

テクニカル資料

略語およびシンボルマーク	2	EndA+またはEndA-大腸菌 選択の重要性	9
アミノ酸と核酸データ		大腸菌株制限の表現型	10
アミノ酸構造式	4	抗生物質：機能と耐性機構	10
アミノ酸の略語および分子量	4	実験用溶液の調製と特性	
ペプチド結合の化学式	4	バッファー・溶液の調製法	11
コドン表	4	バッファーの温度変化によるpHの影響	12
核酸の塩基対構造	5	耐熱性DNAポリメラーゼの特性	12
IUPACによるヌクレオチドの両義性コード	5	様々なアッセイ法で利用される検出波長	
各種NTPの特性	5	蛍光または発色によるアッセイ	13
プラスミドとタンパク質の数量データ		発光(ルシフェラーゼベース)によるアッセイ	13
汎用プラスミドのコピー数	5	ラジオアイソトープの特性	13
汎用核酸の長さおよび分子量	5	プロメガの細胞溶解剤とレポーターアッセイ/ タンパク質定量法との適合性	14
核酸とタンパク質の汎用換算式	6	制限酵素	
アガロース/ポリアクリルアミドゲル分析		制限酵素用バッファーの組成 (1X)	15
色素移動度：ポリアクリルアミド変性ゲル	6	末端付近に制限酵素認識部位を持つ PCR産物を切断する能力	15
色素移動度：ポリアクリルアミド未変性ゲル	6	スター活性の要因	15
色素移動度：アガロースゲル (0.5-1.4%)	6	プロメガの各種10Xバッファー使用における 制限酵素の相対活性値、反応温度、熱不活性化	16
アガロースゲル濃度と直鎖状DNAの 至適分離サイズ	6	制限酵素における部位特異的なメチル化の影響	18
アクリルアミドゲル濃度とタンパク質の 至適分離サイズ	6	IUPAC核酸によるヌクレオチドの両義性コード	19
大腸菌		認識配列のアルファベット順リスト	19
汎用大腸菌株の遺伝子型	7	一般的な制限酵素のイソシゾマー	20
大腸菌遺伝子型の説明	8	切断末端別の制限酵素	22
		プライマーとシークエンス情報	
		バクテリオファージRNAポリメラーゼ プロモーター配列について	23
		in vitro転写/翻訳の鋳型とするPCR産物用の T7プライマーの設計法	23
		プロメガのシークエンシング用プライマー	24
		プロメガのオリゴヌクレオチドの形状と濃度	25
		製品使用上の注意事項	
		製品に関する注意、保証	26
		「トレードマーク、サービスマーク、 使用制限、特許、その他の注意点」	26



Technical Reference

略語およびシンボルマーク

A	
α	alpha
Ab	antibody
Ac-DEVD-AMC	acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl coumarin (fluorogenic substrate for caspase-3/7)
Ac-DEVD-CHO	acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-1-aldehyde (reversible aldehyde inhibitor of caspase-3/7)
Ac-DEVD-pNA	acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (colorimetric substrate for caspase-3/7)
Ac-YVAD-AMC	acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-amino methyl coumarin (fluorogenic substrate for caspase-1)
Ac-YVAD-CHO	acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-1-aldehyde (reversible aldehyde inhibitor of caspase-1)
ADP	adenosine diphosphate
Ad-2	adenovirus-2
AKAP	A-kinase anchoring protein
a.m.u.	atomic mass unit
AMC	7-amino-4-methyl coumarin
amol	attomole (10^{-18} mole)
AMP	adenosine monophosphate
AMV	avian myeloblastosis virus
AP	alkaline phosphatase
AP1, 2	activator protein 1, 2
APC film	automatic processor-compatible film
ARE	AU-rich element
ATP	adenosine triphosphate
B	
β	beta
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BMV	brome mosaic virus
bp	base pairs
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
BSA	bovine serum albumin
BYDV	barley yellow dwarf virus
C	
CaM KII	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP)
CAT	chloramphenicol acetyltransferase
CBZ	benzyloxycarbonyl
CCD	charge-coupled device (camera)
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent
cdc2	cell division cycle 2 protein
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming unit
cGMP	guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP)
Ci	Curie
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CKI, CK-1	casein kinase I
CKII, CK-2	casein kinase II
cm	centimeter
CMM	canine pancreatic microsomal membranes
CMV	cytomegalovirus
CN	4-chloro-1-naphthol (a horseradish peroxidase substrate)
CNBr	cyanogen bromide
CNS	central nervous system
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CODIS	COmbined DNA Index System
cpm	counts per minute
CPP32	caspase-3 (DEVDase)
CREB	cAMP response element binding protein
C_t	cycle threshold
CTP	cytidine triphosphate
CXR	carboxy-X-tetramethylrhodamine
D	
Da	daltons
DAB	diaminobenzidine
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DEVDase	caspase protease activity on the DEVD peptide
ddRNAi	DNA-directed RNA interference
diAcFAM	diacetyl carboxyfluorescein
DLR	Dual-Luciferase [®] Reporter
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DOGS	dioctadecylamidoglycyl spermine
DOPE	L-dioleoyl phosphatidylethanolamine
DPPiV	dipeptidyl peptidase IV

dsDNA	double-stranded DNA
dsRNA	double-stranded RNA
DTT	dithiothreitol
E	
ED ₅₀	effective dose (for 50% of effect)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
em	emission
ERK1, 2	extracellular signal-regulated protein kinase 1, 2
EiBr	ethidium bromide
EiOH	ethanol
ex	excitation
F	
FAB/MS	fast atomic bombardment mass spectrometry
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FITC-VAD-FMK	FITC-carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (fluorescent marker for caspase activity)
FL	fluorescein
fmol	femtomole (10^{-15} mole)
G	
γ	gamma
g	gram
GAPDH	glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
GLB	Glo Lysis Buffer
GMO	genetically modified organism
GMP	guanosine monophosphate
GPDH	glycerol 3-phosphate dehydrogenase
GQ	genome qualified
GST	glutathione-S-transferase
GTP	guanosine triphosphate
H	
³ H	tritium
h	human
HC	high concentration
hCL1	synthetic CL1, a protein degradation signal
HCV	hepatitis C virus
HDPE	high-density polyethylene
HIV	human immunodeficiency virus
hLuc+	codon-optimized firefly luciferase gene
hLucCP+	hLuc+ with 3' hCL1 and hPEST sequences
hLucP+	hLuc+ with 3' hPEST sequence
hPEST	synthetic PEST, a protein degradation signal
HPLC	high-pressure or high-performance liquid chromatography
hRLuc	synthetic <i>Renilla</i> luciferase gene
hRLucCP	hRLuc with 3' hCL1 and hPEST sequences
hRLucP	hRLuc with 3' hPEST sequence
HRP	horseradish peroxidase
HSV	herpes simplex virus
HTP	high throughput
HTS	high-throughput screening
I	
IC ₅₀	inhibitory concentration (50% inhibition)
ICC	immunocytochemistry
ICE	interleukin-1 β -converting enzyme (caspase-1)
IGF	insulin-like growth factor
IgG	immunoglobulin G
IgY	immunoglobulin Y (chicken egg yolk immunoglobulin)
IHC	immunohistochemistry
IL-4	interleukin-4
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
iso-dC	isodeoxycytosine
iso-dG	isodeoxyguanosine
IVEC	in vitro expression cloning
IVT	in vitro transcription
J	
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JOE	6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxy-fluorescein
K	
kb	kilobase; kilobase pairs
kDa	kilodalton
K _m	Michaelis-Menten constant

(次ページにつづく)

略語およびシンボルマーク (つづき)

L	
λ	lambda
L	liter
LAR	Luciferase Assay Reagent
LDH	lactate dehydrogenase
LDPE	low-density polyethylene
LNGFR	low-affinity NGF receptor (p75 neurotrophin receptor)
LSC	liquid scintillation counting
<i>luc</i>	native firefly luciferase gene
<i>luc+</i>	synthetic firefly luciferase gene
LY 294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4 H-1-benzopyran-4-one (PI-3 kinase inhibitor)

M	
m	murine; milli
M	molar
mAb	monoclonal antibody
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry
MAO	monoamine oxidase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
MEK	MAPK kinase
mg	milligram (10 ⁻³ g)
MGFP	Monster Green® Fluorescent Protein
μg	microgram (10 ⁻⁶ g)
min	minute
μl	microliter (10 ⁻⁶ l)
μM	micromolar (10 ⁻⁶ M)
miRNA	micro RNA
ml	milliliter (10 ⁻³ l)
MLCK	kinase 338, myosin light chain kinase
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
mm	millimeter (10 ⁻³ m)
mM	millimolar (10 ⁻³ M)
mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MW	molecular weight

N	
N	Normal
NaOAc	sodium acetate
NBT	nitro blue tetrazolium
NED	N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride
NF	N-terminal fusion
NF-κB	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
nmol	nanomole (10 ⁻⁹ mole)
NMR	nuclear magnetic resonance
nt	nucleotide
NT-3, NT-4	neurotrophin-3, neurotrophin-4
NTP	nucleotide triphosphate (same as rNTP)

O	
OCT1	octamer-binding transcription factor 1
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl β-D-galactopyranoside

P	
P450	cytochrome P450
pAb	polyclonal antibody
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	polymerase chain reaction
PD 98059	2'-amino-3'-methoxyflavone, MEK1 inhibitor
PES	phenazine ethosulfate
PEG	polyethylene glycol
pg	picogram (10 ⁻¹² g)
Pgp	P-glycoprotein
Pi	inorganic phosphate
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	protein kinase C
PKG	cGMP-dependent protein kinase
PI 3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLB	Passive Lysis Buffer
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), PKC activator
pmol	picomole (10 ⁻¹² mole)
PMP	paramagnetic particle
PMS	phenazine methosulfate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
pNA	<i>p</i> -nitroaniline
PNGase F	peptide N-glycosidase F
PNPP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate

Poly(A)	polyadenylation sequence
PPase	protein phosphatase
PTPase	protein tyrosine phosphatase
PTK	protein tyrosine kinase
PTT	protein truncation test
PVDF	polyvinylidene fluoride
PVP	polyvinylpyrrolidone

Q	
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase PCR

R	
r	recombinant
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RF DNA	replicative form DNA
RISC	RNA-induced silencing complex
RLB	Reporter Lysis Buffer
RLU	relative light units
<i>Rluc</i>	native <i>Renilla</i> luciferase gene
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase	ribonuclease
rNTP	ribosynucleotide triphosphate, (same as NTP)
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomal RNA
RT	reverse transcriptase
RT-PCR	reverse transcription PCR

S	
SAM	S-adenosylmethionine
SAM	streptavidin matrix
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SB 203580	(4-[4'-fluorophenyl]-2-[4'-methylsulfinylphenyl]-5-[4'-pyridyl]imidazole), a p38 MAP kinase inhibitor
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SP1	specificity protein 1
SSB	single-stranded DNA binding protein
ssDNA	single-stranded DNA
St	stearated
STR	short tandem repeat
SV40	simian virus 40

T	
TAE	tris acetate EDTA
TAP	tobacco acid pyrophosphatase
TBE	tris borate EDTA
TCA	trichloroacetic acid
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TE	Tris-EDTA buffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TFIIIB	transcription factor II B
TGFβ _{1,2}	transforming growth factor β1, 2
TK	thymidine kinase
TLC	thin-layer chromatography
T _m	melting temperature
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TMR	carboxy-tetramethylrhodamine
TNFα	tumor necrosis factor-α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
TPCK	N-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
Trk	tyrosine kinase neurotrophin receptor family
tRNA	transfer RNA
TTP	thymidine triphosphate
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick-end labeling

U	
u	unit
UTP	uracil triphosphate

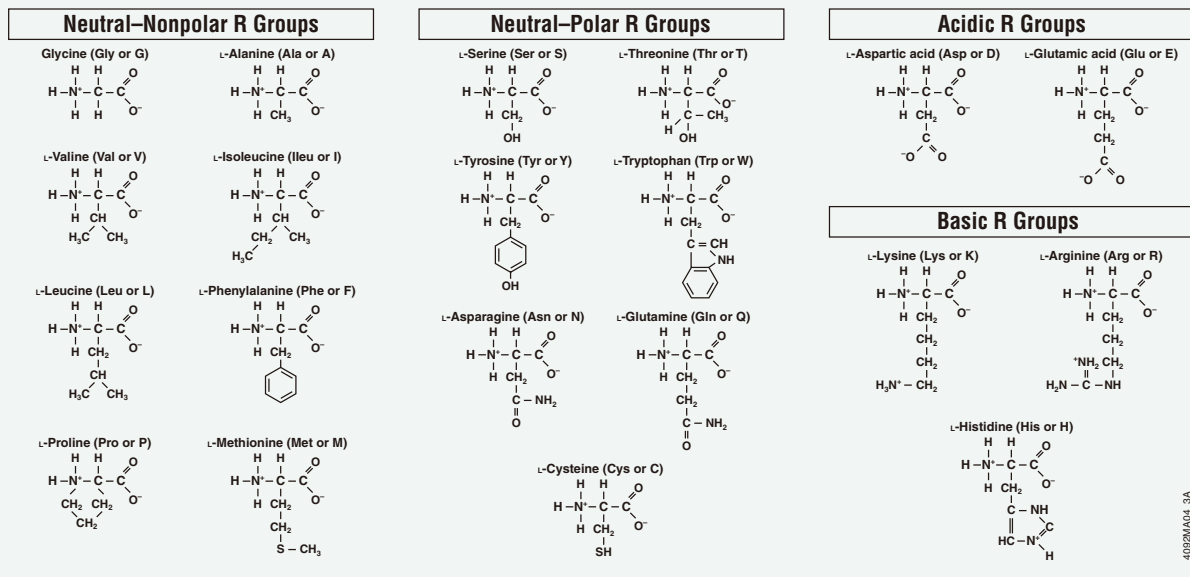
V	
(v/v)	volume:volume ratio
VAcHT	vesicular acetylcholine transporter
V _{max}	maximum velocity (enzyme kinetics)

W	
(w/v)	weight:volume ratio

X	
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

Z	
Z-DEVD-R110	bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-aspartic acid amide) rhodamine 110 (fluorogenic substrate for caspase 3/7)
Z-VAD-FMK	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (pan caspase inhibitor)
zmol	zeptomole (10 ⁻²¹ mole)

アミノ酸構造式

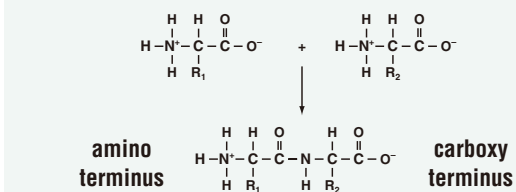


アミノ酸の略語および分子量

アミノ酸	3文字表記	1文字表記	分子量
Alanine	Ala	A	89Da
Arginine	Arg	R	174Da
Asparagine	Asn	N	132Da
Aspartic acid	Asp	D	133Da
Asparagine or aspartic acid	Asx	B	133Da
Cysteine	Cys	C	121Da
Glutamine	Gln	Q	146Da
Glutamic acid	Glu	E	147Da
Glutamine or glutamic acid	Glx	Z	147Da
Glycine	Gly	G	75Da
Histidine	His	H	155Da
Isoleucine	Ile	I	131Da
Leucine	Leu	L	131Da
Lysine	Lys	K	146Da
Methionine	Met	M	149Da
Phenylalanine	Phe	F	165Da
Proline	Pro	P	115Da
Serine	Ser	S	105Da
Threonine	Thr	T	119Da
Tryptophan	Trp	W	204Da
Tyrosine	Tyr	Y	181Da
Valine	Val	V	117Da

アミノ酸の平均分子量は110Da

ペプチド結合の化学式



R₁およびR₂は2種類のアミノ酸の各側鎖基

コドン表

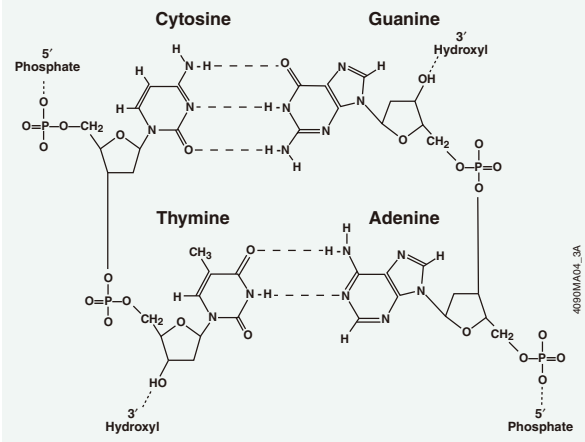
		2番目							
		U	C	A	G				
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

コドンの方向は5'→3'

