにする。
2. 目的配列を挟むようにプライマーを設定し、それぞれのプライマーの 5' 側に制限酵素サイトを付加する。  
N 末端側は pCold TF DNA の読み取りフレームにインサートのフレームが合うように目的配列と制限酵素サイトの間塩基数を調整する。C 末端側はストップコドンに直接制限酵素サイトを付加してもよい。
3. 制限酵素サイトの外側に 4 base 程度の任意配列を付加する。多くの制限酵素は認識配列の外側に数 bp 以上の塩基がないと切断効率が悪くなる。

##### ・プライマー設計例

pCold TF DNA の *Nde*I/*Xho*I サイトに挿入する場合

*Nde*I

Primer 1 (順方向プライマー) 5' - **GCCGCATATGAGCGATAAAATTATTCAC**  
任意配列 チオレドキシ由来配列\*<sup>1</sup>

*Xho*I \*

Primer 2 (逆方向プライマー) 5' - **GCCGCTCGAGTTAGGCCAGGTTAGCGTC**  
任意配列 チオレドキシ由来配列\*<sup>2</sup>

\* 1: *Nde*I サイトを利用する場合は、*Nde*I サイトの ATG にインサートの開始コドン (ATG) を合わせるとことを推奨します。

\* 2: 終始コドン (\*) を含む相補的なチオレドキシンの配列です。

## (2) インサートの調製

1. PCRによる目的遺伝子(約 350 bp)の増幅  
高い正確性を持つ High-Fidelity PCR 酵素 (PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A) など) を用いて、PCR 反応を行う。

|  |              |
|--|--------------|
| 鋳型 DNA (5 ng) *1                           | 1 $\mu$ l    |
| 5×PrimeSTAR Buffer*2                       | 10 $\mu$ l   |
| dNTP Mixture (2.5 mM each) *2              | 4 $\mu$ l    |
| Primer 1 (10 ~ 50 pmol/ $\mu$ l)           | 1 $\mu$ l    |
| Primer 2 (10 ~ 50 pmol/ $\mu$ l)           | 1 $\mu$ l    |
| PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l) | 0.5 $\mu$ l  |
| 滅菌精製水                                      | 32.5 $\mu$ l |
| Total                                      | 50 $\mu$ l   |

\* 1 : プラスミドの場合は 10 pg ~ 1 ng 程度、cDNA やゲノム DNA の場合は 5 ~ 200 ng 程度使用します。

\* 2 : 5×PrimeSTAR Buffer、dNTP Mixture は PrimeSTAR HS DNA Polymerase (製品コード R010A) に添付されています。

|      |             |             |
|------|-------------|-------------|
| 98°C | 10 sec.     | } 30 cycles |
| 55°C | 5 ~ 15 sec. |             |
| 72°C | 1 min.      |             |

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch*/Gradient (製品コード TP350/TP600) を用いる場合

2. 増幅産物の確認  
PCR 反応液 5  $\mu$ l を用いて電気泳動を行い、増幅サイズを確認する。
3. 増幅産物の精製  
増幅産物がシングルバンドの場合には、フェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いる PCR Clean-up などのタンパク質除去操作を行う。  
増幅産物に複数のバンドがある場合にはアガロースゲルからの回収を行う。
4. 増幅産物の制限酵素切断  
精製を行ったインサート DNA を制限酵素により切断する。
  - 1) 以下の反応液を調製する。

|                              |                 |
|------------------------------|-----------------|
| インサート DNA                    | 0.5 ~ 1 $\mu$ g |
| 10 × K Buffer                | 3 $\mu$ l       |
| <i>Nde</i> I (10 U/ $\mu$ l) | 1 $\mu$ l       |
| <i>Xho</i> I (10 U/ $\mu$ l) | 1 $\mu$ l       |
| 滅菌精製水                        | X $\mu$ l       |
| Total                        | 30 $\mu$ l      |

