

4  
APR. 2004  
No.58

Wako

<http://www.wako-chem.co.jp>

# Bio Window

## CONTENTS

「合成化学発光プローブL-012を用いた活性酸素産生動態の解析」 今田伊助、佐藤英介、西川 学、井上正康…… p.2

### 生理活性

NO還元酵素(P450nor)…………… p.3  
ペプチド研究所  
Uroteisin II -Related Peptide(Human, Rat)……………p.15

### 蛍光

同仁化学 FSB solution…………… p.4

### 免疫

GT社 Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit…………… p.5  
ホクドー社 Native OPN ELISA Kit…………… p.6  
BioLegend社 フローサイトメトリー用抗体/カタログ発行……………p.19

### 遺伝子

UBI社 哺乳類siRNA発現プラスミド……………p.20  
N-G社  
qPCR™ QuickGoldStarMastermix Plus シリーズ……………p.22  
amaxa社 Rat Oligodendrocyte Nucleofactor™ Kit……………p.23  
5-Benzylthio-1-H-tetrazole……………p.24

### 培養

ThermoTrace社 無血清培地…………… p.8

### プロテオミクス

P-C社  
MemCode™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF…………… p.10  
P-C社 Phosphopeptide Isolation Kit…………… p.12  
P-C社 PepClean™ C-18 Spin Column…………… p.13  
P-C社  
Chemiluminescent BlueRanger®  
Prestained Protein Molecular Weight Marker…………… p.14  
ユビキチン関連試薬…………… p.16  
高純度マトリックス…………… p.17  
BioChain社  
細胞質・核・膜・細胞骨格タンパク質の  
単離に便利なKitシリーズ…………… p.18

### お知らせ

学会案内…………… p.5  
エンドキシシ試験法セミナー2004案内…………… p.24

# 合成化学発光プローブ L-012 を用いた活性酸素産生動態の解析

大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学講座  
今田伊助、佐藤英介、西川 学、井上正康

## 1. はじめに

好気性生物は呼吸により毎日多量の酸素を消費し、生体内エネルギー産生に利用している。この際、消費酸素の数%は、生体内で反応性の活性酸素種に変換されている。呼吸により生体内に取り込まれた酸素は、生体組織のミトコンドリアや小胞体、またペルオキシソームなどの細胞内画分により1電子還元を受け、まずスーパーオキシドアニオン (superoxide) に変換される (図1)<sup>1)</sup>。Superoxide は生体内で superoxide dismutase (SOD) で過酸化水素に、過酸化水素はさらに微量の遷移金属の存在下 hydroxyl ラジカルなどに変換される。

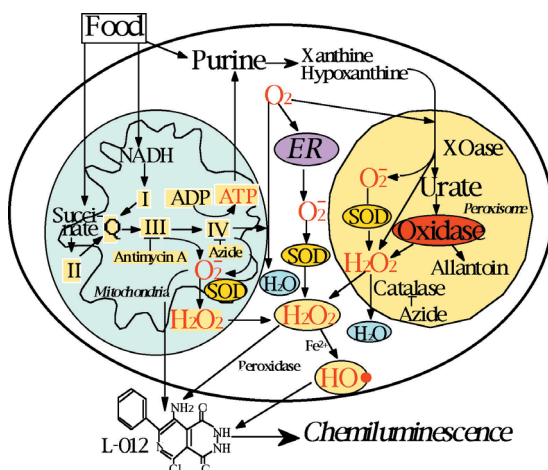


図1. 肝細胞画分における活性酸素の産生

## 2. 活性酸素の分析

活性酸素の分析法として、電子スピン共鳴法、分光分析法、化学発光法などが用いられている。これらの中で、操作が簡単な化学発光法は高感度で優れた方法である。著者らは先に、複雑な生体試料中でも極めて高感度な化学発光プローブとして 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione (L-012) を見だし、本プローブを用いてヒト血液および口腔内好中球やラット腹腔内好中球の活性酸素動態を明らかにした<sup>2)</sup>。今回、ラット肝ミトコンドリア画分の活性酸素産生動態の解析について紹介する。ラット肝ミトコンドリアによる基質呼吸下での活性酸素産生を各種化学発光プローブを用いて解析した結果、コハク酸やグルタミン酸を基質としてミトコンドリア呼吸下に産生される活性酸素を測定することができた。その感度は、従来用いられてきた lumimol, lucigenin 及び MCLA に比べ、L-012 が極めて特異的かつ高感度であった。この際、活性酸素産生量は各 State によりかなり異なることが認められ、State I < III < IV < II の順番で、State II で増加、State III で低下した。State II 呼吸及び State III 呼吸で産生される活性酸素は SOD 及び deferoxamine により阻害され、本発光は superoxide 及び hydroxyl ラジカルに由来することが判明した (図2)。

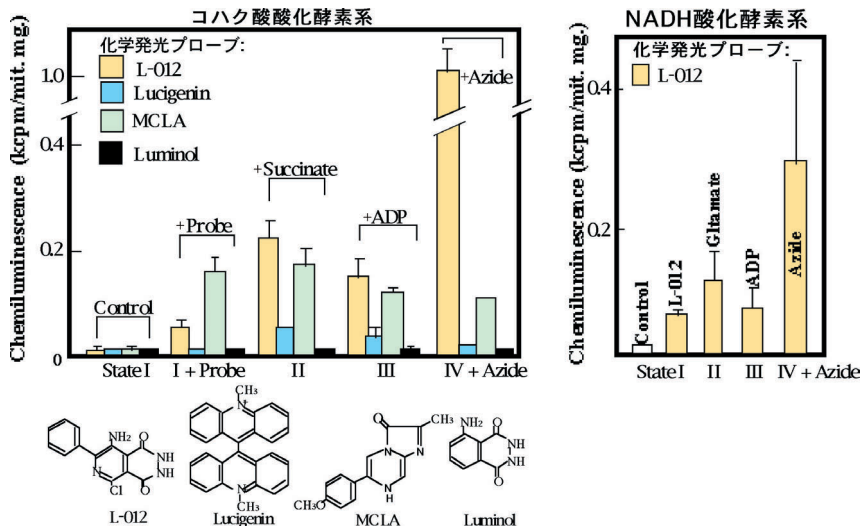


図2. ラット肝ミトコンドリアにより産生される活性酸素の各種化学発光プローブによる分析

### 3. おわりに

活性酸素の多くは反応性が高く、生体成分を攻撃して加齢性病態を含め、様々な病気の増悪因子となり重篤な病気を起こす危険性が高い。従って、その定量解析と代謝制御が重要である<sup>3)</sup>。さらに、最近の研究ではミトコンドリアで生成される活性酸素がアポトーシスや老化促進因子として注目をあびている<sup>4)</sup>。L-012 を用いる活性酸素産生動態の解析は、今後この方面の研究に寄与すると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Singh, I., Ann. N. Y. Acad. Sci., 804 612627(1996); Chance, B., Sies, H., Boveris, B., Physiol. Rev., 59, 527-605 (1979).
- 2) Imada, I. et al., Anal. Biochem., 271, 53-58(1999). 参照：今田伊助ほか、和光純薬時報、69(3), 31-34(2001).
- 3) 井上正康監訳：レドックス制御と抗酸化治療戦略、医薬ジャーナル社、大阪、(2001).
- 4) Inoue, M., et al., Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, Curr. Med. Chem., 10, 2495-2505(2003).

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
120-04891	L-012	100 mg	15,000

## NO測定・除去用試薬



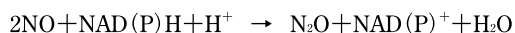
# NO還元酵素(P450nor)

P450norは、モノオキシゲナーゼとしてではなくNOをN<sub>2</sub>Oに還元するレダクターゼとして働くユニークなP450酵素です。NOとの結合速度定数はPRIOなどのNOトラップ剤に比べ非常に速くなっています。NO測定、NO除去に使用できます。

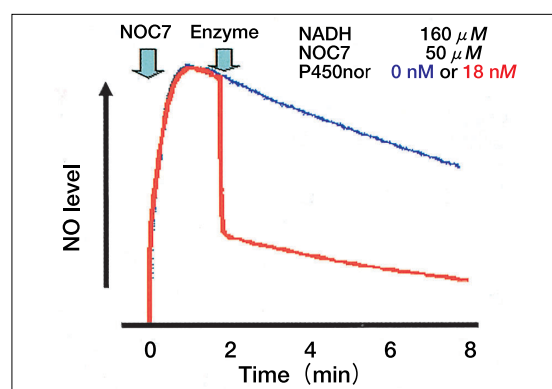
#### 【規格】

- 起源：Aspergillus oryzae
- 形状：液状（凍結品）
- 分子量：45,600
- 最適pH：5.5～7.2
- 熱安定性：T<sub>50</sub>=53.9
- 等電点：5.44
- 活性：43,000 mol NO/mol enzyme以上（37℃）
- k<sub>rea</sub>：1.5×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

#### 【酵素活性測定原理】



#### 【瞬間的なNO除去反応】



コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
148-07851	NO還元酵素 (P450nor)	100 n mol	30,000

K.T.

新製品

アミロイド染色用蛍光色素(1% FSB in DMSO)



# FSB solution

アミロイドーシスはアミロイド( $\beta$ シート線維構造を持つタンパク質)が臓器や組織細胞の外に沈着してこれらの臓器や組織の働きを阻害する病気です。アミロイドーシスには、常染色体優性遺伝で起きる「遺伝性アミロイドーシス」および慢性疾患や糖尿病などに合併してみられる「続発性アミロイドーシス」など多くのタイプがあります。また、この病気は全身の様々な部分にアミロイドが沈着する「全身性アミロイドーシス」と脳や皮膚など特定の部位にアミロイドが沈着する「限局性アミロイドーシス」にも分類され、これらはアミロイド前駆タンパクの違いによりさらに細分類されています。

従来、この研究にはBSB [1-Bromo-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene] が使用されていましたが、FSB [1-Fluoro-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene]はBSBの臭素をフッ素に変えて重原子効果による蛍光消光をなくすことで、アミロイドの高感度蛍光染色を可能にしました。アルツハイマー病患者の脳組織 (Fig.1)およびFAP患者の心臓組織 (Fig.2)の染色結果において、FSBはBSBより鋭敏にアミロイド沈着部分を検出しています。

FSBはBSBとほぼ同じ骨格であるため、蛍光強度以外はBSBの特性をそのまま有していると考えられます。このことから*in vivo*でBSBより高感度検出が可能となり、今後のアミロイドーシスの診断・治療などの研究へのさらなる応用が期待されます。

### 【使用方法】

- \* 本製品は1% FSBのDMSO溶液です。
- 本製品1本から、0.01%濃度の染色液が10 ml、0.0001%の染色液が1,000 ml調製できます。