停止コドンは太文字

AUG開始コドンは太文字/斜体

核酸の塩基対構造



IUPACによるヌクレオチドの両義性コード

- Y = T or C (pyrimidine)
- R = G or A (purine)
- M = A or C (amino)
- K = G or T (keto)
- S = G or C (strong interaction: 3 H bonds)
- W = A or T (weak interaction: 2 H bonds)
- B = G or T or C (not A)
- V = G or C or A (not T, not U)
- D = G or A or T (not C)
- H = A or C or T (not G)
- N = G or A or T or C (unknown nucleotide)

各種NTPの特性

NTP	MW*	λ_{\max} at pH 7.0 (nm)	Absorbance at λ_{\max} for 1M Solution (E) (pH 7.0)
α -S dATP	507.3	259	15,400
α -S dCTP	483.3	271	9,100
α -S dGTP	523.3	252	13,700
α -S dTTP	498.3	267	9,650
ATP	507.2	259	15,400
CTP	483.2	271	9,000
dITP	492.2	249	12,200
dUTP	468.2	262	10,200
GTP	523.2	253	13,700
UTP	484.2	260	10,000
dATP	491.2	259	15,400
dCTP	467.2	272	9,100
dGTP	507.2	253	13,700
dTTP	482.2	267	9,600
iso-dC	481.2	260	6,300
iso-dG	507.2	292	11,000

* 無水和の遊離酸としての分子量

吸光度/核酸濃度換算式

$$\frac{\text{(observed absorbance at } \lambda_{\max})}{\text{absorbance at } \lambda_{\max} \text{ for 1M solution}} = \text{molar concentration of nucleic acid}$$

参考資料

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

汎用プラスミドのコピー数

プラスミド	サイズ	複製起点*	コピー数	**収量 (ml培養液あたり)	文献
pGEM® series	2,700bp	mutated pMB1	300-700	1.8-4.1 μ g	1
pUC	2,700bp	mutated pMB1	500-700	2.9-4.1 μ g	1
pBR322	4,400bp	pMB1	>25	>0.23 μ g	2
ColE1	4,500bp	ColE1	>15	>0.15 μ g	3
pACYC	4,000bp	p15A	~10	~0.09 μ g	4
pSC101	9,000bp	pSC101	~6	~0.12 μ g	5
HaloTag® pHT2	5,000bp	mutated pMB1	300-700	3.3-7.6 μ g	1
pGL series	5,000bp	mutated pMB1	300-700	3.3-7.6 μ g	1
pRL series	4,000bp	mutated pMB1	300-700	2.7-6.0 μ g	1
pHRL series	4,000bp	mutated pMB1	300-700	2.7-6.0 μ g	1
pHRG series	4,000bp	mutated pMB1	300-700	2.7-6.0 μ g	1
pCBG and pCBR series	5,000bp	mutated pMB1	300-700	3.3-7.6 μ g	1
phMGFP	4,700bp	mutated pMB1	300-700	3.1-7.1 μ g	1
pGEM®-T/Easy	3,000bp	mutated pMB1	300-700	2.0-4.6 μ g	1
pGeneClip™ series	5,000bp	mutated pMB1	300-700	3.3-7.6 μ g	1
psiCHECK™-1/2	4,000-6,000bp	mutated pMB1	300-700	2.7-9.1 μ g	1
pSTRIKE™ series	4,000bp	mutated pMB1	300-700	2.7-6.0 μ g	1
pTnT™	2,900bp	mutated pMB1	300-700	1.9-4.4 μ g	1
pCMVnT™	4,000bp	mutated pMB1	300-700	2.7-6.0 μ g	1
pACT and pBIND series	6,000bp	mutated pMB1	300-700	4.0-9.1 μ g	1
pALTER®-1/Ex1	5,800bp	pMB1	>25	>0.3 μ g	3
pALTER®-Ex2	5,800bp	p15A	~10	~0.13 μ g	4
pSP	2,500bp	mutated pMB1	300-700	1.6-3.8 μ g	1
pCI, pSI	3,600bp	mutated pMB1	300-700	2.4-5.5 μ g	1

* pMB1、mutated pMB1およびColE1を持つプラスミドは共に不適合グループに属するため互いに不適合ですが、これらはp15AまたはpSC101レプリコンを持つプラスミドとは完全に適合します。

** 理論上のプラスミド収量は、細胞 2.0×10^8 個/ml 菌体培養液 (37°C、16時間培養) と仮定し、報告されているコピー数、各プラスミドのサイズから算出した値。

参考資料

1. Summerton, J., Atkins, T. and Bestwick, R. (1983) *Anal. Biochem.* **133**, 79.
2. Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) *Anal. Biochem.* **114**, 193.
3. Jansz, H.S., Pouwels, P.H. and Schiphorst, J. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* **123**, 626.
4. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513.
5. Birnboim, H.C. (1983) *Meth. Enzymol.* **100**, 243.

汎用核酸の長さおよび分子量

核酸	塩基長	分子量*
lambda DNA	48,502 (dsDNA)	3.2×10^7
pBR322 DNA	4,361 (dsDNA)	2.8×10^6
28S rRNA	4,800	1.6×10^6
23S rRNA (<i>E. coli</i>)	2,900	1.0×10^6
18S rRNA	1,900	6.5×10^5
16S rRNA (<i>E. coli</i>)	1,500	5.1×10^5
5S rRNA (<i>E. coli</i>)	120	4.1×10^4
tRNA (<i>E. coli</i>)	75	2.5×10^4

* シークエンスに基づく分子量

核酸の平均分子量

1. Average MW of a dsDNA base pair = 660.
2. Average MW of a ssDNA base = 330.
3. Average MW of an RNA base = 340.

参考資料

1. Daniels, D.L. et al. (1983) *Appendix II: Complete annotated lambda sequence*. In: *Lambda II*, ed., R.W. Hendrix et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 519.
2. Sutcliffe, J.G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3737.
3. Sutcliffe, J.G. (1979) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 77.

Technical Reference

核酸とタンパク質の汎用換算式

オンラインの計算サイトwww.promega.com/biomath/でこれらの計算が行えます。

接頭語と記号

接頭語	記号	大きさ
kilo	k	10 ³
centi	c	10 ⁻²
milli	m	10 ⁻³
micro	μ	10 ⁻⁶
nano	n	10 ⁻⁹
pico	p	10 ⁻¹²
femto	f	10 ⁻¹⁵
atto	a	10 ⁻¹⁸
zepto	z	10 ⁻²¹

吸光度/DNA濃度変換

- 1 A₂₆₀ unit of double-stranded DNA = 50μg/ml
- 1 A₂₆₀ unit of single-stranded DNA = 33μg/ml
- 1 A₂₆₀ unit of single-stranded RNA = 40μg/ml

DNA重量/mol数変換

- 1μg of 1,000bp DNA = 1.52pmol (3.03pmol of ends)
- 1μg of pBR322 DNA = 0.36pmol DNA
- 1pmol of 1,000bp DNA = 0.66μg
- 1pmol of pBR322 DNA = 2.8μg

DNA重量/mol数変換式

2本鎖DNA

$$\text{pmol} \rightarrow \mu\text{g} : \text{pmol} \times N \times \frac{660\text{pg}}{\text{pmol}} \times \frac{1\mu\text{g}}{10^6\text{pg}} = \mu\text{g}$$

$$\mu\text{g} \rightarrow \text{pmol} : \mu\text{g} \times \frac{10^6\text{pg}}{1\mu\text{g}} \times \frac{\text{pmol}}{660\text{pg}} \times \frac{1}{N} = \text{pmol}$$

N : 塩基長 (bp)
660pg/pmol : 1塩基の平均分子量

1本鎖DNA

$$\text{pmol} \rightarrow \mu\text{g} : \text{pmol} \times N \times \frac{330\text{pg}}{\text{pmol}} \times \frac{1\mu\text{g}}{10^6\text{pg}} = \mu\text{g}$$

$$\mu\text{g} \rightarrow \text{pmol} : \mu\text{g} \times \frac{10^6\text{pg}}{1\mu\text{g}} \times \frac{\text{pmol}}{330\text{pg}} \times \frac{1}{N} = \text{pmol}$$

N : 塩基長 (base)
330pg/pmol : 1塩基の平均分子量

タンパク質のmol数/重量変換

- 100pmol of 100kDa protein = 10μg
- 100pmol of 50kDa protein = 5μg
- 100pmol of 10kDa protein = 1μg
- 100pmol of 1kDa protein = 100ng

DNA長/タンパク質分子量変換

- 1kb of DNA = 333 amino acids of coding capacity = 37kDa protein
- 270bp DNA = 10kDa protein
- 810bp DNA = 30kDa protein
- 1.35kb DNA = 50kDa protein
- 2.7kb DNA = 100kDa protein
- average MW of an amino acid = 110 daltons

色素移動度：ポリアクリルアミド変性ゲル

色素は表示の2本鎖DNA長と同じポイントに移動する。

ゲル濃度 (%)	プロモフェノールブルー	キシレンシアノール
5.0	35bp	140bp
6.0	26bp	106bp
8.0	19bp	75bp
10.0	12bp	55bp
20.0	8bp	28bp

Adapted from Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

色素移動度：ポリアクリルアミド未変性ゲル

色素は表示の2本鎖DNA長と同じポイントに移動する。

ゲル濃度 (%)	プロモフェノールブルー	キシレンシアノール
3.5	100bp	460bp
5.0	65bp	260bp
8.0	45bp	160bp
12.0	20bp	70bp
15.0	15bp	60bp
20.0	12bp	45bp

Adapted from Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

色素移動度：アガロースゲル (0.5-1.4%)

色素は表示の2本鎖DNA長と同じポイントに移動する。

色素	サイズ
GoTaq® blue dye	4kb
Xylene cyanol FF	4kb
Bromophenol Blue	300bp
Orange G	50bp
GoTaq® yellow dye	10bp

Some information adapted from Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

アガロースゲル濃度と直鎖状DNAの至適分離サイズ

ゲル濃度 (%)	至適分離サイズ (bp)
0.5	1,000-30,000
0.7	800-12,000
1.0	500-10,000
1.2	400-7,000
1.5	200-3,000
2.0	50-2,000

アクリルアミドゲル濃度とタンパク質の至適分離サイズ

ゲル濃度 (%)	至適分離サイズ (kDa)
8	40-200
10	21-100
12	10-40

汎用大腸菌株の遺伝子型

大腸菌の遺伝子は下記の対立遺伝子変異以外は野性型とします。

特記しない限り F' 因子は野性型で、λ- です。*マークで表した大腸菌はコンピテントセルとしてプロメガから購入頂けます。また太文字がついてるものはグリセロールストックとしてお求めいただけます。

大腸菌株	遺伝子型
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), dcm, gal, λ(DE3)
*BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS (Cm ^r)
BMH 71-18 mutS	thi, supE, Δ(lac-proAB), [mutS::Tn10(tet ^r)] [F', tra D36, proAB, lacI ^q ZΔM15]
C600 (1)	thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44
C600hfl (1)	thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, hflA150::Tn10(tet ^r)
DH1 (2)	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), supE44, relA1
DH10B	F ⁻ , mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, λ-, rpsL(str ^r), nupG
DH5α™	φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF) U169, phoA
DM1 (3)	F', dam-13::Tn9(Cm ^r) dcm, mcrB, hsdR-M ^r , gal1, gal2, ara-, lac-, thr-, leu-, ton ^R , tsx ^R , Su ^o
ES1301 mutS	lacZ53, thyA36, rha-5, metB1, deoC, IN(rrnD-rrnE), [mutS201::Tn5]
*HB101 (4)	thi-1, hsdS20 (r _B ⁻ , m _B ⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(str ^r), xyl-5, mtl-1
JM101 (5)	supE, thi, Δ(lac-proAB), F' (traD36, proAB, lacI ^q ZΔM15)
*JM109 (5)	endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q ZΔM15]
JM109(DE3) (5)	endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q ZΔM15], λ(DE3)
JM110 (5)	rpsL(str ^r), thr, leu, thi, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q ZΔM15]
*KRX	[F', traD36, ΔompP, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal ^r), thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), e14 ⁻ (mcrA-), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA Polymerase
KW251	supE44, galK2, galT22, metB1, hsdR2, mcrB1, mcrA, [argA81::Tn10(tet ^r)], recD1014
LE392 (6)	hsdR514, (r _K ⁻ , m _K ⁺), supE44, supF58, lacY1 or Δ(lacZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55
NM522 (7)	supE, thi, Δ(lac-proAB), Δhsd5 (r _K ⁻ , m _K ⁻), [F', proAB, lacI ^q ZΔM15]
NM538 (8)	supF, hsdR (r _K ⁻ , m _K ⁺), trpR, lacY
NM539 (8)	supF, hsdR (r _K ⁻ , m _K ⁺), lacY, (P2)
Stb12™	F ⁻ , mcrA, Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1, λ-, Δ(lac-proAB)
Stb14™	mcrA, Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1, λ-, Δ(lac-proAB), gal, F' {proAB ⁺ , lacI ^q , ZΔM15, Tn10(tet ^r)}
SURE®	e14 ⁻ , (mcrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5 (kan ^r), uvrC, [F' proAB, lacI ^q ZΔM15::Tn10 (tet ^r)]
TOP10	F ⁻ , mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, rpsL (str ^r), endA1, nupG
TOP10F'	F' {lacI ^q Tn10 (tet ^r)}, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (str ^r), endA1, nupG
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI ^q ZΔM15::Tn10(tet ^r)]
XL10-Gold®	Tet ^r , Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte [F' proAB lacI ^q ZΔM15, Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]
Y1089 (9)	Δ(lacU169), proA+, Δ(lon), araD139, strA, hflA150, [chr::Tn10(tet ^r)], (pMC9)
Y1090 (9)	Δ(lacU169), proA+, Δ(lon), araD139, strA, supF, rpsL(str ^r), [trpC22::Tn10 (tet ^r)], (pMC9), hsdR (r _K ⁻ , m _K ⁺)

表示

F' : F' エピソームを持ち、菌株によっては特徴が加えられます。
λ () : 宿主菌ゲノムにポリメラーゼ遺伝子を持つバクテリアファージ
λが組み込まれています。pMC9はlacI^qを持つpBR322で、amp耐性およびtet耐性を供与します。

参考資料

- Jendrisak, J., Young, R.A. and Engel, J. (1987) In: *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Berger, S. and Kimmel, A., eds., Academic Press, San Diego, CA.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Lorow-Murray, D. and Bloom, F. (1991) *Focus* **13**, 20.
- Lacks, S. and Greenberg, J.R. (1977) *J. Mol. Biol.* **114**, 153.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103.
- Murray, N. et al. (1977) *Mol. Gen. Genet.* **150**, 53.
- Gough, J. and Murray, N. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 1.
- Frischauf, A. et al. (1983) *J. Mol. Biol.* **170**, 827.
- Huynh, T., Young, R.A. and Davis, R. (1985) In: *DNA Cloning*, Vol. 1, Glover, D., ed., IRL Press Ltd., Oxford, UK.

