

Product Information

CellLytic™ Express

製品番号 C1990

保存温度 -20 °C

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

CellLytic™ Express は培養液中のバクテリア細胞をそのまま溶解してタンパク質を抽出します。CellLytic Express は界面活性剤と酵素が調合された試薬(組成は非公開)で、培養液中でのバクテリア細胞溶解に最適化されています。超音波処理器やフレンチプレスといった細胞破碎器具を特別に用意する必要はありません。このワンステップ抽出法では精製前に集菌やライセートの清澄化を行う必要がないため、培養抽出液全体から標的タンパク質を直接アフィニティーレジンに吸着させることができます。培養液中でのバクテリア細胞溶解は常に従来の抽出法よりも高い収率でタンパク質が得られる上、集菌ステップの時間を節約できます。

HIS-Select™ および Anti-FLAG® M2 精製レジンを用いて、融合タンパク質を完全な状態で精製することができました。アフィニティーゲルや磁気ビーズと組み合わせれば、培養フラスコ・試験管の中で、培養・抽出・精製プロセス全てをそのまま行うことができます。従来法よりもサンプルの操作ステップが少なく、処理時間が短くて済むため、標的タンパク質をより完全な状態のまま回収できます。

CellLytic Express は Ready-to-use 試薬で、必要なすべての成分が 1 本の試薬に配合されているため、タンパク質抽出のために他の試薬を加える必要はありません。25 mL 培養液用・500 mL 培養液用の便利な計量済みパッケージをご用意しております。

CellLytic Express は *E. coli* BL21 株の溶解に最適化されています。その一方で、DH5α や JM109 といった一般的な菌株にも有効です。CellLytic Express は類似する他の菌体にも使用できます。CellLytic Express はヒスチジンタグおよび FLAG タグとの融合タンパク質を発現している *E. coli* BL21 株でテストされました。本試薬はその他の融合タンパク質のアフィニティー精製とも組み合わせ使用できます。

本製品以外にご用意いただく試薬および器具
(製品番号を適宜付記しております)

- HIS-Select コバルトアフィニティーゲル
(製品番号 H8162)
- HIS-Select ニッケルアフィニティーゲル
(製品番号 P6611)
- グルタチオンアガロース(製品番号 G4510)
- HIS-Select 磁気アガロースビーズ
(製品番号 H1786)(製造中止)
- グルタチオン磁気アガロースビーズ
(製品番号 G1919)(製造中止)
- プロテアーゼインヒビターカクテル
細菌用(製品番号 P8465)
ヒスチジンタグ融合タンパク質用(製品番号 P8849)
一般用(製品番号 P2714)

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

使用前に使用説明書の全体(特に試薬適合性チャート)をお読みになることをお勧めします。

調製について

CellLytic Express は Ready-to-Use 試薬です。精製するタンパク質の性質に応じて他の試薬を加えることもできます。例えば塩類、プロテアーゼインヒビター、還元剤(ジチオトレイトール、2-メルカプトエタノールなど)を添加できます。これらの試薬は CellLytic Express の粉末には添加せず、CellLytic Express を培養液に溶解してから添加してください。

保存安定性

本製品は保冷剤と共に配送します。保存温度は -20°C を推奨します。適切に保存した場合、開封前の CellLytic Express は 2 年間は安定です。

手順

細菌の培養

目的の組換えタンパク質を含む菌株を、発現に必要な条件の下で培養します。CellLytic Express はさまざまな培地中での溶解に適しています。本製品は Terrific Broth (製品番号 T9179、T5574) で培養した菌体の溶解に最適化されていますが、Luria Broth (製品番号 L3522、L2542) での直接溶解にもご利用いただけます。

Terrific Broth と Luria Broth はどちらも、ヒスチジンタグ融合タンパク質の培養液中精製に使用されてきました。

本製品は OD_{600} が 0.5~6.0 の培養液を対象としていますが、 OD_{600} が 11.0 という高密度培養液でも溶解および精製に成功しています。細胞密度が非常に高い場合は最終的な溶解液が濁っていることがあります。そうした場合も溶解液を清澄化せずにそのままアフィニティーレジンにロードすることができます。高密度培養液の場合は CellLytic Express の使用量を増やすことで溶解および可溶化を確実にすることができます。