#### 1. FSB染色液の調製

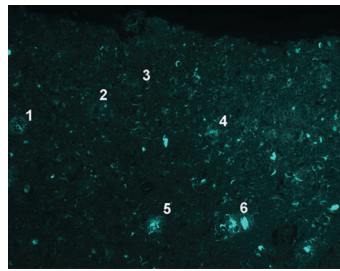
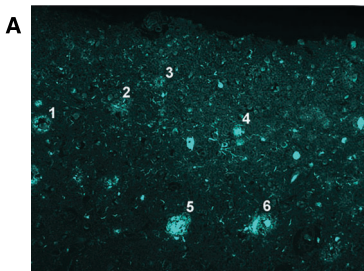
製品に50% エタノールを加えて希釈し、0.01~0.0001%の濃度にする。

#### 2. 染色

- ・切片をFSB染色液に30分間浸す。
- ・切片を飽和炭酸リチウム水溶液に浸した後、50% エタノールにて軽く洗う。

#### 3. 観察：UV光(V励起)にて観察する。

Fig.1 アルツハイマー病



アルツハイマー病患者の脳の前頭皮質切片(エタノール固定)の染色像 (\*光っている部分がアミロイド)

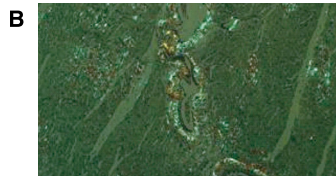
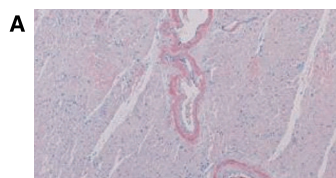
A:FSB  
B:BSB

準隣接切片で図中の番号はそれぞれの老人斑に対応している。

FSBの方がより細かい部分まで明確に観察できる。(画像提供:理化学研究所脳科学総合研究センター 神経蛋白制御チーム)

樋口 真人先生、西道 隆臣先生)

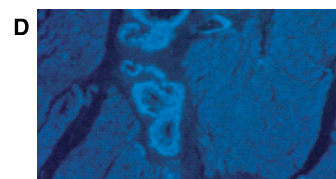
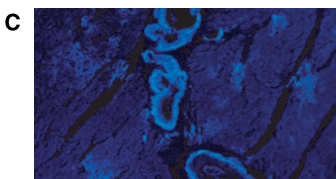
Fig.2 FAP(家族性アミロイドポリニューロパチー)



FAP患者の心臓組織切片の染色像

(\*Congo redは赤褐色、BSBとFSBは光っている部分がアミロイド)

A:Congo red  
B:Congo red (偏光顕微鏡下)  
C:FSB×20  
D:BSB×20



FSBはより細かい部分まで明確に観察でき、アミロイド沈着部分のコントラストがはっきりしている。(画像提供:熊本大学大学院)

医学薬学研究部

原岡 克樹先生

同 生態情報分析医学講座

安東 由喜雄先生)

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
341-90811	F308	FSB solution	100 $\mu$ l	25,000



# Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit

アディポネクチン (AdiponectinもしくはAcrp30) は脂肪細胞により産生・分泌されるホルモンの1種です。ヒト血中に5~10  $\mu\text{g/ml}$ という比較的高濃度で存在しており、肥満とともに血中濃度は低下するという性質をもっています。また、血糖の調節や血管修復、動脈硬化の抑制などの働きがあると知られており、最近注目されています。

本キットではサンドイッチELISA法を用いてヒトアディポネクチンを4時間程で簡便に定量することができます。

## 【特長】

- 測定可能範囲：3.9~250 ng/ml
- 感度：0.246 ng/ml
- 4時間程で定量できる。
- 培地上清・血清・血漿のいずれでもサンプルとして使用できる。

## 【キット内容】

- ▶96穴マイクロプレート .....1枚
- ▶スタンダード .....500ng
- ▶スタンダード用希釈液  
(血清、血漿用) .....21ml  
(培地上清用) .....3本×21ml
- ▶希釈液.....11ml
- ▶洗浄液 (×25) .....21ml
- ▶発色液 (2種類) .....各12.5ml
- ▶HRP標識抗アディポネクチン  
モノクローナル抗体.....21ml
- ▶停止液 .....6ml
- ▶プレートカバー .....4枚

## 【参考文献】

- 1) Yamauchi, T. *et al.* (2003) *Nature* **423**:762
- 2) Berg, A.H. *et al.* (2002) *Trends Endocrinol.Metab.* **13**:84
- 3) Fruebis, J. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:2005.
- 4) Yamauchi, T. *et al.* (2001) *Nat. Med.* **7**:941

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
571-98551	8143	Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit	1キット	76,000

また、バッファーや基質の条件などを自由に検討できるディベロップメントキットもご用意しています。1キットで約15~20プレート分の試薬が入っていますので大量の検体を定量するのに最適です。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
588-71521	49218	Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Development Kit	1キット	155,000
526-32321	4902	Substrate Reagent Pack	15~20プレート分 (12.5ml×8)	41,000
		▶基質溶液A (過酸化水素溶液) ▶基質溶液B (TMB)		

\*ディベロップメントキットは各種抗体とスタンダードがセットになっています。発色基質は入っていません。

## 【関連製品】

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
585-71531	10084	Mouse Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit	1キット	74,000
581-77091	21065X	Recombinant Human Adiponectin/Acrp30, CF	50 $\mu\text{g}$	60,000

U.TN.

データシートはホームページから入手できます。 <http://www.g-tonline.com/home.html>

## お知らせ

学会名	会期	会場
* 環太平洋蛋白質科学国際会議/日本蛋白質科学会年会	4/15~18	パシフィコ横浜
* コンビケム研究会	4/26~27	千里ライフサイエンスセンター
* 日本食品衛生学会	5/12~13	中央区中央会館
* 日本糖尿病学会	5/13~15	東京国際フォーラム
* インターフェックス・国際バイオEXPO	5/19~21	東京ビックサイト
日本実験動物学会	5/20~22	長崎大学
* 日本栄養・食糧学会	5/22~23	東北大学川内キャンパス
日本防菌防黴学会	5/26~27	品川区立総合文化会館

\* 印は当社展示予定の学会です。

高感度で定量可能！



## Native OPN ELISA Kit

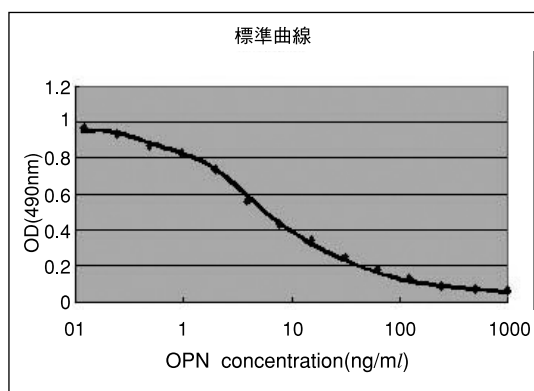
オステオポンチン(OPN)は分子量約6万前後のリン酸化糖タンパクです。最近、OPNがHIV感染症に合併する難治性日和見真菌症における感染防御機構に大きく関与していることが示され(文献1参照)、また、オステオポンチンの機能がTRAP(酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ)に制御されていることも報告され(文献2参照)、多くの関心を集めています。

本キットはヒト初乳由来の天然オステオポンチンを抗原として得られた抗オステオポンチンモノクローナル抗体5D10を用いたOPN定量キットです。Antibody capture assay法を採用することにより天然オステオポンチン量を高感度(100pg/ml-100ng/ml)で定量することが可能です。

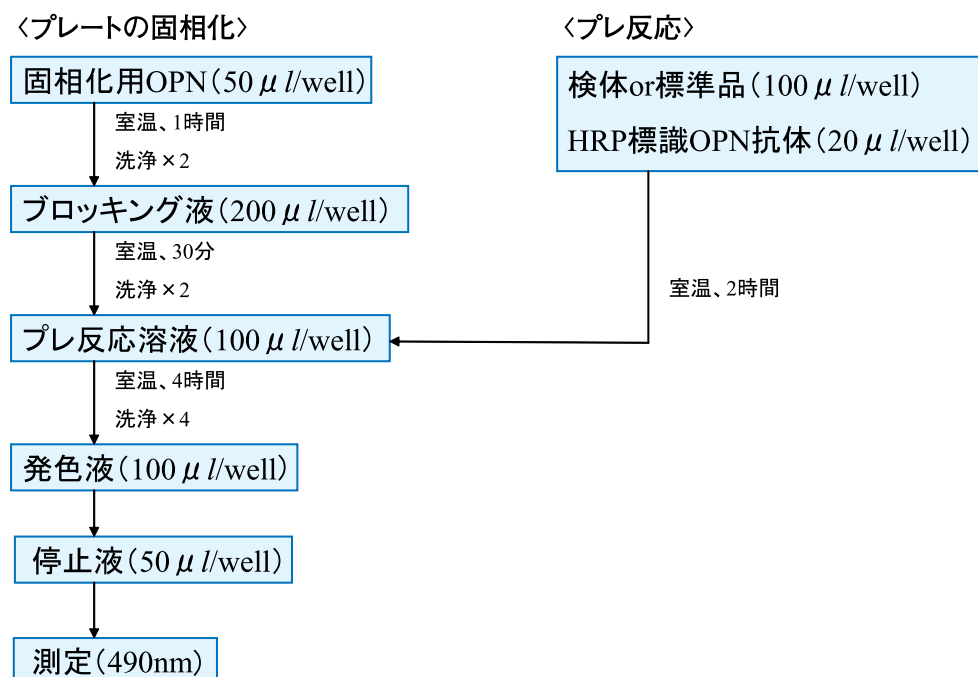
母乳中、各組織中、培養上清中などのオステオポンチン含量測定にご利用ください。

### 【キット内容】

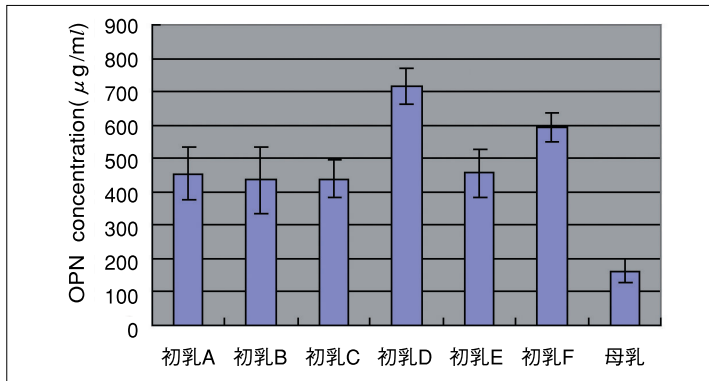
- ▶ ヒト初乳OPN (固相化用) .....5 $\mu$ g/tube  $\times$  2本
- ▶ ヒト初乳OPN (スタンダード) .....0.5 $\mu$ g/tube  $\times$  1本
- ▶ HRP標識抗OPNモノクローナル抗体 .....4ml  $\times$  1本
- ▶ ブロッキング原液 .....10ml  $\times$  2本
- ▶ OPD tablet .....13mg  $\times$  2錠
- ▶ 洗浄原液 (20倍濃縮) .....20ml  $\times$  1本
- ▶ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....40 $\mu$ l  $\times$  1本
- ▶ PBS.....30ml  $\times$  1本
- ▶ ELISA用96wellプレート .....96well  $\times$  4枚
- ▶ 発色停止液 .....10ml  $\times$  1本



