



*Roche Applied Science*

Protein Expression ワークフロー  
-統合されたソリューション

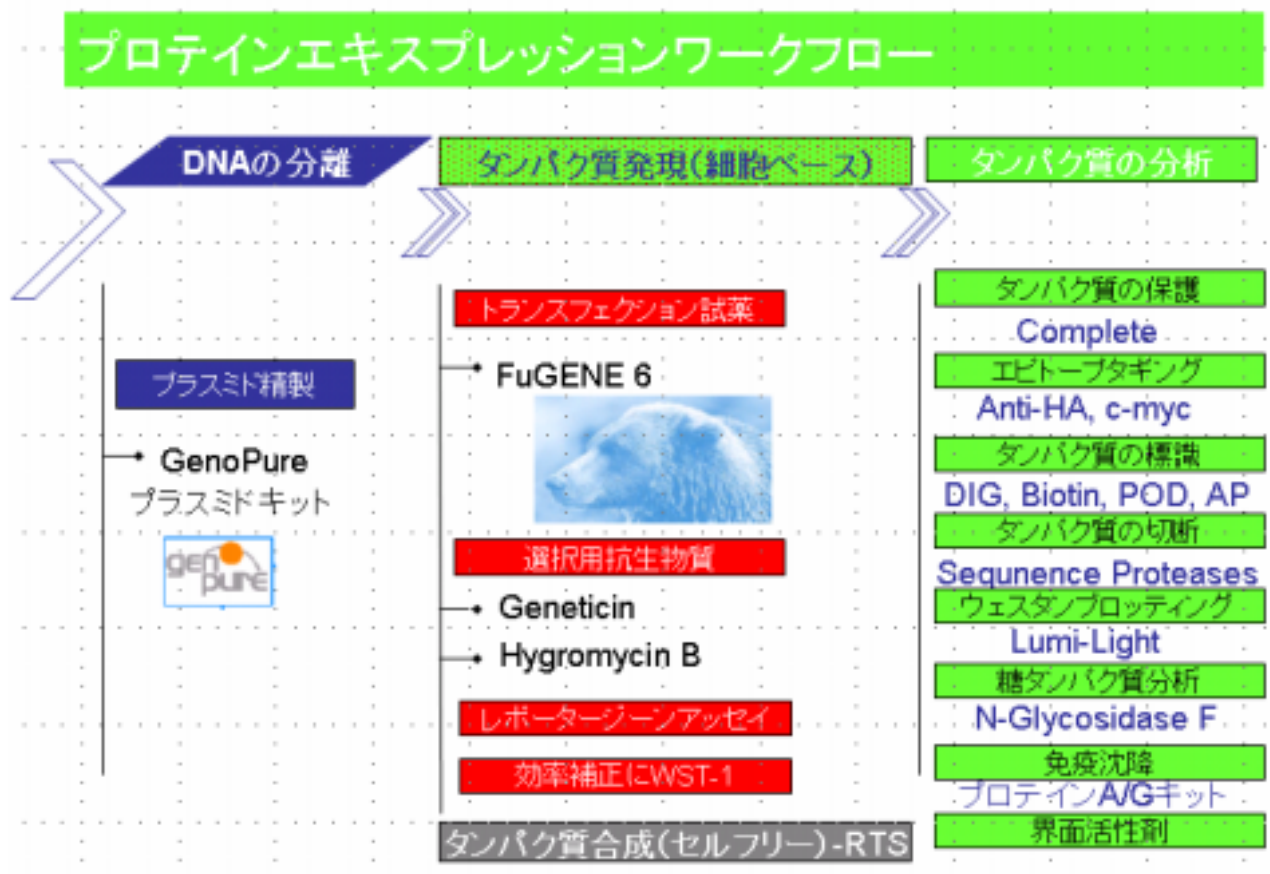
**Cutting-Edge  
Transfection  
Reagents**



ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

## ワークフロー-統合されたソリューションを目指して

現代の生命科学研究において、正しいアプリケーションに対する正しい製品を見つけることは、ますます困難になってきています。サンプル材料、感度、スループットなどに対するさまざまな要求は、僅かですが重要な違いを持つ広範囲な製品を生み出しました。アプリケーションに対する正しい製品を見つける助けとして、ロシュ・ダイアグノスティクスでは一連の製品群をワークフローにまとめ、統合されたソリューションとして提供しています。ここでは、Protein Expression ワークフローについてまとめています。



# Protein Expressionワークフロー

## トランスフェクションに適するプラスミドの精製

### GenoPure プラスミドキット

ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するプラスミドを RNAi 研究に使用するとき、プラスミド DNA の純度がトランスフェクションの成功に特に重要です。GenoPure プラスミドキットでのプラスミド精製で、高純度なトランスフェクションに適したグレードのプラスミド DNA が得られます。

#### 特長



① バクテリアライセートの清澄化—もう遠心操作の必要はありません  
⇒ “Folded filter” を用いた「ろ過操作」により数分間で清澄化が可能です。



② 分離した高純度プラスミドDNA—トランスフェクショングレードDNA  
⇒ このプラスミドDNAは、塩化セシウムによる2回遠心法よりも高い純度を持ちます。



③ 高純度プラスミドDNAの大量調製を「Genopure」パワーで、よりスピーディーに！ 各プラスミドDNAの回収量とA<sub>260/280</sub>の比について



プラスミドDNA名	プラスミドDNAの収量	A <sub>260/280</sub> の比
P2Y1/pcDNA3	150µg	1.82
P2Y1-Myc/pcDNA3	330µg	1.84
mGluR1a-FLAG/pcXN2KS	75µg	1.94
mGluR5/pcDNA3	150µg	1.80

各種プラスミドDNA/ E.CoW DH5α (菌の生育A<sub>600</sub>≈約3.0) を使用した。今回のバクテリア培養液量は、すべて50 mlとした。キットの能書に従ってバクテリアペレットの改良アルカリ溶解後、「ろ紙法」によるライセートの清澄化を行った。