試験的スケール(培養液 25 mL)の精製

小スケールの試験的抽出を行い、抽出後に行う精製手順のパラメーターを最適化してください。パラメーターの例としては、アフィニティーレジンへのタンパク質結合に最適な pH の値などがあります。

また、目的のタンパク質が封入体を形成しないことを確認しておくことも効果的です。封入体の精製手順は CellLytic B (製品番号 B7435) の Technical Bulletin に記載されています。

また、封入体可溶化試薬である CellLytic IB (製品番号 C5236) もご用意しております。CellLytic Express の強力な可溶化作用および独自配合された酵素により、CellLytic Express ライセートからは短時間の洗浄とペレット回収ステップだけで封入体を精製できます。しかし、実際の手順は、精製対象の封入体ごとに経験的に決定する必要があります。

至適パラメーターが決定済みであり、封入体が問題とならない場合は「大スケールの精製」の項に進むことができます。

1. CellLytic Express 溶解パウダーの 1 ボトル全量 (1.26 g) を 25 mL の培養液に加えます。培養液が 25 mL より少ない場合は、培養液 1 mL あたり 0.05 g の CellLytic Express 溶解パウダーを加えます。転倒混和して溶解パウダーを完全に懸濁します。
2. この溶解混合液を、ときどき混和しながら室温で 15~20 分間おきます。
注: 溶解ステップは 37°C で実施することもできます (通常はその方が速く溶解が進みます)。
3. 溶解後の混合液はほぼ完全に透明となっているはずです。

CellLytic Express は溶解後すぐに精製に進むことを念頭に置いた製品ですが、ライセートは通常、最大で 6 時間はタンパク質や細胞破片が沈殿することなく完全な可溶化状態を保っています。CellLytic Express による処理は迅速で高効率であるため、普通はプロテアーゼインヒビターを添加する必要はありません。標的タンパク質が分解されているようであれば、溶解後の最終ライセートにプロテアーゼインヒビターを添加することができます。

大スケール(培養液 500 mL)の精製

以下の手順は OD_{600} が約 2.0 の培養液 500 mL の溶解手順として書かれています。これは菌体湿重量でおよそ 2 g 分です。

細胞タンパク質の抽出量を最大とするには、溶解する培養液の最終的な OD_{600} の値が 0.5~6.0 の範囲内にあるようにしてください。

1. CellLytic Express 溶解パウダーの 1 パック全量 (25.2 g) を 500 mL の培養液に加えます。転倒混和して溶解パウダーを完全に懸濁します。
2. この溶解混合液を、ときどき混和しながら 15~20 分間おきます。
注: 溶解ステップは 37°C で実施することもできます (通常はその方が速く溶解が進みます)。
3. 溶解後の混合液はほぼ完全に透明となっているはずです。

CellLytic Express は溶解後すぐに精製に進むことを念頭に置いた製品ですが、ライセートは通常、最大で 6 時間はタンパク質や細胞破片が沈殿することなく完全な可溶化状態を保っています。CellLytic Express による処理は迅速で高効率であるため、普通はプロテアーゼインヒビターを添加する必要はありません。標的タンパク質が分解されているよう

であれば、溶解後の最終ライセートにプロテアーゼインヒビターを添加することができます。

溶解後のタンパク質の精製

細菌用培地の組成はさまざまであるため、標的タンパク質とアフィニティーレジンとの結合条件を最適化するにはライセートの pH を調整する必要があるかもしれません。この至適 pH は使用するアフィニティー精製の種類に応じて経験的に決定してください。

CellLytic Express は HIS-Select シリーズのアフィニティーゲルまたは磁気ビーズを用いたヒスチジンタグ融合タンパク質の精製に最適化されています。CellLytic Express ライセートからのヒスチジンタグ融合タンパク質と HIS-Select アフィニティーゲルの結合に最適な pH の範囲は 6.7~7.0 です。通常、HIS-Select アフィニティーゲルで組換えタンパク質を精製する場合は pH の調整は必要ありません。CellLytic Express はヒスチジンタグおよび FLAG タグとの融合タンパク質を発現している *E. coli* BL21 株でテストされています。