### 【測定方法】



**【測定例1】 Human milk中のOPN濃度の比較**



**【測定例2】 ヒト初乳OPN精製 (gel permeation chromatography) 過程におけるOPN含量**

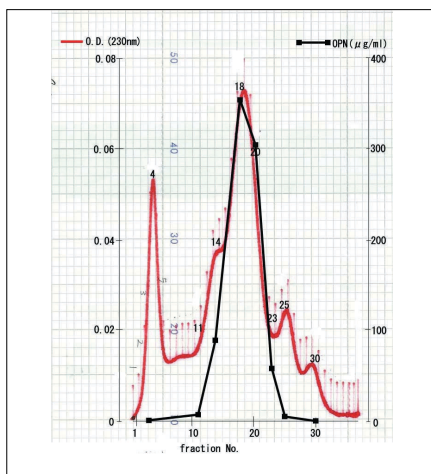
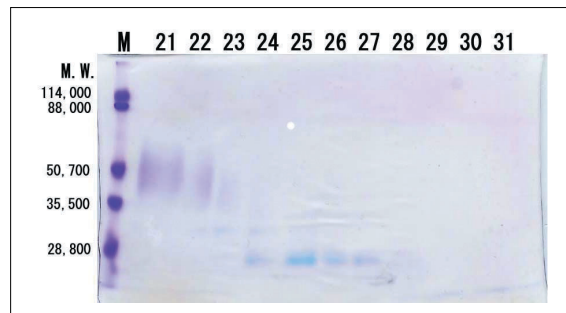
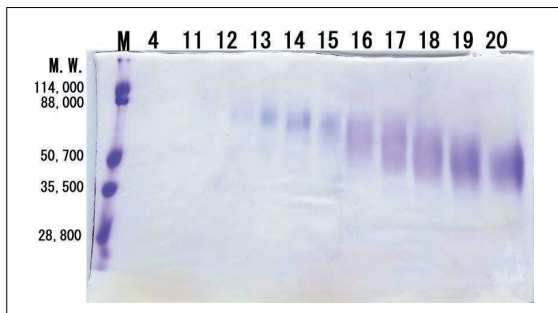


Fig1:Gel permeation chromatography chart に各フラクションのOPN測定結果を重ねた図  
メインピークにOPNが集中していることがわかります。



Gel permeation chromatography の各フラクションをSDS-PAGEし、ホクドー社のStains Allゲル染色キットで染色したものです。Fig.1において認められたメインピークが、50-80kDaのインタクトOPNであることがわかります。

**【参考文献】**

- 1) Yoshinobu Koguchi, Kazuyoshi Kawakami, Shigeyuki Kon, Tatsuya Segawa, Masahiro Maeda, Toshimitu Uede, and Atsushi Saito. Penicillium marneffeii Causes Osteopontin-Mediated Production of Interleukin-12 Peripheral Mononuclear Cells. Infection and Immunity. Mar. 2002, p. 1042-1048.
- 2) Alison R Hayman and Timothy M Cox. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Knockout Mice. Journal of Bone and Mineral Research. V.18, No.10, 2003.

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
304-15121	OP20	Native Osteopontin ELISA Kit	192回用	90,000

**【関連製品】**

307-08881	OP02	Stains All ゲル染色キット	20回用	30,000
306-13621	BC09	オステオポンチン (OPN), ヒト初乳由来	100 μg/vial	50,000
307-13651	AB02	抗ヒト初乳オステオポンチンモノクローナル抗体(clone name:5D10, 6C3, 6E5, 7A8, 8E5, 8H4)	50 μg/vial	60,000

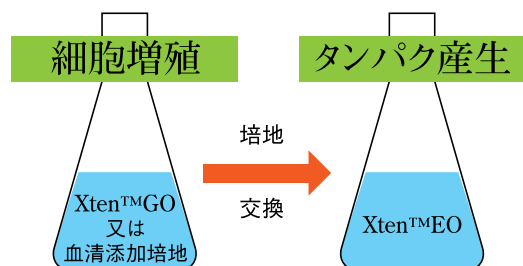
BSE問題の影響で供給量が不安定な血清製品の代替に

Thermo Trace

## Thermo Trace社 無血清培地

- ロットチェックが不要で、安定供給可能
- 細胞増殖とタンパク質産生を各々に適した条件で行えるため、生産性が飛躍的にアップ!!

### 【使用例】



### 【安全性】

培地に添加されているタンパク質成分はニュージーランド産ウシ由来。

### 【安定品質】

ロット間の再現性が良好。IgG不含、エンドトキシン低減。

### 【信頼性】

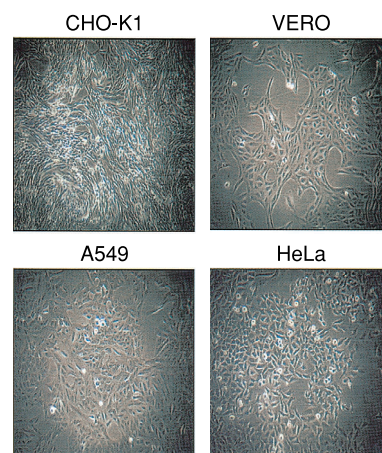
Thermo Trace社はISO9001を取得。原料から最終製品まで一貫製造のため、ロットの追跡調査が可能。

### ■Xten™ GO

細胞増殖用無血清培地(オーストラリア産)

### 【特長】

- CHO、VERO、A549あるいはHeLaなど附着性細胞の増殖に最適。
- 炭酸水素ナトリウム/HEPESが含まれており、優れたpH安定性を有する。
- フェノールレッドを含まない。
- 細胞増殖因子および接着性因子として、ニュージーランド産新生仔ウシ血清由来のトランスフェリン、フェチュインおよび組換え体インスリン様成長因子1(IGF1)を含む(総タンパク質含量: 175  $\mu\text{g/ml}$ )。
- イムノグロブリンおよびホルモンを含まない。
- FBS添加培地からXten™ GOへ直接培地交換が可能で、順化不要。



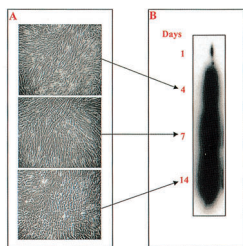
Xten™ GOによる附着性細胞の増殖例

### ■Xten™ EO & Xten™ LoPro EO

組換えタンパク質発現用無血清培地(オーストラリア産)

### 【特長】

- CHO-K1およびCHO-K1由来細胞系による組換えタンパク質発現に最適。
- 栄養因子および接着性因子として、ニュージーランド産新生仔ウシ血清由来のトランスフェリンおよびフェチュインを含む。



Xten™ LoPro EOで培養したCHO-K1細胞による組換えタンパク質発現の時間経過

- T25フラスコ中で、CHO-K1細胞を10% FBS添加Coon's培地でコンフルエントな状態まで増殖させた後、Xten™ LoPro EOに培地交換し、さらに1,4,7および14日間培養した。
- 各培養期間中の培地中の組換えタンパク質量を、ウエスタンブロットで測定した。

### 【使用方法】

- Xten™ GOあるいはFBS添加培地により細胞をコンフルエントな状態まで増殖させ、Xten™ EOあるいはXten™ LoPro EOで培養します。
- Xten™ GOあるいはFBS添加培地からXten™ EOあるいはXten™ LoPro EOへ直接培地交換が可能で、順化不要です。
- 長期間(21日間まで)のタンパク質発現にはXten™ EO(総タンパク質含量: 310  $\mu\text{g/ml}$ )が、短期間(14日間まで)のタンパク質発現にはXten™ LoPro EO(総タンパク質含量: 10  $\mu\text{g/ml}$ )が適しています。Xten™ LoPro EOで発現したタンパク質は、その後の精製効率が大幅に高くなります。



## Xten™ Hybricell

ハイブリドーマ細胞増殖・組換えタンパク質発現用無血清培地(オーストラリア産)

### 【特長】

- NSOミエローマ細胞や、NS1あるいはSP2/0由来のマウスハイブリドーマ細胞によるモノクローナル抗体産生に最適。
- 炭酸水素ナトリウム/HEPESが含まれており、優れたpH安定性を有する。
- フェノールレッドを含まない。
- 細胞増殖因子として、ニュージーランド産新生仔ウシ血清由来のアルブミンおよびトランスフェリンを含む(総タンパク質含量: 500 μg/ml)。
- ホルモンを含まない。
- L-グルタミンを含まない(使用時に4mMとなるようL-グルタミンの添加が必要)。
- FBS添加培地からXten™ Hybricellへ直接培地交換が可能で、順化不要。

## TMEM™

血清使用量低減培地(オーストラリア産)

### 【特長】

- 付着性細胞および浮遊性細胞の増殖に最適。
- 炭酸水素ナトリウム/HEPESが含まれており、優れたpH安定性を有する。
- フェノールレッドを含まない。
- 細胞増殖因子として、ニュージーランド産新生仔ウシ血清由来のアルブミンおよびトランスフェリンを含む(総タンパク質含量: 375 μg/ml)。
- ホルモン、ステロイドを含まない。
- L-グルタミンを含まない(使用時に4mMとなるようL-グルタミンの添加が必要)。

