

タンパク質発現実験

関連製品ガイド

2014年7月改訂版

タンパク質発現システム

◆大腸菌コールドショック発現システム

可溶性発現

高効率

高純度

◆ブレヴィバチルス発現システム

分泌発現

大量発現

活性型タンパク質を発現

◆ヒト細胞発現ベクター

ヒト型の修飾

大量発現

◆無細胞合成システム(ヒト細胞株由来)

1チューブ&1ステップ反応

高分子合成

◆昆虫細胞発現システム

大量発現

翻訳後プロセッシング

◆植物発現ベクター

アグロバクテリウムを介した植物形質転換用

リフォールディング・可溶化

◆Refolding CA Kit

タンパク質精製樹脂

◆Hisタグ融合タンパク質精製

タンパク質定量試薬

◆BCA法／Bradford法



タンパク質発現システム

大腸菌コールドショック発現システム pCold™ ベクターシリーズ

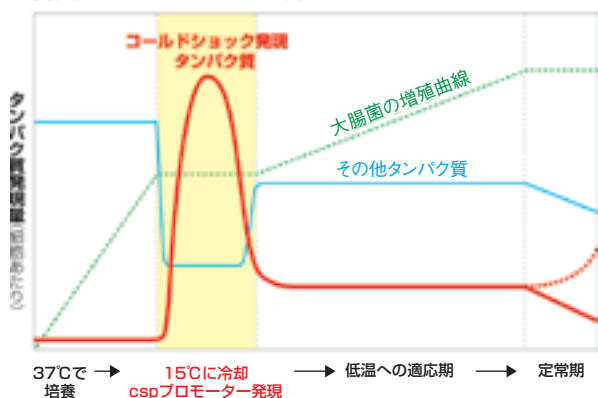
- ◆ 高い発現効率
- ◆ 可溶性発現



コールドショック発現系とは…

37℃で培養している大腸菌の培養温度を低温にシフトさせると生育は一時的に停止し、大部分の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タンパク質 (CSPs) は特異的に増加します。このメカニズムに注目し、タカラバイオと米国 New Jersey 医科歯科大学井上正順教授によって共同で開発されたのが**コールドショック発現ベクター「pCold™ シリーズ」**です。
従来の大腸菌発現系と比較して目的のタンパク質を効率的かつ高純度で得ることができます。

大腸菌のコールドショック応答



コールドショック発現の標準プロトコール

pCold™ ベクター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。



発現用プラスミドで宿主大腸菌を形質転換し、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。



50～100 µg/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。



培養液の OD₆₀₀ が 0.4～0.5 となった時点で培養液を 15℃ に急速冷却し、30 分間放置する。



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。



SDS-PAGE や活性測定により発現を確認する。

※最適な培養・誘導条件 (培地、培養温度、通気攪拌条件、誘導のタイミング、誘導後の培養時間など) は目的タンパク質によって異なりますので、必要に応じて条件検討を行ってください。

特 長

- 培養液を 15℃ に冷却するだけで効率よく発現を誘導
- 従来の大腸菌発現系に比べ、生産効率と可溶性発現が向上
- 幅広い大腸菌ホストで使用可能
- 可溶化タグの種類や His タグの有無を目的に合わせて選択可能

【製品ラインナップ】 目的に合わせて、**可溶化タグの種類、His タグ配列の有無**などを選択してください。

製品名	GenBank Accession No.	可溶化タグ	His タグ	タグ切断に使用できる酵素	翻訳促進配列 (TEE)	容 量	製品コード	価格 (税別)
pCold™ GST DNA	—	GST	●	Factor Xa* ¹ 、HRV 3C Protease* ²	●	25 µg	3372	¥100,000
pCold™ ProS2 DNA	—	ProS2 (Protein S)	●	HRV 3C Protease* ² 、Thrombin* ² 、Factor Xa* ²	●	25 µg	3371	¥100,000
pCold™ TF DNA	AB213654	TF (Trigger Factor)	●	HRV 3C Protease* ² 、Thrombin* ² 、Factor Xa* ²	●	25 µg	3365	¥105,000
pCold™ I DNA	AB186388	—	●	Factor Xa* ¹	●	25 µg	3361	¥53,000
pCold™ II DNA	AB186389	—	●	—	●	25 µg	3362	¥53,000
pCold™ III DNA	AB186390	—	—	—	●	25 µg	3363	¥53,000
pCold™ IV DNA	AB186391	—	—	—	—	25 µg	3364	¥53,000
pCold™ Vector Set						pCold™ I ~ IV DNA 各 5 µg のセット	3360	¥110,000

*1 : His タグ配列を除去 *2 : His タグおよび可溶化タグ配列を除去

★使用上の注意

pCold ベクターは New Jersey 医科歯科大学よりライセンスを受け、タカラバイオ (株) が製造、販売しています。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、別途、商業利用契約を締結します。(本製品は、ご購入の際にライセンス同意書の提出が必要です。)

pCold™ GST DNA

(製品コード 3372)

Pick up!

特長

- 発現条件の至適化なしでも高い可溶性率を実現
- GSTアフィニティー精製、Hisタグ精製、タグ切断が可能

実験例

■ GST-envZB融合タンパク質(約46.3 kDa)の発現～精製

【方法】

pCold GST DNAにenvZB遺伝子配列(162aa)を挿入し、TaKaRa Competent Cell BL21 (製品コード 9126)に導入後、発現誘導を行った。菌体破砕液を可溶性画分と不溶性画分に分け、可溶性画分をGlutathione-Superflow Resin(製品コード 635607)を用いて精製した。溶出は、33 mM還元型グルタチオンを含む50 mM Tris-HCl, pH 8.0を用いて行い、得られた各画分についてSDS-PAGE/CBB染色により分析した。

M: Protein Molecular Weight Marker (Broad) (製品コード 3452)

T: 菌体破砕液

S: 菌体破砕液可溶性画分

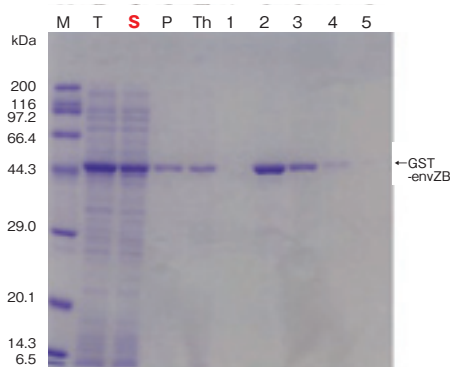
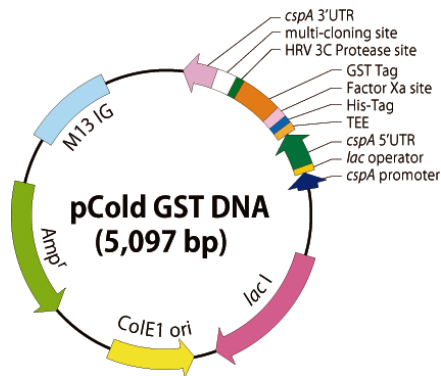
P: 菌体破砕液不溶性画分