- 2) 37°C で 1 時間反応させる。
- 3) 反応液をエタノール沈殿などにより精製する。\*
- 4) 電気泳動、吸光度測定 (OD<sub>260</sub>) などにより、回収したフラグメントのサイズと濃度を確認する。

\* : 制限酵素 *Nde* I、*Xho* I はどちらもエタノール沈殿により失活させることができます。エタノール沈殿で完全に失活しない制限酵素を用いた場合にはフェノール処理を行います。また、アガロースゲルからの DNA 回収を行うと、切断によって生じた短い断片を完全に除去することができます。



---

[エタノール沈殿の手順]

1. サンプルの 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) を加え攪拌する。
2. サンプルの 2 ~ 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加えてよく攪拌し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 30 分以上放置する。
3.  $4^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm で 10 ~ 15 分間遠心し、上清を除去する。
4. 70% 冷エタノールを加え、 $4^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm で 5 分間遠心する。
5. 上清を除去し、風乾する。
6. 適当量 (10 ~ 50  $\mu\text{l}$  程度) の TE バッファーに溶解する。

(3) pCold TF DNA の制限酵素切断

増幅断片の消化に用いた制限酵素を用いてコールドショックベクター pCold TF DNA を消化し精製する。精製した DNA は TE バッファーに溶解し、吸光度により DNA 濃度を測定する。

1. 以下の反応液を調製する。

|                                     |                  |
|-------------------------------------|------------------|
| pCold TF DNA                        | 1 $\mu\text{g}$  |
| 10 × K Buffer                       | 3 $\mu\text{l}$  |
| <i>Nde</i> I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) | 1 $\mu\text{l}$  |
| <i>Xho</i> I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) | 1 $\mu\text{l}$  |
| 滅菌精製水                               | X $\mu\text{l}$  |
| Total                               | 30 $\mu\text{l}$ |

2.  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 ~ 2 時間反応させる。
3. 反応液をエタノール沈殿により精製する。\*
4. 適量の TE バッファーに溶解する。
5. 吸光度 ( $\text{OD}_{260}$ ) 測定し、DNA 濃度を計算する。  
※ dsDNA の場合、1  $\text{OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$  より濃度を算出
6. 100 ng/ $\mu\text{l}$  となるように濃度を調整する。

\* : 制限酵素切断後、アルカリホスファターゼ [BAP (製品コード 2120A)、CIAP (製品コード 2250A) など] を用いた脱リン酸反応を行うことができます。ただし、1 種類の制限酵素のみで切断した場合には必ず脱リン酸反応を行ってください。更に、切断により生じた短い断片を完全に除きたい場合にはアガロースゲルからの DNA 回収を推奨します。

---

#### (4) pCold TF DNA へのインサート DNA の挿入と形質転換

##### 1. Ligation 反応

制限酵素消化したベクター断片とインサート DNA を混合し、DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023) を用いて連結する。  
ベクターとインサートの使用量は、モル比で 1:3 ~ 1:10 が望ましい。

1) 氷上で以下の反応液を調製する。

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| 切断処理済み pCold TF 100 ng (約 0.03 pmol) | 1 $\mu$ l  |
| インサート DNA (0.1 ~ 0.3 pmol)           | 4 $\mu$ l  |
| Ligation Mix                         | 5 $\mu$ l  |
| Total                                | 10 $\mu$ l |

2) 16°C で 1 時間反応させる。

##### 2. 形質転換

- 1) *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) を使用直前に氷中で融解する。
- 2) 100  $\mu$ l のコンピテントセルに 10  $\mu$ l の Ligation 反応液を加え、穏やかに攪拌する。
- 3) 氷中で 30 分間放置する。
- 4) 42°C で 45 秒間保温する。
- 5) 氷中で 1 ~ 2 分間放置する。
- 6) あらかじめ 37°C に保温しておいた SOC Medium\* を最終 1 ml になるように加える。
- 7) 37°C で 1 時間振とうする。
- 8) アンピシリンを含む LB プレートに適量をまき、37°C で一晩培養する。

