

● 新規ポリペプチドタグ (Cry-tag) を用いたタンパク質産生受託サービス

目的遺伝子を新規ポリペプチドタグとの融合タンパク質として *E.coli* で発現させる受託サービスです。本発現法を用いると、大腸菌では生産が困難であったタンパク質でも大量に発現、回収することが可能です。

* 本技術は岡山大学工学部遺伝子機能設計学研究室との共同研究によるものです。

Cry-tag について

- グラム陽性土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* は、孢子形成期に殺虫タンパク質 (Cry タンパク質) を体内に巨大なタンパク質結晶封入体として形成、蓄積します (図1参照)。Cry-tag は Cry タンパク質の結晶封入体に関する領域を tag として用いています (特許 第 460-4231 号)
- 目的タンパク質を Cry-tag との融合タンパク質として *E.coli* の菌体内で発現させることにより、結晶封入体として大量に発現、蓄積することが可能です (図2参照)。

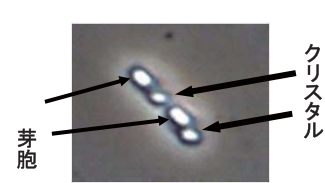


図1 *B. thuringiensis* subsp. *Sotto* T84AIが産生する芽胞とクリスタル

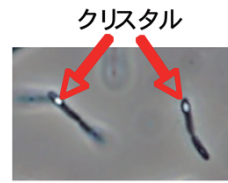


図2 Cry-tagを付加した融合タンパク質は、大腸菌内でも大量に結晶封入体を発現/蓄積する

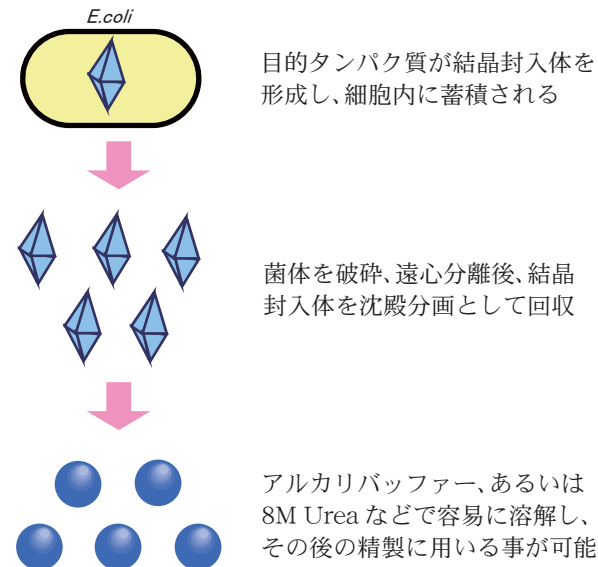
特 徴

- ◆ 宿主に対する細胞毒性を無毒化して発現、蓄積するため、大腸菌での発現が困難であったタンパク質の産生に特に有用です。
- ◆ プロテアーゼによる分解や、不可逆的な凝集からタンパク質を保護するため、タンパク質の発現量が向上します。
- ◆ 当技術で産生する結晶封入体は、一般的な封入体とは異なり、アルカリ溶液あるいは変性剤 (8M Urea 等) にて簡単に溶解し、再び結晶封入体を形成することは無いため、扱いが非常に容易です。
- ◆ Cry-tag にはプロテアーゼ認識配列が組み込まれているため、Cry-tag と目的タンパク質とをプロテアーゼによって容易に分離、除去することが可能です。

ご注文方法

詳細についてはお問い合わせ下さい

本発現系の流れ

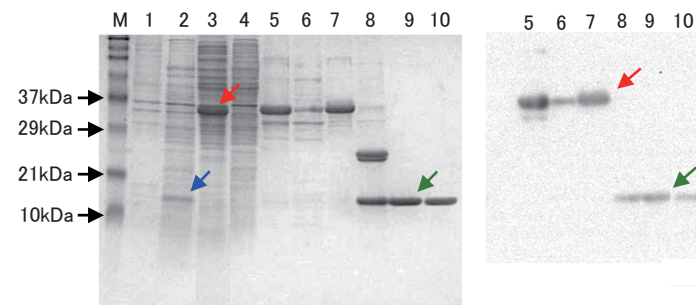


目的タンパク質が結晶封入体を形成し、細胞内に蓄積される

菌体を破碎、遠心分離後、結晶封入体を沈殿分画として回収

アルカリバッファー、あるいは8M Ureaなどで容易に溶解し、その後の精製に用いる事が可能

本発現系の実施例



M: 分子量マーカー、1: IPTG 誘導前、2: IPTG 誘導後 (Cry-tag 無し)、3: IPTG 誘導後 (Cry-tag 有り)、4: 可溶性分画、5: 不溶性分画、6: His カラム洗浄分画、7: His カラム溶出分画、8: Cry-tag 切断後、9: 単離シスタチン C、10: ヒト生体由来シスタチン C

