



Cell-Free with Increased Solubility

無細胞抽出液による可溶性ネイティブ-ヒトタンパク質の発現

By Michael R. Slater, Ph.D., Robin Hurst, M.S., Becky Pferdehirt, B.S., Doug White, M.S., Andrew Niles, M.S., Natalie Betz, Ph.D., and Elaine Schenborn, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

本稿では、55種類の異なるヒトタンパク質をコードするFlexi® Vector プラスミドを用いて、Wheat Germ Extract Plusと2つの大腸菌発現系における可溶性ネイティブ-タンパク質の発現を比較しています。大腸菌で発現したタンパク質はたったの3つ（全て可溶性）だけでしたが、*E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNAを使うことで、この数は42に増加しました。しかし、これらのタンパク質のうち可溶性画分に発現したものは10種類のみでした。これとは対照的に、Wheat Germ Extract Plus では55種類全てのタンパク質が可溶性画分に発現し、さらにバッチモードと比較すると、透析モードでは4倍近い収量が得られました。

コストを考慮すると大腸菌が第1の選択肢になりますが、哺乳動物のタンパク質を発現させる場合、収量あるいは可溶性の点で不十分であり、問題となる場合があります。

はじめに

組換えタンパク質を作製する場合、全てのタンパク質がどの発現系でも希望する発現レベルを示し、可溶性タンパク質として発現されるわけではないため、発現系の選択は難しい問題です。コストを考慮すると大腸菌が第1の選択肢になりますが、哺乳動物のタンパク質を発現させる場合、収量あるいは可溶性の点で不十分であり、問題となる場合があります。無細胞系抽出物は、タンパク質生産の1つの手段として考えられます。しかし、これまではいくつかのアプリケーションで収量が不足する場合があります。Wheat Germ Extract Plus（カタログ番号L3250）を使うと、可溶性タンパク質が高い収率で得られ（10～80µg/ml）、透析法を用いることでさらに収量を上げることができます（1）。本稿では、Flexi® Vectorテクノロジーを用いて異なるタンパク質発現系をスクリーニングし、クローニングの負担を軽減する試みを行いました。Flexi® Vector Systemを用いることにより、それぞれのシステムで組換えタンパク質を発現させるために最適なベクターへ、1つのベクター型から別のベクター型に、高い正確性でタンパク質コード領域を移すことができます（2）。

我々は、55種類のヒトタンパク質の発現を、*E. coli* BL21(DE3) pLysS Competent Cells（カタログ番号L1191）で発現させた場合と、*E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA（カタログ番号L1130）およびWheat Germ Extract Plusにおいて発現させた場合について比較しました。これらのタンパク質は全て元のままの配列でコードされており（つまり発現系に合わせたコドンの最適化は行っていません）どれもアフィニティタグあるいは可溶性タグは付いていません。また、Wheat Germ Extract Plusを用いて発現させたタンパク質の中で直ちにアッセイできる1種類についてその機能活性を調べました（Caspase-Glo® 3/7 Assay、カタログ番号G8090を用いた活性化プロカスペーゼ-3のアッセイ）。その結果、透析法を用いれば、機能を持ったタンパク質は4倍近くに増加することが示されました。

ヒト組換えタンパク質クローンのライブラリー作成

Flexi® Vector Systemsでは、柔軟性が高く、方向性のあるクローニング法により、タンパク質コード領域をペプチド融合タグ付きあるいはタグ無しで発現するプラスミドを作製することができます。発現やタンパク質融合タグの付加に必要な特徴はベクターの骨格に存在し、タンパク質コード領域は、切断頻度の低い2つのレアカッター制限酵素、*SgfI*と*PmeI*によってベクター間で容易に移し換えることができます。Flexi® Vectorには致死遺伝子バーナーゼが含まれており、これを利用してタンパク質コード配列のポジティブセレクションを行います。また、抗生物質耐性マーカーも含まれており、Flexi® Vectorを有するコロニーの選択を行います。これらのシステムにより、迅速、効率的かつ高い正確性で、様々なFlexi® Vector間での遺伝子配列を移動させることができます。