Th: Glutathione-Superflow 非吸着画分

1-5: Glutathione-Superflow 溶出画分1～5

【結果】

GST融合タンパク質が高発現し、大部分が可溶性画分に得られた。さらに、アフィニティー精製により高純度な産物が得られた。



分子シャペロンによるタンパク質可溶化発現

Chaperone Competent Cells および Chaperone Plasmid Set

タンパク質の折りたたみを介助する分子シャペロンを目的タンパク質と共発現させることにより、発現タンパク質の可溶化を促進できます。コールドショック発現ベクターシリーズと組み合わせると一層効果的です。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Chaperone Competent Cells BL21 Set	100 µl×3×6種類	9120	¥68,300
Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21	100 µl×10	9121	¥35,700
Chaperone Competent Cell pGro7/BL21	100 µl×10	9122	¥35,700
Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21	100 µl×10	9123	¥34,000
Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21	100 µl×10	9124	¥35,700
Chaperone Competent Cell pTf16/BL21	100 µl×10	9125	¥35,700
TaKaRa Competent Cell BL21	100 µl×10	9126	¥33,600
Chaperone Plasmid Set	1キット	3340	¥23,000

※ Chaperone Competent Cells各種は、Chaperone Plasmid Setに含まれる5種類のシャペロンプラスミドでそれぞれ形質転換した大腸菌BL21株のコンピテントセルです。

終売

目的タンパク質のみを効率よく誘導発現／同位体標識に最適

Single Protein Production System (SPP System™)

SPP System™では、1本鎖RNAの特定の配列(ACA)を認識して切断するMazF (mRNA Interferase)を利用し、宿主由来のタンパク質発現を抑制して目的タンパク質のみを効率よく発現させることができます。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SPP System™ I	1 Set	3367	¥65,000
SPP System™ II	1 Set	3368	¥65,000
SPP System™ III	1 Set	3369	¥65,000
SPP System™ IV	1 Set	3370	¥65,000
SPP System™ Set	1 Set	3366	¥130,000

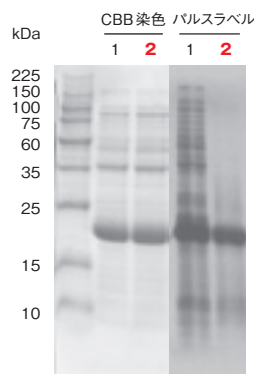
【製品内容】

SPP System用コールドショック発現ベクター I～IVのいずれか(20 µg)

MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド(0.5 µg)

ポジティブコントロールベクター(0.2 µg)

※ SPP System Setには、SPP System用コールドショック発現ベクター I～IV(各20 µg)が含まれます。



1: MazF 非共役発現
2: MazF 共役発現

目的タンパク質
以外の誘導発現を
シャットアウト!

タンパク質発現システム

ブレヴィバチルス発現システム

Brevibacillus Expression System

◆ 分泌発現
◆ 活性保持



Brevibacillus 発現システムは高効率分泌発現を特長とするタンパク質生産能に優れたシステムです。

本菌はグラム陽性の細菌で、タンパク質を大量に分泌生産する特長を有しています。

● 活性型のタンパク質を分泌生産

各種生物由来の酵素やサイトカイン類を効率よく生産でき(右図)、これらが活性を示すことも確認されています。

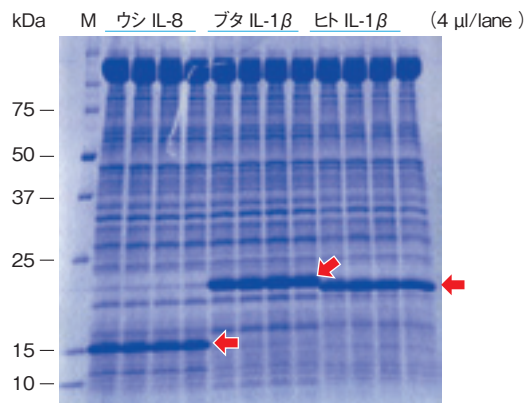
● プロテアーゼによる分解を防止

宿主株はプロテアーゼ遺伝子をノックアウトしてあるため、目的タンパク質はほとんど分解を受けずに培養上清中に分泌生産されます。

● 培養・取扱いが容易

宿主株は一般的な培養基材で簡単に培養できます。孢子形成遺伝子を破壊しているので、使用後の殺菌も容易です。

pNY326 によるサイトカイン類の生産



各サイトカイン遺伝子を pNY326 DNA に挿入し、Brevibacillus を形質転換した。得られたコロニーからランダムに選んだ 4 クローンについて、それぞれ試験管スケールで培養を行った。培養上清を SDS-PAGE 分析した結果、高生産(約 200 mg/L)が確認され、コロニー間の生産量に差は見られなかった。

■ 各種分泌タンパク質の発現量

本システムを用いて酵素、抗原、抗体、サイトカインなどで高い発現レベルを達成しています。下表にこれまでの成功例の一部を示しました。バクテリア、古細菌由来のタンパク質のほか、真核生物由来のタンパク質の生産実績もあり、由来を問わず高い発現量を示しています。

タンパク質	起源	発現量 (g/L)	タンパク質	起源	発現量 (g/L)
α-アミラーゼ	<i>B. licheniformis</i>	3.7	IFN-γ	ニワトリ	0.5
Sphingomyelinase	<i>B. cereus</i>	3.0	TNF-α	ウシ	0.4
CGTase	<i>B. macerans</i>	5.0	GM-CSF	ウシ	0.2
超耐熱性プロテアーゼ	<i>A. pernix</i>	0.1	GH	ヒラメ	0.2
超耐熱性ヌクレアーゼ	<i>P. horikoshii</i>	0.7	表層抗原	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9
PDI	ヒト	1.0	VHH (抗NDOM)	ラマ	3.0
EGF	ヒト	7.0	scFv (抗fluorescein)	マウス	0.2
NGF	マウス	0.2	Fab (抗erbB)	マウス	0.4

【製品ラインナップ】

製品名	概要	プロモーター	Hisタグ	タグ切断	容量	製品コード	価格(税別)
Brevibacillus Expression System II	分泌発現系: pNY326 ベクター、pNCMO2 ベクター、コンピテントセルのセット	P5 P2(強力)	—	—	1 Kit	HB200	¥100,000
pNY326 DNA	Brevibacillus 内で複製するプラスミド	P5	—	—	10 μg	HB111	¥35,000
pNCMO2 DNA	Brevibacillus と大腸菌のシャトルベクター	P2(強力)	—	—	10 μg	HB112	¥35,000
pNY326-BLA DNA	コントロールベクター	P5	—	—	1 μg	HB114	¥20,000
pNC-HisT DNA	Brevibacillus と大腸菌のシャトルベクター。His タグ融合タンパク質を分泌発現可能	P2(強力)	●	Thrombin	10 μg	HB121	¥35,000
pNC-HisF DNA			●	Factor Xa	10 μg	HB122	¥35,000
pNC-HisE DNA			●	Enterokinase	10 μg	HB123	¥35,000
Brevibacillus Competent Cells	<i>B. choshinensis</i> SP3 株のコンピテントセル				100 μl × 10	HB116	¥30,000
pNI DNA	Brevibacillus 菌体内発現ベクター	P2(強力)	—	—	10 μg	HB131	¥35,000
pNI-His DNA			●	Enterokinase	10 μg	HB132	¥35,000
BIC System	BIC 法 (Brevibacillus In vivo Cloning 法) を採用した高効率分泌発現システム。4 種類のベクター (pBIC DNA Set)、コントロールインサート、コンピテントセルのセット	P22	●	Enterokinase	1 Kit	HB300	¥100,000
pBIC DNA Set	分泌シグナルの異なる 4 種類の直鎖状ベクターのセット。分泌シグナルを最適化でき、発現成功率の向上・生産量の増大を実現	P22	●	Enterokinase	1 Set	HB310	¥80,000