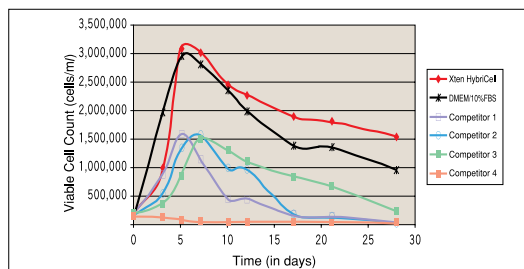
### 【Thermo Trace無血清培地製品リスト】

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	備考	希望納入価格(円)
523-82146	11-401-0500V	Xten™ GO	500 ml	タンパク質含量:175μg/ml	7,000
529-82143	11-401-1000V	細胞増殖用	1,000 ml		12,000
524-82176	11-300-0500V	Xten™ EO	500 ml	タンパク質含量:310μg/ml	7,000
520-82173	11-300-1000V	組換えタンパク質発現用	1,000 ml		12,000
521-82186	11-310-0500V	Xten™ LoPro EO	500 ml	タンパク質含量:10μg/ml	7,000
527-82183	11-310-1000V	組換えタンパク質発現用	1,000 ml		12,000
520-82156	11-410-0500V	Xten™ Hybricell	500 ml	タンパク質含量:500μg/ml	7,000
526-82153	11-410-1000V	ハイブリドーマ細胞増殖 組換えタンパク質発現用	1,000 ml		12,000
572-35966	11-450-0500V	TMEM™ LoPro GO	500 ml	2% FBS添加で細胞が増殖	7,000
578-35963	11-450-1000V	血清使用量低減用	1,000 ml		12,000
579-35971	21-159-0100V	Trypsin Solution 2.5%	100 ml	(関連製品)	2,000
576-35981	21-163-0100V	Trypsin-EDTA Solution	100 ml	付着性細胞の剥離に	2,000

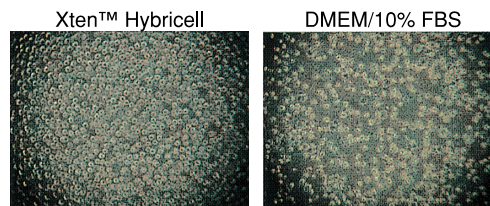
サンプルについては、当社代理店あるいは当社営業員にお申しつけ下さい。  
各無血清培地の組成およびアプリケーションデータについては下記URLを参照して下さい。

<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/life/article/thermotrace.htm>

【パンフレット請求先】 Wako Bio Window係 E-mail: biowin@wako-chem.co.jp FAX: 06-6201-5964



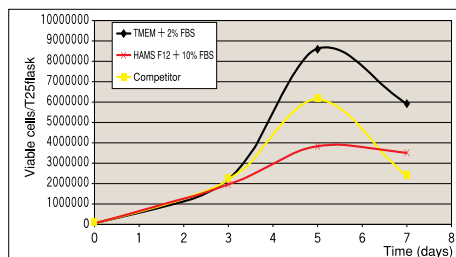
異なる培地におけるSP2/0-9D5細胞の増殖  
T25フラスコ中で増殖したSP2/0-9D5の細胞数を示す。細胞を37℃、5% CO<sub>2</sub>で培養した。



異なる培地におけるSP2/0-9D5細胞の増殖  
培養開始から28日後、20倍拡大写真。

### 【使用方法】

- 使用時に2% (~4%)となるようFBSを添加し、細胞培養します。
- 10% FBS添加培地からTMEM™へ直接培地交換が可能で、順化不要です。



異なる培地におけるCHO-K1細胞の増殖  
T25フラスコ中で増殖したCHO-K1の生存細胞数を示す。細胞を37℃、5% CO<sub>2</sub>で培養した。

I.T.

# MemCode™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF

ウェスタンブロット転写膜上のタンパク質を染色するためのリバーシブルな染色キットです。高感度で、青色に染色されますので写真撮影時により鮮明に写すことができます。また、この染色は、キット中のStain Eraserを使用して除去して頂けます。

## 【特長】

- **高感度**：検出感度は25～50ng protein
- **単時間で染色を消去(脱染色)**：およそ10分で染色バンドから色素を除去することができます。
- **青色に染色**：青色に染色されますので、写真映りがより鮮明です。
- **退色しません**：染色されたバンドは、退色しませんので膜を長期間保存できます。

## 【キット内容】 PVDF膜 (8cm×8cm) 10枚分

- ▶ MemCode™ Sensitizer .....250ml
- ▶ MemCode™ Reversible Stain .....250ml
- ▶ MemCode™ Destain .....1000ml
- ▶ MemCode™ Stain Eraser .....250ml

## 【操作方法】(概略)

### A：染色



1、水で膜を洗浄



2、MemCode™ Sensitizerを加え、振とう(2分間)



3、MemCode™ Stainを加え、振とう(1分間)タンパク質バンドが青色を呈する

### B：脱色



1、MemCode™ Destain溶液で3回洗浄



2、1:1で混和したメタノール/Destain溶液中で振とう洗浄(5分間)



3、水で5回洗浄

### C：染色バンドの消去(色素の除去)



1、1:1に混和したMemCode™ Eraser/メタノール溶液中で振とう洗浄(10～20分間)



2、水で5回洗浄

**【データ】PVDF膜に転写された炭酸脱水素酵素の染色**

炭酸脱水素酵素の濃度を変えて4-20% トリス-グリシンSDSポリアクリルアミドゲルに添加、泳動後、PVDF膜へ転写。

A: MemCode™ により1分間染色後、プロトコールに従い脱色



Lane 1 : 10ng  
Lane 2 : 25ng  
Lane 3 : 50ng  
Lane 4 : 100ng  
Lane 5 : 200ng  
Lane 6 : 300ng  
Lane 7 : 400ng  
Lane 8 : 500ng  
Lane 9 : 1000ng  
Lane 10 : 分子量マーカー

[コードNo.524-79741(メーカーコード:26681)]

B: 0.1% Ponceau S(5%酢酸溶液)により5分間染色、プロトコールに従い脱色



コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
587-71471	24585	MemCode™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF	1Kit	25,100

**【関連商品】**

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
584-71481	24580	MemCode™ Reversible Protein Stain Kit for Nitrocellulose Membrane	1Kit	22,100
524-79741	26681	BlueRanger® Prestained Protein Molecular Weight MarkerMix	1Plate (48マイクロチューブ)	20,900

U.K.

酵素消化タンパク質からのりん酸化ペプチド分離に便利



# Phosphopeptide Isolation Kit

本品は、酵素消化されたペプチド混合物からりん酸化ペプチドを選択的に分離精製するためのキットです。ゲルに固定されたガリウムにりん酸基が特異的に相互作用することにより分離されます。りん酸化ペプチドのLC-MSやMALDI-MS分析の前処理にご利用下さい。

## 【特長】

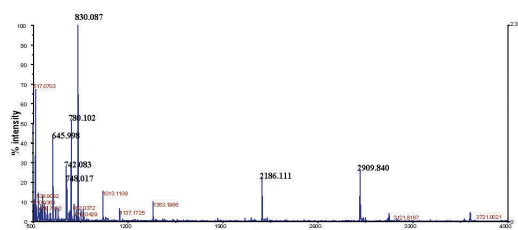
- 速くて簡単 操作時間が約15分で完了
- 高い許容量 1ディスク当たり約150  $\mu\text{g}/\text{l}$ のりん酸化ペプチドを統合可能

## 【キット内容】

- ▶ Mini-Spin Column .....30本
- ▶ SwellGel® Gallium-Chelated Disc .....30個

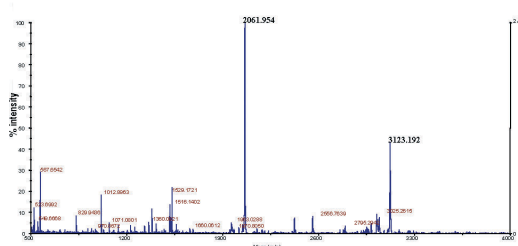


\* SwellGel®ディスク1個がミニスピナラム1本にセットされています。



### ■データ1：βカゼインのトリプシン消化のMALDI-TOFマススペクトル（本キットによる処理なし）

Mass 646、742、748、780、830及び2,186はβカゼインのトリプシン消化により予測されるペプチドを示します。マイナスマージされているため2,910Daと3,123Daで既知のりん酸化ペプチドのピークが示されていません。Mass 2,909のピークは部分的な消化断片を示します。



### ■データ2：Phosphopeptide Isolation Kitで処理されたβカゼインのトリプシン消化のMALDI-TOFマススペクトル

2,062のピークは48-63残基からのアミノ酸配列を意味しているシングルりん酸化ペプチドです。3,123のピークは4りん酸基を含む16-40残基由来のペプチドです。βカゼインのりん酸化されていないペプチドはほとんど検出されていません。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
573-39651	89853	Phosphopeptide Isolation Kit	1Kit	58,400

\* 発売当初は「Phospho-Peptide Enrichment Kit」という品名でしたが、変更になりました。

U.K.

MS分析サンプルの調整に便利なスピんカラム!!  
精製／濃縮が30分で完了!



## PepClean™ C-18 Spin Column

MS分析は微量タンパク質の同定に用いられますが、効率のよいMS分析を妨害する多くの緩衝液や化合物があり、その結果、感度やスペクトルの品質が低くなります。

本品は、多孔性C-18逆相レジンがセットされたスピんカラムです。妨害物質を取り除き、MS分析に最適な試料を調整するために大変便利です。また、MS分析の前処理だけでなく精製と濃縮が行われますので、ペプチドの濃縮などその他の目的にもご利用頂けます。

### 【特長】

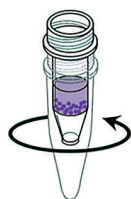
- MS分析の妨害物質除去
- 簡単・便利
- 高回収率

### 【推奨試料濃度】

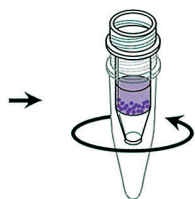
- 20ng(300fmol)タンパク量以上由来のペプチドを含むサンプル
- 0.5ng~30 $\mu$ gの単独ペプチドを含むサンプル

### 【操作法(概略)】

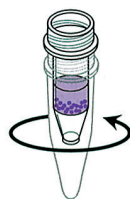
1. レジンの活性化    2. レジンの平衡化    3. サンプル添加



200 $\mu$ l 50%メタノール  
or  
50%アセトニトリル  
をレジンに添加し、  
1分遠心。  
(この操作を2回行う)  
所要時間:3-5分

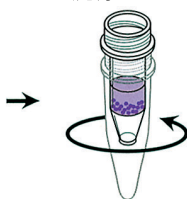


200 $\mu$ l 0.5%TFA  
5%アセトニトリル溶液で  
レジンを平衡化。  
1分遠心。  
(この操作を2回行う)  
所要時間:3-5分



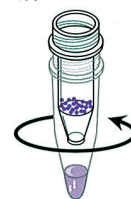
試料10-150 $\mu$ lを添加。  
1分遠心。  
溶出したBufferを回収、  
再添加。  
1分遠心。  
所要時間:3-5分

### 4. 洗浄



200 $\mu$ l 0.5%TFA  
5%アセトニトリル溶液  
で洗浄。  
1分遠心。  
(この操作を2回行う)  
所要時間:5分

### 5. 溶出



20 $\mu$ l 70%  
アセトニトリルで溶出  
(この操作を2回行う)  
所要時間:3分

### 6. 乾燥し、

MS分析用緩衝液  
に再溶解



コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
580-70621	89870	PepClean™ C-18 Spin Column	25本	15,900
586-70623	89873		50本	29,700

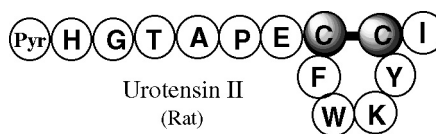
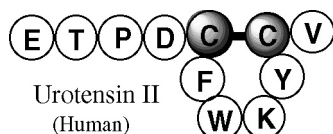
U.K.