我々は、Origene（MD, 米）、かずさDNA研究所（千葉、日本）、IMAGE consortiumおよびMGC（ATCC経由、VA, 米）といった複数の遺伝子バンクから組換えヒトタンパク質クローンを得ました。OrigeneとかずさDNA研究所から得られたコード領域は、両端に*SgfI*と*PmeI*サイトを持つFlexi® Vector形式になっていました。IMAGEとMGCからのcDNAクローンは、コード領域に*SgfI*および*PmeI*サイトを付加したプライマーを用いてタンパク質コード領域を増幅することによって、Flexi® Vector形式に変換しました（3）。

大腸菌での実験では、タンパク質コード領域はpF1AあるいはpF1K T7 Flexi® Vectorにすでに移し換えられているか、あるいは移し換えました（図1、パネルA）。これらのベクターはT7 RNAポリメラーゼプロモーターを介したタンパク質コード領域の転写を意図して構築されており、これらのベクターを使ったin vivoでのタンパク質発現には、BL21(DE3)pLysS 細胞のようなT7 RNAポリメラーゼを発現する菌株が必要になります。小麦胚芽の実験では、タンパク質コード領域はpF3AまたはpF3K WG(BYDV) Flexi® Vectorに移し換えました（図1、パネルB）。これらのベクターは、T7またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを介して小麦胚芽抽出液を用いたin vitroタンパク質発現を行うようにデザインされています。また、これらのベクターはオオムギ黄萎ウイルス：Barley Yellow Dwarf Virus(BYDV) の5'および3'翻訳増進配列を含んでいて、これにより小麦胚芽抽出液によるタンパク質発現量が増加する可能性があります（4, 5）。

以降の実験では、これらのクローンからのプラスミドDNAはPureYield™ Plasmid Midiprep System（カタログ番号A2492）を用いて精製しました。大腸菌のin vivo実験では、pF1AまたはpF1KプラスミドDNAは、BL21(DE3)pLysSコンピテントセルに形質転換されました。表1では、このライブラリーに集めたタンパク質を、それぞれの登録番号と予想タンパク質分子量と共にリストにしています。ライブラリーには、代表的なキナーゼ、転写因子、受容体、プロテアーゼファミリーが含まれています。今回の異種タンパク質発現の実験では、表1に挙げたヒトタンパク質コード領域によって、バーナーゼの灰色で示された配列（図1）を置き換えます。

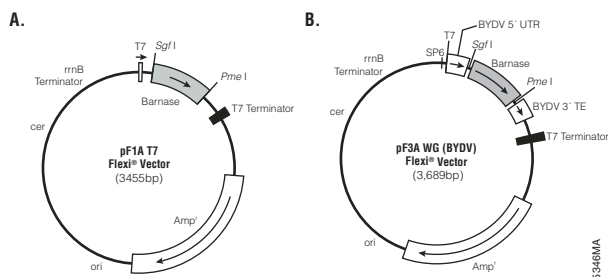


図1. ヒトタンパク質の発現に用いたFlexi® Vector

パネルA. pF1A T7ベクター。パネルB. pF3A WG (BYDV) ベクター。カナマイシンあるいはアンピシリン耐性のマーカーを持つプラスミドがある。

E.coli BL21(DE3)pLysSにおけるヒトタンパク質の発現

BL21(DE3)pLysS細胞には、IPTGによって誘導されるプロモーターの制御下にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が存在します。55種類全てのヒトタンパク質クローンでこの菌株を形質転換し、Coomassie® 染色ゲルで予想サイズのタンパク質を生産するかどうかを確認しました。55種類のヒトクローンのうち、たったの3つのみがSDS-PAGE解析で可溶性タンパク質として発現されることが確認されました。これらのクローンのうちの1つを図2に示します。発現の頻度はやや低いものの、大腸菌で発現させることが難しいとされているキナーゼやその他のタンパク質を多く含んでいるライブラリーであることを考えると、この頻度は予想発現頻度からそれほどかけ離れてはいません。大腸菌におけるタンパク質発現に影響する要因として考えられるのは、コドンユースージ、可溶性増進ペプチドとの融合、メッセージの安定性、シャペロンを介したフォールディング、細胞毒性、翻訳後修飾、そしてタンパク質結合パートナーの存在などです。比較のために、無細胞系E.coli T7 S30 Extract System for Circular DNAおよびWheat Germ Extract Plusについてもタンパク質発現を調べました。