★使用上の注意

ブレヴィバチルス発現システム関連製品は、ヒゲタ醤油株式会社が開発・製造し、タカラバイオ株式会社が販売しています。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には、別途、商業利用契約の締結が必要となります。本製品、その構成部分またはその誘導体、ならびにこれらで製造されたものを第三者に譲渡(無料配付、販売)することは許可されておりません。(本製品は、ご購入の際にライセンス同意書の提出が必要です。)

BIC System

(製品コード HB300)

Pick up!

本製品は、BIC法 (Brevibacillus In vivo Cloning 法) を採用した高効率分泌発現システムです。

特長

● PCR 増幅後は混ぜるだけの抜群の使いやすさ

両端にベクターと相同の 15 bp の配列を付加した目的遺伝子増幅産物と直鎖状の pBIC ベクターを混合し、プレビバチルスコンピテントセルに導入するだけで発現プラスミドを構築できます。

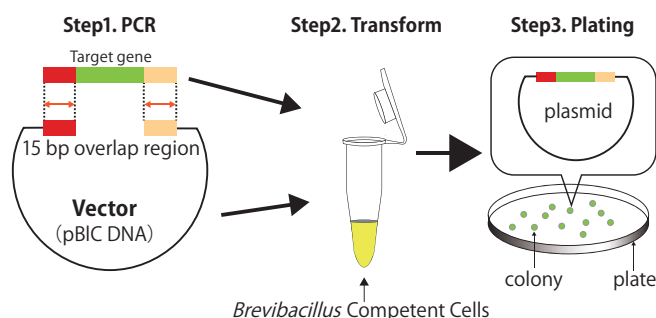
● 実績ある 4 つの分泌シグナルを採用

分泌シグナルの最適化により、発現成功率が大幅に向上し、従来よりも生産量が増大します。

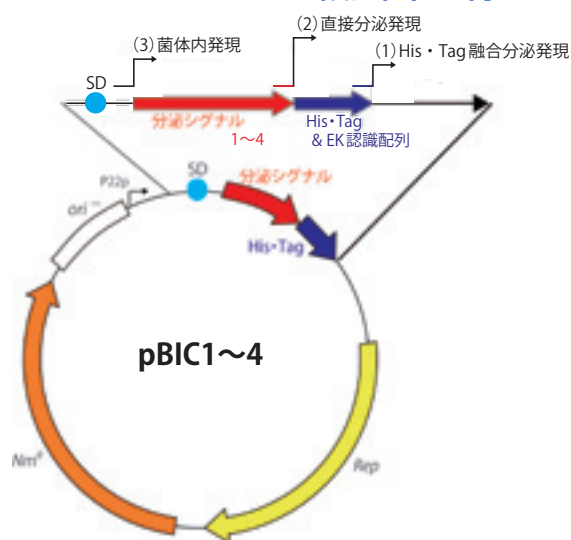
● 発現様式の選択も自在

フォワードプライマーの設定位置を変えることで、目的遺伝子のベクターへの挿入位置を変更でき、以下のように (1) His タグ融合型分泌発現、(2) 直接分泌発現、(3) 菌体内発現を選択することができます。

BIC 法の概要



pBIC ベクター上のプライマー設定位置と得られる発現様式



ベクターの (1) ~ (3) の各位置に相同な 15 塩基を目的遺伝子増幅用プライマーの 5' 側に付加して目的遺伝子を増幅し、BIC 法で発現ベクターを構築すると・・・

(1) His タグ融合分泌発現

発現ベクターでは目的遺伝子の N 末端に分泌シグナルと His タグ配列が挿入されています。精製後に His タグを除去するため、下流にはエンテロキナーゼ認識配列も含まれています。

(2) 直接分泌発現

分泌シグナルの直下に目的遺伝子が挿入された発現ベクターが得られます。

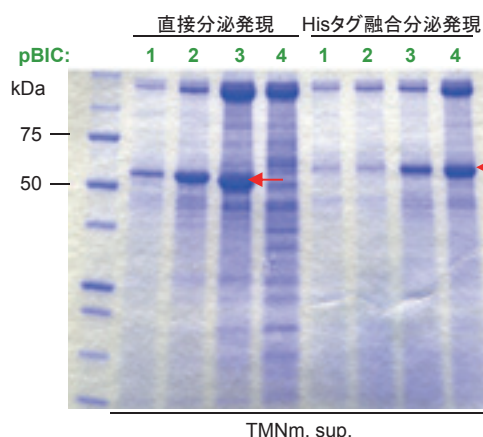
(3) 菌体内発現

分泌シグナルを持たない発現ベクターが構築されます。プレビバチルス発現系は分泌発現だけでなく、菌体内発現の実績もありますので、大腸菌で不溶化してしまう場合などにお試しください。

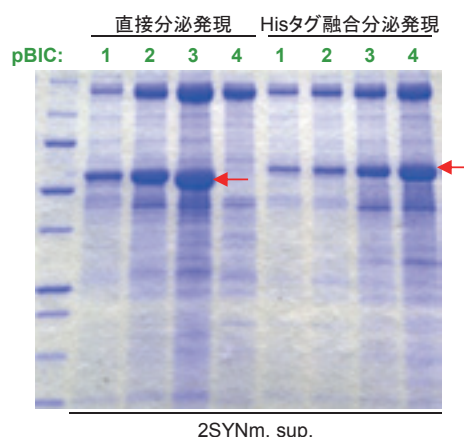
実験例

■ pBIC ベクター DNA を用いたヒト PDI (protein disulfide isomerase) の分泌発現

pBIC DNA Set (製品コード HB310) に含まれる 4 種類のベクターそれぞれと PDI 遺伝子配列を混合し、BIC 法による反応を行った。得られた形質転換体を 3 ml TMNm 培地と 2SYNm 培地に植菌し、30℃、120 rpm、48 時間振とう培養を行った。培養上清を SDS-PAGE により解析した結果、分泌シグナルによって大きく生産性が異なり、pBIC3 (直接分泌発現: His タグなし) では 1 g/L を超える高生産が確認された。His タグの有無によって最適な分泌シグナルや発現量が異なることも確認された。



TMNm, sup.



2SYNm, sup.