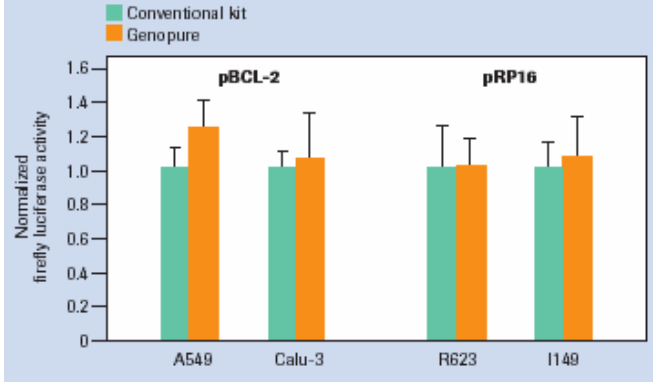
Genopure プラスミド ミディキット	5~30 ml バクテリア培養液から: 100µg	約60分	20回	5~30 ml
Genopure プラスミド マキシキット	30~150 ml バクテリア培養液から: 500µg	約75分	10回	30~150 ml

\* この反応回数はハイコピープラスミド使用時のものです。ローコピープラスミドの場合には上記反応回数その半分となりますのでご注意ください。

DNAの分離

図2: コトランスフェクションされたウミシイタケのルシフェラーゼ活性で較正されたホタルルシフェラーゼ活性。

従来法のキットと Genopure キットで調製されたプラスミドにより得られた比率をそれぞれ並べています。平均値±標準偏差は、2回のトランスフェクションより導いています。



この比較データは GenoPure プラスミド マキシキットにより、従来法よりも高純度なプラスミド DNA が得られることを示しました。第1に、中和バクテリア溶解液を清澄化する単純なる過ステップは、フィルターカートリッジ(あるいは遠心)を取り扱うよりも簡便です。第2に、Genopure キットでは、クロマトグラフィー法に必要な洗浄や溶出ステップが少ないため、30%の時間短縮となります。このキットは最も厳しい分子生物学のアプリケーションに適する、高純度プラスミドの分離における優れた製品ということが出来ます。

詳細は、www.roche-applied-science.com/napure を訪問してください。

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
GenoPure プラスミド ミディキット	3143414	20 回	¥17,900
GenoPure プラスミド マキシキット	3143422	10 回	¥18,900

## セルベースでのタンパク質発現

### トランスフェクション

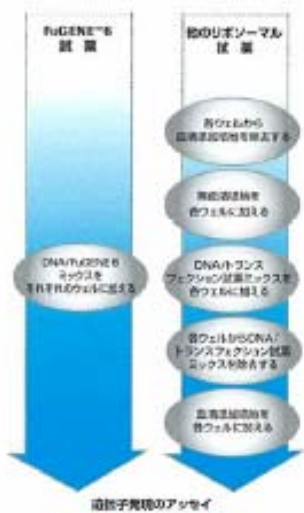
#### FuGENE 6 ノンリポソームトランスフェクション試薬

プラスミドのトランスフェクションには、FuGENE 6 が勧められます。FuGENE 6 は、初代培養やトランスフェクションしにくい細胞株を含む 700 種類以上の真核細胞株で成功している、効率がよく低毒性の先進的なノンリポソームのトランスフェクション試薬です。

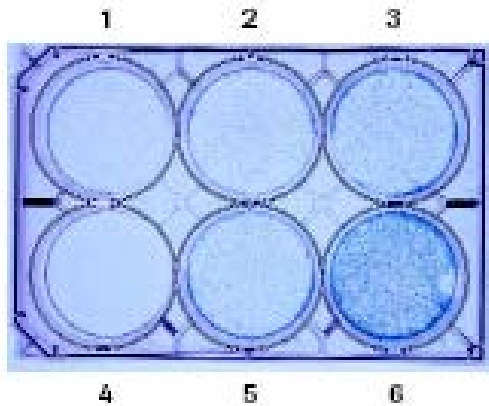
#### ここがポイント！

- 操作ステップが少ない
- 細胞毒性が低い
- 多種類の細胞に効率的にトランスフェクション可能
- 副次効果が少ない（試薬自身による遺伝子の変動が少ない）

#### ☞ 1ステップトランスフェクション



#### ☞ トランスフェクション効率の比較：



FuGENE 6 と他の 5 種類の試薬でトランスフェクトされた COS-1 細胞の -Gal 染色。  
 ウェル 1, 2, 5 : ポリカチオン系脂質  
 ウェル 3 : 新規のカチオン系ポリマー  
 ウェル 4 : モノカチオン系脂質  
 ウェル 6 : FuGENE 6

#### ☞ 副次効果が少ない（遺伝子の変動が少ない）

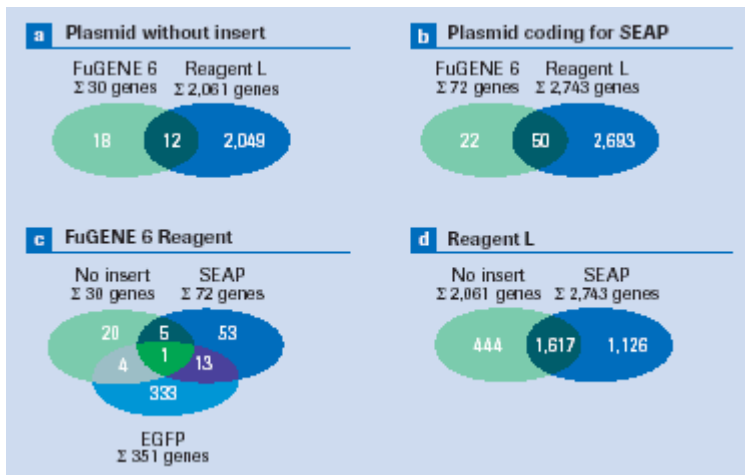


図. トランスフェクションによる副次効果。試薬Lでは関係の無い遺伝子の発現が数多く促進・抑制されますが、FuGENE 6では副次効果が無く、ほとんど遺伝子の変動しません。