E. coli T7 S30 Extract Systemにおけるヒトタンパク質の発現

E.coli T7 S30 Extract System for Circular DNAには、転写および翻訳に必要な全ての成分とT7 RNAポリメラーゼが含まれており、T7 RNAポリメラーゼプロモーターを持つpF1AあるいはpF1K T7 Flexi® Vector (カタログ番号C8441、C8451) にクローニングされたDNA配列の発現を単純化します。鋳型DNAを添加した後、タンパク質発現は37℃で2時間行われ、非放射性的FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System (カタログ番号L5001) を用いてモニタリングしました。発現タンパク質の可溶性は、遠心前と遠心後のサンプルをSDS-PAGEにかけ、ラベルされたタンパク質のバンドを比較することで評価しました(図3、パネルA)。調べた55種類のヒトタンパク質のうち、42種類(76%)が発現しましたが、50%以上の可溶性を示すタンパク質はたったの10種類(発現したもののうちの24%)でした(表1)。

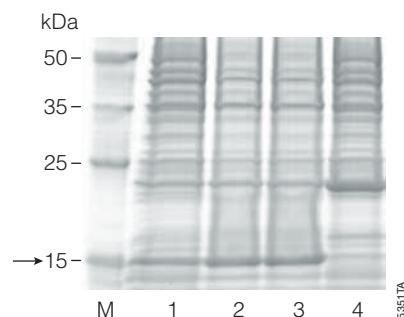


図2. BL21 (DE3) pLysSコンピテントセル (カタログ番号L1191) でのサンプル49の大腸菌 in vivo発現

LB培地を用いた培養(37℃)で、O.D.₆₀₀が0.5に達したところで1mM IPTGによる誘導をかけた。37℃で4.5時間培養した後、細胞を回収して1晩-20℃で凍結した。細胞は50μg/μlのリゾチームを含む20mM HEPES (pH 7.2)、2mM EDTAに再懸濁し、超音波破碎 (Branson Model 2510、各5分間 3回) で完全に溶菌した。サンプルは4~20%のTris-Glycineゲル (Invitrogen、カタログ番号EC6025) で分離した。分析はAmersham Personal Densitometer SIを用いて行った。レーンM: Promega Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号V8490); レーン1: 非誘導の全細胞破碎液; レーン2: 誘導をかけた全細胞破碎液; レーン3: 誘導をかけた上清; レーン4: コントロールのBL21 (DE3) pLysS細胞。レーン3の誘導をかけた上清では、破碎液を16,000×g、22℃で15分間遠心した。矢印はタンパク質の予想サイズ15,747Daを示している。

Wheat Germ Extract Plusにおけるヒトタンパク質の発現

Wheat Germ Extract Plusは、広い範囲のmRNA鋳型を効率的に翻訳するために必要な成分を全て含んでいます(1)。次の実験では、pF3AまたはpF3K環状プラスミドを鋳型としてT7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (カタログ番号P1320) により転写物を合成し、その後MicroSpin® G-25 Columns (Amersham) で精製したものをを用いました。

約8μgのmRNAを使い、Wheat Germ Extract Plusによる翻訳反応を行いました。タンパク質発現は、非放射性的FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System (カタログ番号L5001; 図4) を用いてモニタリングしました。発現タンパク質の可溶性は、遠心前と遠心後のサンプルをSDS-PAGEにかけ、ラベルされたタンパク質のバンドを比較することで評価しました。ここで調べた55種類のヒトタンパク質全てが、50%以上の可溶性で発現されました(図3、パネルB; 図4)。