ヒト細胞(HEK293細胞)発現ベクター pHEK293 Ultra Expression Vector

NEW

- ◆ 大量発現
- ◆ ヒト型の修飾



特長

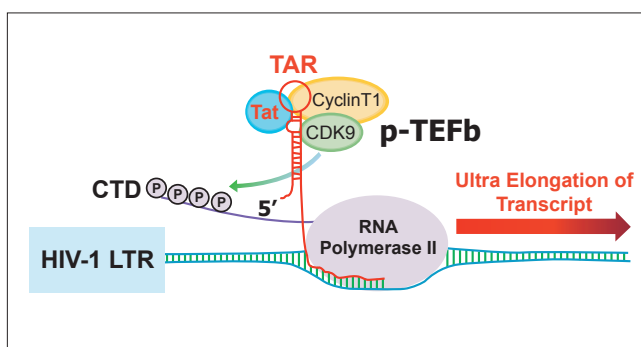
- HEK293系細胞での一過性高発現用ベクター(⇒高発現の原理をご覧ください)
- 従来のCMVプロモーターを用いた遺伝子発現と比較して最大10倍量のタンパク質生産が可能
- 選べる2種類の製品ラインナップ
 - ・ 簡便な高発現には、1ベクタータイプ(I)がお勧め
 - ・ より高発現を望むなら、プラスミドの混合比率を最適化できる2ベクタータイプ(II)がお勧め
- 特に抗体医薬やバイオ医薬品の開発段階などのスクリーニング工程への応用に最適！

	製品名	製品内容	容量	製品コード	価格(税別)	備考
簡便に高発現可能な1ベクタータイプ	pHEK293 Ultra Expression Vector I	・ pHEK293 Ultra Expression Vector I	20 µg	3390	¥105,000	ラ 営
最適化して高発現可能な2ベクタータイプ	pHEK293 Ultra Expression Vector II	・ pHEK293 Ultra Expression Vector II ・ pHEK293 Enhancer Vector	各 20 µg	3392	¥105,000	ラ 営

ラ 本製品のご購入に際してはライセンス確認書(同意書)の提出が必要です。 営 営利施設のユーザー様はご購入前にライセンスの取得が必要です。詳細は弊社ウェブサイトでご確認ください。

高発現の原理

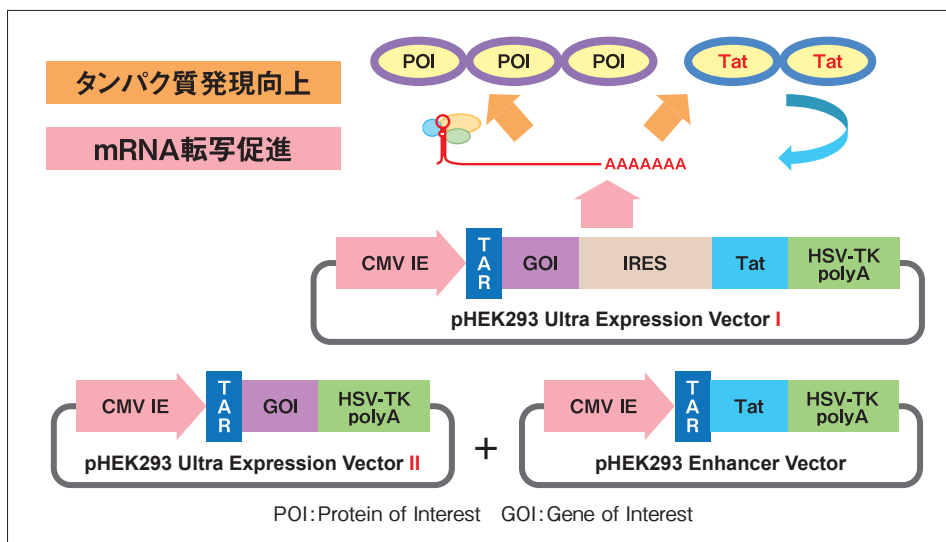
本製品は、エイズウイルスゲノム由来のRNA配列「TAR」と、転写活性化因子である「Tat」による高発現システム(TAR-Tat発現システム)を利用しています(右図)。TAR-Tat発現システムによるHIV-LTRからの転写活性化は、TatがウイルスRNAの5'末端に形成されるTARと呼ばれるループ構造に結合し、RNA polymerase IIをリン酸化することで行われます。本製品はこの原理を利用して、目的タンパク質発現用ベクター/Tat発現用ベクターの5'側非翻訳領域にTARをコードする配列を付加しています。これにより、Tatタンパク質の効率的な発現が可能となり、目的タンパク質の発現量を大幅に向上させることができます(特許出願中)。



◆ pHEK293 Ultra Expression Vectorを用いた目的タンパク質の発現

pHEK293 Ultra Expression Vector I (製品コード 3390)を使用すると、1ベクターで目的タンパク質発現とTat発現が同時にでき、簡便です。

pHEK293 Ultra Expression Vector II (製品コード 3392)を用いると、目的タンパク質発現とTat発現を別個のベクターにより行うため、目的タンパク質にあわせてトランスフェクションする2種類のプラスミド比率を最適化でき、より効率的な目的タンパク質の生産が可能になります。



■ 蛍光タンパク質の高発現効果

【方法】

pHEK293 Ultra Expression Vector I/II、pBApo-CMV DNA (製品コード 3242)、A社タンパク質高発現ベクター各々に、蛍光タンパク質 AcGFP1 遺伝子配列を挿入して発現プラスミドを構築した。構築プラスミドを接着性 HEK293T 細胞、浮遊性 HEK293 細胞にトランスフェクションし (トランスフェクションは各製品のプロトコールに従った)、2 日後に顕微鏡観察 (接着性 HEK293T 細胞のみ) およびフローサイトメーターで蛍光強度の観察を行った。

接着性 HEK293T 細胞

12 ウェル細胞培養用プレートに培養、TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700) を用いて導入

1. pBApo-CMV / AcGFP1 (1 µg)
2. Vector I / AcGFP1 (1 µg)
3. Vector II / AcGFP1 (1 µg) + Enhancer Vector (0.008 µg)
4. Vector II / AcGFP1 (1 µg) + Enhancer Vector (0.2 µg)
5. A 社高発現 Vector / AcGFP1 (1 µg)

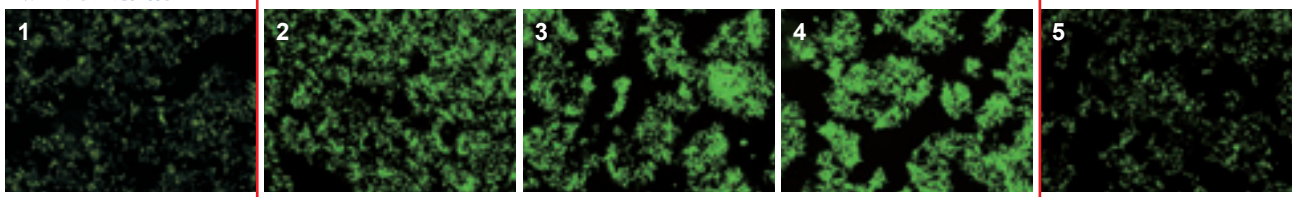
浮遊性 HEK293 細胞

125 ml 三角フラスコに培養、FreeStyle 293 Expression System (Life Technologies) の細胞・試薬を使用

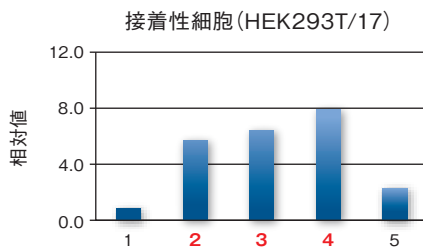
6. pBApo-CMV / AcGFP1 (30 µg)
7. Vector I / AcGFP1 (30 µg)
8. Vector II / AcGFP1 (30 µg) + Enhancer Vector (0.24 µg)
9. Vector II / AcGFP1 (30 µg) + Enhancer Vector (6 µg)
10. A 社高発現 Vector / AcGFP1 (30 µg)