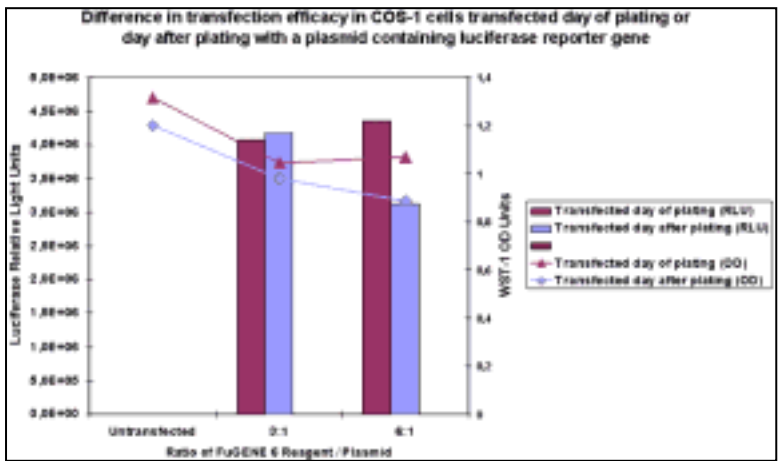
# Protein Expressionワークフロー

タンパク質発現（細胞ベース）

## セルベースでのタンパク質発現

- ☞ **ハイスループットスクリーニングにおける FuGENE 6 の応用**
- ・ FuGENE 6 トランスフェクション試薬はハイスループットアプリケーションに有用な製品です。
  - ・ 細胞毒性が低いため、必要とされる（洗浄や培地の除去/添加）操作ステップが少なく、しかも播種と同じ日に細胞をトランスフェクトすることができます。
  - ・ 結果は 96 ウェルプレートでの、より少ない細胞数でも同じですので、FuGENE 6 は 1 回当たり 0.15μl しか必要としません（1 ml の液量で 6000 回以上のトランスフェクションが可能です）。

### 典型的な結果 ルシフェラーゼレポーター遺伝を組み込んだプラスミドでの同日および翌日トランスフェクションの効率と細胞毒性の差異



COS-1 細胞をプレートに播種し、pBlast ルシフェラーゼプラスミド (Invitrogen) が、2 種類の FuGENE 6 / プラスミド比で同日 (■) および翌日 (□) にトランスフェクトされた。ルシフェラーゼの発現はロシュ・ダイアグノスティックスのルシフェラーゼレポーター遺伝アッセイで、トランスフェクションの 24 時間後に分析された。細胞毒性は WST-1 細胞増殖試薬を使用し、細胞の代謝活性を測定することで試験された (線)。

☞ **RNAi 干渉実験 - shRNA をコードしたプラスミドのトランスフェクション**  
shRNA をコードしたベクターのトランスフェクションには、FuGENE 6 が最適です。



図は、FuGENE 6 で shRNA 発現プラスミドを導入した NIH 3T3 細胞での、48 時間後の PML ノックダウンを示しています。PML 特異的 shRNA がトランスフェクトされた細胞で、強いノックダウンが見られるのに対し、p53 や Tyro20nt-特異的 shRNA をコードしたプラスミドでは、PML の発現に影響は見られません。

← PML に対する shRNA をコードしたベクターのみがたんぱく質の発現を抑えています

\*siRNA のトランスフェクションには、遺伝子ノックダウンワークフロー中の XtremeGENE siRNA トランスフェクション試薬をご覧ください。

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
FuGENE 6 トランスフェクション試薬	1 815 091	0.4 ml	¥27,800
	1 814 443	1 ml	¥58,700
	1 988 387	5×1 ml	¥234,800

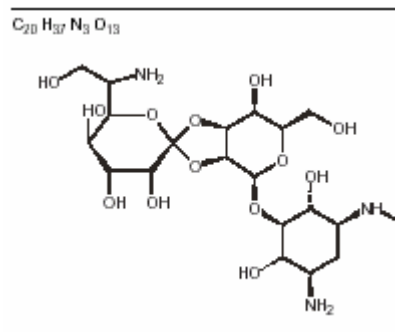
## 選択用抗生物質

Geneticin  
Hygromycin

トランスフェクションの間、目的の DNA が核内に取り込まれ、細胞内の転写機構と相互作用します。ほとんどの細胞では、遺伝子の“トランジェント”な発現は、トランスフェクション後 2-24 時間で起こりますが、その後、細胞内のヌクレアーゼによるトランスフェクションされた DNA の分解により、消失します。少数のトランスフェクション細胞において、DNA 組み換えイベントが外来 DNA を染色体 DNA に組み込み、“ステーブル”な遺伝子発現を導きます。これらのステーブルにトランスフェクションされた細胞は、3-7 日以内に、検出可能なレベルで外来遺伝子を発現します。



ハイグロマイシン B の構造式



DNA 組み換えは大変まれなため、ステーブルなトランスフェクション細胞を得るためには、多数の細胞をトランスフェクションしなければなりません。抗生物質に対する耐性遺伝子を組み込んだクローニングベクターでトランスフェクションされた細胞は、培養培地に抗生物質を加えるだけで、簡単にステーブルにトランスフェクションされた細胞を選択できます。これらの条件下で、耐性遺伝子（および外来遺伝子）を組み込まれた細胞は増殖し、トランスフェクションされなかった細胞は死滅します。