無細胞抽出液による可溶性ネイティブ-ヒトタンパク質の発現

表1. 本研究で使用されたタンパク質ライブラリーの概要

サンプル1～40はOrigene (MD, 米) サンプル41～44はかずさDNA研究所から得た。サンプル1～44はFlexi® Vectorに入った状態で提供された。サンプル45～55はPCRクローニングによりFlexi® Vectorに入れ、元となる鋳型はIMAGEまたはMGCコレクションからATCC (VA, 米) を介して提供されたcDNA。BL21 = *E. coli* BL21(DE3)pLysSコンピテントセル。S30 = *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA。WG = Wheat Germ Extract Plus。ACC = 登録番号。N = 発現せず。I = 発現したが不溶性。S = 発現し可溶性。可溶性は、22 において16,000 × gで15分間に遠心した後、可溶性画分に残る発現タンパク質が50%以上であるものと定義した。

Sample	Description	ACCN	Mol. Wt.	BL21	S30	WG
1	Androgen receptor (dihydrotestosterone receptor; AR)	NM_000044	99287	N	I	S
2	Estrogen receptor 1 (ESR 1)	NM_000125	66315	N	N	S
3	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A (HTR1A)	NM_000524	46206	N	I	S
4	Glutamate receptor, metabotropic 2 (GRM2)	NM_000839	95667	N	N	S
5	Glutamate receptor, metabotropic 3 (GRM3)	NM_000840	98979	N	I	S
6	Mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14)	NM_001315	41393	N	S	S
7	Heat shock factor binding protein 1 (HSBP1)	NM_001537	8643	N	N	S
8	B-cell translocation gene 1 anti-proliferative (BTG1)	NM_001731	19308	N	I	S
9	fms-related tyrosine kinase (FLT1)	NM_002019	150834	N	N	S
10	Integrin, alpha V, vitronectin receptor (ITGAV)	NM_002210	116151	N	I	S
11	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase; KDR)	NM_002253	151640	N	I	S
12	Protein kinase C, gamma (PRKCG)	NM_002739	78547	N	N	S
13	Mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9)	NM_002752	48238	N	S	S
14	Mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAP2K6)	NM_002758	37592	N	I	S
15	Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP2K4)	NM_003010	44387	N	I	S
16	Aurora kinase C (AURKC)	NM_003160	32287	N	I	S
17	Aurora kinase B (AURKB)	NM_004217	39380	N	I	S
18	cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)	NM_004379	35236	N	S	S
19	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)	NM_004448	138026	N	N	S
20	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (MCM2)	NM_004526	101996	N	I	S
21	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5 cell division cycle 46 (MCM5)	NM_006739	82385	N	N	S
22	Calcium binding protein P22 (CHP)	NM_007236	22555	N	N	S
23	Nuclear receptor binding protein (NRBP)	NM_013392	59944	N	I	S
24	Mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8)	NM_013909	48395	N	I	S
25	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (MCM4)	NM_018274	96657	N	I	S
26	Growth factor, augmentor of liver regeneration (GFER)	XM_034465	15495	N	S	S
27	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (BTK)	NM_000061	76381	N	I	S
28	Glutamate receptor, metabotropic 5 (GRM5)	NM_000842	128973	N	I	S
29	Spleen tyrosine kinase (SYK)	NM_003177	72066	N	I	S
30	tec protein tyrosine kinase (TEC)	NM_003215	34649	N	I	S
31	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta (PTK2B)	NM_004103	115935	N	I	S
32	EPH receptor B3 (EPHB3)	NM_004443	110429	N	I	S
33	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1)	NM_005012	104412	N	I	S
34	Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R)	NM_005211	108083	N	I	S
35	Discoidin domain receptor family, member 2 (DDR2)	NM_006182	96836	N	N	S
36	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4)	NM_017460	57542	N	S	S
37	Neurotrophic tyrosine kinase (NTRK3)	NM_002530	929015	N	N	S
38	fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)	NM_004119	112904	N	N	S
39	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT)	NM_000222	109964	N	I	S
40	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1)	NM_002851	254630	N	I	S
41	Protein tyrosine phosphatase receptor type T (PTPRT)	AB006621	165434	S	I	S
42	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily c, member 6 (DNAJC6)	AB007942	102887	S	I	S
43	Myotubularin-related protein 3 (MTMR3)	AB002369	154450	N	N	S
44	TAO kinase 1 (TAOK1)	AB037782	116533	N	I	S
45	Histone deacetylase (HD1)	U50079	55202	N	I	S
46	Caspase-6, apoptosis-related cysteine protease	BC000305	33409	N	I	S
47	Cysteine protease Yama (procaspase-3)	U26943	31707	N	S	S
48	Mineralocorticoid receptor (hMR)	M16801	107167	N	S	S
49	Cellular retinol binding protein II (CRBP2)	U13831	15747	S	I	S
50	Glucocorticoid receptor (GRL)	NM_000176	85759	N	S	S
51	Procaspase-7, cysteine protease CHM-1	U40281	34376	N	I	S
52	Melanoma antigen recognized by T cells (MAR1)	BC014423	13256	N	N	S
53	Small muscular protein (SMPX)	BC005948	9658	N	S	S
54	T-cell activation protein (Q9Y605)	BC022797	14749	N	I	S
55	T-cell tumor protein (TCTP)	BC003352	19695	N	S	S