【結果】

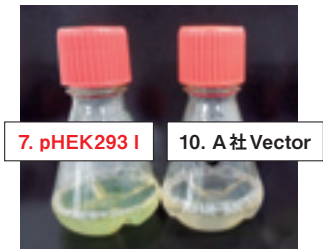
蛍光顕微鏡画像



AcGFP 陽性細胞の蛍光強度



浮遊性細胞培養写真



本製品を用いることで、一般的な CMV プロモーターを利用した発現ベクター (pBApo-CMV DNA) と比較して **5~11 倍**、A 社製高発現ベクターと比較して **2~7 倍** の蛍光強度の増加が認められた。

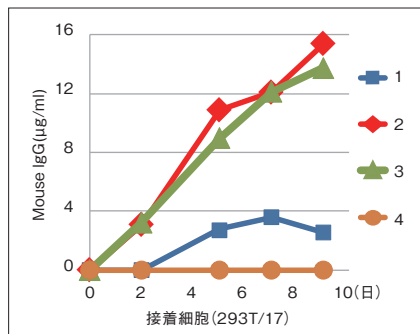
本製品を用いた試験では、**肉眼でも培地が緑色になることを確認**できた。

(弊社比較データ)

■ マウス抗ヒト IgG 抗体の高発現効果

pHEK293 Ultra Expression Vector II、pBApo-CMV DNA に、マウス抗ヒト IgG 抗体の重鎖、軽鎖の遺伝子配列を挿入してそれぞれの発現プラスミドを構築した。構築プラスミドを接着性 HEK293T 細胞 (12 ウェル細胞培養用プレートで培養) にトランスフェクションし、2、5、7、9 日後に培養上清を回収して Mouse IgG EIA Kit (販売終了) による Mouse IgG の定量を行った。

本製品を使用することで、一般的な CMV プロモーターを利用した発現ベクター (pBApo-CMV DNA) と比較して **5~7 倍** の Mouse IgG 発現量の向上が認められた。



使用したプラスミドと使用量 (HC : Heavy Chain, LC : Light Chain)

1. pBApo-CMV / -HC & -LC (各 0.5 µg)
2. Vector II / -HC & -LC (各 0.5 µg) + Enhancer Vector (0.008 µg)
3. Vector II / -HC & -LC (各 0.5 µg) + Enhancer Vector (0.2 µg)
4. Negative Control

★上記の実験例の詳細や他のアプリケーションもウェブサイトでご紹介しています。ぜひご覧ください。

【関連製品】

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
NucleoBond® Xtra Midi Plus (※1)	構築プラスミドを高純度 (トランスフェクショングレード)、高収量で精製	10 回	740412.10	¥16,800
TransIT®-293 Transfection Reagent (※2)	HEK293 用トランスフェクション試薬	1 ml	MIR2700	¥60,000
pBApo-CMV DNA	哺乳動物細胞発現用の基本ベクター	20 µg	3242	¥38,000

※1 はマッハライナーゲル社の、※2 は Mirus 社の製品です。

タンパク質発現システム

無細胞タンパク質合成システム

Human Cell-Free Protein Expression System

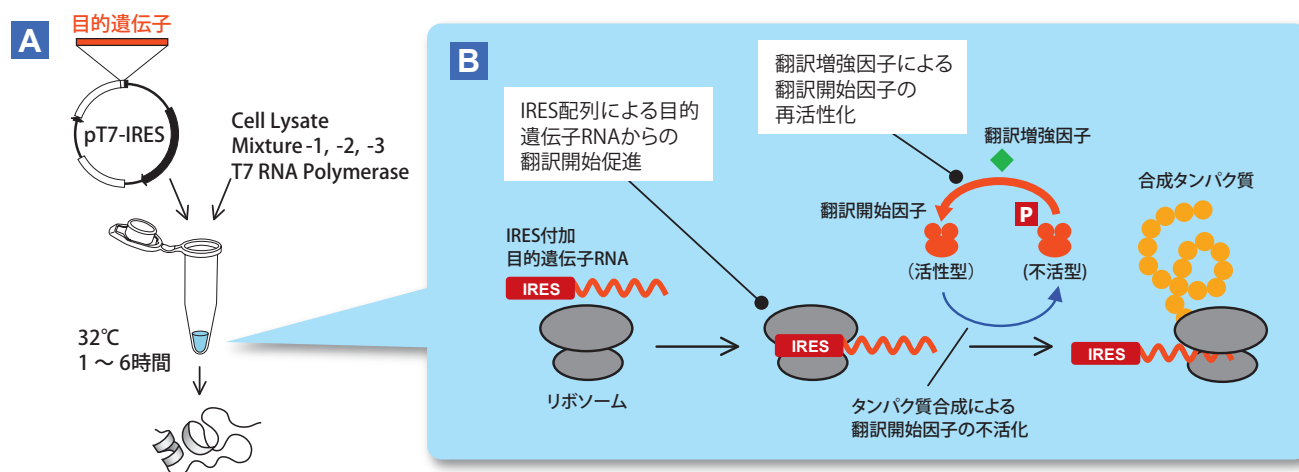
- ◆ 宿主不要(培養不要)
- ◆ シングルチューブ内で簡便に合成



特長

- ヒト細胞株由来の細胞抽出液を利用した無細胞タンパク質合成システム
- IRES 配列の利用、翻訳増強因子の効果により合成レベルが向上
- 簡便なシングルチューブ反応を採用
- 150 kDaを超える高分子量タンパク質の合成にも応用可能
- 透析タイプの **Maxi System** を使用すれば、合成量がさらにアップ!