ロシュ・ダイアグノスティックスでは、2 種類の繁用される選択用抗生物質を発売しています。これらはまた、抗生物質耐性を失った復帰細胞の除去にも用いられます。

タンパク質発現（細胞ベース）

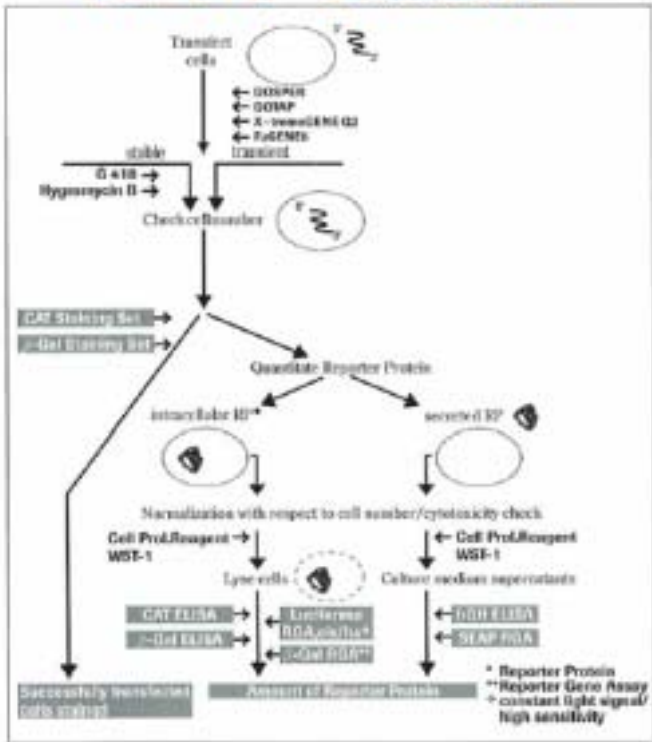
選択用抗生物質	ベクターが持つ耐性遺伝子	製品番号	包装単位	希望価格
ジェネティシン (G418)	ネオマイシン耐性遺伝子	1464981	1 g	¥21,100
		1464990	5 g	¥83,900
ハイグロマイシン B	ハイグロマイシン耐性遺伝子	843555	1 g	¥27,900

# Protein Expressionワークフロー

## レポーター遺伝子アッセイ-トランスフェクション効率の検討

トランスフェクト真核細胞での遺伝子発現は、通常プロモーター配列と、容易に検出できる”レポーター”遺伝子を連結する事で、研究されます。ロシュ・ダイアグノスティクスではバラエティに富む各種測定キットを提供しています。

### レポーター遺伝子実験製品ガイド

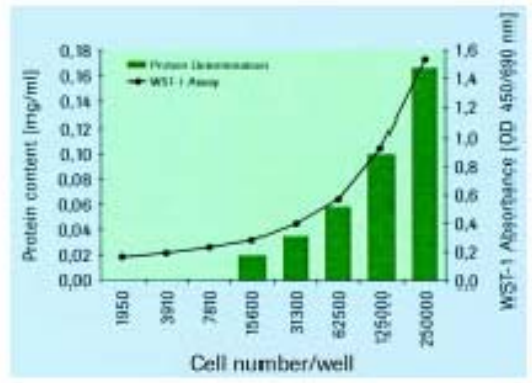


Products for Reporter Gene Assays			
	Cat. No.	Pack Size	Price
Luciferase Reporter Gene Assay, constant light signal	1 897 667	1000 assays	¥ 77,700
Luciferase Reporter Gene Assay, high light intensity	1 669 893	200 assays	¥ 20,100
	1 814 036	1000 assays	¥ 80,500
Luciferase for luminometric quantification	411 523	1 mg	¥ 20,500
D(-)-Luciferin for luminometric quantification	411 400	10 mg	¥ 33,500
	1 626 353	50 mg	¥ 100,700
β-Gal ELISA	1 539 426	1 kit (192 tests)	¥ 52,600
β-Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent	1 758 241	500 assays (microtiterplate format) or 250 assays (tube format)	¥ 40,400
β-Gal Staining Set	1 828 673	1 set (for 100tests in 3.5 cm dishes)	¥ 33,600
CAT ELISA	1 363 727	1 kit (192 tests)	¥ 80,500
Anti-CAT-coated Microtiter Plates, transparent	1 465 074	192 tests	¥ 44,100
Anti-CAT-Digoxigenin (Anti-CAT-DIG)	1 465 066	2 × 100 μg	¥ 39,800
SEAP Reporter Gene Assay, Chemiluminescent	1 779 842	500 assays (microtiter plate format) or 250 assays (tube format)	¥ 47,000
BM Chemiluminescence ELISA Substrate (AP)	1 759 779	150 ml (600 SEAP assays)	¥ 39,000
hGH ELISA	1 585 878	1 kit (192 tests)	¥ 62,900

タンパク質の発現

## 細胞増殖試薬 WST-1：レポーター遺伝子アッセイ結果の補正に

細胞培養の変動を除外するため個々のウェルの結果は、タンパク質濃度や細胞数について標準化しなければなりません。細胞増殖試薬 WST-1 はタンパク質濃度や細胞数と完全に相関します。



実験：WST-1 の変換は、少なくともタンパク質の定量と同じ感度です。タンパク質の定量は BCA 法で行いました。

製品名		包装単位	希望価格
細胞増殖試薬 WST-1	1644793	2500 テスト	¥ 44,900

# Protein Expressionワークフロー

## タンパク質の保護

### コンプリート、プロテアーゼインヒビターカクテル錠

細胞はさまざまなタイプのプロテアーゼを持っています：以下の実験のためにタンパク質を完全に保護するには、各種インヒビターの混合物が必要です。ロシュ・ダイアグノスティックスのコンプリート インヒビターカクテル錠は特別に最適化された、様々なプロテアーゼインヒビターの混合物を含んでいます。1錠をサンプルに添加することで、目的タンパク質を簡便・確実に保護します。

プロテアーゼインヒビターカクテル錠であるコンプリートは、発売以来絶大な支持を頂いております。その阻害能は下記の表で示されるとおり、完璧(complete)です。

材料および酵素濃度	プロテアーゼのタイプ	添加後の阻害% (直後)	添加後の阻害% (60分後)
キモトリプシン、1.5µg/ml	セリン	97%	97%
サーモライシン、0.8µg/ml	メタロ	99%	100%
パパイン、1 mg/ml	システイン	95%	73%
プロナーゼ、1.5µg/ml	ミクスチャー	88%	99%
膵臓抽出液、1.5µg/ml	ミクスチャー	87%	99%
トリプシン、0.002µg/ml	セリン	93%	73%

次の細胞、バクテリアでのタンパク質抽出に成功しています(その他、数百種類)。

- ヒト絨毛細胞
- ラット PC 12 細胞
- 好中球
- ジャーカット細胞
- Escherichia coli*
- bacillus subtilis*
- Saccharomyces cerevisiae*