ほとんどの培地は金属イオンを含むため、培養液中溶解法でヒスチジンタグ融合タンパク質を精製する際にレジンの結合能の低下がみられることがあります。この結合能のわずかな低下は培地とレジンの間で起こった金属イオン交換によるものですから、新しい金属イオンでレジンを再生して結合能を回復させることができます。この再生手順については、HIS-Select ニッケルアフィニティーゲル(製品番号 P6611)または HIS-Select コバルトアフィニティーゲル(製品番号 H8162)の Technical Bulletin をご覧ください。

CellLytic Express はライセートを清澄化せずに精製用アフィニティーレジンにロードできるよう設計されています。オプションとしての清澄化ステップを実施して不溶性物質を沈殿させるには、ライセートを 16,000 x *g* で 15 分間遠心分離します。遠心前に小スケールの精製試験を実施して、標的タンパク質が封入体(不溶性ペレット中に検出される)を形成しないことを確認してください。

Bradford 試薬(製品番号 B6916)、ビシンコニン酸キット(製品番号 BCA-1)、Lowry 試薬(製品番号 690-A)、Biuret 試薬(製品番号 690-1)はいずれも CellLytic Express に適合していますが、正確にタンパク質を定量するには適切なブランクを使用する必要があります。

試薬適合性チャート

試薬	作用	コメント
キレート剤(EDTA、EGTA)	IMAC レジンから金属イオンを除去する、必須 Mg ²⁺ イオンをキレート化する	EDTA は HIS-Select シリーズ製品には適合しません。この種の試薬はアフィニティーゲルから金属イオンを奪ってキレート化します。また、元の細胞溶解混合液に EDTA を加えると、エンドヌクレアーゼ活性に必要な金属イオンがキレート化されるため溶液が粘稠化します。
プロテアーゼインヒビター	タンパク質の分解を防ぐ	望ましい場合は、細菌細胞抽出液にプロテアーゼインヒビターを加えることができます。ヒスチジンタグ融合タンパク質用には製品番号 P8849 を、細菌用には製品番号 P8465 をお勧めします。
還元剤 (2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール)	化学的に還元する	処理後に HIS-Select シリーズ製品を使用する場合は低濃度で添加することができます。FLAG タグ用レジンやグルタチオンレジンを使用する場合は添加しないでください。

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
ライセートが濁っている	細胞密度が高すぎる	OD ₆₀₀ が 0.5~6.0 である培養液は濁ったライセートとはなりません。ライセートは 16,000 x g で 15 分間遠心分離することで清澄化できます。ペレットを分析して標的タンパク質が沈殿していないことを確認してください。高密度培養液の場合は CellLytic Express の使用量を増やして残存する粒子を可溶化できます。
	インキュベーション時間が短すぎる	すべての細胞成分を完全に可溶化するため、溶解混合物は 15 分以上インキュベート(室温放置)してください。
タンパク質濃度が予想より低い	細胞の溶解が不完全である	溶解プロセスは 15 分以上行い、細胞を完全に溶解させてください。
	発現レベルが低すぎる	誘導物質の添加量を増やしてください。誘導時間を長くしてください。組換え遺伝子の構造を確認してください。別の菌株を使用してください。
	タンパク質サンプルの pH が結合に適していない	培地組成のため、アフィニティーレジンとの結合は多くの場合 pH の影響を受けます。CellLytic Express は Terrific Broth 培地(製品番号 T9179)を用いた溶解に最適化されているため、この培地を用いる場合は通常 pH 調整は必要ありません。しかし、Terrific Broth 以外の培地で溶解・精製を行う場合は pH 調整が必要な場合があります。CellLytic Express ライセートを HIS-Select シリーズで精製する場合、至適 pH の範囲は 6.7~7.0 です。

JP/MAM 2/04

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。