Human Cell-Free Protein Expression Systemによるタンパク質合成の概略



A 目的遺伝子をクローニングしたpT7-IRES Vectorを、反応液 [Cell Lysates、T7 RNA Polymerase、Mixture-1、Mixture-2 (翻訳増強因子)、Mixture-3 (ATP 等やアミノ酸類)] に添加するだけで、mRNA への転写からタンパク質合成までをシングルチューブ内でワンステップで行うことができます。

B IRES 配列により翻訳が速やかに開始されます。さらに、翻訳増強因子がタンパク質合成の進行とともに不活性化する翻訳開始因子を再活性化し、翻訳レベルの低下を抑えて高い翻訳効率を維持します。

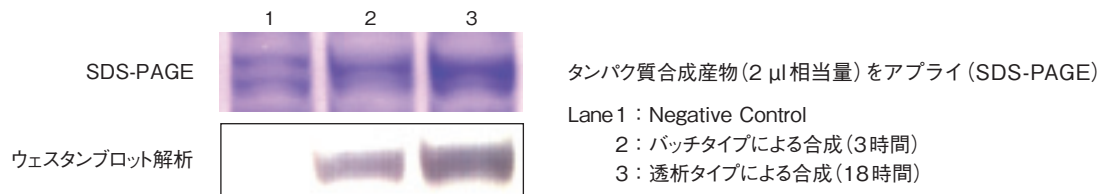
実験例

■ 本システムを使用した Human Ago2 (約80 kDa)の大量発現

【方法】

上記製品のバッチタイプ(製品コード 3281)と透析タイプ(製品コード 3285)で Human Ago2 の合成を行った。その後 SDS-PAGE、および Anti-Human Ago2, Monoclonal (Clone 1B1) (製品コード M211) を用いたウェスタンブロット(発色法)により、目的タンパク質を検出した。

【結果】



【製品ラインナップ】

製品名	概要	プロモーター	精製タグ	タグ切断	容量	製品コード	価格(税別)
Human Cell-Free Protein Expression System	pT7-IRES ベクター、T7 RNA Polymerase、Cell Lysate、Mixture-1、-2、-3 を含む試薬キット	T7	—	—	10 回	3281	¥38,000
Human Cell-Free Protein Expression Maxi System	透析しながらタンパク質合成することで合成量をアップ	T7	—	—	5 回	3285	¥125,000
pT7-IRES His-N DNA	目的タンパク質にタグを融合発現するベクター	T7	His	Factor Xa	20 μ g	3290	¥36,000
pT7-IRES His-C DNA		T7	His		20 μ g	3291	¥36,000
pT7-IRES Myc-N DNA		T7	Myc		20 μ g	3292	¥36,000

終売

タンパク質発現システム

昆虫細胞発現システム

BacPAK™ バキュロウイルス発現システム

- ◆ 大量発現
- ◆ 翻訳後修飾



クロンテックのBacPAK™ Baculovirus Expression Systemでは、昆虫宿主細胞を使用して極めて高レベルの組換えタンパク質発現を行うことができます。大腸菌発現では困難な、大きなサイズのタンパク質や翻訳後修飾を要するタンパク質の発現などに適しています。

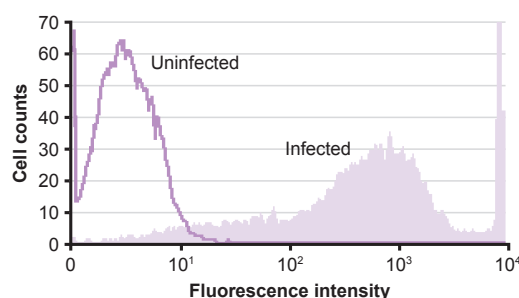
特 長

- 高収量(培地中のタンパク質濃度;1~500 mg/L)
- 翻訳後修飾やプロセシングが起こることで、天然型に近いタンパク質を取得可能
- 哺乳動物細胞に近い糖鎖修飾(N-グリコシレーション)
- 夾雑タンパク質やタンパク質分解酵素が比較的少なく精製が容易

実験例

■ 組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞でのAcGFP1 蛍光タンパク質の発現

N末端6×HNタグつきLiving Colors 蛍光タンパク質 AcGFP1を発現する組換えバキュロウイルスを作製した。ウイルスに感染した Sf9 細胞は高レベルの AcGFP1を発現し、極めて強い蛍光を示すようになった。フローサイトメトリーによる分析から、感染細胞の蛍光強度の平均は、非感染コントロールと比較して約440倍高いことがわかった。



製 品 名	概 要	容 量	製品コード	価格(税別)
BacPAK™ Baculovirus Expression System	バキュロウイルス発現システム	1 Set	631402	¥144,000
BacPAK™ Baculovirus Rapid Titer Kit	免疫学的測定法により、バキュロウイルス力価を48時間で測定	5回	631406	¥98,000
BacPAK™ qPCR Titration Kit	qPCR法により、バキュロウイルス力価(ゲノムDNAコピー数)を約4時間で測定	200回	631414	¥86,000

リフォールディング・可溶化

封入体リフォールディングの条件検討にRefolding CA Kit

キットの内容(25サンプル用)

8 M 塩酸グアニジン	1 ml×2
4 M ジチオスレイトール(DTT)	50 µl
1% Tween 40	1 ml×2
1% Tween 60	1 ml×2
1% CTAB	1 ml×2
1% SB3-14	1 ml×2
200 mM DL-シスチン	0.75 ml×2
3% シクロアミロース(CA)	1.6 ml×7

組換えタンパク質を発現させた場合、封入体(inclusion body)となり不溶化することがしばしばあります。

本キットは、不溶化したタンパク質の活性を回復させるために、変性剤(塩酸グアニジン、DTT)で封入体をアンフォールド後、以下のリフォールディング工程の条件検討に使用できます。

- ①界面活性剤を加えて変性剤を希釈し、タンパク質の凝集を防ぐ。
- ②高重合度シクロアミロース(CA)により界面活性剤を除去し、リフォールディング(再生)を行う。

シクロアミロース(CA)

グルコースが環状にα-1,4-結合した多糖。この高重合度シクロアミロースの包接能を利用し、タンパク質・界面活性剤複合体から界面活性剤を徐々に除去していくことが可能で、活性を有する正しい高次構造にタンパク質をリフォールディングさせることができる。

終売

~~Refolding CA Kit~~

~~封入体を形成した組換えタンパク質を効率よくリフォールディングする条件を検討~~

~~25回~~

~~7350~~

~~¥28,000~~

終売

~~Refolding CA Large Kit~~

~~条件検討後のスケールアップ操作に~~

~~1 Kit~~

~~7351~~

~~¥162,000~~

終売

~~Cycloamylose Protein Refolding Reagent~~

~~シクロアミロース(CA)別売品~~

~~10 g~~

~~7352~~

~~お問い合わせ~~

~~20 g~~

~~7353~~

~~ください~~

本製品は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構、江崎グリコ株式会社よりライセンスを受け、タカラバイオ株式会社が製造販売しています。