免疫沈降・2D 電気泳動・タンパク質合成でのタンパク質の保護にも、安心して使用できます。

すべての成分は安定で無毒です。EDTA-フリータイプは、金属に依存するタンパク質の安定性や、精製技術(ポリ His-タグタンパク質)の機能に影響を与えません。



詳細は、[www.roche-applied-science.com/proteaseinhibitor](http://www.roche-applied-science.com/proteaseinhibitor) を訪問してください

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
コンプリート	1697498	20 錠	\ 35,000
	1836145	3 x 20 錠	\ 94,500
コンプリートミニ	1836153	25 錠	\ 35,000
コンプリート、EDTA フリー	1873580	20 錠	\ 18,500
コンプリートミニ、EDTA フリー	1836170	25 錠	\ 18,500

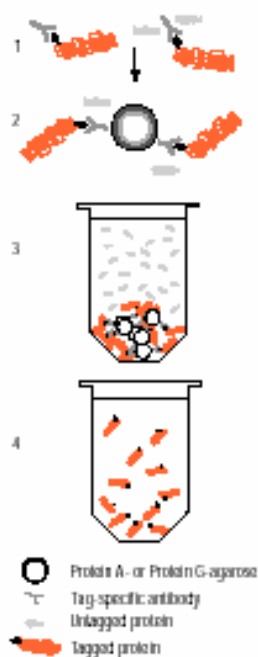
## 免疫沈降-目的タンパク質の回収・精製・検出

免疫沈降キット (プロテイン A/G)

細胞内標識および免疫沈降キット

### ここがポイント!

- A か G が選べる
- 必要なすべての試薬が含まれる
- コンブリートを含み、タンパク質分解を保護
- タグ特異的抗体との組み合わせで簡便に精製可能



Tag特異的抗体の結合

複合体とプロテイン  
A/Gアガロースの結合

非特異的沈降  
タンパク質の洗い流し

A/Gアガロース複合体  
からの  
タグタンパク質の遊離

タンパク質の分析

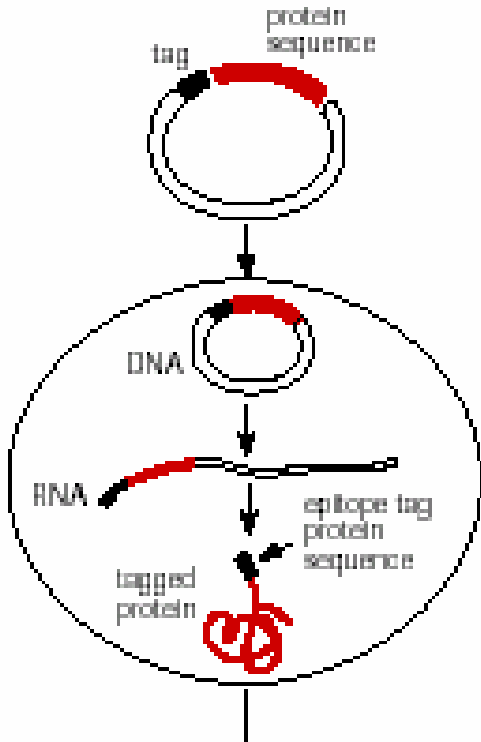
製品名	製品番号	包装単位	希望価格
免疫沈降キット (プロテイン A)	1 719 394	20回反応	\30,900
免疫沈降キット (プロテイン G)	1 719 386	20 回反応	\35,500
細胞標識 & 免疫沈降キット	1 647 652	1 キット	\57,400
プロテインA-アガロース	1 719 408	2 ml	\27,600
	1 134 515	5 ml	\63,100
プロテインG-アガロース	1 719 416	2 ml	\46,000
	1 243 233	5 ml	\73,900

## エピトープタギング

### タグ特異的抗体を使用する、タグタンパク質の簡便な検出と精製

エピトープタギングは、煩雑で時間のかかる新規の研究するタンパク質に対する抗体を毎回作成するという手間を省きます。また、巨大な融合タンパク質とは異なり、これらの小さなエピトープタグは一般的に、タグタンパク質の生物機能における副次効果を最小にします。

タグに対する抗体はタンパク質の検出、特徴づけ、精製をシンプルにします。これらはまた、標識抗体としても入手可能で、インフルエンザのヘマグルチニンタンパク質 (HA)、ヒト c-myc タンパク質、6個のヒスチジン残基などの一般的に使用されるエピトープ配列を認識します。



組換え DNA 技術を用いて、短いペプチド(エピトープタグ)の DNA 配列と目的のタンパク質をコードしている DNA 配列をつなぐ。

DNA コンストラクトを適切な生物 (バクテリア、酵母、昆虫細胞、哺乳細胞) に導入する。

In Situ でのタンパク質の発現

タグタンパク質の生来の機能を発揮させる。

<アプリケーション>

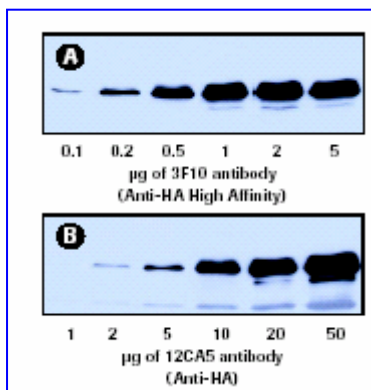
- ・タグタンパク質の局在
- ・タンパク質間相互作用の測定
- ・タグタンパク質の機能解析
- ・クローニングされたオープンリーディングフレームの同定。

### Anti-HA、Anti-c-myc、Anti-VSV-G

#### アプリケーション

#### ウェスタンブロットティング、免疫蛍光、免疫沈降

HA、プロテイン C、c-myc、VSV-G、His6、GFP でタギングされたタンパク質の検出と特徴づけ



図：2種類の Anti-HA 抗体による HA タグタンパク質の免疫沈降の比較。HA タグ GFP タンパク質が図に示された量(µg)の各抗体とその後のプロテイン G-アガロースとのインキュベーションにより、免疫沈降されました。ペレットを可溶化、電気泳動、ウェスタンブロットしました。検出は、POD 標識 Anti-HA と BM ケミルミネッセンスウェスタンブロットティング基質で行われました。高親和性のクローン 3F10 の場合、20 分の 1 の量しか免疫沈降に必要としませんでした。

## エピトープタギング

### 精製

Anti-HA アフィニティマトリックス

Anti-プロテイン C アフィニティマトリックス

The logo for Epitope Tags, featuring the words "Epitope" and "Tags" in a white, serif font on a green rectangular background.