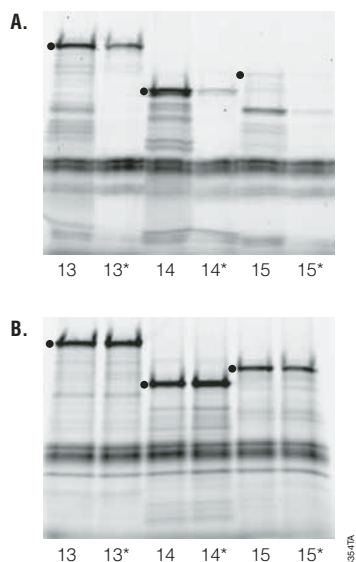


図3. 無細胞抽出液中に発現したタンパク質の可溶性

発現したタンパク質の可溶性は、遠心前と遠心後のサンプルについてSDS-PAGE上でラベルしたタンパク質のバンドを比較して判断した。反応液は室温において14,000 rpmで15分間遠心し、Eppendorf 遠心機5415 Cを用いて可溶性画分を調製した。4~20%のTris-Glycineゲル (Invitrogen、カタログ番号EC6025) に遠心前/遠心後の反応液1μlを添加した。ゲルはAmersham Typhoon® Blue2 (488) Laserを励起に用い、520BP 40CY2 Blue Fam 蛍光フィルターを用いて蛍光光度計で解析した。遠心後のサンプル13、14、15はサンプル13*、14*、15*と示す。パネルA. 無細胞系タンパク質発現は、*E.coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (カタログ番号L1130) を用い、環状DNA 約4μg、FluoroTect™ GreenLys tRNA (カタログ番号L5001) 1μl、Amino Acid Mixture Minus Methionine 2μl とAmino Acid Mixture Minus Leucine 2μlを使用して、Technical Bulletin #TB219の方法で行った。反応は37 °Cで2時間行った。パネルB. 翻訳はWheat Germ Extract Plusにおいて、mRNA 約8μg、FluoroTect™ GreenLys tRNA 1μlを用いて25 °Cで2時間行った。ドットは各サンプルにおける予想タンパク質サイズを示している。

Wheat Germ Extract Plusにおける透析によるタンパク質収率の増加

Wheat Germ Extract Plusは、一般的には単一チューブ方式 (バッチモード) で使用され、10~80μg/mlの範囲でのタンパク質を発現します (1)。この収率は透析を行うことで上げることができます。我々は8種類のヒトタンパク質の発現を透析モードで行いました。Coomassie® 染色したSDS-PAGEをベースにすると、これらのタンパク質の収量は250μg/mlと推定されました。サンプルのうちの1つ、サンプル47のプロカパーゼ-3については、機能活性を測定しました。プロカパーゼ-3をカパーゼ-8で活性化した後、Caspase-Glo® 3/7 Assay (カタログ番号G8090) を用いて活性をアッセイしました。7時間の透析モードで発現したタンパク質のカパーゼ-3活性は、単一チューブ方式に比べて4倍近くにまで増加しました。組換えカパーゼ-3標準品 (BioMol) と小麦胚芽で発現しカパーゼ-8でプロセッシングされた前駆体酵素が同様の活性を持っていると仮定すると、バッチモードでは34μg/ml、透析モードでは120μg/mlのカパーゼ-3が発現したことになります。これは、レポータータンパク質を用いて測定したところ透析モードではタンパク質発現が4~7倍に増加したというこれまでの結果と一致します (参考文献1、データ未掲載)。