植物形質転換用高発現ベクター(改良版) pRI 201 DNAシリーズ

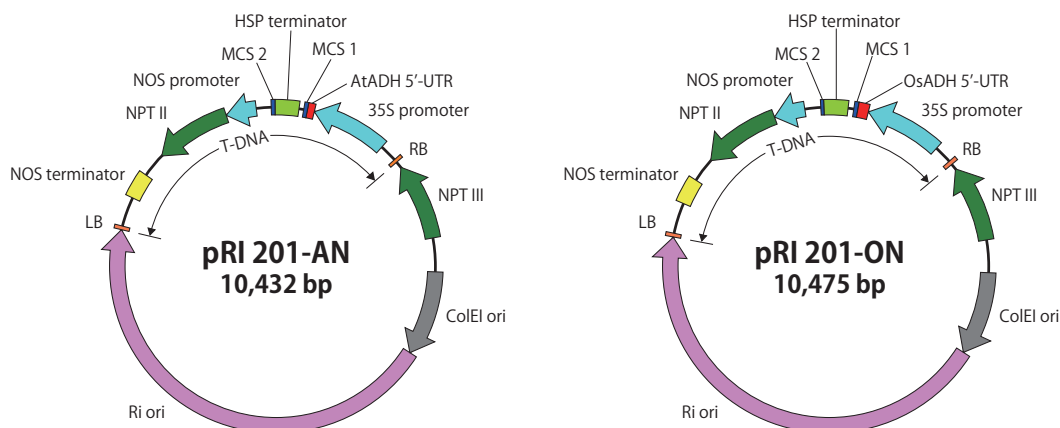
◆ 植物体での発現



タカラバイオでは植物関連製品として、アグロバクテリウムを介した植物形質転換用のユニークなベクターをご用意しています。シロイヌナズナ、トマト、タバコなどの双子葉植物(pRI 201-AN DNA、pRI 201-AN-GUS DNAを使用)、あるいはイネなどの単子葉植物(pRI 201-ON DNA、pRI 201-ON-GUS DNAを使用)の形質転換、および外来遺伝子の高発現を実現します。

特 長

- Ri プラスミド由来の変異型複製起点(Ri ori)を持つバイナリーベクター
- 高コピー型の大腸菌oriを持ち、大腸菌での複製も容易
- 定評のあるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを搭載
- ADH(Alcohol Dehydrogenase)遺伝子由来の5'非翻訳領域(5'-UTR)(翻訳エンハンサー領域)の採用で、植物体で目的遺伝子産物の高発現を実現
- HSP(Heat Shock Protein)遺伝子由来 terminator の搭載で、より高発現が可能



※本ベクターは、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学より技術および試料の提供を受けて、タカラバイオ(株)が製品化したしました。

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
pRI 201-AN DNA	双子葉植物用：HSP terminatorにより、従来品のpRI 101シリーズに比べて植物体での目的遺伝子産物の高発現が可能	10 µg	3264	¥55,000
pRI 201-ON DNA	単子葉植物用：HSP terminatorにより、従来品のpRI 101シリーズに比べて植物体での目的遺伝子産物の高発現が可能	10 µg	3265	¥55,000
pRI 201-AN-GUS DNA	形質転換時のポジティブコントロールとして汎用されるGUS(β-glucuronidase)遺伝子をpRI 201-ANに組み込んだベクター	10 µg	3266	¥55,000
pRI 201-ON-GUS DNA	形質転換時のポジティブコントロールとして汎用されるGUS(β-glucuronidase)遺伝子をpRI 201-ONに組み込んだベクター	10 µg	3267	¥55,000

※その他のpRIベクター製品については弊社ウェブカタログをご覧ください。

～使用例も増えています～

pRI 201-ANと *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 MP90を組み合わせて *Nicotiana benthamiana* 葉でのタンパク質発現に使用

S. Kimura, T. Kawarazaki, H. Nibori, M. Michikawa, A. Imai, H. Kaya, and K. Kuchitsu (2013): The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of Arabidopsis NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *J. Biochem.*, **153**, 191-195.

pRI 201-ANと *Agrobacterium tumefaciens* GV3101を組み合わせてシロイヌナズナの形質転換に使用

T. Negishi, K. Oshima, M. Hattori, M. Kanai, S. Mano, M. Nishimura and K. Yoshida (2012): Tonoplast- and Plasma Membrane-Localized Aquaporin-Family Transporters in Blue Hydrangea Sepals of Aluminum Hyperaccumulating Plant. *PLoS One*, **7** (8), e43189.

【関連製品】

形質転換植物用アグロバクテリウムコンピテントセル

- バイナリーベクター法に使用されるベクターDNAを菌体内に導入するためのエレクトロポレーション用
- 得られた形質転換 *A. tumefaciens* は様々な植物の感染実験(形質転換実験)に使用可能

製品名	容量	製品内容	形質転換効率	製品コード	価格(税別)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 Electro-Cells	1 Set	Electro-Cells 40 µl×5 pRI 900 DNA (1 ng/µl) 10 µl SOC 培地 1 ml×10	>5×10 ⁶ /µg pRI 900 DNA	9115	¥33,600

His タグ融合タンパク質精製樹脂・カラム

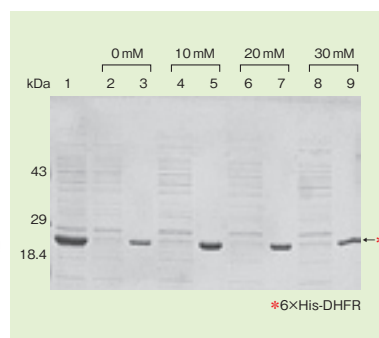
高純度精製に適した Co^{2+} レジン

TALON® Resin

- ヒスチジン繰り返し配列に特異性が高い Co^{2+} を使用
- 4 配位結合キレート剤で Co^{2+} を強固に固定
- 多様な精製条件下で使用可能
6M グアニジン変性条件でも収量を維持します。



TALON® Resin は目的タンパク質のみをキャッチ



N 末端 6 × His タグ融合マウス DHFR (19.5 kDa) を発現させた大腸菌ライセート 2 ml を、**TALON® Resin** を用いて、種々の濃度の β -ME 存在下で自然落下法にて精製した。

偶数レーン：非吸着画分 (20 μ l)
奇数レーン：溶出画分 (5 μ l)

目的タンパク質のみを高純度に精製！

製品名	容量	製品コード	価格(税別)	レジン	充填カラム／カートリッジ	抽出／洗浄／溶出 バッファー
TALON® Metal Affinity Resin ※	25 ml	635502	¥53,000	●	—	—
TALON® Superflow™ Metal Affinity Resin ※	25 ml	635506	¥66,000	●	—	—
HisTALON™ Gravity Columns	1 ml×5	635655	¥18,000	—	●	—
HisTALON™ Gravity Column Purification Kit	1 Kit	635654	¥47,000	—	●	●
HisTALON™ Superflow™ Cartridges ※	1 ml×5	635650	¥35,000	—	●	—
	5 ml×5	635682	¥106,000	—	●	—
HisTALON™ Superflow™ Cartridge Purification Kit	1 ml×5 (20 回)	635649	¥70,000	—	●	●
	5 ml×5 (5 回)	635681	¥127,000	—	●	●

※容量が異なる製品もラインナップしています。詳しくは弊社ウェブサイトをご覧ください。

高収量精製に適した Ni^{2+} レジン

His60 Ni Superflow™ Resin

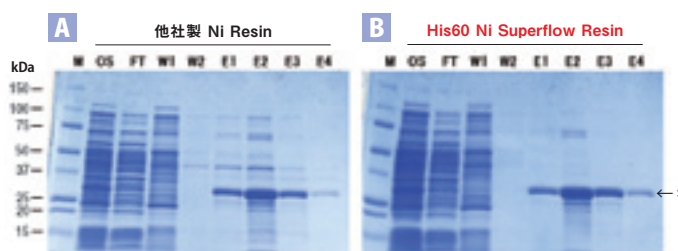
- 市販の Ni レジンの中で最高の結合容量
(~60 mg ヒスチジンタグ融合タンパク質 / ml レジン)
- 中圧・高速クロマト装置に対応可能なスーパーフロータイプ
- 変性、非変性条件で使用可能
- 樹脂の再使用、再生も可能