大腸菌遺伝子型の説明

遺伝子型	説明	変異による効果
<i>ara-14</i>	アラビノース代謝変異	アラビノース異化作用の阻害
<i>araD</i>	L-リブロースリン酸4-エピメラーゼ変異	アラビノース異化作用の阻害
<i>argA</i>	N-アセチルグルタミン酸シンターゼ変異	最少培地での増殖にアルギニンが必要
<i>cycA</i>	D-アラニン、グリシン、D-セリン、D-サイクロセリンの輸送、L-アラニンキャリアーに関連	炭素の供給源としてD-アラニンを利用不能
<i>dam</i>	アデニンメチラーゼ変異	5'...G ^m ATC...3' 配列内のアデニンのメチル化阻害
<i>dapD</i>	スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ変異	スクシニルCoAの合成を障害し、コハク酸またはリジン+メチオニンの補充を要求
<i>dcm</i>	シトシンメチラーゼ変異	5'...C ^m CAGG...3' と 5'...C ^m CTGG...3' 配列内のシトシンのメチル化阻害
<i>deoC</i>	デオキシリボース-リン酸アルドラーゼ変異	
<i>deoR</i>	調節遺伝子の変異 デオキシリボース合成遺伝子からの発現を安定化	長いプラスミドの効果的な増殖
<i>dut1</i>	dUTPをdUMP+PPiに変換する デオキシウリジントリホスファターゼ変異	dUTPからdUMPへの変換が障害され、dUTPプールが増加し、チミンの代わりにウラシルが取込まれる。dUTPの安定した取込みにはung遺伝子の変異が必要。
<i>endA1</i>	エンドヌクレアーゼI 変異	精製プラスミドDNAの質が向上
<i>galE</i>	galETKオペロンの一部で、UDPガラクトース-4-エピメラーゼをコード	バクテリオファージP1の感染に対する抵抗性獲得
<i>galK</i>	ガラクトキナーゼ変異	ガラクトースの異化作用を阻害
<i>galT</i>	ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ変異	ガラクトースの異化作用を阻害
<i>gyrA96</i>	DNAジャイレース変異	ナリジキシン酸に対する抵抗性獲得
<i>hflA150</i>	chl遺伝子産物の安定化を誘導するプロテアーゼ変異	λファージの溶原化頻度増大 (1)
<i>hflB</i>	プロテアーゼ変異	λファージの溶原化頻度増大
<i>hsdR</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺)	制限マイナス、修飾プラス (<i>E. coli</i> K株メチレーションシステム)	トランスフォームしたDNAが内在性制限酵素で切断されず、クローニング可能。この宿主菌から調製したDNAはr _K ⁺ 大腸菌へトランスフォーム可能。
<i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻)	制限マイナス、修飾マイナス (<i>E. coli</i> B株メチレーションシステム)	トランスフォームしたDNAが内在性制限酵素で切断されず、クローニング可能。この宿主菌から調製したDNAは <i>hsdS20</i> メチラーゼによるメチル化を受けていません。
<i>lacI^q</i>	<i>lac</i> リプレッサーの過剰発現	<i>lac</i> リプレッサーにより <i>lac</i> プロモーターからの転写を阻害
<i>lacY</i>	ガラクトシドパーミアゼ変異	ラクトース利用阻害
<i>lacZΔM15</i>	β-D-ガラクトシダーゼ遺伝子の部分欠失	ベクター側 (pGEM [®] -Z Vectorなど) から発現するα-ペプチドの補充 (α相補) により、β-ガラクトシダーゼ活性を回復。X-Galを含むプレートで組換え体を選別する青/白選択が可能。
<i>leuB</i>	β-インプロピルマレートデヒドロゲナーゼ変異	最少培地での増殖にロイシンが必要
Δ(<i>lon</i>)	<i>lon</i> プロテアーゼ欠失	発現したタンパク質の分解を抑制
<i>LysS</i>	pLysSプラスミドが宿主ゲノムに統合	このプラスミドを持つ菌株はtet耐性を持ち、T7リソチーム (T7 RNAポリメラーゼの天然阻害物質) 産生により、T7 RNAポリメラーゼプロモーターに制御される転写のバックグラウンドが低減 (2)。
<i>mcrA</i>	メチルシトシン制限システム変異	5'...G ^m CGC...3' 配列でメチル化されたDNAの制限阻害
<i>mcrB</i>	メチルシトシン制限システム変異	5'...AG ^m CT...3' 配列でメチル化されたDNAの制限阻害
<i>metB</i>	シスタチオンγ-シンターゼ変異	最少培地での増殖にメチオニンが必要
<i>metC</i>	シスタチオンβ-リアーゼ変異 メチオニンの生合成に関与	最少培地での増殖にメチオニンが必要
<i>mtl</i>	マンニトール代謝変異	マンニトール異化作用の阻害
<i>mutS</i>	メチル基質依存的ミスマッチ修復マイナス株	メチル化されていない新合成鎖のミスマッチ修復を阻害
<i>ompT</i>	プロテアーゼVII (外膜タンパク質) 変異	発現したタンパク質の分解を抑制
P2	P2バクテリオファージ溶原菌	P2溶原菌では <i>red</i> , <i>gam</i> 遺伝子を持つλファージの増殖を阻害 (3)
<i>proA</i>	γ-グルタミルリン酸レダクダーゼ変異	<i>proA</i> / <i>argD</i> 変異はプロリン合成を阻害しないが、アルギニンにより抑制。変異体は最少培地にプロリンを放出し、プロリンアナログに耐性を獲得。 <i>proA</i> / <i>argD</i> / <i>argR</i> の3重変異体は最少培地+アルギニンで緩やかに増殖。
<i>proAB</i>	プロリン代謝変異	最少培地での増殖にプロリンが必要
<i>recA1</i> , <i>recA13</i>	組換え変異	導入DNAと宿主菌DNAの組換えを阻害するためインサートを安定に保持。 <i>recA13</i> 宿主菌より <i>recA1</i> 宿主菌の方がインサートを安定に保持します。
<i>recB</i> , <i>recC</i> <i>recD</i>	エクソヌクレアーゼV変異 Rec BCD3量体 (エクソヌクレアーゼV) は、ATP依存的にssDNAおよびdsDNAをオリゴヌクレオチドに分解。相同組換えに関与	一般的な組換えを低減し、放射線障害の修復に影響 逆位反復配列を容易に増殖
<i>recF</i>	組換え・修復 変異	変異体は娘鎖のギャップ (複製後修復) を修復不能

(次ページにつづく)

大腸菌遺伝子型の説明 (つづき)

遺伝子型	説明	変異による効果
<i>relA</i>	ppGppシンセターゼ I 変異 未結合tRNA感受リボソームタンパク質 <i>relA</i> (ppGppシンセターゼ I) はアミノ酸枯渇に反応して新規なヌクレオチドグアノシン5'-2リン酸-3'-2リン酸を合成	タンパク質合成のないRNA合成
<i>rha</i>	メチルペントースであるL-ラムノースの利用	ラムノースの異化作用を阻害
<i>rpsL</i>	30SリボソームのS12サブユニット変異	ストレプトマイシン耐性獲得
<i>sbcB</i>	エクソヌクレアーゼI変異	<i>recBC</i> 変異株での組換え
<i>strA</i>	変異体はリボソームタンパク質S12を変化させる	ストレプトマイシン耐性獲得
<i>supB, supC, supG, supL, supM, supN, supO</i>	サブプレッサー変異	オーカー (UAA) 変異およびアンバー (UAG) 変異のサブプレッサー変異
<i>supD, supE, supF</i>	サブプレッサー変異	アンバー (UAG) 変異のサブプレッサー変異
<i>thi-1</i>	チアミン代謝変異	最少培地での増殖にチアミンが必要
<i>thr</i>	スレオニン生成変異	変異体はスレオニン要求株
<i>thyA</i>	チミジル酸シンターゼ; d TTP生成	変異体はチミジン要求株
Tn5	トランスポゾン	カナマイシン耐性獲得
Tn10	トランスポゾン	テトラサイクリン耐性獲得
<i>tonA</i>	外膜タンパク質の変異	バクテリオファージT1抵抗性獲得
<i>traD36</i>	転移因子変異	F'エピソード転移阻害
<i>trpC</i>	ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ変異; トリプトファン生成経路の一部	
<i>trpR</i>	<i>trpR</i> アポリプレッサー; トリプトファンの生成の調節と輸送に関与	
<i>tsx</i>	T6ファージおよびコリシンK受容体; ヌクレオシドの特異的拡散に関わる外膜タンパク質; 抗生物質アルビシジン (albicidin) の輸送	バクテリオファージT6およびコリシンKに耐性
<i>ung1</i>	ウラシル-DNA N-グリコシラーゼ	プラスミドDNA内へのウラシル許容
<i>xyl-5</i>	キシロース代謝変異	キシロース異化作用阻害

参考資料

- Hoyt, A. et al. (1982) *Cell* **31**, 565.
- Studier, F.W. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 37-44.
- Kaiser, K. and Murray, N. (1985) In: *DNA Cloning*, Vol. 1, Glover, D., ed., IRL Press Ltd., Oxford, UK.

EndA+またはEndA-大腸菌 選択の重要性

エンドヌクレアーゼ I は、2本鎖DNAを分解する*endA*遺伝子にコードされた12kDaのペリプラズム タンパク質です。大腸菌遺伝子型*endA1*は野生型*endA*遺伝子の変異型として知られています。この変異を持つ大腸菌株は*EndA*ネガティブ (*EndA*-) と呼ばれ、野生型は*EndA*+と表記されます。下表は*EndA*-および*EndA*+菌株のリストです。良質なDNAは、プロメガのPureYield™およびWizard® Plus SV Plasmid Purification Systemを用いて*EndA*+および*EndA*-菌株のどちらからでも容易に得ることができます。しかし、産生されるエンドヌクレアーゼ I のレベルは菌株の種類に依存するので、非常に多くのエンドヌクレアーゼ I を産生する菌株を用いる場合、調製したプラスミドDNAから完全にエンドヌクレアーゼ I を排除することは困難です。通常、可能な限り*EndA*-菌株を使用することを推奨しています。

EndA+大腸菌株

ABLE® C	KW251
ABLE® K	LE392
BL21(DE3)	MC1061
BMH 71-18	NM522 (all NM series strains are EndA+)
CJ236	P2392
C600	PR700 (all PR series strains are EndA+)
DH12S™	Q358
ES1301	RR1
HB101	TB1
HMS174	TG1
JM83	TKB1
JM101	Y1088 (all Y10 series strains are EndA+)
JM110	

EndA-大腸菌株

BJ5183	JM108	SURE®
DH1	JM109	TOP10
DH10B	KRX	XLO
DH20	MM294	XL1-Blue
DH21	SK1590	XL10-Gold®
DH5α™	SK1592	
JM103	SK2267	
JM105	SRB	
JM106	Stb12™	
JM107	Stb14™	

大腸菌株制限の表現型

大腸菌株	mcrA	mcrBC	EcoK	
			R	M
C600	-	+	+	+
C600 <hfl< h1=""></hfl<>	-	+	+	+
DH5α™	+	+	-	+
DH10B	-	-	-	-
HB101	+	-	-	-
JM109	(-)	(+)	-	+
JM109(DE3)	(-)	(+)	-	+
KW251	-	-	-	+
LE392	-	+	-	+
NM538	-	+	-	+
NM539	-	+	-	+
Select96™	-	-	-	-
Stb12™	-	-	-	-
Stb14™	-	-	-	-
SURE®	-	-	-	-
TOP10	-	-	-	-
Y1089	(-)	+	+	+
Y1090	(-)	+	+	+

記号

- () = 前後世代より推定
- + = 野生型
- = 変異型

大腸菌は外来DNAの侵入を防ぐために、制限システム、修飾システムを持っています。通常、これらのシステムはメチラーゼと制限酵素を利用して、外来DNAと宿主菌のDNAを区別し、外来DNAを破壊します。このようなシステムは、異種DNAを組込んだベクターを大腸菌に導入する際に問題となります。しかし、制限システムを除去した様々な変異株を使用することにより、その問題を解決することができます。

大腸菌にはmcrA, mcrBCの2つのmcr (methyl-cytosine restricting) システムとmrr (modified adenine recognition and restriction) システムがあり、それぞれメチル化シトシン (m5C) やメチル化アデニン (m6A) を含む特殊な配列を持つDNAを制限し、多くの研究室で使用される大腸菌はこのタイプに属します。mcrA, mcrBC, mrrメチル化制限システムは配列に特異的で、この特殊配列がメチル化されている場合にのみ攻撃を受けます。一方、EcoKI制限システムでは、特定の認識部位がメチル化により防御されていない場合にDNAが制限されます。DNAはCpG methylases (M. Sss I) によりCpG配列のシトシンがメチル化され、様々なアデニンメチラーゼによりアデニンのメチル化を受けます。Dam (DNA adenine methyltransferase) はGATC配列を、Dcm (DNA cytosine methyltransferase) はCC(A/T)GG配列を修飾します。mcrA, mcrBCおよびmrrシステムはdcmサイトを修飾したDNAを制限せず、またmrrシステムはdam, EcoK IおよびEcoR Iサイトを修飾したDNAを制限しません(1)。

哺乳動物、高等植物や多くの原核生物のゲノムDNAにはメチルシトシンが含まれています(2)。そのため、このようなゲノム塩基配列をクローニングし、大腸菌で増やす場合はmcrおよびmrrシステムが欠除した大腸菌を使用する必要があります。

参考資料

1. Neidhardt, F.C. et al. (1996) In: Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, ASM Press, Washington, D.C.
2. Woodcock, D.M. et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 3469.

抗生物質：機能と耐性機構

抗生物質	機能	耐性機構	適正濃度	ストック溶液
Ampicillin (Amp)	ペニシリン派生物質で、バクテリアの細胞壁合成反応を阻害	耐性遺伝子 (bla) はペリプラズム酵素のβ-ラクタマーゼをコードしており、抗生物質のβ-ラクタム環を切断する	50-125µg/ml in water	50mg/ml
Chloramphenicol (Cm)	リボソームの50Sサブユニットに結合し、ペプチド結合の形成を妨げることによりタンパク質合成を阻害する静菌剤	耐性遺伝子 (cat) はアセチルトランスフェラーゼをコードしており、抗生物質にアセチル基を転移し、不活性化する	20-170µg/ml in ethanol	34mg/ml
Kanamycin (Kan)	70Sリボソームに結合し、mRNAの誤読の原因となる殺菌剤	耐性遺伝子 (kan) はアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼをコードしており、抗生物質を修飾し、リボソームとの結合を阻害する	30µg/ml in water	50mg/ml
Streptomycin (Sm)	リボソームの30Sサブユニットに結合し、mRNAの誤読の原因となる殺菌剤	耐性遺伝子 (str) にコードされる酵素が、抗生物質を修飾し、リボソームとの結合を阻害する	30µg/ml in water	50mg/ml
Tetracycline (Tet)	リボソームの30Sサブユニットに結合し、タンパク質合成を阻害する光感受性静菌剤	耐性遺伝子 (tet) にコードされるタンパク質はバクテリア膜を修飾し、抗生物質の細胞内侵入を防ぐ	10µg/ml in liquid culture; 12.5µg/ml in plates	12.5mg/ml in ethanol
Neomycin (Neo)	原核生物70Sリボソームサブユニットに結合し、タンパク質合成を阻害する殺菌剤。高濃度では、原核生物リボソームに類似したミトコンドリアリボソームと相互作用し、その他の真核生物リボソームの親和性も低下させるため、真核生物に対しても有毒性	バクテリアAPH (アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ) 遺伝子 (Tn5由来) の発現	50µg/ml for bacterial selection	25mg/ml in water
Hygromycin (Hygro)	80Sリボソームの転移を妨害するタンパク質合成阻害剤で誤翻訳の原因となる	耐性遺伝子 (hph) はホスホトランスフェラーゼをコードし、シクリトール環 (hyosamine) 上の4-水酸基をリン酸化する。生成した7'-O-ホスホリル-ハイグロマイシンBはin vivo、in vitroの両方で生物学的活性を失う	50-1,000µg/ml for mammalian selection; 20-200µg/ml for bacterial selection	100mg/ml in HEPES buffer (pH7.0) or water
Puromycin (Puro)	アミノヌクレオシド抗生物質は、原核生物および真核生物のリボソーム上におけるペプチル転移反応を特異的に阻害することによりタンパク質合成をブロックし、早期ペプチド伸張終結の原因となる	耐性遺伝子 (pac) はピューロマイシン N-アセチル-トランスフェラーゼをコードする	1-10µg/ml for mammalian selection	10mg/ml in HEPES buffer (pH 7.0) or water
G418	真核生物にのみ存在する80Sリボソームサブユニットに結合し、タンパク質合成を阻害	真核細胞でバクテリアAPH (アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ) 遺伝子 (Tn5由来) を発現し、G418を解毒	G418 is often used for initial selection at 500µg/ml, with a range of 50-1,000µg/ml	50mg/ml in either water or 100mM HEPES (pH 7.3)—prepared in a highly buffered solution to maintain tissue culture media pH