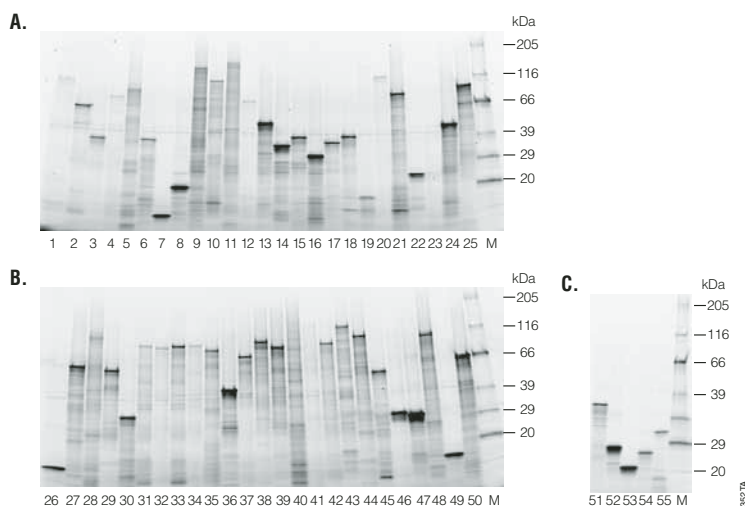


図4. Wheat Germ Extract Plusによる55種類のヒトタンパク質の発現

Flexi® VectorプラスミドDNAは、PureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号A2492) のコンビネーションプロトコルを用いて精製した。転写産物はT7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (カタログ番号P1320) を用いて55種類の環状プラスミド鋳型から生成され、その後ゲルろ過による精製を行った (MicroSpin® G-25 Columns, Amersham、カタログ番号27-5325-01)。翻訳はWheat Germ Extract Plus (カタログ番号L3250) を用いて、mRNA約8μgとFluoroTect™ GreenLys tRNA (カタログ番号L5001) 1μlを用いて25 °Cで2時間行った。翻訳終了後、各反応液のうち5μlを1μlのRNase ONE™-Ribonuclease (カタログ番号M4261)、4μlの水と混和し、室温で15分間静置後、未反応のFluoroTect™ リジン結合tRNAを除去した。RNase ONE™-Ribonuclease処理したサンプルのうちの2μlを、10μlの4×SDSサンプルバッファーと混和し、65 °Cで1分間加熱後、4~20%のCriterion™ Precast ゲル (Bio-Rad、カタログ番号345-0034) で150ボルト1.5時間で分離した。レーンM: 蛍光分子質量マーカー (Sigma、カタログ番号F3526) を4×SDSサンプルバッファー1:100で希釈し、1μlを添加した。ゲルはAmersham Typhoon® Blue2 (488) Laserを励起に用い、520BP 40CY2 Blue Fam 蛍光フィルターを用いて蛍光光度計により解析した。