Anti-HA アフィニティマトリックスには Anti-HA (クローン 3F10) が結合されていますので、高い親和性でタグタンパク質の精製を可能にします。

また、Anti-プロテイン C アフィニティマトリックスは  $\text{Ca}^{2+}$  の含 / 不含により結合・溶出が可能ですので、穏やかな条件下で精製が可能です。

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
Anti-HA (12CA5)	1 583 816	200 $\mu\text{g}$	\47,000
	1 666 606	5 mg	\391,800
Anti-HA High Affinity (3F10)	1 867 423	50 $\mu\text{g}$	\42,400
	1 867 431	500 $\mu\text{g}$	\347,000
Anti-HA High Affinity Matrix (3F10)	1 815 016	1 ml	\100,700
Anti-HA-Biotin (12CA5)	1 666 851	100 $\mu\text{g}$ (500 $\mu\text{l}$ )	\52,400
Anti-HA-Biotin High Affinity (3F10)	2 158 167	50 $\mu\text{g}$	\59,300
Anti-HA-Fluorescein (12CA5)	1 666 878	100 $\mu\text{g}$ (500 $\mu\text{l}$ )	\51,700
Anti-HA-Fluorescein High Affinity (3F10)	1 988 506	50 $\mu\text{g}$	\55,100
Anti-HA-Peroxidase (12CA5)	1 667 475	50 $\mu\text{g}$ (500 $\mu\text{l}$ )	\42,400
Anti-HA-Peroxidase High Affinity (3F10)	2 013 819	25 U (25 $\mu\text{g}$ )	\53,700
Anti-HA-Rhodamine (12CA5)	1 666 959	100 $\mu\text{g}$ (500 $\mu\text{l}$ )	\51,700
HA peptide	1 666 975	5 mg	\44,300
Anti-c-myc	1 667 149	200 $\mu\text{g}$	\47,000
	1 667 203	5 mg	\391,800
Anti-c-myc-Peroxidase	1 814 150	500 $\mu\text{g}$ (500 $\mu\text{l}$ )	\42,400
c-myc peptide	1 667 246	5 mg	\43,700
Anti-His6	1 922 416	100 $\mu\text{g}$	\38,900
Anti-His6 -Peroxidase	1 965 085	50 U	\42,400
Anti-Protein C Affinity Matrix	1 815 024	1 ml	\48,600
Anti-Protein C-Peroxidase	1 814 974	50 $\mu\text{g}$	\41,100
Anti-VSV-G	1 667 351	200 $\mu\text{g}$	\47,000
Anti-GFP	1 814 460	200 $\mu\text{g}$	\43,700
rGFP	1 814 524	50 $\mu\text{g}$	\22,400

## ウェスタンブロッティング

### Lumi-Light ウェスタンブロッティングキットと基質

**発色および発光でのタンパク質検出：**タンパク質の検出において、最も一般的なペルオキシダーゼとルミノールによる、化学発光を用いたタンパク質の検出は選択すべき方法となりました。高感度の Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロッティング基質およびキット、PVDF メンブレンを使用することで、サンプル材料を節約できます。Lumi-Light<sup>PLUS</sup> は、基質添加後のシグナルの安定性が高い（9 時間以上安定）ため、複数回の露光が可能です。

簡便性、スピード、効率を最大限に追求。Lumi-Light 製品にトライし、ルミノールに基づく化学発光検出の多くの利点を体験してください。

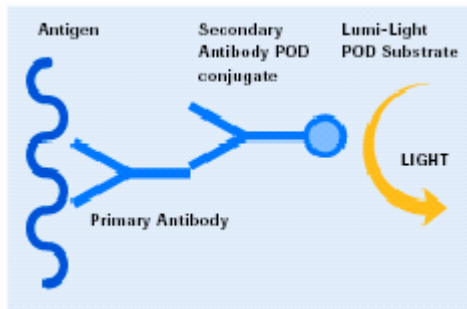


図 1. Lumi-Light 基質によるプロットされた抗原の化学発光検出。

1. 抗原がメンブレンにプロットされる。
2. 一次抗体が固相化された抗原に結合。
3. POD 標識二次抗体が一次抗体に結合。
4. POD が Lumi-Light 基質と反応し、発光。
5. X-線フィルムや化学発光用イメージャーで検出。

### 経済性と高感度

経済性なら Lumi-Light、高感度を必要とするなら Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロッティング基質を選択してください。

### 感度の増加

Lumi-Light ウェスタンブロッティング基質からのシグナルは、大変に強度が高いためより少量のタンパク質が検出できます（少なくとも 50 ng）。

### 柔軟性の発見

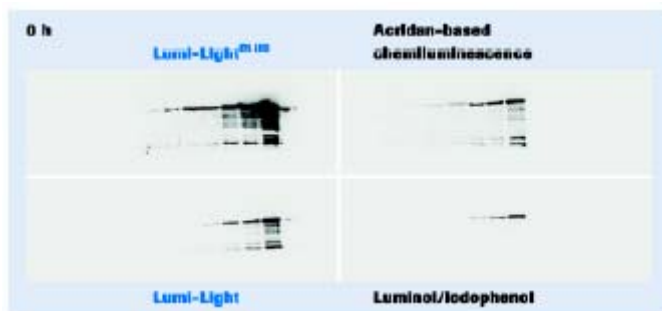
Lumi-Light の発光は 3 時間以上安定なため、感度を上げるためにより長い時間や数回の露光が可能です。

### 最高の感度

どこにもこれ以上の感度を達成したものはありません。超高感度検出の Lumi-Light<sup>PLUS</sup> では 5 pg の抗原が検出可能です。

### 12 時間まで検出可能

Lumi-Light<sup>PLUS</sup> のシグナルは 12 時間続き、数回の長時間露光が可能です。プロットを多量に作成し、同時に観察することで、実験の一貫性が改善できます。