バッファー・溶液の調製法

溶液	調製法
アガロースゲルサンプルバッファー (6X)	TEバッファー (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) 6mlにスクロース4gとプロモフェノールブルー 2.5mgを溶解し、TEバッファーで10mlにメスアップします。室温保存。
7.5M酢酸アンモニウム	57.81gの酢酸アンモニウムを水に溶解し、水で100mlにメスアップします。0.2µmフィルターで濾過滅菌します。pH5.5。
BigDye® 希釈バッファー	250mM Tris-HCl (pH9.0), 10mM MgCl ₂
D-ピオチン, 100mM	100mM Na ₂ HPO ₄ に必要量のピオチンを溶解し、100mM NaH ₂ PO ₄ でpH7.2に調整します。100mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.2) で必要容量までメスアップした後、0.22µmフィルターで濾過滅菌し、無菌状態で分注します。
デンハルト溶液 (50X)	水300mlにFicoll® 5g, ポリビニルピロリドン5g, BSA 5gを溶解し、水で500mlにメスアップします。濾過後25mlずつ分注し、-20℃保存。
DEPC処理	処理する溶液100mlに0.2ml DEPC (dithiopyrocarbonate) を加え良く攪拌した後、ドラフトで一晩静置。残留DEPCを不活性化するためにオートクレーブします。 注意 : DEPCは発ガン性物質であるとされていますので、グローブ着用の上ドラフト内に取り扱ってください。Trisなどの一級アミンを含む溶液にはDEPC処理を行わないで下さい。
1M DTT (dithiothreitol)	0.01M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 20mlにDTT 3.09gを溶解します。濾過滅菌後、1mlずつ分注し、-20℃で保存。
0.5M EDTA (pH 8.0)	水800mlにdisodium ethylenediaminetetraacetate · 2H ₂ Oを186.1g溶解します。マグネットスターを用いて良く攪拌します。NaOHでpH8.0に調整し、分注後、オートクレーブにより滅菌します。
エチジウムブロマイド, 10mg/ml	水100mlにエチジウムブロマイド 1gを溶解します。マグネットスターで色素が完全に溶解するまで数時間攪拌します。容器をアルミホイルで包むか溶液を褐色瓶に移し、4℃で保存します。 注意 : エチジウムブロマイドは変異誘発性であり、毒性を有します。エチジウムブロマイド溶液を使用する際はグローブを着用し、粉末を秤量する場合はマスクをつけて下さい。
IPTG (0.1M)	脱イオン水にIPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 1.2gを溶解し、50mlにメスアップします。濾過滅菌 (0.2µm) 後、5mlずつ分注して-20℃で保存します。このIPTGストック溶液は-20℃で2-4ヶ月安定です。
LB	脱イオン水にBacto®-tryptone 10g, Bacto®-yeast extract 5g, NaCl 5gを溶解し、脱イオン水で1Lにメスアップします。10M NaOHでpH7.5に調整し、オートクレーブにより滅菌します。500mlずつ分注し、室温で保存します。
5X MOPSゲルランニングバッファー	DEPC処理水1.6LにMOPS (free acid) 83.72g, 酢酸ナトリウム8.23gを加え攪拌し完全に溶解します。DEPC処理した0.5M EDTA溶液20mlを加え、10N NaOHでpH7.0に調整します。DEPC処理水で2Lにメスアップした後、200mlずつ分注してオートクレーブします。溶液は黄色を呈しますが、バッファーの品質に影響はありません。分注した溶液は遮光して、室温または4℃に保存します。
M9 プレート (1mM thiamine-HCl)	脱イオン水にNa ₂ HPO ₄ 6g, KH ₂ PO ₄ 3g, NaCl 0.5g, NH ₄ Cl 1g, 寒天15gを溶解し、1Lにメスアップします。10N NaOHでpH7.4に調整後、オートクレーブし、50℃になるまで冷やします。1M MgSO ₄ 溶液2.0ml, 1M CaCl ₂ 0.1ml, 20%グルコース10ml, 1M thiamine-HCl 1.0mlを加えます。この完全培地を濾過滅菌 (0.2µm) し、プレートに注ぎます。カバーをしたプレートを逆さまにして4℃で保存します。1-2ヶ月は安定です。
Mueller Hinton II Broth	脱イオン水に牛肉エキス300g, Bacto® casamino acids 17.5g, Bacto® soluble starch 1.5gを加え、1Lにメスアップします。pH7.3に調整し、オートクレーブで滅菌します。
Mueller Hinton II Broth (cation-adjusted)	脱イオン水100mlにMgCl ₂ · 6H ₂ O 8.36gを溶解し、マグネシウムストック溶液を調製します (Mg ²⁺ の終濃度10mg/ml)。脱イオン水 100mlにCaCl ₂ · 2H ₂ O 3.68gを溶解し、カルシウムストック溶液を調製します (Ca ²⁺ の終濃度10mg/ml)。2つのストック溶液を濾過滅菌します。マグネシウムストック溶液をMg ²⁺ 終濃度10-12.5mg/mlになるように加え、カルシウムストック溶液はCa ²⁺ 終濃度20-25mg/mlになるように加えます。
フェノール (acid) (RNAにのみ使用)	50mM酢酸ナトリウム (pH 4.0) 500mlにフェノール500gを55℃に暖めて溶解します。分離した水相 (上部) を除去し、50mM酢酸ナトリウム (pH 4.0) 500mlを加え乳化させるために攪拌します。この操作を上部の水相がpH 4.1以下になるまで繰り返し行います。
PBS (phosphate-buffered saline)	滅菌水800mlにNaCl 8g, KCl 0.2g, Na ₂ HPO ₄ 1.44g, KH ₂ PO ₄ 0.24gを溶解します。HClでpH 7.4に調整し、1Lにメスアップします。分注後、オートクレーブで滅菌します。
酢酸カリウム (アルカリ溶解用)	5M酢酸カリウム60mlに氷酢酸11.5ml, 水28.5mlを加えます (本溶液はカリウムは3M, 酢酸は5Mです)。
RNAローディングバッファー	50%グリセロール, 1mM EDTA, 0.4%プロモフェノールブルー, 1mg/mlエチジウムブロマイドになるように、DEPC処理水に各試薬を加えます。リボヌクレアーゼの混入を防ぐために、グレードの高いグリセロールを使用してください。500µlずつ分注し、-20℃に保存します。10-20µl RNAサンプル (RNA + サンプルバッファー) に2µlのローディングバッファーを使用します。
RNAサンプルバッファー	脱イオンホルムアミド10.0ml, 37%ホルムアルデヒド3.5ml, 5X MOPS 2.0mlを混合します。500µlずつチューブに分注してキャップをしっかり閉めた後、-20℃で保存します。-20℃で保存すれば6ヶ月は保存できます。1種類のRNAサンプルには2つのサンプルバッファーを使用してください。 注意 : ホルムアミドは催奇物質であり、ホルムアルデヒドは毒性を持つ発ガン物質です。操作はドラフト内で行い、研究室の安全規定に従ってください。

(次ページにつづく)

Technical Reference

バッファー・溶液の調製法 (つづき)

溶液	調製法
SDSゲルサンプリングバッファー (2X)	グリセロール20ml、β-メルカプトエタノール5ml、10% SDS 20ml、プロモフェノールブルー 20mg、4Xスタッキングゲルバッファー (Tris 6.06g、10% SDS 4ml [pH 6.8] を水100mlに溶解) 25mlを混合します。溶解後、水で100mlにメスアップし、12N HClでpH6.8に調整後、室温に保存します。
10% SDS (sodium dodecyl sulfate)	水900mlに電気泳動グレードSDS 100gを溶解 (68℃に加温) します。HClでpH 7.2に調整後、1Lにメスアップし、分注します。SDSは刺激剤なので粉末を秤量する場合はマスクをして下さい。
20X SSC	水800mlにNaCl 175.3g、クエン酸ナトリウム88.2gを溶解し、10N NaOHでpH 7.0に調整します。1Lにメスアップし、分注後オートクレーブで滅菌します。
20X SSPE	水800mlにNaCl 175.3g、NaH ₂ PO ₄ ・H ₂ O 27.6g、EDTA 7.4gを溶解しNaOHでpH 7.4に調整します (10N NaOH溶液 約6.5ml)。1Lにメスアップし、分注後オートクレーブで滅菌します。
SOC	脱イオン水97mlにBacto®-tryptone 2.0g, Bacto®-yeast extract 0.5g, 1M NaCl 1ml, 1M KCl 0.25mlを加え完全に溶解するまで攪拌します。オートクレーブの後室温まで冷まします。2Mマグネシウムストック (1M MgCl ₂ , 1M MgSO ₄) 1mlと2Mグルコースストック1ml (終濃度は各20mM) を加えた後、濾過滅菌 (0.2µm) します。pH7.0に合わせ、25-50mlずつに分注後、室温で保存します。
50X TAE	脱イオン水700mlにTris-base 242g、Na ₂ EDTA・(2H ₂ O) 37.2gを溶解します。さらに氷酢酸57.1mlを加え、水で1Lにメスアップします。室温または4℃で保存します。
10X TBE	脱イオン水900mlにTris-base 108g、ホウ酸55gを溶解します。さらに0.5M EDTA (pH 8.0) 40mlを加え、水で1Lにメスアップします。室温または4℃で保存します。
TCA (trichloroacetic acid) 100%溶液	500g TCAの入っているボトルに水227mlを加えます。この溶液は100% (w/v) TCAです。
1X TEバッファー (pH 8.0)	10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA
TE-saturated phenol:chloroform: isoamyl alcohol	クロロホルム500mlにフェノール500gを溶解した後、イソアミルアルコール25mlを加えます。TEバッファー (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) を等量加え、攪拌して乳化します。2相に分離したら、上相を除き、再びTEバッファーを加えます。再度2相に分離したら、液相を1cm残して、上部を除きます。褐色瓶に入れて4℃で保存します。
TE-4 buffer (pH 8.0)	脱イオン水 900mlにTris-base 2.21g、EDTA (Na ₂ EDTA・2H ₂ O) 0.037g を溶解します。HClでpH8.0に調整し、脱イオン水で1Lにメスアップします。
尿素ポリアクリルアミドゲルサンプリングバッファー	脱イオンホルムアミド90mlにスクロース10g、プロモフェノールブルー 20mg、キシレンシアノール20mgを溶解します。その後、水で100mlにメスアップします。
X-Gal	液量が2mlになるようにN,N'-dimethylformamideにX-Gal 100mgを溶解します。500µlずつ分注した後、遮光して-20℃で保存します。X-Galの終濃度は50mg/mlです。このX-Galストック溶液は-20℃で2-4ヶ月安定です。

バッファーの温度変化によるpHの影響

バッファー	pK _a /20°C	ΔpK _a /10°C
MES	6.15	-0.110
ADA	6.60	-0.110
PIPES	6.80	-0.085
ACES	6.90	-0.200
BES	7.15	-0.160
MOPS	7.20	-0.013
TES	7.50	-0.200
HEPES	7.55	-0.140
Tricine	8.15	-0.210
Tris	8.30	-0.310
Bicine	8.35	-0.180
Glycylglycine	8.40	-0.280

参考資料

Good, N.E. (1986) *Biochemistry* **5**, 467.

耐熱性DNAポリメラーゼの特性

由来	Taq* (<i>Thermus aquaticus</i>)	Tfl (<i>Thermus flavus</i>)	Tth (<i>Thermus thermophilus</i>)	Tli (<i>Thermococcus litoralis</i>)	Pfu (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
MW	80kDa	94kDa	94kDa	90kDa	92kDa
Extension temperature	74°C	74°C	74°C	74°C	75°C
5'→3' Exonuclease Activity	Yes	Yes	Yes	No	No
3'→5' Exonuclease Activity	No	No	No	Yes	Yes
Reverse Transcriptase Activity	Weak	Yes	Yes	No	NA
Predominant PCR Product Ends	3'-A	3'-A	3'-A	70% Blunt; 30% Single-Base Overhangs	Blunt

* GoTaq® DNA PolymeraseおよびPCR Master MixにはTaq DNA Polymeraseが含まれています。NA = Not available.

参考資料

Newton, C.R. and Graham, A. (1994) In: *PCR*, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, U.K. 13.

蛍光または発色によるアッセイ

表示された波長は、各製品で推奨されるもので、この推奨波長と最大吸収/励起/蛍光波長とは異なる場合があります。

製品名 (化合物)	吸収	励起/蛍光
Apo-ONE® System (rhodamine 110)	—	485nm/530nm
AttoPhos® System (2-[2-benzothiazoyl]-6'-hydroxybenzothiazole; BBT)	—	435nm/555nm
β-Galactosidase Enzyme Assay System (o-nitrophenol)	420nm	—
CaspACE™ Assay System, Colorimetric (p-nitroaniline; pNA)	405nm	—
CellTiter 96® Assay (MTT formazan product)	570nm	—
CellTiter 96® AQ _{UBIOUS} Assay (MTS formazan product)	490nm	—
CellTiter 96® AQ _{UBIOUS} One Solution Assay (MTS formazan product)	490nm	—
CellTiter-Blue® Assay (resorufin)	570nm (1)	560nm/590nm
ChipShot™ Labeling and Clean-up System		
• Cy [®] 3	550nm	550nm/570nm
• Cy [®] 5	650nm	650nm/670nm
CytoTox 96® Assay (formazan product)	490nm	—
CytoTox-Fluor™ Assay	—	485nm/520nm
CytoTox-ONE™ Assay (resorufin)	570nm (1)	560nm/590nm
DAPI (nucleic acid stain)	—	360nm/460nm
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (fluorescein)	—	494nm/520nm
E _{max} ® ImmunoAssay Systems (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB)	450nm	—
FluoroTect™ Green _{lys} tRNA (BODIPY®-FL)	—	502nm/510nm
Griess Reagent (azo compound)	520–550nm	—
HaloTag® diAcFAM Ligand (after hydrolysis)	—	494nm/562nm
HaloTag® TMR Ligand	—	555nm/585nm
HaloTag® Coumarin Ligand	—	353nm/442nm
Hemoglobin (present in rabbit reticulocyte lysates)	300–600nm	—
Monster Green® Fluorescent Protein (hMGFP)	—	480nm/540nm
MultiTox-Fluor Assay	—	400nm/505nm and 485nm/520nm
Nucleic acids	260nm	—
PepTag® peptides	570nm	540nm/592nm
Phosphatase assay (molybdate dye)	600nm or 630nm	—
Polysaccharides (potential contaminant in DNA preparations)	230nm	—
PowerPlex® Systems		
• 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE)	—	520nm/548nm
• carboxy-tetramethylrhodamine (TMR)	—	550nm/573nm
• carboxy-X-rhodamine (CXR)	—	578nm/604nm
• fluorescein (FL)	—	494nm/520nm
ProFluor® Assays		
• rhodamine 110 (R110)	—	485nm/530nm
• 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC)	—	355nm/460nm
Propidium iodide (nucleic acid stain)	—	540nm/620nm
Protein	280nm	—

¹ レゾルフィンレベルは、570nmで分光光度 (比色法) により定量できますが、感度を増加させるために蛍光測定を推奨します。詳細についてはCellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB317またはCytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Technical Bulletin #TB306をご覧ください。

発光 (ルシフェラーゼベース) によるアッセイ

ルシフェラーゼは、基質内の化学エネルギーを光子として放出させることにより発光を生じる酵素です。この発光の原理は、蛍光の化学反応とは異なり、光を発生させるために関連する分子を励起させる必要はありません。

全てのルシフェラーゼは広いピーク幅を持った発光スペクトルを持つため、一般的に出来るだけ多くの可視スペクトルを測定することが推奨されます。しかし、2つの異なるルシフェラーゼを使用するChroma-Luc™ テクノロジーについてはこのルールに当てはまりません。これらのルシフェラーゼ発光は重複する部分がありながらも明確に区別可能な発光スペクトルを有しているため、それぞれの発光測定には異なる波長レンジを使用します。

製品名	発光波長のピーク	フィルターの必要性
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	560nm	No Filter
Beta-Glo® Assay System (β-Galactosidase assay coupled to a firefly luciferase reaction)	560nm	No Filter
Calpain-Glo™ Protease Assay	560nm	No Filter
Caspase-Glo® Assays (Caspase assay coupled to a firefly luciferase reaction)	560nm	No Filter
CellTiter-Glo® Assay (ATP assay using firefly luciferase)	560nm	No Filter
(Chroma-Luc™) Click beetle luciferase		
(Red) CBR _{luc}	613nm	610 long pass
(Green) CBG99 _{luc} or CBG68 _{luc}	537nm	510/60 (510±30)
DPPIV-Glo™ Protease Assay	560nm	No Filter
Firefly luciferase (<i>Luc</i> , <i>luc+</i> , <i>hLuc+</i> or <i>Luc2</i> genes from pGL3 and pGL4 Vector series or other vectors such as psiCHECK™-2)	560nm	No Filter
Kinase-Glo® Assay and Kinase-Glo® Plus Assay	560nm	No Filter
(Kinase assay coupled to a firefly luciferase reaction)		
MAO-Glo™ Assay	560nm	No Filter
P450-Glo™ Assays (Cytochrome P450 assay coupled to a firefly luciferase reaction)	560nm	No Filter
Pgp-Glo™ Assay System	560nm	No Filter
Proteasome-Glo™ Cell-Based Assay	560nm	No Filter
<i>Renilla</i> luciferase (<i>Rluc</i> or <i>hRluc</i> genes from pRL, phRL, phRG and pGL4 Vector series or other vectors such as psiCHECK™-1 and -2)	480nm	No Filter

ラジオアイソトープの特性

ラジオアイソトープの核は不安定でランダムに崩壊し、異なる元素に変わります。この崩壊に伴い高エネルギーを持つ原子構成要素が放出されます。これらの粒子はα粒子 (2陽子 + 2中性子)、β-粒子 (電子) があり、高エネルギー放射線 (γ線、x線) も放出されます。各ラジオアイソトープは放射活性の50%減衰時間 (半減期) で特徴づけられます。