※カラム1本において試料容量10~150 $\mu$ l中の20ngタンパク以上、または、30 $\mu$ gを超えるトータルペプチドの消化を処理できます。



## Urotensin II-Related Peptide (Human, Rat)

魚類には尾部下垂体 (urophysis) と呼ばれる特殊なホルモン貯蔵放出器官があり、ここに神経分泌ホルモンである Urotensin I (U-I) と Urotensin II (U-II) が存在します。カエルの脳に U-II が見つかったことから、哺乳類にも Urotensin があるのではないかと推測され、1998年にヒト Prepro-U-II の cDNA 構造がわかり<sup>1)</sup>、さらに、合成ヒト U-II は強い血管収縮作用を持つことが報告されました<sup>2)</sup>。ヒト U-II が報告されて間もなく、ラット Prepro-U-II の cDNA 構造もわかりました<sup>3)</sup>。我々はこの Prepro-U-II の一次構造から、ラット U-II は [Pyr<sup>110</sup>]-Prepro-U-II (Rat, 110-123) であろうと推定しました。その際 110 位の Gln 残基は、翻訳後に修飾される可能性の高い Pyr (Pyroglutamyl) 基に置換されていると考えました。化学合成したラット U-II はラット大動脈標本において、ヒト U-II とほぼ同等の収縮活性を示す事を確認しました。このラット U-II は、無麻酔ラットに静脈内適用すると、ヒト U-II と同程度の血圧低下作用を示し<sup>4)</sup>、脳室内に適用した場合は昇圧作用を示したと報告されています<sup>5)</sup>。

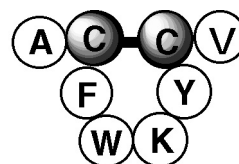


ところで、ラット Prepro-U-II は典型的なプロセッシングサイトを欠いているので、ラットには別の U-II が存在するのではないかと考えられていました。武田薬品工業の研究チームは抗 U-II 抗体を使用し、ラット脳抽出物から 8 アミノ酸残基からなる Urotensin II-Related Peptide (URP) を単離同定しました<sup>6)</sup>。また、ラット、マウス、ヒト URP は同一構造である事を前駆タンパクの解析結果から明らかにしました。Prepro-URP の組織分布は Prepro-U-II と少し異なり、ラットにおいては胸腺と脾臓に多く、ヒトでは卵巣と精巣に多く分布します。また、麻酔下のラットにおける血圧低下作用は上述のラット U-II とほぼ同程度と報告されています。

この URP はラットの脳に実存する内因性ペプチドであり、その生理学的な役割の解明に大きな興味を持たれています。さらに、ヒトにおける新たな Urotensin の存在と意義に注目が集まっています。

### 【参考文献】

- 1) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15803 (1998)
- 2) *Nature*, **401**, 282 (1999)
- 3) *FEBS Lett.*, **457**, 28 (1999)
- 4) *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1625 (2001)
- 5) *J. Hypertens.*, **21**, 159 (2003)
- 6) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 860 (2003)



Urotensin II-Related Peptide (Human, Rat)

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
331-44081	4408-v	Urotensin II-Related Peptide (Human, Rat)	0.5 mg vial	12,000

### 【関連製品】

330-43711	4371-v	Urotensin II (Rat)	0.5 mg vial	20,000
338-43653	4365-v	Urotensin II (Human)	0.5 mg vial	20,000
334-00251	14365-v	Urotensin II (Human) Antiserum	50 $\mu$ l vial	32,000

## ユビキチン関連試薬

ユビキチン-プロテアソームシステムに代表されるタンパク質分解機構は、アポトーシス、シグナル伝達、代謝調節などの高次機能の制御やタンパク質の品質管理などにおいて重要な役割を担っています。

弊社では、ユビキチン活性化酵素(E1)を始め、ユビキチン転移酵素(E2)やプロテアソームおよびその阻害剤などユビキチン-プロテアソーム関連試薬を安価にラインアップしております。

### 【E1 (活性化酵素)】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
219-01111	Ubiquitin Activating Enzyme, Mouse, recombinant, Solution	25 $\mu$ g	30,000
198-13341	SUMO-1 Activating Enzyme, Human, recombinant, Solution	25 $\mu$ g	30,000

### 【E2 (転移酵素)】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
212-01221	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc1, Histidine Tag, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	48,000
219-01231	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc2, Histidine Tag, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	48,000
213-01131	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc3(cdc34), Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000
215-01191	Ubiquitin Conjugating Enzyme UbcH5a, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000
218-01201	Ubiquitin Conjugating Enzyme UbcH5b, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000
216-01121	Ubiquitin Conjugating Enzyme UbcH5c, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000
216-01241	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc6, Histidine Tag, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	48,000
213-01251	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc7, Histidine Tag, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	48,000
210-01141	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc9(SUMO-1), Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000
217-01271	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc10, Histidine Tag, Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	48,000
217-01151	Ubiquitin Conjugating Enzyme Ubc12(NEDD8), Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000

### 【UBL (ユビキチン様タンパク質)】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
199-12771	SUMO-1 (1-97), Human, recombinant, Solution	200 $\mu$ g	30,000
145-07621	NEDD8(1-76), Human, recombinant, Solution	100 $\mu$ g	30,000

### 【Inhibitor (阻害剤)】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
131-14011	MG-115	5mg	24,000
138-14021	MG-132	5mg	22,000
135-14031	MG-262	100 $\mu$ g	39,000
215-01071	Ubiquitin Aldehyde	50 $\mu$ g	38,000
333-43681	Lactacystin [ペプチド研究所]	0.2mg	20,000
031-18201	Clasto-Lactacystin $\beta$ -Lactone	100 $\mu$ g	36,000
058-06841	Epoxomicin	100 $\mu$ g	32,000

### 【Substrate (基質)】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
164-20511	20S Proteasome, Fluorogenic Substrate	5mg	24,000

### 【Proteasome (プロテアソーム)】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
161-20521	20S Proteasome from Human Erythrocyte	50 $\mu$ g	34,000

### 【Antibody】

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
535-50391	Anti Human Ubiquitin, Monoclonal Antibody (Clone:3-39) [Senetek Ltd.]	200 $\mu$ l	169,000
538-50381	Anti Human Ubiquitin, Monoclonal Antibody (Clone:525) [Senetek Ltd.]	200 $\mu$ l	169,000
305-06741	Anti Ubiquitin, Monoclonal Antibody (Clone:FK1) [日本バイオテスト研究所]	1mg	35,000
302-06751	Anti Ubiquitin, Monoclonal Antibody (Clone:FK2) [日本バイオテスト研究所]	1mg	35,000
572-28751	Anti-Ubiquitin, Bovine (Rabbit) [Calbiochem]	50 $\mu$ l	42,500

K.T.A.



# 高純度マトリックス

プロテオーム解析では、質量分析計を用いたタンパク質の同定や翻訳後修飾の解析が行われています。質量分析計には、イオン化の方法と分析計の組み合わせにより様々な種類がありますが、ペプチドの質量を測定する場合には、MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization: マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 法やESI (Electrospray ionization: エレクトロスプレーイオン化) 法によりイオン化します。MALDI法は、多検体の短時間処理に優れており、一方、ESI法はタンデムMSでペプチドの配列情報を得たい場合に有用です。

MALDI法では、マトリックスと呼ばれる化合物を試料に加えて混合結晶を作製し、この結晶表面にレーザー光を照射してイオン化します。マトリックスとして汎用されているのは、 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) や Sinapic Acid (SA)、それに2,5-Dihydroxy benzoic acid (DHB) です。これらのマトリックスは、サンプルによって使い分けられ、一般的にペプチド試料に対してはCHCAが、タンパク質試料に対してはSAが、ペプチド・糖・糖脂質に対してはDHBが使用されます。しかし、市販されているマトリックスをそのまま使用すると、マススペクトルにマトリックス由来のピークが現れ、バックグラウンドが高くなり、SN比が低くなる場合があります。そのため、使用前に再結晶処理を行い、マトリックス由来のピークをできるだけ除く必要があります。

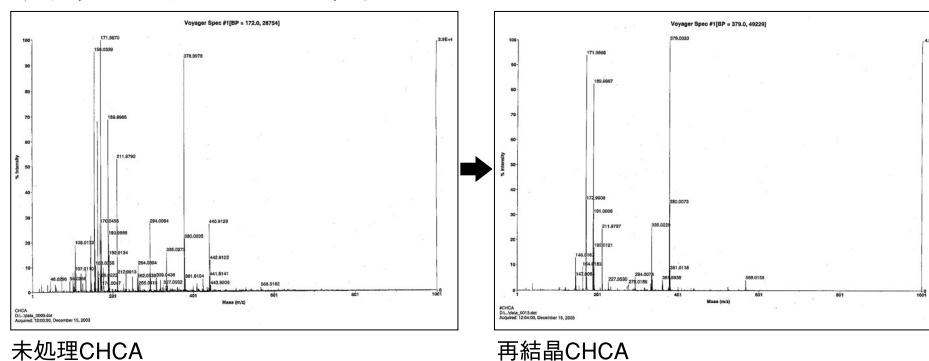
本品は、再結晶処理済みのマトリックスですので、再結晶処理を行わなくても非常にきれいなマススペクトルが得られます。

## 〔 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) の再結晶処理の効果〕

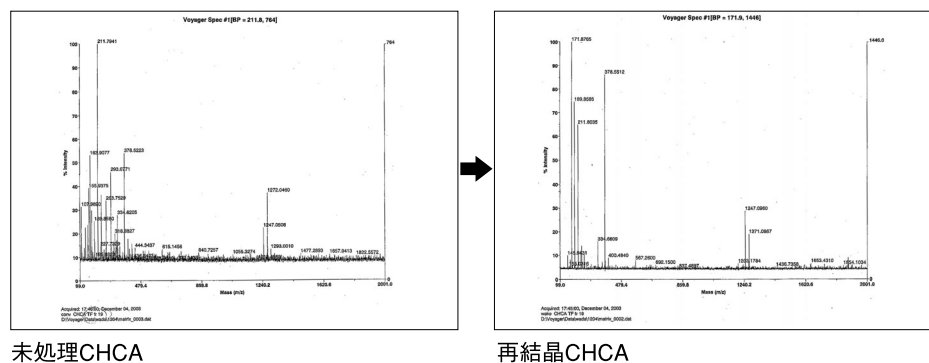
市販されているCHCAと再結晶処理したCHCAのMALDI-TOF/MSデータを比較した。再結晶化した高純度CHCAのマススペクトルの方がノイズが少なくきれいであることが分かる。

(データ提供: 大阪府立母子医療センター 和田芳直先生)

〈図1〉 マトリックスのみのマススペクトル



〈図2〉 CHCAを用いてペプチド試料を測定したマススペクトル



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
037-19261	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid 【CHCA】	プロテオーム研究用	50mg×5本	20,000
192-13361	Sinapic Acid 【SA】	プロテオーム研究用	50mg×5本	20,000
044-29101	2,5-Dihydroxybenzoic Acid 【DHB】	プロテオーム研究用	50mg×5本	20,000

### 【関連製品】

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
125-05061	Lysyl Endopeptidase®, Mass Spectrometry Grade	プロテオーム研究用	20 $\mu$ g×5本	15,000
202-15951	Trypsin, from Porcine Pancreas, Mass Spectrometry Grade	プロテオーム研究用	20 $\mu$ g×5本	15,000
293-57701	Negative Gel Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	11,000
299-58901	Silver Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	19,000

K.T.A.