図：Lumi-Light、Lumi-Light<sup>PLUS</sup>、コンペティターの化学発光 POD 基質の比較。基質のインキュベーション後、直ちに(0 時間)ウェスタンプロットでそれぞれの化学発光 POD 基質を比較しました。β-ガラクトシダーゼ(1 pg, 5 pg, 10 pg, 50 pg, 100 pg, 1 ng)を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンにプロットします。このプロットを 3μg/ml の抗 β-ガラクトシダーゼおよび 50 mU/ml の抗マウス IgG-POD とインキュベートしました。基質とのインキュベーション直後に、10 分間の露光を行いました。

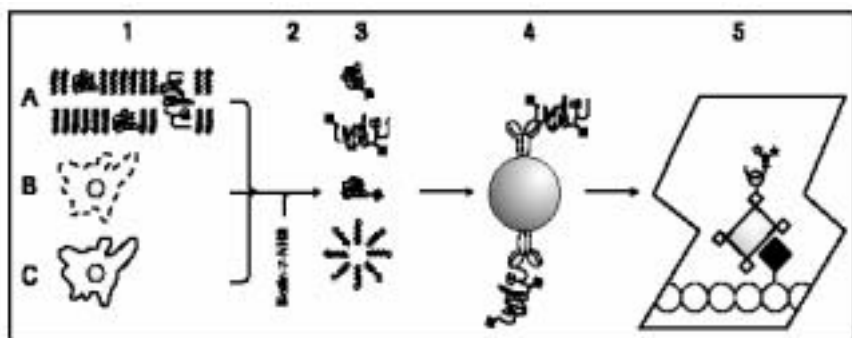
# Protein Expressionワークフロー

## タンパク質の標識

### DIG・Biotin Labeling

#### 細胞膜・細胞内タンパク質の Non-RI 標識

細胞膜や細胞内のタンパク質および糖タンパク質の標識には、通常  $^{125}\text{I}$  や RI 標識アミノ酸が使用され、その後に免疫沈降で分離、SDS-PAGE およびオートラジオグラフィーで分析されてきました。ジゴキシゲニンやビオチン-NHS エステルは、安定なハプテンをタンパク質に導入することにより、安全性、取扱所の問題、プローブの安定性、コストなど、RI が抱える問題を解決しました。ウェスタンブロット分析においても、POD 標識抗ジゴキシゲニン抗体やストレプトアビジンと化学発光基質の組み合わせにより、RI を上回る感度が実現できます。



細胞タンパク質の  
ビオチン標識

溶解

免疫沈降

標識SAによる  
ウェスタン分析

### 酵素標識 ( AP/POD Labeling )

抗体や生体タンパク質の酵素標識には以下のキットが有用です。

#### ウェスタンブロットング試薬

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
Lumi-Light ウェスタンブロットング基質	2 015 200	400 ml(4000 cm <sup>2</sup> )	\26,700
Lumi-Light <sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットング基質	2 015 196	100 ml(1000 cm <sup>2</sup> )	\49,400
Lumi-Light <sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットング キット(マウス/ウサギ)	2 015 218	1 kit(1000 cm <sup>2</sup> )	\85,900
関連製品名	製品番号	包装単位	希望価格
PVDF ウェスタンブロット メンブレン	3010040	1 ロール(26.5 cm x 3.75 cm)	\30,900
ブロッキング試薬、粉末	1 096 176	50 g	\11,700
ブロッキング試薬、溶液	1 921 673 1 921 681	100 ml(10 プロット) 6x100 ml(60 プロット)	\13,800 \48,100

#### タンパク質標識試薬

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
Biotin Protein Labeling Kit	1418165	5 回反応	\34,000
DIG Protein Labeling Kit	1367200	5 回反応	\35,300
Fluorescein Labeling Kit	1386093	5 回反応	\37,700
Cellular Labeling & Immunoprecipitation Kit			
AP Labeling Kit			
POD Labeling Kit			

タンパク質の分析

## タンパク質の切断

### シーケンスグレードプロテアーゼ

### エンドプロテイナーゼ Asp-N, Lys-C, Glu-C, トリプシン

タンパク質を分析するには、しばしば断片化が必要とされます。シーケンスグレードのプロテアーゼはこのアプリケーションに有用です。

### ここがポイント！

- 高い特異性
- 夾雑酵素活性なし
- MSにも最適

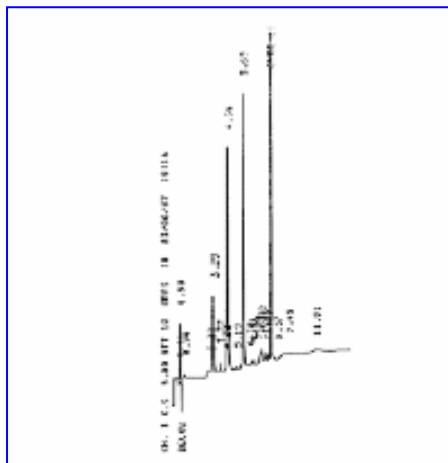


図1：逆相 HPLC によるエンドプロテイナーゼ Asp-N シーケンシンググレードの特異性。

消化：100  $\mu$ l の 50 mM リン酸ナトリウムバッファー、pH 8.0 中に 100  $\mu$ g のグルカゴン + 10  $\mu$ g のエンドプロテイナーゼ Asp-N シーケンシンググレードを加え、37°C で 18 時間

逆相 HPLC：20  $\mu$ l の消化物

カラム：Shandon ODS Hypersil, 5  $\mu$

溶媒 A：水中 0.1% TFA, (v/v)

溶媒 B：水中 0.1% TFA, (v/v、70%アセトニトリル(v/v)

グラジエント：20 min linearly 0–100% B；流速：1 ml/min

測定波長：215 nm

フラグメント：

3.29 min Asp (15) – Gln (20),

4.36 min His (1) – Ser (8),

5.69 min Asp (9) – Leu (14),

8.05 min Asp (21) – Thr (29).