His60 Ni Superflow™ は高収量精製が可能

pET 発現システムを用いて、6×HN タグ融合 AcGFP1 タンパク質の発現を行った。他社同等製品 (パネル A)、および **His60 Ni Superflow™ Resin** (パネル B) をそれぞれの推奨条件で用いて、6×HN タグ融合 AcGFP1 タンパク質 (*) を含む等量のサンプルを精製した。

M : 分子量マーカー
OS : 元サンプル
FT : 素通り画分
W1、W2 : 洗浄画分
E1~E4 : 溶出画分



製品名	容量	製品コード	価格(税別)	レジン	充填カラム／カートリッジ	抽出／洗浄／溶出 バッファー
His60 Ni Superflow™ Resin ※	25 ml	635660	¥42,000	●	—	—
	250 ml	635662	¥373,000	●	—	—
His60 Ni Gravity Columns	1 ml×5	635657	¥15,000	—	●	—
His60 Ni Gravity Column Purification Kit	1 Kit	635658	¥42,000	—	●	●
His60 Ni Superflow™ Cartridges ※	1 ml×5	635675	¥28,000	—	●	—
	5 ml×5	635679	¥82,000	—	●	—

※容量が異なる製品もラインナップしています。詳しくは弊社ウェブサイトをご覧ください。

タンパク質定量キット

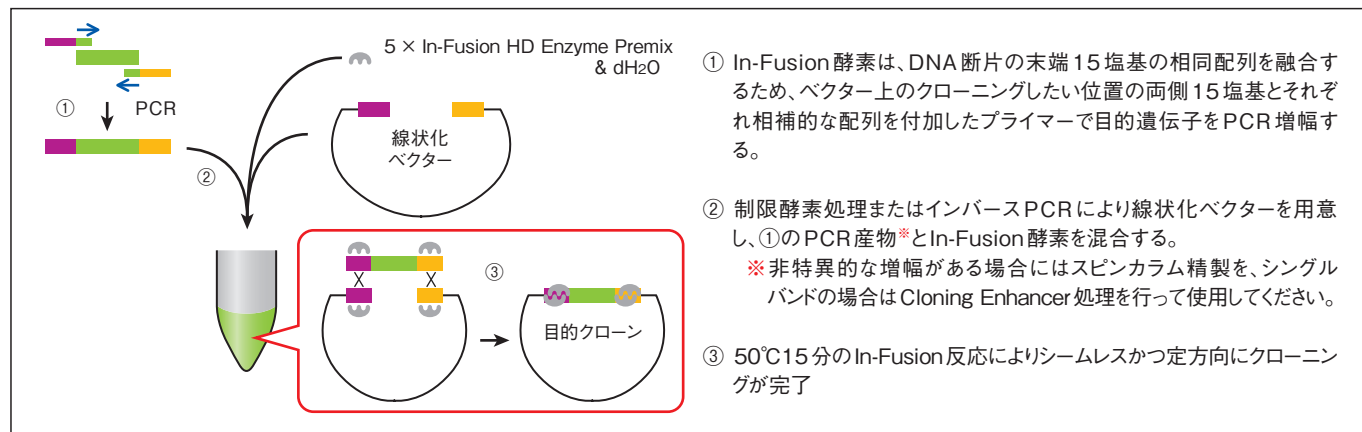
定番の BCA 法、Bradford 法の定量試薬を、抜群のコストパフォーマンスでご提供しています。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa BCA Protein Assay Kit	500 回 (1 ml 反応系の場合)	T9300A	¥15,000
TaKaRa Bradford Protein Assay Kit	500 回 (1 ml 反応系の場合)	T9310A	¥12,000

耳寄り情報

タンパク質発現ベクターの構築には、In-Fusion クローニングがおすすめ!

- インサートの種類、クローニング部位、ベクターを選ばずディレクショナルにクローニング
- 短鎖から長鎖(50 bp~15 kb)まで効率よくクローニング可能
- 1回の反応で、複数DNA断片の同時クローニングも可能
- In-Fusion 反応はわずか15分で完了



【製品ラインナップ】

下記リストでは10回包装、プレミックス済み液体タイプの製品をご紹介します。

製品名	製品コード	価格(税別)	キット付属品				おすすめは?
			Cloning Enhancer	精製用カラム NucleoSpin	Stellar Competent Cell	CloneAmp HiFi PCR Premix	
In-Fusion® HD Cloning Kit	639648	¥23,000	—	—	—	—	すでにタカラバイオの高正確性PCR酵素「PrimeSTARシリーズ」をお使いの方はこちらがおすすめです。
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer	639633	¥25,000	●	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin®	639639	¥26,000	—	●	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Plus	638909	¥50,000	—	●	●	●	初めてIn-Fusionキットを使用される方、特にオールインワンキットをご要望の方はこちらをどうぞ!
In-Fusion® HD Cloning Plus CE	638916	¥48,000	●	—	●	●	

※プレミックス済み液体タイプのIn-Fusion HDには、上記のほか、50回包装と100回包装があります。

※すぐに使える分注済みの凍結乾燥タイプの製品(EcoDryシリーズ)もラインナップもしています。詳しくはウェブカタログをご覧ください。

In-Fusion® HD キット付属品

Cloning Enhancer

PCRサンプルがシングルバンドの場合に増幅産物をそのままIn-Fusion 反応に用いるための前処理試薬。この処理により、PCRに使用したプライマーや鋳型プラスミド、dNTPの影響を受けず、In-Fusion 酵素が最大のパフォーマンスを示すことができる。

CloneAmp™ HiFi PCR Premix

正確性が極めて高いPCR酵素。In-Fusionクローニングにおいて、インサートDNAの増幅やPCRによるベクターの環状化に最適である。本製品は、In-Fusion HD Cloning Plusシリーズに添付されている。

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

PCR産物が複数バンドの場合にゲル精製を行うスピンカラム

Stellar™ Competent Cells

高い形質転換能を持つコンピテントセル。長鎖プラスミドDNAの形質転換においても高い効率を得られ、同様の遺伝子型を持つ他のコンピテントセルと比較してコロニー形成速度が速い。pUC系プラスミドでの形質転換の際には、β-ガラクトシダーゼのα-相補性を利用し、X-Gal添加による組換え体の青/白選択を行うことができる。

- ・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。
- ・本パンフレット記載の価格は2021年9月17日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。
- ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
- ・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。

タカラバイオ株式会社

首都圏支店・東日本支店・西日本支店
関西支店・営業第2部
テクニカルサポートライン

TEL 03-3271-8553
TEL 077-565-6969

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website

<https://www.takara-bio.co.jp>

Facebook

<https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店