ラジオアイソトープ (β線) の物性

ラジオアイソトープ	半減期	比活性 (mCi/mmol)	娘核
tritium [³ H]	12.43 years	10 ² –10 ⁵	helium-3
carbon-14 [¹⁴ C]	5,730 years	1–10 ²	nitrogen-14
sulphur-35 [³⁵ S]	87.4 days	1–10 ⁶	chlorine-35
phosphorus-33 [³³ P]	25.5 days	10–10 ⁴	sulphur-33
phosphorus-32 [³² P]	14.3 days	10–10 ⁶	sulphur-32

ラジオアイソトープ (γ線/x線) の物性

ラジオアイソトープ	半減期	比活性 (mCi/mmol)	娘核
iodine-131 [¹³¹ I]	8.06 days	10 ² –10 ⁴	xenon-131
iodine-125 [¹²⁵ I]	60 days	10 ² –10 ⁶	tellurium-125

プロメガの細胞溶解剤とレポーターアッセイ/タンパク質定量法との適合性

細胞溶解剤	適合するレポーターアッセイ	適合するタンパク質定量法 ⁽⁴⁾	ウェスタンブロット ⁽⁵⁾
Cell Culture Lysis Reagent (CCLR)	<ol style="list-style-type: none"> Luciferase Assay System⁽¹⁾ β-Galactosidase assay (β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer)⁽²⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> GenoTechnology NI™ Protein Assay Pierce BCA Protein Assay with Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set Bio-Rad RC DC™ Protein Assay Molecular Probes NanoOrange® Protein Quantitation Kit (dilute lysate 1:10) BioRad DC Protein Assay or Pierce BCA Protein Assay (dilute lysate at least 1:2) 	<ul style="list-style-type: none"> Compatible Can release cytoplasmic, mitochondrial and nuclear contents⁽⁶⁾
Reporter Lysis Buffer (RLB)	<ol style="list-style-type: none"> Luciferase Assay System⁽¹⁾ β-Galactosidase assay (including both β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer and Beta-Glo® Assay System) CAT Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer 	<ul style="list-style-type: none"> GenoTechnology NI™ Protein Assay Pierce BCA Protein Assay with Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set Pierce Coomassie® Plus protein assay Bio-Rad RC DC™ Protein Assay Normal Bradford assay with 2–8μl of undiluted lysate Molecular Probes NanoOrange® Protein Quantitation Kit (dilute lysate 1:10) BioRad DC Protein Assay (large scale only) or Pierce BCA Protein Assay (dilute lysate at least 1:2) 	<ul style="list-style-type: none"> Compatible Can release cytoplasmic and nuclear contents. RLB releases nuclear contents more efficiently with a freeze-thaw cycle⁽⁶⁾
Passive Lysis Buffer (PLB)	<ol style="list-style-type: none"> Luciferase Assay System⁽¹⁾ β-Galactosidase assay (including both β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer and Beta-Glo® Assay System) CAT Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer Dual-Luciferase® Reporter Assay 	<ul style="list-style-type: none"> GenoTechnology NI™ Protein Assay Pierce BCA Protein Assay with Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set Pierce Coomassie® Plus protein assay Bio-Rad RC DC™ Protein Assay Pierce BCA Protein Assay (dilute lysate 1:10) Molecular Probes NanoOrange® Protein Quantitation Kit (dilute lysate 1:10) 	<ul style="list-style-type: none"> Compatible Can release cytoplasmic and nuclear contents⁽⁶⁾
Glo Lysis Buffer (GLB)	<ol style="list-style-type: none"> Luciferase Assay System⁽¹⁾ Bright-Glo™ Luciferase Assay and Steady-Glo® Luciferase Assay ONE-Glo™ Luciferase Assay System β-Galactosidase assay (including both β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer and Beta-Glo® Assay System) (up to 45μl of lysate in assay)⁽²⁾ CAT Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (up to 25μl of lysate in assay)⁽³⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> GenoTechnology NI™ Protein Assay Pierce BCA Protein Assay with Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set Bio-Rad RC DC™ Protein Assay Pierce BCA protein assay (dilute lysate 1:10) Molecular Probes NanoOrange® Protein Quantitation Kit (dilute lysate 1:10) 	<ul style="list-style-type: none"> Compatible Can release cytoplasmic, mitochondrial and nuclear contents⁽⁶⁾
Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer (RLALB)	<ol style="list-style-type: none"> Renilla Luciferase Assay β-Galactosidase assay (up to 45μl of lysate in assay) CAT Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (up to 25μl of lysate in assay) 	<ul style="list-style-type: none"> GenoTechnology NI™ Protein Assay Pierce BCA Protein Assay with Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set Bio-Rad RC DC™ Protein Assay Molecular Probes NanoOrange® Protein Quantitation Kit (dilute lysate 1:10) 	<ul style="list-style-type: none"> Not tested

⁽¹⁾ Luciferase Assay Systemはホタルルシフェラーゼ活性のみを測定するようにデザインされています。また、シグナルの半減期は延長されていません。これらにはカタログ番号E1500, E1501, E4030, E4550およびE1483が含まれます。

⁽²⁾ β -Galactosidase Enzyme Assayに添付の停止バッファーを使用しなければ、1XRLBの代わりに細胞溶解剤またはライセートの希釈液として使用できます。システムに添付されている1M sodium carbonateを加えると沈殿が起り、正確な測定ができなくなるため、1xCCLR, 1XGLBで調製したサンプルを用いる場合は、停止バッファーとして1M Tris baseを使用することを推奨します。

⁽³⁾ 活性はRLBを使用した場合ほど高くは検出されません。CATの発現が非常に低い場合、最適な感度を得るためにRLBの使用を推奨します。

⁽⁴⁾ どのタンパク質定量システムを用いる場合にも、最適な精度を得るためにアッセイと同濃度の細胞溶解剤を使用して標準曲線を作成してください。タンパク質定量に問題がある場合はライセートを水でさらに希釈し、スケールを上げてアッセイしてください。

⁽⁵⁾ ウェスタンブロット分析は、APまたはHRP標識2次抗体を用い、HRPではTMB stabilized substrate、APIにはWester Blue®を用いた発色法により検出しました。細胞溶解剤 (CCLR, RLB, PLB, GLB) は 1X, 2X, 5Xの各濃度でテストしました (GLBは 1Xのみ)。

⁽⁶⁾ 異なる細胞内オルガネラ (細胞膜、核、ミトコンドリア) に対する溶解力について調べました。試験は、細胞質、ミトコンドリア、核それぞれに特異的な抗原である ERK1/2、シトクロームオキシダーゼサブユニット I、ヒストンに対するウェスタンブロット分析を用いて行いました。

制限酵素用バッファの組成 (1X)

バッファ	pH (at 37°C)	Tris-HCl (mM)	MgCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	DTT (mM)
A	7.5	6	6	6	—	1
B	7.5	6	6	50	—	1
C	7.9	10	10	50	—	1
D	7.9	6	6	150	—	1
E	7.5	6	6	100	—	1
F	8.5	10	10	100	—	1
G	8.2	50	5	—	—	—
H	7.5	90	10	50	—	—
J	7.5	10	7	—	50	1
K	7.4	10	10	—	150	—
L	9.0	10	3	100	—	—

MULTI-CORE™ Buffer (1X) = 25mM Tris-acetate (pH 7.5 at 37°C), 100mM potassium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM DTT.

備考

- 0°C~25°Cまでの範囲では、Trisバッファの温度が10°C上昇するごとに、TrisバッファのpHが0.31 pH unitsずつ減少します。
- 25°C~37°Cまでの範囲では、Trisバッファの温度が10°C上昇するごとに、TrisバッファのpHが0.25 pH unitsずつ減少します。
- プロメガの制限酵素には全て10mg/ml Acetylated BSAが添付されます。BSAは制限酵素の活性に必ずしも必要ではありませんが、多くの制限酵素で活性の増加が認められます。全ての制限酵素消化反応にBSAを終濃度0.1mg/mlになるように添加することを推奨します。

末端付近に制限酵素認識部位を持つPCR産物を切断する能力

酵素	PCR断片末端からの距離 (bp)			
	0	1	2	3
Apal	—	—	±	+
BamHI	—	±	+	+
BstXI	—	±	+	+
ClaI	—	±	+	+
EcoRI	—	±	+	+
EcoRV	—	+	+	+
HindIII	—	—	+	+
NotI	—	—	+	+

酵素	PCR断片末端からの距離 (bp)			
	0	1	2	3
PstI	—	—	±	+
SacI	—	±	+	+
Sall	+	+	+	+
SmaI	—	±	+	+
SpeI	+	+	+	+
XbaI	—	±	+	+
XhoI	—	—	±	+

PCR産物上の制限酵素認識配列末端とPCR産物自体の末端が0, 1, 2, 3ベース離れている場合の切断能力を様々な制限酵素でテストしました (1)。精製したPCR産物 (10-50ng) を0.5unitの制限酵素を含む10µlの適切な反応バッファ中で45分間消化しました。消化能は、切断可能 (+)、切断不能 (-)、低い再現性 (±) で示しました。データは少なくとも2回の反復実験より得られ、Eaton Publishingの許可を得て追試を行いました。

参考資料

- Zimmermann, K. *et al.* (1998) Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *BioTechniques* **24**, 582.

スター活性の要因

標準的でない条件で制限酵素処理を行った場合に、目的の認識部位と異なった配列でDNAが切断されることがあります。“スター活性”とはこのような至適化されていない条件下における認識部位に非特異的なDNAの消化を表します。最も頻繁に起こる現象 (活性)は認識配列外での1塩基置換、欠失、及び1本鎖のニックです(1)。一般的に、推奨されるバッファや適切な温度で制限酵素処理を行えばスター活性は生じません。多くの制限酵素で下記の要因によりスター活性が生じることが示されています (2)。

- 高い酵素濃度 (一般的に100 units/µg以上)
- 高いグリセロール濃度 (5% v/v以上)
- Mg²⁺の代用としたMn²⁺の使用 (またはその他の2価陽イオンの代用)
- 低い塩濃度 (一般的に25 mM以下)
- 高いpH, (特にpH 8.0以上)
- DMSO, エタノール, 有機溶媒の存在下

参考資料

- Barany, F. (1988) *Gene* **65**, 149.
- Brown, T.A., Hames, B.D. and Rickwood, D. (1991) In: *Molecular Biology Lab Fax*, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, United Kingdom.

● Technical and Legal References

Technical Reference

プロメガの各種10Xバッファー使用における制限酵素の相対活性値、反応温度、熱不活性化

それぞれの制限酵素に添付される10Xバッファーは100%の活性が得られるように至適化されています。ほとんどの場合、4-CORE® 10X Buffer (Buffer A~D) 中のいずれかで十分な活性が得られます。バッファー EおよびHは、汎用される多くのクローニング用酵素に対する最適なバッファーでもあるため、プロメガの酵素の多くはこれらのバッファーを用いた活性測定が行われています。この表から複数の制限酵素で消化する場合に最適なバッファーを選択することができます。図に示した相対活性値は、それぞれの酵素について最適なバッファーを用いた時の活性値を100%とした時の値です。

Promega 制限酵素	添付 バッファー	試験バッファー							MULTI- CORE™	熱不活性化	反応温度
		A	B	C	D	E	H				
AatII	J	50-75%	10-25%	<10%	<10%	10-25%	<10%	<10%	<10%	+	37°C
AccI	G	50-75%	25-50%	25-50%	10-25%	<10%	<10%	25-50%	25-50%	-	37°C
AccIII	F	<10%	10-25%	25-50%	25-50%	n.d.	n.d.	<10%	<10%	-	65°C
Acc65I	D	10-25%	50-75%	75-100%	100%	75-100%	100-125%**	100%	100%	+	37°C
AgeI	K	25-50%	25-50%	25-50%	50-75%	n.d.	n.d.	100%	100%	+	37°C
AluI	B	75-100%	100%	75-100%	10-25%	n.d.	n.d.	10-25%	10-25%	+	37°C
ApaI	A	100%	50-75%	50-75%	<10%	10-25%	<10%	75-100%	75-100%	+	37°C
AvaI	B	10-25%	100%	50-75%	25-50%	100%	10-25%	<10%	<10%	+/-	37°C
Avall	C	50-75%	50-75%	100%	25-50%	n.d.	n.d.	25-50%	25-50%	+	37°C
BalI	G	10-25%	<10%	<10%	<10%	n.d.	n.d.	<10%	<10%	+	37°C
BamHI	E	75-100%*	75-100%	75-100%	50-75%	100%	50-75%	75-100%	75-100%	+	37°C
BanI	G	25-50%	25-50%	10-25%	<10%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	50°C
BclI	C	10-25%	75-100%	100%	50-75%	50-75%	50-75%	10-25%	10-25%	-	50°C
BglI	D	10-25%	25-50%	75-100%	100%	25-50%	75-100%	100%	100%	+	37°C
BglIII	D	25-50%	75-100%	75-100%	100%	n.d.	n.d.	<10%	<10%	-	37°C
BsrSI	D	10-25%	25-50%	10-25%	100%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	65°C
BssHII	H	75-100%	50-75%	75-100%	50-75%	n.d.	100%	75-100%	75-100%	-	50°C
BstEII	D	25-50%	50-75%	50-75%	100%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	60°C
BstOI	C	10-25%	25-50%	100%	25-50%	n.d.	n.d.	<10%	<10%	-	60°C
BstXI	D	<10%	10-25%	25-50%	100%	100%	75-100%	10-25%	10-25%	+/-	50°C
BstZI	D	<10%	<10%	10-25%	100%	10-25%	75-100%	10-25%	10-25%	-	50°C
Bsu36I	E	<10%	25-50%	50-75%	25-50%	100%	n.d.	50-75%	50-75%	-	37°C
CfoI	B	75-100%	100%	75-100%	25-50%	n.d.	n.d.	100%	100%	+/-	37°C
Clal	C	75-100%	75-100%	100%	75-100%	100%	50-75%	100%	100%	+	37°C
CspI	K	<10%	10-25%	25-50%	50-75%	100%	100-125%**	10-25%	10-25%	+	30°C
DdeI	D	25-50%	25-50%	50-75%	100%	n.d.	n.d.	25-50%	25-50%	+/-	37°C
DpnI	B	50-75%	100%	75-100%	50-75%	n.d.	n.d.	100%	100%	+	37°C
DraI	B	75-100%	100%	75-100%	50-75%	n.d.	n.d.	25-50%	25-50%	+	37°C
Eco47III	D	<10%	25-50%	50-75%	100%	n.d.	n.d.	25-50%	25-50%	+	37°C
EcoCRI	B	10-25%	100%	75-100%	<10%	25-50%	n.d.	100%	100%	+	37°C
EcoRI	H	25-50%	50-75%	50-75%	50-75%	75-100%	100%	100%*	100%*	+	37°C
EcoRV	D	10-25%	25-50%	50-75%	100%	25-50%	50-75%	100%	100%	+	37°C
HaeII	B	50-75%	100%	50-75%	10-25%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	37°C
HaeIII	C	75-100%	75-100%	100%	50-75%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	37°C
HhaI	C	50-75%	75-100%	100%	50-75%	n.d.	n.d.	75-100%	75-100%	+	37°C
HincII	B	25-50%	100%	25-50%	50-75%	75-100%	50-75%	100%	100%	+	37°C
HindIII	E	25-50%	100%	75-100%	10-25%	100%	25-50%	50-75%	50-75%	+	37°C
Hinfl	B	50-75%	100%	75-100%	75-100%	n.d.	n.d.	50-75%	50-75%	-	37°C
HpaI	J	25-50%	50-75%	25-50%	10-25%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	37°C
HpaII	A	100%	50-75%	50-75%	10-25%	n.d.	n.d.	100%	100%	-	37°C

(次ページにつづく)