## プロテオミクスに最適なトリプシン、リコンビナント、プロテオミクスグレード

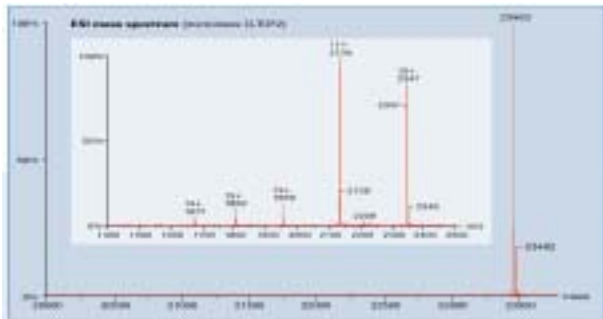


図2：リコンビナントトリプシンの純度プロフィール

← トリプシン以外からの断片はありません。

そのため、マスマスペクトロメトリー（MS）に最適です。

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
エンドプロテイナーゼ Asp-N	1 420 488	2 $\mu$ g	¥14,600
シーケンシンググレード	1 054 589	3× 2 $\mu$ g	¥38,700
エンドプロテイナーゼ Glu-C	1 420 399	50 $\mu$ g	¥14,600
シーケンシンググレード	1 047 817	3× 50 $\mu$ g	¥37,100
エンドプロテイナーゼ Lys-C	1 420 429	5 $\mu$ g	¥14,600
シーケンシンググレード	1 047 825	3× 5 $\mu$ g	¥37,100
エンドプロテイナーゼ Arg-C	1 370 529	3× 5 $\mu$ g	¥37,100
トリプシン、シーケンシンググレード	1 418 475	4× 25 $\mu$ g	¥8,400
	1 047 841	4× 100 $\mu$ g	¥26,600
修飾トリプシン、	1 418 025	4× 25 $\mu$ g	¥12,800
シーケンシンググレード	1 418 033	4× 100 $\mu$ g	¥43,400
トリプシン、リコンビナント、プロテオミクスグレード	3708985	4× 25 $\mu$ g	¥8,600
	3708969	4× 100 $\mu$ g	¥26,200
ペプチドマッピングセット	1 520 423	1 set	¥42,600

# Protein Expressionワークフロー

## 糖タンパク質の分析

DIG グリカンデテクションキット

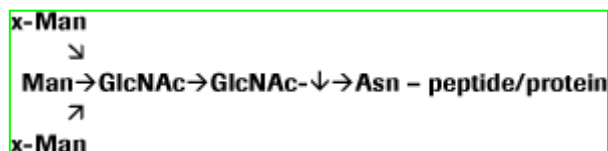
DIG グリカンディファレンシーションキット

N-グリコシダーゼ F、O-Glycosidase、ノイラミニダーゼ

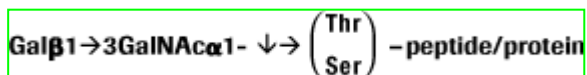
### ここがポイント!

- 多様な糖鎖を切断  
N-Glycosidase F、O-Glycosidase、ノイラミニダーゼ
- 糖タンパク質の特異的な検出  
グリカン検出キット
- レクチンによる糖鎖特異的分類  
グリカン分類キット

糖タンパク質の分析（シーケンス、糖鎖構造）にはタンパク質部分と糖鎖部分の分離が必須の処理となります。ロシュ・ダイアグノスティックスの N-グリコシダーゼ F（N型糖鎖の切断）、O-グリコシダーゼ（O型糖鎖の切断）、ノイラミニダーゼ（末端シアル酸の除去）は、酵素的に穏やかに両型の糖鎖を分離できます。ノイラミニダーゼによる末端シアル酸の除去は、糖鎖の切断効率を飛躍的に高めます。



[N-グリコシダーゼ F の切断部位]



[O-グリコシダーゼの切断部位]

グリカン検出キットは糖鎖の末端を過ヨウ素酸により酸化し、アルデヒド基を生成することで、糖鎖にジゴキシゲニンが標識されます。AP 標識 DIG 抗体により、高感度に糖タンパク質が検出できます。

グリカン分類キットは、DIG 標識レクチンを使用し、その糖鎖特異的な結合により、糖タンパク質の糖鎖構造の一部を決定することができます。

## タンパク質の分析

☞ プロテオミクス→グライコミクス、ポストゲノム研究の流れは止まりません。糖鎖研究に有用な糖タンパク質分類および検出キットも販売しています。

### 糖タンパク質の糖鎖切断

製品名	基質特異性	製品番号	包装単位	希望価格
N-グリコシダーゼ F、 リコンビナント(凍結乾燥)	X-Man	1 365 185	100 U	¥25,000
	↓	1 365 193	250 U	¥47,100
N-グリコシダーゼ F、 リコンビナント(溶液)	Man→GlcNAc↓-Asn-ペプチド/ タンパク質	1 365 169	100 U	¥25,000
	↑	1 365 177	250 U	¥47,100
O-グリコシダーゼ	Galβ→3GalNAcα1↓- ( Thr )	1 347 101	25 mU	¥27,000
ノイラミニダーゼ、 低プロテアーゼグレード	AcNeuα2↓→X あるいは HlcNeuα2↓→X	1 585 886	5 U	¥19,500

### 糖タンパク質の検出、糖鎖の分類

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
DIG グリカンデテクションキット	1 142 372	1 キット	¥55,100
DIG グリカンディファレンシーションキット	1 210 238	1 キット	¥58,400

## トランスフェクションのスペシャルインターネットサイト

プラスミドの調製・タンパク質の発現・分析に関する詳細な情報は下記の特別インターネットサイトを訪問してください。

<http://www.roche-applied-science.com/sis/fugene/>

The screenshot shows a Microsoft Internet Explorer browser window displaying the Roche Applied Science website. The browser's address bar shows the URL <http://www.roche-applied-science.com/sis/fugene/>. The website features a navigation menu with options like 'Home', 'Scientific Overview', 'Product Overview', and 'Product Profiles'. The main content area is titled 'Cutting-Edge Transfection Reagents' and includes a list of products: FUGENE 6, X-transGEMO siRNA, DOSPER, X-transGEMO Q2, and DOTAP. A 'New!' section highlights the X-transGEMO siRNA Transfection Reagent for effective Gene Knockdown. The background of the main content area features a blue-tinted image of a bear's head.