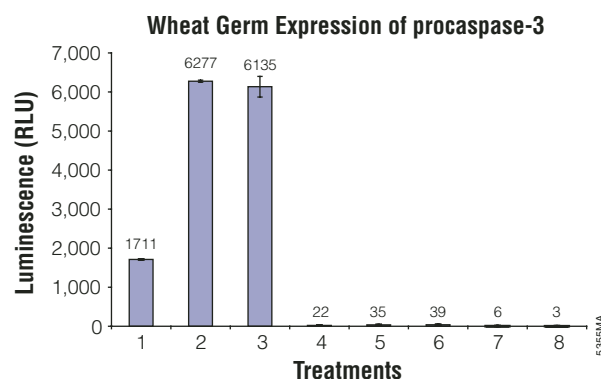


図5. Wheat Germ Extract Plusによるプロカスペーゼ-3の発現

パッチモード反応 (treatmentの1と4) は、約8μgのmRNAと30μlのWheat Germ Extract Plusを用い、50μlの反応液中で25、2時間行われた。treatmentの7と8はインプットRNAなしのパッチモードのコントロール。透析モード反応 (treatmentの2、3、5、6) は、約12μgのmRNAと30μlのWheat Germ Extract Plusを用い、50μlの反応液中において25、7時間 (treatmentの2と5) または18時間 (treatmentの3と6) 透析カップ (MWCO 12,000 BioTec International、第一化学薬品が販売、DBCコード212956) とUniplate (Watman カタログ番号7701-5102) で2.5mlのバッファーを使って行われた。透析バッファーの組成は、12mM HEPES、0.5mMスベルミジン、5mM DTT、80μMアミノ酸、100mM KOAc、1.2mM ATP、0.1mM GTP、10mM CP、1.5mM Mg(OAc)₂。

カスパーゼ3活性は、Caspase-Glo® 3/7 Assay (カタログ番号G8091) で測定した。プロカスパーゼ-3は、20μlの溶解液を250U カスパーゼ-8 (2.5μlのBioMol カスパーゼ-8) で37、1時間処理することで活性化された (treatment 1、2、3、7) 対応する未処理の溶解液 (treatmentの4、5、6、8) には2.5μlの10mM HEPES (pH 7.5) を加え、37 で1時間反応させた。カスパーゼ8処理あるいは未処理の後、溶解液は10mM HEPES (pH 7.5) で1:20,000の濃度に希釈した。Caspase-Glo® 3/7 Assay測定は、定常状態で行われた (約20分)。結果は相対発光量 (RLU) として表示した。標準曲線 ($r^2 = 0.9994$) は組換えヒトカスパーゼ-3 (BioMol SE-169、インプットRNAを含まない) Wheat Germ Extract Plusで、200U/mlから1:20,000に希釈した) を使って得られ、その比活性は13,889Units/μg。 (BioMolでは、1活性ユニットは200μMのAc-DEVD-pNAを用いて30 で1pmol/分のpNAを生成する酵素量と定義。)

結論

我々は、55種類の異なるヒトタンパク質をコードするFlexi® Vectorプラスミドを用いて、Wheat Germ Extract Plusと2つの大腸菌発現系における可溶性ネイティブ-タンパク質発現を比較しました。E. coli BL21(DE3)pLysS細胞の可溶性画分に発現したタンパク質が3種類のみであったのに対し、E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNAで発現したタンパク質の数は42種類に増えましたが、そのうち可溶性画分に発現したのは10種類だけでした。Wheat Germ Extract Plusでは、55種類全てのタンパク質が可溶性画分に発現しました。また、我々はカスパーゼ-8によって活性化されるカスパーゼ-3の前駆体酵素の発現についても試験しました。単一チューブでのパッチモードと比較すると、Wheat Germ Extract Plusの透析モードでは4倍近い収量が得られました。

参考文献

- Hurst, R. *et al.* (2005) *Promega Notes* **90**, 19–21.
- Slater, M. *et al.* (2005) *Promega Notes* **89**, 11–5.
- Flexi® Vector Systems Technical Manual, #TM254, Promega Corporation.
- Guo, L., Allen, E.M. and Miller, W.A. (2000) *RNA* **6**, 1808–20.
- Guo, L., Allen, E.M. and Miller, W.A. (2001) *Mol. Cell* **7**, 1103–9.

プロトコル

- ◆ *Wheat Germ Extract Plus System Technical Manual* #TM066, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm066/tm066.html
- ◆ *Flexi® Vector Systems Technical Manual* #TM254, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm254/tm254.html
- ◆ *PureYield™ Plasmid Midiprep System Technical Manual* #TM253, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm253/tm253.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Wheat Germ Extract Plus	40 × 50μl	L3250	60,000
	10 × 50μl	L3251	17,000
pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector	20μg	L5671	45,000
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	20μg	L5681	45,000
pF1A T7 Flexi® Vector	20μg	C8441	42,000
pF1K T7 Flexi® Vector	20μg	C8451	42,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
BL21(DE3)pLysS Competent Cells	1ml	L1191	21,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090	16,000
E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA	30 reactions	L1130	58,000
FluoroTect™ Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System	40 reactions	L5001	50,000
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 preps	A2492	27,000
	100 preps	A2495	96,000