プロメガの各種10Xバッファー使用における制限酵素の相対活性値、反応温度、熱不活性化（つづき）

試験バッファー

Promega 制限酵素	添付 バッファー	試験バッファー						MULTI- CORE™	熱不活性化	反応温度
		A	B	C	D	E	H			
Hsp92I	F	10-25%	75-100%	50-75%	25-50%	n.d.	n.d.	10-25%	+	37°C
Hsp92II	K	10-25%	25-50%	25-50%	<10%	n.d.	n.d.	<10%	+	37°C
I-Ppol	I-Ppol	10-25%	25-50%	25-50%	25-50%	n.d.	n.d.	n.d.	+	37°C
KpnI	J	100%*	25-50%	25-50%	<10%	25-50%	<10%	75-100%	+/-	37°C
Mbol	C	10-25%	75-100%	100%	50-75%	n.d.	n.d.	<10%	+	37°C
MbolI	B	10-25%	100%	50-75%	75-100%	n.d.	n.d.	100%	+	37°C
MluI	D	10-25%	25-50%	50-75%	100%	25-50%	100-125%**	10-25%	+/-	37°C
MspI	B	75-100%	100%	75-100%	25-50%	n.d.	n.d.	25-50%	+	37°C
MspA1I	C	25-50%	100%*	100%	10-25%	n.d.	n.d.	100%	+	37°C
NarI	G	75-100%	50-75%	75-100%	25-50%	n.d.	n.d.	50-75%	+	37°C
NciI	B	100%*	100%	25-50%	25-50%	n.d.	n.d.	50-75%	+	37°C
NcoI	D	50-75%	75-100%	75-100%	100%	100%	100-125%**	75-100%	+	37°C
NdeI	D	<10%	<10%	25-50%	100%	n.d.	n.d.	25-50%	+	37°C
NheI	B	75-100%	100%	75-100%	10-25%	75-100%	10-25%	100%	+	37°C
NotI	D	<10%	10-25%	25-50%	100%	25-50%	100-125%**	25-50%	+	37°C
NruI	K	<10%	<10%	<10%	50-75%	n.d.	n.d.	10-25%	+	37°C
NsiI	D	10-25%	50-75%	50-75%	100%	25-50%	>125%**	10-25%	+/-	37°C
PstI	H	10-25%	50-75%	50-75%	50-75%	25-50%	100%	25-50%	+	37°C
PvuI	D	10-25%	25-50%	50-75%	100%	n.d.	n.d.	<10%	-	37°C
PvuII	B	25-50%	100%	50-75%	25-50%	n.d.	n.d.	50-75%	+	37°C
RsaI	C	75-100%	75-100%	100%	<10%	n.d.	n.d.	<10%	+	37°C
SacI	J	75-100%	25-50%	25-50%	<10%	100%	25-50%	100%	+	37°C
SacII	C	100%	50-75%	100%	50-75%	25-50%	>125%**	<10%	+	37°C
SalI	D	<10%	10-25%	25-50%	100%	25-50%	25-50%	<10%	+	37°C
Sau3AI	B	25-50%	100%	75-100%	<10%	n.d.	n.d.	100%	+	37°C
Scal	K	<10%	100%*	50-75%	75-100%	n.d.	n.d.	10-25%	+	37°C
SfiI	B	75-100%	100%	75-100%	25-50%	75-100%	50-75%	75-100%	-	50°C
SgfI	C	25-50%	25-50%	100%	<10%	n.d.	n.d.	<10%	+/-	37°C
SmaI	J	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	100%	+	25°C
SnaBI	B	50-75%	100%	50-75%	<10%	n.d.	n.d.	100%	-	37°C
SpeI	B	75-100%	100%	75-100%	75-100%	100%	25-50%	100%	+	37°C
SphI	K	75-100%	75-100%	100%*	75-100%	100%	>125%**	10-25%	+	37°C
SspI	E	10-25%	50-75%	50-75%	75-100%	100%	100-125%**	50-75%	+	37°C
StuI	B	75-100%	100%	75-100%	50-75%	n.d.	n.d.	50-75%	+	37°C
TaqI	E	10-25%	25-50%	50-75%	50-75%	100%	n.d.	100%	-	65°C
Tru9I	F	75-100%	50-75%	75-100%	25-50%	n.d.	n.d.	25-50%	-	65°C
VspI	D	<10%	25-50%	75-100%	100%	n.d.	n.d.	<10%	+	37°C
XbaI	D	50-75%	75-100%	75-100%	100%	100%	100-125%**	100%	-	37°C
XhoI	D	25-50%	75-100%	75-100%	100%	25-50%	100-125%**	10-25%	+	37°C
XhoII	C	25-50%	25-50%	100%	10-25%	n.d.	n.d.	<10%	+	37°C
XmaI	B	50-75%	100%	25-50%	<10%	25-50%	<10%	50-75%	+	37°C
XmnI	B	75-100%	100%	75-100%	10-25%	n.d.	n.d.	75-100%	+	37°C

* スター活性が認められるため、推奨いたしません。

** 酵素活性は推奨するバッファーの使用に基づいていますが、いくつかの酵素でbuffer Hの使用で活性が増加します。

n.d. = テストされていません。

☐はゲノム品質保証を示します。これらの酵素はアガロースプラグに包理した染色体DNAを用いてテストしています。

熱不活性化の表記

+ = 95%以上不活性化 (DNAは消化されない)

- = 96%以下の不活性化(DNAは完全に消化されます。例：20活性ユニットの5% [1ユニット以上] 以上が残ります。)

+/- = 部分的な不活性化 (DNAは部分的に消化されます。)

熱不活性化実験の条件

各制限酵素の最適バッファー 50μl中に20ユニットの酵素を加え65°C、15分のインキュベーションを行った。その後、ユニット定義に従い1μgのDNAを加え1時間のインキュベーションを行った後、アガロースゲル電気泳動で分析した。

制限酵素における部位特異的なメチル化の影響

この表はプロメガ制限酵素のいくつかについて、*dam*, *dcm*, CpGおよび CpNpG部 (p = リン酸基)での部位特異的なメチル化に対する感受性を示しています。これら4種類の修飾は細菌、真核生物、ウイルスのDNAで頻繁に見られます。多くの大腸菌株は部位特異的な*dam*や*dcm* DNAメチラーゼを含んでいます。高等真核生物では部位特異的な CpGやCpNpG DNAメチラーゼを含んでいます。哺乳類のゲノムではCGジヌクレオチドにおいてメチレーションが主に起こります。植物のゲノムではCGやCNGの配列でメチレーションが起こる可能性があります。

原核生物のメチレーション

dcm シトシンメチラーゼ変異：5'...CCTGG...3'で内側のシトシン塩基のC5位をメチル化する。

dam アデニンメチラーゼ変異：5'...GATC...3'でアデニン塩基のN6位をメチル化する。

真核生物のメチレーション

CpG ジヌクレオチド配列5'...CG...3'でシトシン塩基のC5位をメチル化する。

CpNpGp トリヌクレオチド配列5'...CNG...3' (N = すべての塩基) のシトシン塩基のC5位をメチル化する。

部位特異的なメチレーションに関するさらに詳細な情報については **McClelland, M., Nelson, M. and Raschke, E. (1994) Nucl. Acids Res. 22, 3640.** をご覧ください。

記号：

- s = このメチレーションに感受性を持つ。
- i = このメチレーションに感受性を持たない。
- s(ol) = オーバーラップ (メチレーション配列に制限酵素部位が重なる場合に感受性を持つ。)
- n/a = 情報なし

制限酵素	認識部位	dam	dcm	CpG	CpNpG
AatII	GACGTC	i	i	s	i
AccIII	TCCGGA	s(ol)	i	i	i
Acc65I	GGTACC	i	s(ol)	i	i
Apal	GGGCCC	i	s(ol)	s(ol)	i
AvaI	CYCGRG	i	i	s	i
AvaII	GGWCC	i	s(ol)	s(ol)	s(ol)
Ball	TGGCCA	i	s(ol)	i	s(ol)
BamHI	GGATCC	i	i	i	s(ol)
BclI	TGATCA	s	i	i	i
BglI	GCCNNNNNGGC	i	i	s(ol)	s(ol)
BglIII	AGATCT	i	i	i	s(ol)
BssHIII	GCGCGC	i	i	s	i
BstEII	GGTNACC	i	i	i	i
BstOI	CCWGG	i	i	i	n.d.
BstXI	CCANNNNNNTGG	i	i	i	i
BstZI	CGGCCG	i	i	s(ol)	s(ol)
CfoI	GCGC	i	i	s	n.d.
ClaI	ATCGAT	s(ol)	i	s	i
CspI	CGGWCCG	i	i	i	s
DdeI	CTNAG	i	i	i	s(ol)
Eco47III	AGCGCT	i	i	s	i
EcoRI	GAATTC	i	i	s(ol)	i
HaeIII	GGCC	i	i	i	s(ol)
HhaI	GCGC	i	i	s	s(ol)
HincII	GTYRAC	i	i	i	i
HindIII	AAGCTT	i	i	i	i
HpaII	CCGG	i	i	s	s

制限酵素	認識部位	dam	dcm	CpG	CpNpG
KpnI	GGTACC	i	i	i	i
MboII	GAAGA(8/7)	s(ol)	i	i	i
MluI	ACGCGT	i	i	s	i
MspI	CCGG	i	i	i	s
NarI	GGCGCC	i	i	s	i
NheI	GCTAGC	i	i	s(ol)	s(ol)
NotI	GCGGCCGC	i	i	s	s
NruI	TCGCGA	s(ol)	i	s	i
PmeI	GTTTAAAC	i	i	s(ol)*	s(ol)*
PstI	CTGCAG	i	i	i	s
PvuI	CGATCG	i	i	s	s(ol)
PvuII	CAGCTG	i	i	i	s
SacI	GAGCTC	i	i	i	i
SacII	CCGCGG	i	i	s	s
SalI	GTCGAC	i	i	s	n.d.
Sau3AI	GATC	i	i	s(ol)	s(ol)
Scal	AGTACT	i	i	i	i
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	i	s(ol)	s(ol)	s(ol)
SgfI	GCGATCGC	i	i	s	n.d.
SmaI	CCCGGG	i	i	s	s
SnaBI	TACGTA	i	i	s	i
SphI	GCATGC	i	i	i	i
StuI	AGGCCT	i	s(ol)	i	s(ol)
TaqI	TCGA	s(ol)	i	i	i
XbaI	TCTAGA	s(ol)	i	i	i
XhoI	CTCGAG	i	i	s	i
XhoII	RGATCY	i	i	i	s(ol)
XmaI	CCCGGG	i	i	i	n.d.
XmnI	GAANNNN	i	i	n.d.	n.d.

* *PmeI* は両鎖のシトシンのメチル化により阻害されます。

IUPACによるヌクレオチドの両義性コード

- Y = T or C (pyrimidine)
- R = G or A (purine)
- M = A or C (amino)
- K = G or T (keto)
- S = G or C (strong interaction: 3 H bonds)
- W = A or T (weak interaction: 2 H bonds)
- B = G or T or C (not A)
- V = G or C or A (not T, not U)
- D = G or A or T (not C)
- H = A or C or T (not G)
- N = G or A or T or C (unknown nucleotide)

認識配列のアルファベット順リスト

A▼AGCTT	HindIII	CTGCA▼G	PstI	G▼TCGAC	Sall
AAT▼ATT	SspI	C▼TNAG	DdeI	GT▼MKAC	AccI
A▼CCGGT	AgeI	C▼YCGRG	AvaI	GTT▼AAC	HpaI
ACTGG(1/-1)	BsrSI	GAAGA(8/7)	MboII	GT▼YRAC	HincII
A▼CGCGT	MluI	GAANN▼NNTTC	XmnI	R▼GATCY	XhoI
A▼CTAGT	SpeI	G▼AATTC	EcoRI	RGCGC▼Y	HaeII
A▼GATCT	BglII	GACGT▼C	AatII	TAC▼GTA	SnaBI
AGC▼GCT	Eco47III	GR▼CGYC	Hsp92I	T▼CCGGA	AccIII
AG▼CT	AluI	GAG▼CTC	EcoCRI	T▼CGA	TaqI
AGG▼CCT	StuI	GAGCT▼C	SacI	TCG▼CGA	NruI
AGT▼ACT	Scal	G▼ANTC	HinfI	T▼CTAGA	XbaI
AT▼CGAT	Clal	GAT▼ATC	EcoRV	T▼GATCA	BclI
ATGCA▼T	NsiI	▼GATC	MboI, Sau3AI	TGG▼CCA	BalI
AT▼TAAT	VspI	G ^{me} A▼TC	DpnI	T▼TAA	Tru9I
CAG▼CTG	PvuII	GCATG▼C	SphI	TTT▼AAA	DraI
CA▼TATG	NdeI	GCCN ₄ ▼NGGC	BglI		
CATG▼	Hsp92II	GCGAT▼CGC	SgfI		
CCAN ₅ ▼NTGG	BstXI	GCG▼C	CfoI, HhaI		
C▼CATGG	NcoI	G▼CGCGC	BssHII		
C▼CCGGG	XmaI	GC▼GGCCGC	NotI		
CCC▼GGG	SmaI	G▼CTAGC	NheI		
CCGC▼GG	SacII	G▼GATCC	BamHI		
C▼CGG	HpaII, MspI	GG▼CC	HaeIII		
CC▼SGG	NciI	GGCCN ₄ ▼NGGCC	SfiI		
CC▼TNAGG	Bsu36I	GG▼CGCC	NarI		
CC▼WGG	BstOI	GGGCC▼C	ApaI		
CGAT▼CG	PvuI	G▼GTACC	Acc65I		
C▼GGCCG	BstZI	GGTAC▼C	KpnI		
CG▼GWCCG	CspI	G▼GTNACC	BstEII		
CMG▼CKG	MspAII	G▼GWCC	AvaII		
C▼TCGAG	XhoI	G▼GYRCC	BanI		
CTCTCTTAA▼GGTAGC	I-PpoI	GT▼AC	RsaI		

備考：認識部位の外側に切断部位が存在する場合は () 内に示す。例えば GTCTC(1/5) と表記されたものは、次の位置で切断されます。

5'...GTCTCN▼...3'
3'...CAGAGNNNNN▲...5'

一般的な制限酵素のイソシゾマー (太文字の制限酵素はプロメガから入手できます。)