\* : SOC Medium は *E. coli* HST08 Premium Competent Cells に添付されています。

#### (5) プラスミドの調製と確認

得られたコロニーをアンピシリンを含む LB 培地に接種し、一晩培養した培養液からプラスミドを調製する。プラスミドの調製には市販のキットが使用できる。(NucleoSpin Plasmid EasyPure (製品コード 740727.10/.50/.250) など)  
得られたプラスミドを制限酵素 *Nde*I、*Xho*I で切断した後、電気泳動によりインサートの有無を確認する。  
正しいサイズのインサートを持つプラスミドが確認できたら、シーケンス反応によりインサートの塩基配列を確認し、発現用プラスミドとして以降の実験に用いる。  
シーケンスには下記のプライマー配列が利用できる。

|     |             |                         |
|-----|-------------|-------------------------|
| 上流側 | pCold-TF-F1 | 5'-CCACTTTCAACGAGCTGATG |
|     | pCold-TF-F2 | 5'-GCGAAAGTGACTGAAAAAG  |
| 下流側 | pCold-R     | 5'-GGCAGGGATCTTAGATTCTG |

---

## VIII. 参考文献

- 1) Qing G, *et al. Nat Biotechnol.* (2004) **22**: 877-882.
- 2) Gerlind S, *et al. EMBO J.* (1995) **14**: 4939-4948.

## IX. 関連製品

### < pCold ベクターシリーズ >

- pCold™ DNA シリーズ (製品コード 3360 ~ 3364)
- pCold™ ProS2 DNA (製品コード 3371)
- pCold™ GST DNA (製品コード 3372)

### < 組換えタンパク質の可溶性発現に >

- Chaperone Competent Cells BL21 Set (製品コード 9120)
- Chaperone Competent Cells pG-KJE8/BL21 (製品コード 9121)
- Chaperone Competent Cells pGro7/BL21 (製品コード 9122)
- Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21 (製品コード 9124)
- Chaperone Competent Cells pTf16/BL21 (製品コード 9125)
- Chaperone Plasmid Set (製品コード 3340)

### < E. coli コンピテントセル >

- ・発現用
  - TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)
- ・クローニング用
  - E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
  - E. coli DH5  $\alpha$  Competent Cells (製品コード 9057)
  - E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
  - E. coli HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)
  - E. coli DH5  $\alpha$  Electoro-Cells (製品コード 9027)
  - E. coli JM109 Electoro-Cells (製品コード 9022)

### < Hisタグ融合タンパク精製関連試薬 >

- TALON® Metal Affinity Resin (製品コード 635501 ~ 635504/635652/635653)
- HisTALON™ Superflow Cartridge Purification Kit (製品コード 635649/635681)
- HisTALON™ Buffer Set (製品コード 635651)
- His60 Ni Superflow Resin (製品コード 635659 ~ 635664)
- His60 Ni Gravity Columns (製品コード 635657)
- His60 Ni Buffer Set (製品コード 635665)
- ほか各種

### < その他 >

- HRV 3C Protease (製品コード 7360)
- In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 ~ 639650)
- IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (製品コード 9030)
- NucleoSpin Plasmid EasyPure (製品コード 740727.10/.50/.250)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

## X. 注意

1. 本製品は研究目的にのみ使用が許可されています。本製品または、本製品を利用して製造したものを商業目的で使用する際は、ライセンス付のベクター製品をご購入ください。この製品については弊社までお問い合わせください。
  2. 本製品、その構成部分またはその誘導體、ならびにこれらで製造されたものを第三者に譲渡（無料配布、販売）することはできません。但し、本製品の購入により既にコールドショックベクターの研究目的での使用を許可されている第三者に対しては、別途、譲渡を行う者とタカラバイオ（株）の間で譲渡に係る契約を締結した上でこれらを譲渡することができます。
- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
  - タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
  - ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
  - PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、TALON、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。pCold はタカラバイオ株式会社の、HisTALON は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**