## 細胞質・核・膜・細胞骨格タンパク質の単離に便利なKitシリーズ

### ■CNMCS Compartmental Protein Extraction Kit

機能的プロテオミクスの課題の一つは、定量的かつ選択的な細胞内局在性の解析用に、複雑なタンパク質混合物を単離することです。これには、組織や細胞から細胞内プロテオームを単離する、標準化された再現性のある操作手順が必要となります。

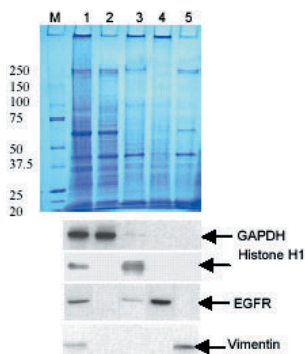
BioChain社のCNMCSキットは、専有技術に基づき、組織や細胞から細胞質(C)、核(N)、膜(M)および細胞骨格(CS)タンパク質を連続的に単離する、革新的、簡便かつ費用効率の高い方法を提供することにより、その課題に対処します。この独自のキットは、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング、ゲルシフトアッセイや他のタンパク質アッセイなどの用途において、タンパク質の初期精製や前処理のための優れたツールです。

#### 【特長】

- **利便性**：組織や培養細胞からの細胞質(C)、核(N)、膜(M) および細胞骨格(CS)タンパク質の段階的調製に必要な試薬をすべてセット
- **迅速性**：3時間以内に4つの分画タンパク質を単離
- **信頼性**：超高品質かつ再現性の高い細胞内プロテオームの分離(分画タンパク質の明らかに異なる電気泳動分離パターンや、マーカータンパク質の正確な細胞内局在性により検証)
- **高純度**：クロスコンタミを最小限に抑制
- **操作性**：取り扱いやすい
- **適用サンプル**：100 mg~5 gの組織あるいは $2.5 \times 10^6 \sim 125 \times 10^6$ 個の培養細胞

#### 【用途】

- 標的タンパク質の選択的な翻訳後修飾や細胞内局在性の検出
- 微量タンパク質の調製：タンパク質の視覚化
- 核抽出物の調製：ゲルシフトアッセイ法を用いる、転写調節因子などのDNA結合タンパク質の研究
- 細胞質分画の調製：細胞質ゾルに豊富な可溶性タンパク質の研究
- 膜分画の調製：受容体などの膜タンパク質の研究
- 細胞骨格分画の調製：細胞骨格タンパク質の研究



CNMCS Compartmental Protein Extraction Kitによる哺乳類組織からの細胞質(C)、核(N)、膜(M)、細胞骨格(CS)タンパク質の抽出例

BioChain社のTotal Protein Extraction Kit(後述)およびCNMCS Compartmental Protein Extraction Kitを用いて、ラット結腸組織から抽出した全タンパク質および分画タンパク質を5枚の同一ゲルにアプライし、SDS-PAGEにかけた。

1枚のゲルのクーマシー染色により、それぞれの分画のタンパク質の明確なパターンが示された。

他の4枚のゲルから転写したPVDF膜上での、細胞質マーカータンパク質GAPDH、核マーカータンパク質Histone H1、膜マーカータンパク質EGFRおよび細胞骨格マーカータンパク質vimentinに対する免疫ブロット法により、マーカータンパク質の大部分が、期待される分画タンパク質のレーンに検出された。

Lane 1: 全タンパク質、Lane 2: 細胞質タンパク質、Lane 3: 核タンパク質、Lane 4: 膜タンパク質、Lane 5: 細胞骨格タンパク質

### ■CNM Compartmental Protein Extraction Kit

CNMキットは、CNMCSキットと同じ特長を持ち、細胞質(C)、核(N) および膜(M)タンパク質を連続的に単離します。

#### 【キット内容】

パーツ	K3013010 (CNMCS)	K3012010 (CNM)
Buffer C(細胞質タンパク質単離用)	12 ml	12 ml
Buffer W(洗浄用)	25 ml	25 ml
Buffer N(核タンパク質単離用)	6 ml	6 ml
Buffer M(膜タンパク質単離用)	6 ml	6 ml
Buffer CS(細胞骨格タンパク質単離用)	6 ml	—
50X PI(プロテアーゼ阻害剤)	0.5 ml	0.5 ml

\*5 gの組織または $125 \times 10^6$ 個の培養細胞から分画タンパク質を単離するのに十分な試薬が含まれます。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
—	K3013010	CNMCS Compartmental Protein Extraction Kit	1 each	照会
—	K3012010	CNM Compartmental Protein Extraction Kit	1 each	照会

## ■ Total Protein Extraction Kit

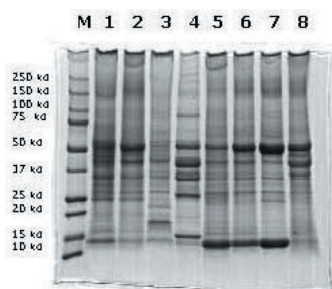
BioChain社のTotal Protein Extraction Kitは、あらゆる組織や細胞から全タンパク質を抽出する、初期精製のための優れたツールです。このキットで単離される全タンパク質は未変性で、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングや他のタンパク質アッセイなどに使用することができます。

### 【特長】

- **高品質**：精製されるタンパク質はインタクトで、250 kDを超える場合もある
- **操作性**：取り扱いやすい、凍結融解の繰返しや超音波処理がない
- **環境適応性**：廃棄物が出ない
- **適用サンプル**：100 mg～5 gの組織あるいは $2.5 \times 10^6 \sim 125 \times 10^6$ 個の培養細胞

### 【用途】

- 全タンパク質の調製：ウエスタンブロッティング、DNA-タンパク質相互作用、酵素活性分析、タンパク質-タンパク質相互作用、免疫沈降や組織特異的発現の検出など



4～20%濃度勾配SDS-PAGEゲル上で分離した全タンパク質  
BioChain社のTotal Protein Extraction Kitを用いて、8種類の異なるヒト組織からそれぞれ50 μgの全タンパク質を単離し、SDS-PAGEにかけた。

Lane 1: Liver、Lane 2: Kidney、Lane 3: Brain、Lane 4: Skeletal Muscle、  
Lane 5: Spleen、Lane 6: Lung、Lane 7: Placenta、Lane 8: Stomach

### 【キット内容】

パーツ		K3011010 (Total)		
Buffer TM (全タンパク質単離用)		13 ml		
50X PI (プロテアーゼ阻害剤)		0.5 ml		
*5 gの組織または $125 \times 10^6$ 個の培養細胞から分画タンパク質を単離するのに十分な試薬が含まれます。				
コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
—	K3011010	Total Protein Extraction Kit	1 each	照会

I.T.

## BioLegend社 取扱い開始!!

# フローサイトメトリー用抗体



米国BioLegend社製品を取扱い開始致しました。  
フローサイトメトリー用抗体を多数品揃え致しております。  
小包装を全ての製品にご用意しておりますので、お求めやすくなっております。  
是非、カタログをご請求下さい。

#### ▶ 抗体

- ・ CD抗体
- ・ サイトカイン抗体
- ・ ケモカイン抗体
- ・ サイトカインレセプター抗体
- ・ ケモカインレセプター抗体

#### ▶ タンパク質

- ・ サイトカイン、組換え体
- ・ ケモカイン、組換え体

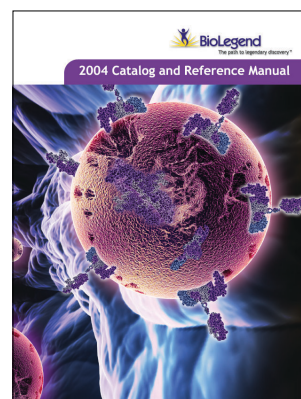
#### ▶ シグナル伝達関連試薬

#### 【カタログ請求先】

Wako Bio Window係

E-mail: biowin@wako-chem.co.jp

F A X : 06-6201-5964



U.K.