制限酵素	イソシゾマー	認識配列	制限酵素	イソシゾマー	認識配列
AatI	StuI , Eco147I, Pme55I, SseBI	AGG▼CCT	BsiEI	BsaOI	CG(A/G)(T/C)▼CG
AatII	—	GACGT▼C	BsmI	BsaMI	GAATGCN▼
AccI	FblI, XmiI	GT▼(A/C)(G/T)AC	BsoBI	AvaI , Ama87I, BcoI, Eco88I	C(C/T)CG(G/A)G
AccIII	BspEI, MroI	T▼CCGGA	Bsp19I	NcoI	C▼CATGG
Acc65I	Asp718I KpnI*	G▼GTACC GGTAC▼C	Bsp68I	NruI	TCG▼CGA
AccB1I	BanI , BshNI, Eco64I	G▼G(C/T)(G/A)CC	Bsp106I	ClaI , BspDI	AT▼CGAT
AccB7I	PfiMI, Van91I	CCAN ₄ ▼NTGG	Bsp119I	Csp45I , NspV, BstBI	TT▼CGAA
AcINI	SpeI	A▼CTAGT	Bsp120I	—	G▼GGCCC GGGCC▼C
AcIWI	AlwI	GGATCNNNN▼	Bsp143I	MboI , Sau3AI , NdeI	▼GATC
AcyI	Bbill, Hin1I, Hsp92I , BsaHI, Msp171I	G(A/G)▼CG(T/C)C	Bsp143II	HaeII	(A/G)CGCG▼(T/C)
AcsI	ApoI	(G/A)▼AATT(C/T)	Bsp1286I	BmyI, SduI	G(G/A/T)GC(C/A/T)▼C
AfaI	RsaI Csp6I	GT▼AC G▼TAC	BspCI	PvuI	CGAT▼CG
AfeI	Eco47III	AGC▼GCT	BspDI	ClaI	AT▼CGAT
AfilI	Bst98I	C▼TTAAG	BspEI	AccIII	T▼CCGGA
AgeI	PinAI	A▼CCGGT	BsrI ¹	BsrSI , BseNI	ACTGGN(1/-1)
AhaIII	DraI	TTT▼AAA	BsrSI¹	BseNI, BsrI	ACTGGN(1/-1)
AhdI	EclHKI	GACNNN▼NNGTC	BssHII	BsePI, Paul	G▼CGCGC
AluI	—	AG▼CT	Bst98I	AfilI, BfrI	C▼TTAAG
AlwI	AcIWI	GGATCNNNN▼	BstBI	Csp45I , NspV, Bsp119I	TT▼CGAA
Alw44I	ApaLI	G▼TGCAC	BstEII	BstPI, Eco91I, PspEI	G▼GTNACC
AocI	Bsu36I , CvnI	CC▼TNAGG	BstNI	BstOI , MvaI EcoRII*	CC▼(A/T)GG ▼CC(A/T)GG
ApaI	— Bsp120I*	GGGCC▼C G▼GGCCC	BstOI	BstNI, MvaI EcoRII*	CC▼(A/T)GG ▼CC(A/T)GG
ApaLI	Alw44I, VneI	G▼TGCAC	BstXI	—	CCANNNN▼NTGG
ApoI	AcsI	(G/A)▼AATT(C/T)	BstYI	XhoI , MfiI	(A/G)▼GATC(T/C)
AseI	VspI , AsnI	AT▼TAAT	BstZI	Eco52I, EagI, XmaIII, EclXI	C▼GGCCG
AsnI	VspI , AseI	AT▼TAAT	Bsu15I	ClaI	AT▼CGAT
AspI	Tth111I	GACN▼NNGTC	Bsu36I	CvnI, AocI, Eco81I	CC▼TNAGG
AspEI	AhdI, Eam1105I, EclHKI	GACNNN▼NNGTC	BsuRI	HaeIII , Pali	GG▼CC
Asp700I	XmnI	GAANN▼NNTTC	CfoI	HhaI Hin6I, HinP1I	GGC▼C G▼CGC
Asp718I	Acc65I KpnI*	G▼GTACC GGTAC▼C	Cfr9I	XmaI SmaI*	C▼CCGGG CCC▼GGG
AsuI	Sau96I, Cfr13I	G▼GNCC	Cfr13I	Sau96I	G▼GNCC
AsuII	Csp45I, BstBI	TT▼CGAA	Cfr42I	SacII	CCG▼GG
AsuHPI	HphI	GGTGAN ₆ ▼	ClaI	BanIII, Bsp106I, BspDI, Bsu15I	AT▼CGAT
AvaI	Ama87I, BcoI, BsoBI, Eco88I	C▼(C/T)CG(G/A)G	CpoI	CspI , RsrII	CG▼G(A/T)CCG
AvaII	SinI, Eco47I, HgiEI	G▼G(A/T)CC	CspI	CpoI, RsrII	CG▼G(A/T)CCG
Axyl	Bsu36I	CC▼TNAGG	Csp6I	—	G▼TAC GT▼AC
Ball	MscI, MluNI	TGG▼CCA	Csp45I	BstBI, NspV, Bsp119I	TT▼CGAA
BamHI	—	G▼GATCC	CvnI	Bsu36I	CC▼TNAGG
BanI	AccBI, BshNI, Eco64I	G▼G(T/C)(A/G)CC	DdeI	BstDEI	C▼TNAG
BanII	Eco24I	G(A/G)GC(T/C)▼C	DpnI²	—	G ^{me} A▼TC GA▼TC
BbeI	—	GGCGC▼C GG▼CGCC	DpnII	DpnII*	▼GATC GA▼TC
BbrPI	Eco72I, PmlI	CAC▼GTG	DraI	—	TTT▼AAA
BbsI ¹	Bsc91I, BpiI	GAAGAC(2/6)	EagI	Eco52I, BstZI , EclXI, XmaIII	C▼GGCCG
BbuI	PaeI, SphI	GCATG▼C	Eam1105I	EclHKI, AhdI, AspEI	GACNNN▼NNGTC
BclI	BsiQI, FbaI	T▼GATCA	Ecl136II	EcoCRI SacI*	GAG▼CTC GAGCT▼C
BcnI	NciI	CC▼(C/G)GG	EclHKI	AhdI, Eam1105I, AspEI	GACNNN▼NNGTC
BfrI	Bst98I	C▼TTAAG	EclXI	BstZI , EagI, Eco52I, XmaIII	C▼GGCCG
BglI	—	GCCNNNN▼NGGC	Eco24I	BanII, FriOI	G(A/G)GC(T/C)▼C
BglII	—	A▼GATCT	Eco32I	EcoRV	GAT▼ATC
BmyI	Bsp1286I	G(G/A/T)GC(C/A/T)▼C	Eco47I	AvaI , SinI	G▼G(A/T)CC
BpmI	GsuI	CTGGAG(16/14)	Eco47III	AfeI	AGC▼GCT
BsaHI	Hsp92I	G(A/G)▼CG(T/C)C	Eco52I	BstZI , XmaIII, EagI, EclXI	C▼GGCCG
BsaMI	BsmI	GAATGC(1/-1)	Eco64I	BanI , BshNI, Eco64I	G▼G(TC)(AG)CC
BsaOI	Bsh1285I, BsiEI	CG(A/G)(T/C)▼C	Eco81I	Bsu36I	CC▼TNAGG
BseAI	AccIII	T▼CCGGA	Eco88I	AvaI	C▼(TC)CG(AG)G
BseNI	BsrSI , BsrI	ACTGGN(1/-1)	Eco91I	BstEII	G▼GTNACC
BsePI	BssHII , Paul	G▼CGCGC			
Bsh1285I	BsaOI	CG(A/G)(T/C)▼CG			
BshNI	BanI , AccB1I, Eco64I	G▼G(T/C)(A/G)CC			
Bsh1365I	BsrBRI	GATNN▼NATC			

(次ページにつづく)

一般的な制限酵素のイソシゾマー (太文字の制限酵素はプロメガから入手できます。)(つづき)

制限酵素	イソシゾマー	認識配列	制限酵素	イソシゾマー	認識配列
Eco105I	SnaBI	TAC▼CTA	NspV	Csp45I, BstBI, Bsp119I	TT▼CGAA
Eco130I	Styl	C▼C(A/T)(T/A)GG	NspBII	MspA1I	C(A/C)G▼C(G/T)G
Eco147I	Stul	AGG▼CCT	PaeI	Bbul, SphI	GCATG▼C
EcoICRI	Ecl136II	GAG▼CTC	PaeR7I	XhoI	C▼TCGAG
	Sacl* , SstI*	GAGCT▼C	Pall	HaellI , BsuRI	GG▼CC
EcoRI	—	G▼AATTC	PfiMI	AccB7I, Van91I	CCAN ₄ ▼NTGG
EcoRII	—	▼CC(A/T)GG	PinAI	AgeI	A▼CCGGT
	BstOI* , BstNI*, Mval*	CC▼(A/T)GG	PstI	—	CTGCA▼G
EcoRV	Eco32I	GAT▼ATC	PvuI	BspCI	CGAT▼CG
EcoT14I	Styl	C▼C(A/T)(A/T)GG	PvuII	—	CAG▼CTG
EcoT22I	Nsil	ATGCA▼T	RsaI	Afal	GT▼AC
EheI	—	GGC▼GCC	RsrII	CspI , Cpol	CG▼G(A/T)CCG
	NarI*	GG▼CGCC	SacI	SstI	GAGCT▼C
FokI ²	—	GGATG(9/13)		Ecl136II*, EcoICRI*	GAG▼CTC
HaellI	Bsp143II	(A/G)GCGC▼(T/C)	SacII	SstII, KspI, Cfr42I	CCGC▼GG
HaellII	BsuRI, Pall	GG▼CC	Sall	—	G▼TCGAC
HapII	HpaII , MspI	C▼CGG	Sau3AI	MboI , NdeII, DpnII	▼GATC
HgiEI	Eco47I, SniI, Avall	G▼G(A/T)CC	Sau96I	Cfr13I	G▼GNCC
HhaI	CfoI	GCG▼C	Scal	—	AGT▼ACT
	HinP1I*, Hin6I*	G▼CGC	Sdul	Bsp1286I	G(G/A/T)GC(C/A/T)▼C
Hin1I	AcyI, Hsp92I	G(A/G)▼CG(T/C)C	SfiI	—	GGCCNNNN▼NGGCC
HincII	HindII	GT(T/C)▼(A/G)AC	SfuI	Csp45I	TT▼CGAA
HindII	HincII	GT(T/C)▼(A/G)AC	SgfI	—	GCGAT▼CGC
HindIII	—	A▼AGCTT	SinI	Avall , Eco47I	G▼G(A/T)CC
HinfI	—	G▼ANTC	SmaI	—	CCC▼GGG
HinP1I	—	G▼CGC		XmaI* , Cfr9I*	C▼CCGGG
	HhaI* , CfoI*	GCG▼C	SnaBI	Eco105I	TAC▼GTA
HpaI	KspAI	GTT▼AAC	SpeI	AclNI	A▼CTAGT
HpaII³	MspI , HapII	C▼CGG	SphI	Bbul, PaeI	GCATG▼C
Hsp92I	AcyI, BsaHI, Hin1I	G(A/G)▼CG(C/T)C	SspI	—	AAT▼ATT
Hsp92II	NlaIII	CATG▼	SstI	SacI	GAGCT▼C
I-PpoI	—	CTCTCTAA▼GGTAGC		EcoICRI*	GAG▼CTC
KasI	—	G▼GCGCC	SstII	SacII	CCGC▼GG
	NarI*	GG▼CGCC	StuI	AatI, Eco147I	AGG▼CCT
KpnI	—	GGTAC▼C	Styl	EcoT14I	C▼C(A/T)(A/T)GG
	Acc65I* , Asp718I*	G▼GTACC	TaqI	TthHB8I	T▼CGA
KspI	SacII	CCGC▼GG	Tru9I	MseI	T▼TAA
MboI	Sau3AI , NdeII, DpnII	▼GATC	Tth111I	AspI	GACN▼NNGTC
MbolI¹	—	GAAGA(8/7)	TthHB8I	TaqI	T▼CGA
MfiI	XhoII	(A/G)▼GATC(T/C)	Van91I	AccB7I, PfiMI	CCAN ₄ ▼NTGG
MluI	—	A▼CGCGT	VneI	ApaLI, Alw44I	G▼TGCAC
MluNI	BalI , MscI	TGG▼CCA	VspI	Asel, AsnI	AT▼TAAT
MroI	AccIII	T▼CCGGA	XbaI	—	T▼CTAGA
MscI	BalI , MluNI	TGG▼CCA	XhoI	PaeR7I	C▼TCGAG
MseI	Tru9I	T▼TAA	XhoII	BstYI, MfiI	(A/G)▼GATC(T/C)
MspI³	HpaII , HapII	C▼CGG	XmaI	Cfr9I, XmaCI,	C▼CCGGG
MspA1I	NspBII	C(A/C)G▼C(G/T)G		SmaI*	CCC▼GGG
MstII	Bsu36I	CC▼TNAGG	XmaIII	Eco52I, BstZI , EagI, EclXI	C▼GGCCG
Mval	BstOI , BstNI	CC▼(A/T)GG	XmaCI	XmaI	C▼CCGGG
	EcoRII*	▼CC(A/T)GG		SmaI*	CCC▼GGG
NaeI	—	GCC▼GGC	Xmnl	Asp700I	GAANN▼NNTTC
	NgoMIV	G▼CCGGC			
NarI	—	GG▼CGCC			
	EheI*	GGC▼GCC			
	KasI*	G▼GCGCC			
	BbeI*	GGCGC▼C			
NciI	BcnI	CC▼(C/G)GG			
NcoI	Bsp19I	C▼CATGG			
NdeI	—	CA▼TATG			
NdeII	MboI , Sau3AI , DpnII	▼GATC			
NgoMIV	—	G▼CCGGC			
	NaeI*	GCC▼GGC			
NheI	—	G▼CTAGC			
NlaIII	Hsp92II	CATG▼			
NotI	—	GC▼GGCCGC			
NruI	Bsp68I	TCG▼CGA			
Nsil	EcoT22I, Mph1103I	ATGCA▼T			

記号 : N = A, C, G or T * = ネオシゾマー

備考 :

1. 認識部位の外側に切断部位が存在する場合は()内に示す。例えば GTCTC(1/5)と表記されたものは、次の位置で切断されます。
5'...GTCTCN▼...3'
3'...CAGAGNNNN▲...5'
2. Dpn IIは切断するために認識配列中のアデニンのメチル化を要求する唯一の市販酵素です。そのためDpn IIはGATCを認識するその他の制限酵素(例, Mbo I, Sau3A I)での代用はできません。
3. Hpa IIと Msp Iは同じヌクレオチド配列を認識しますが、Msp Iが認識配列の外側に位置するシトシンのメチル化にのみ感受性を持つのに対して、Hpa IIはどちらのシトシンのメチル化にも感受性を持つため、すべての用途で相互に代用できるとは限りません。

参考資料

Roberts, R. J. (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, (supp), 2077.

● Technical and Legal References

Technical Reference

切断末端別の制限酵素

5' 突出末端を形成するプロメガの制限酵素

突出部位	適合性確認済み	適合の可能性有り
5'-S		NciI
5'-W		BstOI
5'-AT	AccI	
5'-CG	Clal, HpaII, Hsp92I, MspI, NarI, TaqI	
5'-GN		BsrSI
5'-MK		AccI
5'-TA	NdeI, Tru9I, VspI	
5'-ANT		HinfI
5'-GWC		AvaI, CspI
5'-TNA		Bsu36I, DdeI
5'-AATT	EcoRI	
5'-AGCT	HindIII	
5'-CATG	NcoI	
5'-CCGG	AccIII, AgeI, XmaI	AvaI
5'-CGCG	BssHI, MluI	
5'-CTAG	NheI, SpeI, XbaI	
5'-GATC	BamHI, BclI, BglII, MboI, Sau3AI, XhoI	
5'-GCGC	BanI	
5'-GGCC	BstZI, NotI	
5'-GTAC	Acc65I	BanI
5'-GTNAC		BstEII
5'-GYRC		BanI
5'-TCGA	Sall, XhoI	AvaI
5'-YCGR		AvaI

3' 突出末端を形成するプロメガの制限酵素

突出部位	適合性確認済み	適合の可能性有り
AT-3'	SgfI, PvuI	
CG-3'	CfoI, HhaI	
CN-3'		BsaMI
GC-3'	SacII	BsaOI
NNN-3'		AccB7I, BglI, SfiI
ACGT-3'	AatII	
AGCT-3'	SacI	
CATG-3'	Hsp92II, SphI	
GCGC-3'	HaeII	
GGCC-3'	ApaI	
GTAC-3'	KpnI	
NNNN-3'		BstXI
TGCA-3'	NsiI, PstI	
TTAA-3'	I-PpoI	

記号：

D = A or G or T
 H = A or C or T
 K = G or T
 M = A or C
 N = A or C or G or T
 R = A or G
 S = C or G
 W = A or T
 Y = C or T

バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター配列について

SP6: ATTTAGGTGACACTATAGAA
 T7: TAATACGACTCACTATAGGG
 T3: TATTAACCCTCACTAAAGGG

上記の各RNAポリメラーゼプロモーター配列は、ポジション-17から+3までを示しており、下線のついたGで転写が開始されます。各ポリメラーゼは認識配列に対して非常に強い特異性を示しますが、転写を開始するための認識配列は上記の配列と100%同じである必要はありません。一般的に、転写効率はポジション+3を変更するとわずかに低下し、ポジション+2の変更では50%に、ポジション+1の変更では急激な減少が認められます。

in vitro転写/翻訳の鑄型とするPCR産物用のT7プライマーの設計法

フォワードプライマー：

必須項目：

- T7プロモーター配列 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') は鑄型DNAからの転写に必須
- 翻訳開始に必要なATG開始コドン (5'-ATG-3') (増幅する配列に存在しない場合)
- 標的遺伝子のプライミングに必要な遺伝子特異的な配列

要求項目：

- Kozak配列 (5'-CCACCATGG-3') または、増幅する配列からの真核生物翻訳開始配列 (翻訳開始効率が増加)
- プロモーター上流の余分な6-10塩基 (プロモーターの効率が改善)
- プロモーター配列とKozak配列間の3-6塩基のスペーサー (Kozak配列の上流数塩基からの転写開始を確実にし、RNAへのリボソーム結合が向上)

模範的なフォワードプライマーのデザイン：

5'-(N₆₋₁₀)TAATACGACTCACTATAGGG (N₃₋₆) CCACCATGG (N₁₇₋₂₂)-3'

リバースプライマー：

必須項目：

- 遺伝子特異的配列 (標的遺伝子へのプライミングに必要)

要望項目：

- 停止コドンと逆相補的配列 (TTA, ATC, TCA) (増幅する配列に存在しない場合)。(翻訳の終結、次ラウンドの翻訳のための効率的なリボソームの放出)
- poly(A) tailを付加することにより、RNAの安定性が飛躍的に向上し、高レベルの翻訳が可能。

模範的なリバースプライマーのデザイン：

5'-T₃₀ stop anticodon (N₁₇₋₂₂)-3'

● Technical and Legal References

Technical Reference

プロメガのシークエンシング用プライマー

プライマーシークエンス	カタログ番号	T _m (°C)*	適応ベクター
RNA Polymerase Promoter Primers			
SP6			
5'-d(TATTTAGGTGACACTATAG)-3'	Q5011	42	pGEM®-4Z, -3Zf(+/-), -5Zf(+/-), -7Zf(+/-), -9Zf(-), -11Zf(+/-), -13Zf(+); pGEM®-luc; pSP-luc+; pSP-luc+NF; pALTER®-1; pGEM®-T, -T Easy; PinPoint™ Xa-1, -2, -3; pTnT™ Vector; pCMVtTn™ Vector; pGeneClip™ Basic, Puromycin, Hygromycin, Neomycin, hMGFP
T7			
5'-d(TAATACGACTCACTATAGGG)-3'	Q5021	47	pGEM®-4Z, -3Zf(+/-), -5Zf(+/-), -7Zf(+/-), -9Zf(-), -11Zf(+/-), -13Zf(+); pGEM®-luc; pSP-luc+NF; pALTER®-1; pGEM®-T, -T Easy; pTarget™; pGeneClip™ Basic, Puromycin, Hygromycin, Neomycin, hMGFP; pF1A, pF1K T7 Flexi® Vector; pFN2A, pFN2K (GST) Flexi® Vector; pF4A, pF4K CMV Flexi® Vector; pF5A, pF5K CMV-neo Flexi® Vector; pFC8A, pFC8K (HaloTag®) CMV Flexi® Vector; pF9 CMV Rluc-neo Flexi® Vector; pFN10A (ACT) Flexi® Vector; pFN11A (BIND) Flexi® Vector
T3			
5'-d(ATAACCTCACTAAAGGGA)-3'	Q5741	50	pACT, pALTER®-MAX, pBIND; pCl-neo; HaloTag® pHT2
T7 EEV			
5'-d(AAGGCTAGAGTACTTAATACGA)-3'	Q6700	50	pALTER®-MAX, pSI, pCl, pCl-neo, pCMVtTn™, pTnT™, phMGFP Vector; HaloTag® pHT2; psiCHECK™-1, -2
pUC/M13 Primers			
Forward (17mer) (-40)			
5'-d(GTTTTCCAGTCACGAC)-3'	Q5391	50	pGEM®-3Z, -4Z, -3Zf(+/-), -5Zf(+/-), -7Zf(+/-), -9Zf(-), -11Zf(+/-), -13Zf(+); pGEM®-luc; pGEM®-T, -T Easy; pALTER®-1; pCAT®-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pGeneClip™ Basic, Puromycin, Hygromycin, Neomycin, hMGFP
Forward (24mer) (-47)			
5'-d(CGCCAGGTTTTCCAGTCACGAC)-3'	Q5601	64	[same as Forward (17mer)]
Reverse (17mer)			
5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'	Q5401	47	pGEM®-3Z, -4Z, -3Zf(+/-), -5Zf(+/-), -7Zf(+/-), -9Zf(-), -11Zf(+/-), -13Zf(+); pGEM®-luc; pSP64, -64 Poly(A), -65; pGEM®-T, -T Easy; pCAT®-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pALTER®-1, Ex-1, Ex-2; pGeneClip™ Basic, Puromycin, Hygromycin, Neomycin, hMGFP; psiSTRIKE™ Basic, Puromycin, Hygromycin, Neomycin, hMGFP; psiLentGene™ Basic, Puromycin, Hygromycin, Neomycin
Reverse (22mer)			
5'-d(TCACACAGGAAACAGCTATGAC)-3'	Q5421	55	[same as Reverse (17mer)]
Luciferase Primers			
GLprimer1			
5'-d(TGTATCTTATGGTACTGTAAGT)-3'	E1651	50	pGL2-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control
GLprimer2			
5'-d(CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA)-3'	E1661	55	pSP-luc+; pGL3-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pGL2-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control
RVprimer3			
5'-d(CTAGCAAAATAGGCTGTCCC)-3'	E4481	53	pGL3-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pCAT®3-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pGL3(R2.1)-Basic; pGL3(R2.2)-Basic; pGL4.10[luc2]; pGL4.11[luc2P]; pGL4.12[luc2CP]; pGL4.13[luc2/SV40]; pGL4.14[luc2/Hygro]; pGL4.15[luc2P/Hygro]; pGL4.16[luc2CP/Hygro]; pGL4.17[luc2/Neo]; pGL4.18[luc2P/Neo]; pGL4.19[luc2CP/Neo]; pGL4.20[luc2Puro]; pGL4.21[luc2P/Neo]; pGL4.22[luc2CP/Neo]; pGL4.70[hRluc]; pGL4.71[hRlucP]; pGL4.72[hRlucCP]; pGL4.73[hRluc/SV40]; pGL4.74[hRluc/TK]; pGL4.75[hRluc/CMV]; pGL4.76[hRluc/Hygro]; pGL4.77[hRlucP/Hygro]; pGL4.78[hRlucCP/Hygro]; pGL4.79[hRluc/Neo]; pGL4.80[hRlucP/Neo]; pGL4.81[hRlucCP/Neo]; pGL4.82[hRlucPuro]; pGL4.83[hRlucP/Neo]; pGL4.84[hRlucCP/Neo]; pCBR-Basic, -Control; pCBG68-Basic, -Control; pCBG99-Basic, -Control
RVprimer4			
5'-d(GACGATAGTCATGCCCGCG)-3'	E4491	60	pGL3-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pCAT®3-Basic, -Promoter, -Enhancer, -Control; pGL3(R2.1)-Basic; pGL3(R2.2)-Basic; pGL4.10[luc2]; pGL4.11[luc2P]; pGL4.12[luc2CP]; pGL4.13[luc2/SV40]; pGL4.14[luc2/Hygro]; pGL4.15[luc2P/Hygro]; pGL4.16[luc2CP/Hygro]; pGL4.17[luc2/Neo]; pGL4.18[luc2P/Neo]; pGL4.19[luc2CP/Neo]; pGL4.20[luc2Puro]; pGL4.21[luc2P/Neo]; pGL4.22[luc2CP/Neo]; pGL4.70[hRluc]; pGL4.71[hRlucP]; pGL4.72[hRlucCP]; pGL4.73[hRluc/SV40]; pGL4.74[hRluc/TK]; pGL4.75[hRluc/CMV]; pGL4.76[hRluc/Hygro]; pGL4.77[hRlucP/Hygro]; pGL4.78[hRlucCP/Hygro]; pGL4.79[hRluc/Neo]; pGL4.80[hRlucP/Neo]; pGL4.81[hRlucCP/Neo]; pGL4.82[hRlucPuro]; pGL4.83[hRlucP/Neo]; pGL4.84[hRlucCP/Neo]; pCBR-Basic, -Control; pCBG68-Basic, -Control; pCBG99-Basic, -Control
Miscellaneous Sequencing Primers			
PinPoint™ Sequencing Primer			
5'-d(CGTGACGCGGTGCAGGGCG)-3'	V4211	66	PinPoint™ Xa-1, -2, -3; PinPoint™ Xa-1 T-Vector
pTARGET™ Sequencing Primer			
5'-d(TTACGCCAAGTATTAGGTGACA)-3'	Q4461	55	pTARGET™ Vector

* 各プライマーのT_m値はBase stacking free energy methodにより決定しました。詳しくはwww.promega.com/biomath/をご覧ください。

N/A = プロメガでの取扱いはありません。

プロメガのオリゴヌクレオチドの形状と濃度

	オリゴヌクレオチド	カタログ番号	鎖長	鎖の形状 ⁽¹⁾	濃度	モル濃度 ($\mu\text{M} = \text{pmol}/\mu\text{l}$)
Gel Shift Oligos (2)	AP1 Consensus Oligonucleotide	E3201/E3202	21mer	ds	24.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
	AP2 Consensus Oligonucleotide	E3211/E3212	26mer	ds	29.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
	CREB Consensus Oligonucleotide	E3281/E3282	28mer	ds	32.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
	NF- κ B Consensus Oligonucleotide	E3291/E3292	22mer	ds	25.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
	OCT1 Consensus Oligonucleotide	E3241/E3242	22mer	ds	25.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
	SP1 Consensus Oligonucleotide	E3231/E3232	22mer	ds	25.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
	TFIID Consensus Oligonucleotide	E3221/E3222	26mer	ds	29.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.75 μM
Miscellaneous	Biotinylated Oligo(dT) Probe	Z5261	25mer	ss	437 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 μM
	EcoR I Adaptors	C1291	16mer, 12mer	ds (3)	91.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 μM
	Oligo(dT) ₁₅ Primer	C1101	15mer	ss	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	101 μM
	Random Primers	C1181	6mer	ss	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	252.5 μM
Mutagenesis Oligos	Ampicillin Repair Oligonucleotide	Q6311	27mer	ss	2.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.253 μM
	GeneEditor™ Bottom Strand Selection Oligonucleotide	Q9301	35mer	ss	2.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.251 μM
	GeneEditor™ Top Strand Selection Oligonucleotide	Q9321	35mer	ss	2.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.251 μM
Primer Pairs for RT-PCR	β -Actin Primer Pair	G5740	2 26mers	ss	852 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 μM
	CNTF Primer Pair	G5770	2 25mers	ss	819 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 μM
	NT-3 Primer Pair	G6801	2 25mers	ss	819 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 μM
	p75 Primer Pair	G6861	2 20mers	ss	654 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 μM
Sequencing Primers	pUC/M13 Primer, Forward	Q5391	17mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.78 μM
	pUC/M13 Primer, Forward	Q5601	24mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.26 μM
	pUC/M13 Primer, Reverse	Q5401	17mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.78 μM
	pUC/M13 Primer, Reverse	Q5421	22mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.38 μM
	SP6 Promoter Primer	Q5011	19mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.60 μM
	T7 Promoter Primer	Q5021	20mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.52 μM
	T3 Promoter Primer	Q5741	20mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.52 μM
	T7 EEV Promoter Primer	Q6700	22mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.38 μM
	GLprimer1 (clockwise)	E1651	23mer	ss	2 μg (dried)	264 pmol (dried)
	GLprimer2 (counter clockwise)	E1661	23mer	ss	2 μg (dried)	264 pmol (dried)
	RVprimer3 (clockwise)	E4481	20mer	ss	2 μg (dried)	304 pmol (dried)
	RVprimer4 (counter clockwise)	E4491	20mer	ss	2 μg (dried)	304 pmol (dried)
	pTARGET™ Sequencing Primer	Q4461	24mer	ss	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.25 μM

⁽¹⁾ ds = 2本鎖、ss = 1本鎖

⁽²⁾ 全てのゲルシフト用オリゴは、ゲル精製、アニーリング済みで平滑末端、5'水酸基を持つ2本鎖DNA

⁽³⁾ 突出末端を片方に持つ2本鎖DNA

● Technical and Legal References

Product Use Limitations, Warranty, Disclaimer

製品に関する注意、保証

■ 使用上の注意

特に記載の無い限り、全てのプロメガ製品は研究用で、人、動物、治療等に使用されるものではありません。また、製品には人体に有害な化学物質を含むものがありますので、人体に直接ふれることの無いよう取り扱いには十分注意して下さい。毒性のある製品には製品安全データシート (MSDS) が添付されており、現在知られている取り扱いにおける危険性なども記載されています。MSDSについては弊社ウェブサイトからも入手することができます。

(www.promega.co.jp/msds/)。

※詳細については www.promega.co.jp/msds/ をご覧ください。

■ 毒劇物の表示

毒：「毒物及び劇物取締法」に基づく医薬用外毒物です。法規制に従って、保管、廃棄等を行なって下さい。

劇：「毒物及び劇物取締法」に基づく医薬用外劇物です。法規制に従って、保管、廃棄等を行なって下さい。

■ カルタヘナ法規制対象製品の表示

カルタヘナ：「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（通称カルタヘナ法）」における第二種使用等に相当します。法規制に従って、拡散防止措置を行ってください。

※詳細については www.promega.co.jp/cartagena.html をご覧ください。

保証 製品には技術資料とともに品質保証書 (Promega Product Information) が添付されます。この品質保証書には弊社の品質管理部で定めた機能試験の条件とロットごとのデータが記載されています。プロメガ製品の性能に関する保証については、製品の品質保証書の条件に満たない場合に限り適用されます。弊社により製品の欠陥が確認された場合、交換または購入代金の保証を致します。

製品のプロトコルは、弊社の実験室で成功し、または学術発表から引用したもので有用です。試薬、機器の差異や各自の実験手技の違いによりいつも同じ結果がこれらの方法によって得られるとは限りません。正確な判断と的確な実験が成功をもたらします。

トレードマーク、サービスマーク、使用制限、特許、その他の注意点

Product Use Limitations, Warranty, Disclaimer

Promega manufactures products for a number of intended uses. Please refer to the product label for the intended use statements for specific products.

Promega products contain chemicals which may be harmful if misused. Due care should be exercised with all Promega products to prevent direct human contact.

Each Promega product is shipped with documentation stating specifications and other technical information. Promega products are warranted to meet or exceed the stated specifications. Promega's sole obligation and the customer's sole remedy is limited to replacement of products free of charge in the event products fail to perform as warranted.

Promega makes no other warranty of any kind whatsoever, and SPECIFICALLY DISCLAIMS AND EXCLUDES ALL OTHER WARRANTIES OF ANY KIND OR NATURE WHATSOEVER, DIRECTLY OR INDIRECTLY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, AS TO THE SUITABILITY, PRODUCTIVITY, DURABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR USE, MERCHANTABILITY, CONDITION, OR ANY OTHER MATTER WITH RESPECT TO PROMEGA PRODUCTS.

In no event shall Promega be liable for claims for any other damages, whether direct, incidental, foreseeable, consequential, or special (including but not limited to loss of use, revenue or profit), whether based upon warranty, contract, tort (including negligence) or strict liability arising in connection with the sale or the failure of Promega products to perform in accordance with the stated specifications.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services (techserv@promega.com) or access the Promega online catalog (promega.com/catalog/) for the most up-to-date information on Promega products.

Applications mentioned in Promega literature are provided for informational purposes only. Promega does not warrant that all applications have been tested in Promega laboratories using Promega products.

Promega products labeled "For Laboratory Use" are intended For Research Use Only outside the United States.

Copyright

© 2012 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Promega Trademarks

4-CORE, Altered Sites, AluQuant, Anti-ACTIVE, Apo-ONE, AttoPhos, Beta-Glo, Caspase-Glo, CellTiter 96, CellTiter-Blue, CellTiter-Glo, CytoTox 96, Dual-Glo, Dual-Luciferase, EGGstract, E_{max}, ENLITEN, Flexi, *fmol*, GenePrint, GenePrint® logo, GloMax, GoTag, HaloTag, HeLaScribe, ISOQUANT, Kinase-Glo, MagaCell, MagaZorb, MagnaBot, MagneSil, MagneSphere, Maxwell, Monster Green, Packagene, pALTER, pCAT, PepTag, pGEM, pGEMEX, Plexor, PolyATract, PowerPlex, Prime-a-Gene, ProFection, ProFluor, Promega,

ProMega-Markers, ProtoBlot, QuantiLum, RiboClone, Riboprobe, **Promega**, RNAGents, RNasin, SAM², SignaTECT, SilverSTR, Steady-Glo, Stop & Glo, TnT, Transfectam, Vac-Man, Western Blue, *Western Express* and Wizard are all trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office by Promega Corporation, Madison, WI, USA.

AAF-Glo, AccessQuick, ADP-Glo, AgarACE, ApoLive-Glo, ApoTox-Glo, BacTiter-Glo, Bright-Glo, BRYT, Calpain-Glo, cAMP-Glo, CaspACE, Cell ID, CellTiter-Fluor, CelluACE, CheckMate, ChipShot, Chroma-Glo, Chroma-Luc, CodeBreaker, CytoTox-Fluor, CytoTox-Glo, CytoTox-ONE, DeadEnd, Differex, DLR, DLReady logo, DNA IQ, DPPIV-Glo, DUB-Glo, Eluator, EnduRen, FastBreak, FluoroTect, GeneClip, GeneEditor, GloResponse, GloSensor, GoScript, GSH-Glo, GSH/GSSG-Glo, HaloCHIP, HaloLink, HDAC-Glo, Helix, HisLink, ImProm-II, InCELLect, Instinct, LigaFast, Luciferin-EF, MagaCharc, MagaCel, MagneGST, MagneHis, MagZ, MAO-Glo, MULTI-CORE, ONE-Glo, P450-Glo, pAdvantage, pBEST_{luc}, pCMVtnt, PDE-Glo, Personal Automation, pGeneClip, pGloSensor, Pgp-Glo, PhosphoCatch, PinPoint, PowerTyper, PromegaExpress, Promega Points, Protease-Glo, ProteaseMAX, Proteasome-Glo, psiCHECK, psiLentGene, psiSTRIKE, pTarget, pTnT, PureYield, QuantiFluor, R110Direct, Rapid Response, READase, READIT, READIT® design, ReadyAmp, ReliaPrep, Renilla-Glo, RiboMAX, RNase ONE, siCHECK, siLentGene, SILVER SEQUENCE, SIRT-Glo, siSTRIKE, Slicprep, SoftLink, StemElite, Suc-LLVY-Glo, TagBead, TetraLink, Tfx, TMRDirect, Transcend, TransFast, Turbo, UGT-Glo, Ultra-Glo, ViviRen, VivoGlo, Z-LRR-Glo, Z-nLpNL-D-Glo, Z-RLRG-Glo, Z-VDVAD-Glo and Z-VEID-Glo are all trademarks of Promega Corporation, Madison, WI, USA.

Acknowledgments/Disclaimers

Certain applications of Promega products may require licenses from others.

Promega products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information (www.promega.co.jp/license/).

※この資料は、2012-2013年の資料をもとに作成されたものです。