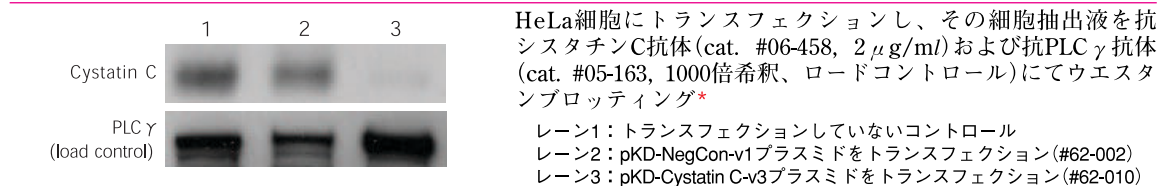
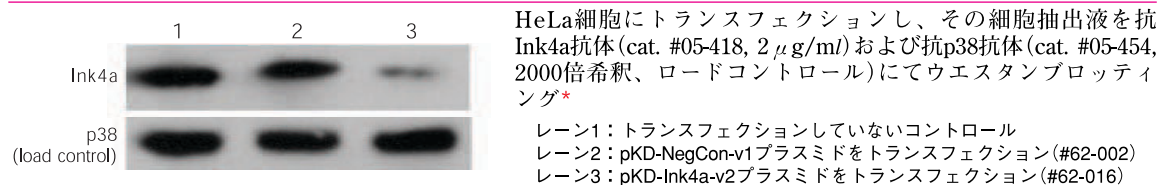
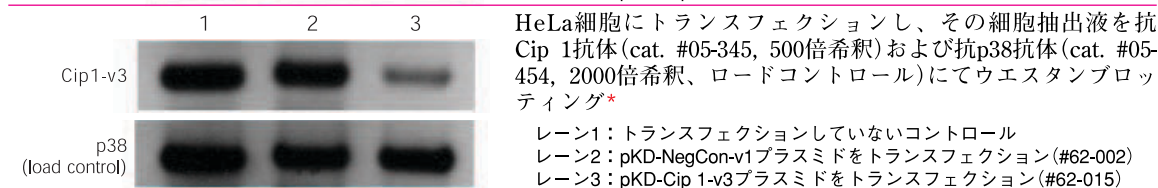
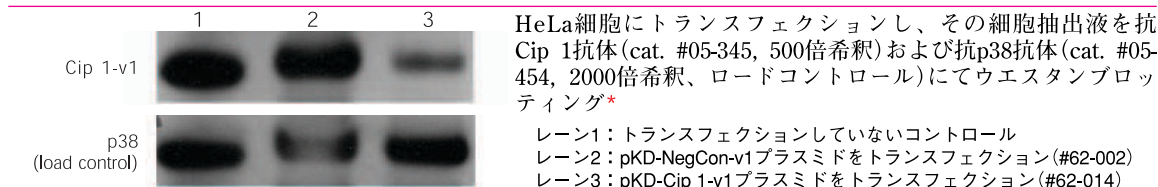
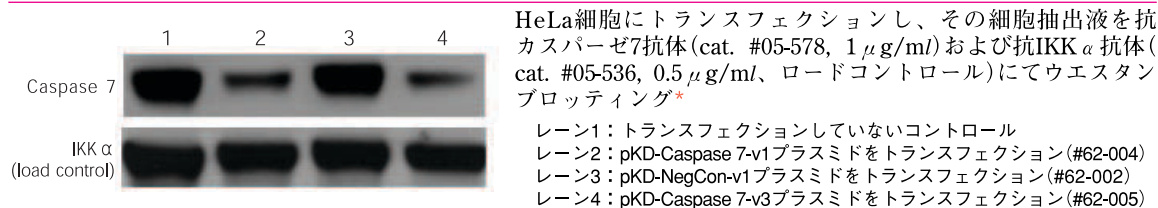
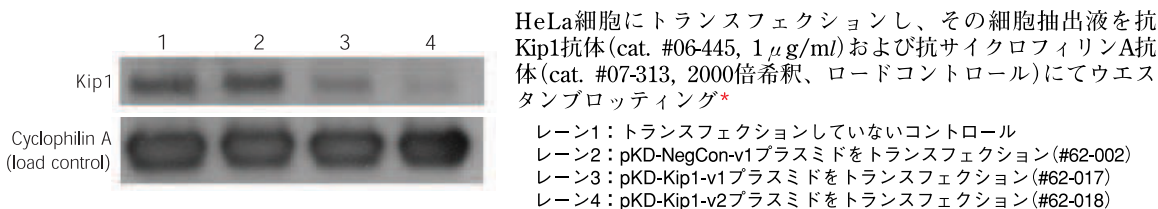
## 哺乳類siRNA発現プラスミド

Upstate社は、有効性が確認された哺乳類siRNA発現プラスミド(pKD)をご提供しています。ターゲットメッセージを75%以上ノックダウンし、ターゲット以外の作用もほとんど、もしくはまったくないことを確認しています。

### ■pKD-NegCon-v1 siRNAプラスミド

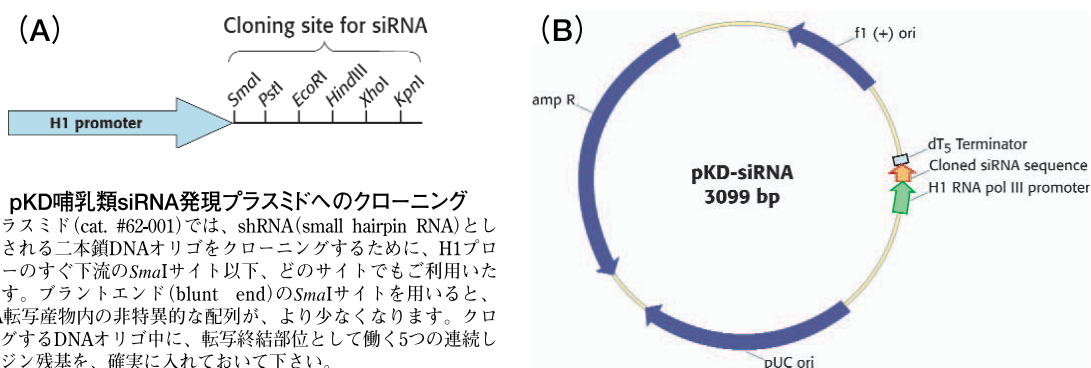
本品は、遺伝子特異的なpKD-siRNAプラスミドと同じベクターの骨格を持ち、ヒトゲノムのいかなる遺伝子とも配列の相同性はありませぬ。本品をご使用頂くことにより、ターゲット特異的なpKD-siRNAプラスミドで認められたノックダウンが、そのsiRNA配列にのみ依存するものであり、PKR/インターフェロン応答の活性化の結果ではないことを示すことができます。

### 【pKD-siRNAを介した遺伝子ノックダウン】



\*トランスフェクションの72時間後に細胞採取

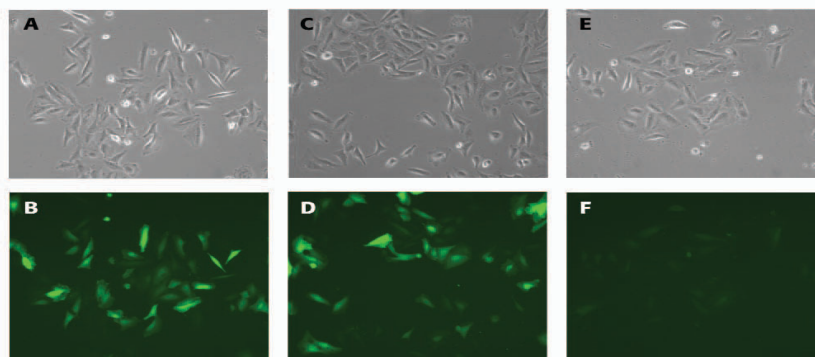
## 【哺乳類siRNA発現プラスミドのpKDシリーズ】



**(A) pKD哺乳類siRNA発現プラスミドへのクローニング**  
 pKDプラスミド (cat. #62-001) では、shRNA (small hairpin RNA) として発現される二本鎖DNAオリゴをクローニングするために、H1プロモーターのすぐ下流の *Sma*I サイト以下、どのサイトでもご利用いただけます。プラントエンド (blunt end) の *Sma*I サイトを用いると、shRNA 転写産物内の非特異的な配列が、より少なくなります。クローニングするDNAオリゴ中に、転写終結部位として働く5つの連続したチミジン残基を、確実にに入れておいて下さい。

### (B) pKD-siRNAプラスミドの基本構造

ヒトH1プロモーターにより、クローニングされた配列の発現 (転写されるとshRNAを形成) が誘導されます。転写はpoly dT配列により終結し、shRNAは細胞によりsiRNAにプロセッシングされます。独自の二本鎖DNAオリゴをクローニングする際は、pKD (cat. #62-001) がご使用いただけます。



### HeLa細胞において発現されたEGFPの、pKD-EGFP-v1を介したノックダウンの蛍光画像

AとB、CとD、EとFの3セットのパネルの細胞は、いずれもEGFP発現プラスミドをトランスフェクションしたものです。パネルAおよびBの細胞は、pKDプラスミドをトランスフェクションしていません。パネルCおよびDの細胞はpKD-NegCon-v1をトランスフェクションし、パネルEおよびFの細胞はpKD-EGFP-v1をトランスフェクションしました。パネルA、C、およびEで示された細胞は位相差光学顕微鏡画像、パネルB、D、およびFの細胞はそれぞれ、EGFPの存在 (または不在) を示す同じ細胞の蛍光画像です。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
565-56911	62-001	pKD	20 $\mu$ g	40,000
562-56921	62-002	pKD-NegCon-v1	20 $\mu$ g	80,000
562-57021	62-012	pKD-Androgen Receptor-v1	20 $\mu$ g	100,000
569-57031	62-013	pKD-Androgen Receptor-v2	20 $\mu$ g	100,000
566-56941	62-004	pKD-Caspase 7-v1	20 $\mu$ g	100,000
563-56951	62-005	pKD-Caspase 7-v3	20 $\mu$ g	100,000
560-56961	62-006	pKD-CHK1-v1	20 $\mu$ g	100,000
567-56971	62-007	pKD-CHK1-v2	20 $\mu$ g	100,000
564-56981	62-008	pKD-CHK2-v1	20 $\mu$ g	100,000
561-56991	62-009	pKD-CHK2-v3	20 $\mu$ g	100,000
566-57041	62-014	pKD-Cip1-v1	20 $\mu$ g	100,000
563-57051	62-015	pKD-Cip1-v3	20 $\mu$ g	100,000
565-57011	62-011	pKD-CREB-v2	20 $\mu$ g	100,000
568-57001	62-010	pKD-Cystatin C-v3	20 $\mu$ g	100,000
569-56931	62-003	pKD-EGFP-v1	20 $\mu$ g	100,000
561-57111	62-021	pKD-GSK3 $\alpha$ -v3	20 $\mu$ g	100,000
568-57121	62-022	pKD-GSK3 $\beta$ -v1	20 $\mu$ g	100,000
565-57131	62-023	pKD-GSK3 $\beta$ -v2	20 $\mu$ g	100,000
560-57061	62-016	pKD-Ink4a-v2	20 $\mu$ g	100,000
567-57071	62-017	pKD-Kip1-v1	20 $\mu$ g	100,000
564-57081	62-018	pKD-Kip1-v2	20 $\mu$ g	100,000
561-57091	62-019	pKD-Kip2-v1	20 $\mu$ g	100,000
564-57101	62-020	pKD-Kip2-v2	20 $\mu$ g	100,000

U.K.

より短時間で高感度アッセイが可能になりました！

# qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus シリーズ



qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus シリーズは、96 well や 384 well のヒートブロック方式のサーマルサイクラーに対応した Quantitative PCR 用試薬です。

新開発の QuickGoldStar DNA Polymerase の採用により、高感度アッセイをより短時間に行うことができるようになりました。

## 【特長】

- プロトコルを変更し、従来の製品よりも実験の所要時間が短くなりました。40 サイクルで約 20 分間の短縮が可能です。
- より高感度になりました。特に標的配列のコピー数が少ない場合に高性能を発揮します(下記データ参照)。

## 【プロトコール】

50°C 2min.  
94°C 3min.  
94°C 15sec. } ×40  
60°C 1min.

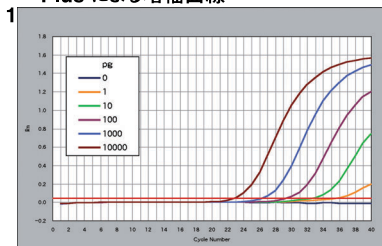
## 【製品内容】

- ▶ 2× Reaction buffer .....7.5ml×1本
  - ・ dNTP/dUTP
  - ・ QuickGoldStar DNA Polymerase
  - ・ MgCl<sub>2</sub> (5mM final conc.)
  - ・ Uracil-N-Glycosylase
  - ・ Stabilisers
  - ・ ROX Passive Reference
  - ・ SYBR® Green I (qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus for SYBR® Green I の場合)
- ▶ 50mM MgCl<sub>2</sub> .....1.5ml×1本

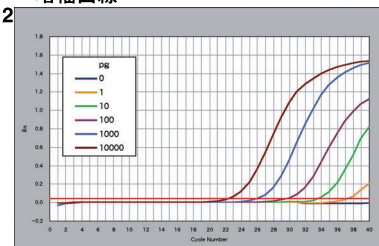
## 【実験例1】 <蛍光標識プローブを用いた実験> Mouse IGF-I mRNA の検出

ABI社 GeneAmp® 5700 Sequence Detection System で、ISOGENを用いて抽出したマウス (C57BL/6) 肝臓Total RNAから Oligo dTプライマーを用いて逆転写したcDNAを鋳型として、Insulin-like growth factor-I (IGF-I) 遺伝子を検出した。(PCRスケール: 50 μl)

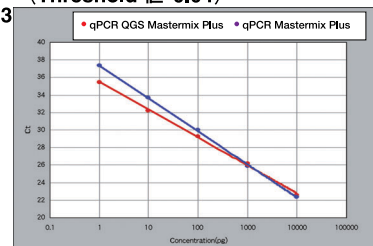
1: qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus による増幅曲線



2: qPCR™ Mastermix Plus による増幅曲線



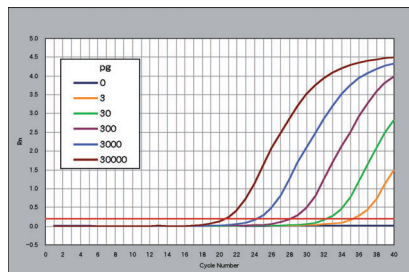
3: 1, 2 の結果から作成した検量線 (Threshold 値: 0.04)



## 【結果】

低鋳型領域において、より高い増幅効率が確認された。

## 【実験例2】 <SYBR® Green I を用いた実験> Human β-actin 遺伝子の検出



ABI社 GeneAmp® 5700 Sequence Detection System で、qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus for SYBR® Green I を用い、段階希釈したヒトゲノム DNA 中の β-actin 遺伝子を検出した。(PCRスケール: 50 μl)

## 【結果】

より低いプライマー濃度(終濃度 50nmol/l)でも、従来品でのプライマー濃度(終濃度 300nmol/l)で実験を行った場合と同等の増幅感度が得られた。

## 【効果】

使用するプライマー濃度を低く抑えることにより、SYBR® Green I を用いる実験系で問題となるプライマーダイマーが生じる可能性を下げることができ、より正確な実験系を確保することができます。

[PCR 反応液組成]

	容量	終濃度
2× Mastermix	25 μl	1×
500 nmol/l Primer Mixture	5 μl	50 nmol/l
human genomic DNA	5 μl	0~30,000pg
H <sub>2</sub> O	15 μl	

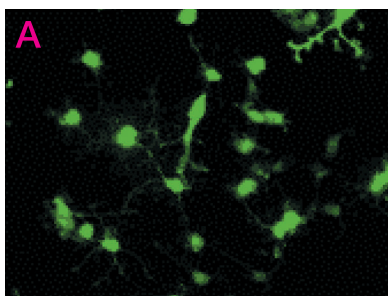
コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
319-80321	qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus	300 反応用	81,000
312-80311	qPCR™ QuickGoldStar Mastermix Plus for SYBR® Green I	300 反応用	73,500

# Rat Oligodendrocyte Nucleofector™ Kit

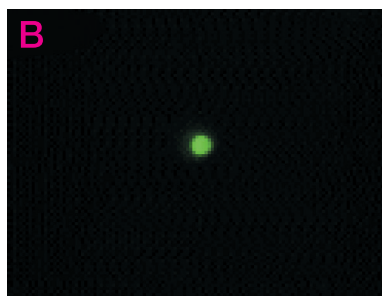
エレクトロポレーション法を応用した革新的遺伝子導入法として注目を浴びるNucleofector™キットシリーズにラットオリゴデンドロサイト用キットが新発売になりました。簡単な操作で効率良く導入する方法で44%という高い導入効率が可能です。

## 【キット内容】(25回用)

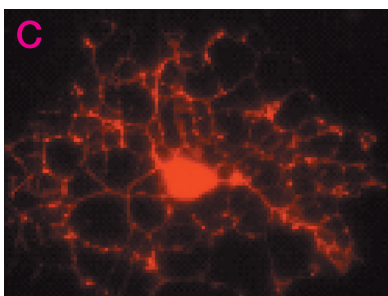
- ▶ Nucleofector™ Solution .....2.25ml
- ▶ Supplement .....0.5ml
- ▶ キュベット .....25個
- ▶ ピペット .....25本
- ▶ プロトコール .....1部



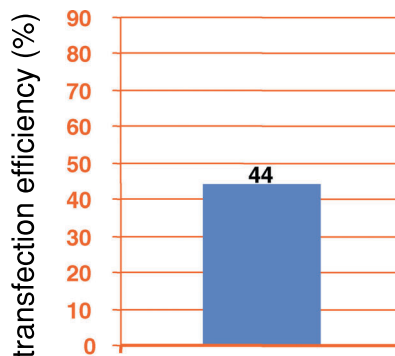
P0/1ラットオリゴデンドロサイト前駆細胞（前脳）へ1 μgのpEGFP導入後の蛍光顕微鏡像



0.25 μgのヒストン2B融合pEGFPを導入後、3時間経過時の蛍光顕微鏡像



データ(B)をオリゴデンドロサイト特異的マーカーMBPを染色



Rat Oligodendrocyte Precursor cell

1 μgのpEGFP導入後、24時間経過時の導入効率  
細胞生存率は約60%

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
575-77071	VPG-1009	Rat Oligodendrocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
577-35531	VPG-1002	Chicken Neuron Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
570-38681	VPG-1003	Rat Neuron Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
572-72341	VPG-1004	Mouse Neural Stem Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
579-72351	VPG-1005	Rat Neural Stem Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
570-77021	VPG-1006	Mouse Astrocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
577-77031	VPG-1007	Rat Astrocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
578-77061	VPG-1008	Mouse Oligodendrocyte Nucleofector™ Kit	25回用	近日発売予定

## 【株化細胞用キット】

500-99021	VCA-1001	Nucleofector™ Kit R for Cell Line (e.g. for HeLa, NIH 3T3, UT7/Epo)	25回用	60,000
507-99031	VCA-1002	Nucleofector™ Kit T for Cell Line (e.g. for CHO, RAW264. 7)	25回用	60,000
504-99041	VCA-1003	Nucleofector™ Kit V for Cell Line (e.g. for 293, COS-7, K562, PC12, Jurkat, HepG2, HL60, HaCaT, THP-1, SH-SY5Y)	25回用	60,000
573-26341	VCO-1001	Cell Line Optimization Nucleofector™ Kit	50回用	140,000

## 【導入装置】

\*その他プライマリーキットも販売しております。お問合せ下さい。

500-98921	AAD-1001	Nucleofector™ Device	1台	2,500,000
-----------	----------	----------------------	----	-----------

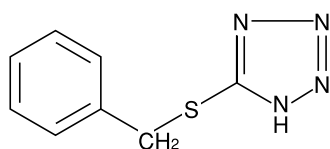
I.K.

高効率なRNA合成アクセリベーター



## 5-Benzylthio-1H-tetrazole

従来のRNA合成のアクセリベーターである1H-テトラゾールやDCI、ETTより、効率が良いアクセリベーターです。短い反応時間で高いカップリング効率が得られます。

 $C_8H_8N_4S=192.24$ 

### 【特長】

- 短い反応時間  
5-Benzylthio-1H-tetrazole : 3分  
1H-Tetrazole : 12~15分
- 高いカップリング効率  
5-Benzylthio-1H-tetrazole : 99%  
1H-Tetrazole : 97%
- 少ないモノマーで合成可能
- プロトコールを変えることなく使用可能
- DNA合成にも使用可能

### 【参考文献】

Welz, R. and Müller, S. : *Tetrahedron Lett.*, 43, 795(2002).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
024-15032	5-Benzylthio-1H-tetrazole 【5-BMT】	核酸合成用	25g	17,000
026-15031			100g	60,000

K.O.

## エンドトキシン試験法セミナー2004～エンドトキシン試験の動向と実際～

### 大阪会場(定員150名)

日時：2004年6月23日(水) 13:00~17:00  
場所：千里ライフサイエンスセンターホール

### 東京会場(定員200名)

日時：2004年6月25日(金) 13:00~17:00  
場所：全電通労働会館

※申し込み順に受付いたします。詳しくは、弊社もしくは弊社代理店までお問合せください。

- 本文に収載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「衣料品」、「食品」、「生活用品」などとして使用できません。
- 記載価格は本体価格のみで、消費税は含まれておりません。

## 和光純薬工業株式会社

本社 ☎540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 ☎(06)6203-1788(学術部)  
支店 ☎103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号 ☎(03)3270-8243(学術部)

- 九州営業所 ☎(092)622-1005(代)
- 横浜営業所 ☎(045)476-2061(代)
- 東海営業所 ☎(052)772-0788(代)
- 筑波営業所 ☎(029)858-2278(代)
- 東北営業所 ☎(022)222-3072(代)
- 北海道営業所 ☎(011)271-0285(代)
- 中国営業所 ☎(082)285-6381(代)

フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806

■ご意見・お問合せ、本誌のDM新規登録・変更等については、  
E-mail : [biowin@wako-chem.co.jp](mailto:biowin@wako-chem.co.jp) まで

URL : <http://www.wako-chem.co.jp>