腎機能マーカーとして需要の高いシスタチン C (Cys-C) を本発現系によって産生した。His-tag のみを結合して発現させたもの (青矢印) と Cry-tag を結合して発現させたもの (赤矢印) の発現量を比較したところ、5 倍量の差が認められた。次いで、不溶性分画に回収した結晶封入体を可溶化した後に His-tag 精製し、80% 以上の純度の融合タンパク質を回収した (lane7)。さらに、プロテアーゼによって Cry-tag と Cys-C を分離した後、Cry-tag を抗体カラムによって除去した結果、90% 以上の純度の Cys-C が回収された (lane9)。また、その抗原性を抗 Cys-C のモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットング解析した結果、ヒト生体由来の Cys-C と同様の抗原性を示すことが確認された (緑矢印)。

抗体作製受託サービス

ポリクローナル抗体受託作製
モノクローナル抗体受託作製
組換えタンパク質発現受託



JAPAN LAMB 株式会社 ジャパン・ラム
<http://www.japan-lamb.jp>
 本 社 〒720-2111 広島県福山市神辺町上御領 1711-6
 TEL 084-965-0574 (代) FAX 084-965-0450
 E-mail : info@japan-lamb.jp

お問い合わせ先

抗体作製: 担当 須藤
toshita@japan-lamb.jp
タンパク質発現: 担当 岩本
okadai@japan-lamb.jp

JAPAN LAMB CO., LTD.
 有限会社 ジャパン・ラム

Monoclonal antibody

●モノクローナル抗体受託作製

ハイブリドーマ(2株)作製
(3step 式例) 納期: 約6ヶ月

定価 ¥ 900,000~

step 01

マウス免疫～抗体価測定

- ・抗原1種につき、BALB/c マウス3匹に免疫。4回の免疫後ELISAにて力価測定を行う。
- ・細胞融合に十分な力価であるか相談。
- ・力価が低い場合、2回追加免疫を継続。
- ・ELISA法で力価測定が不可能な場合は、あらかじめご相談ください。

納期: 2~3ヶ月
¥ 120,000

納期: 約2ヶ月
¥ 480,000

細胞融合～陽性クローン確認

- ・最終免疫後、細胞融合を行う。目的ハイブリドーマ確認の為、ELISAにてスクリーニング。
- ・陽性クローンを確定。
- ・培養上清を送付します。(要相談)
- ・追加抗原によるELISA測定対応可

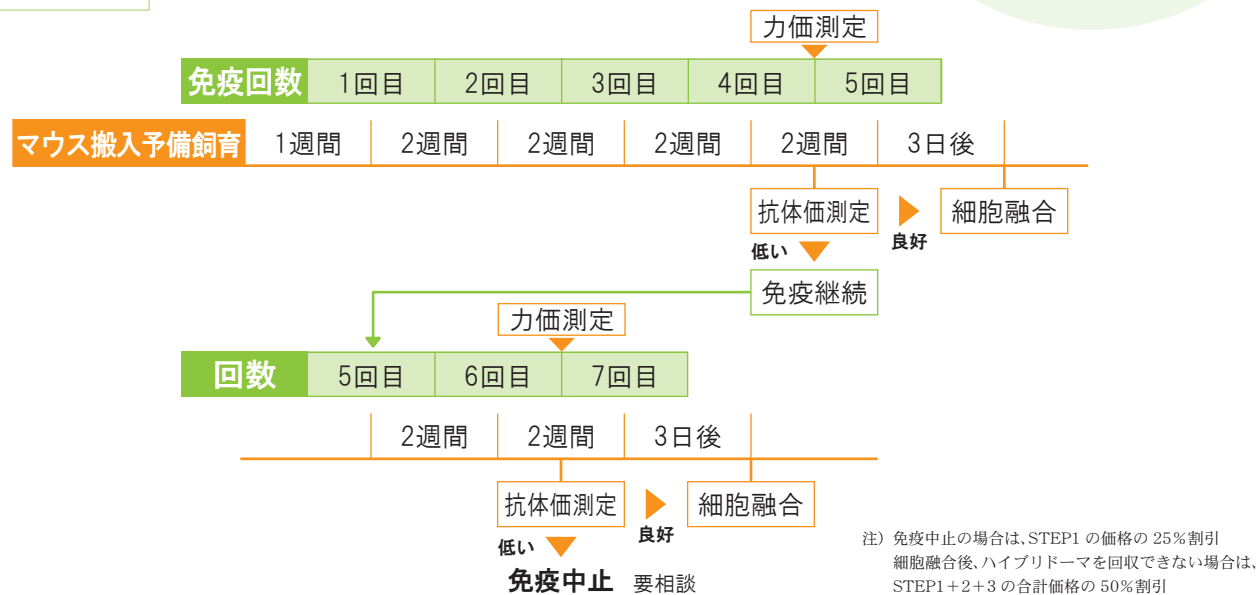
step 02

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

- ・STEP2で得た陽性ハイブリドーマを、2度クローニング。
- ・単一のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(2株)を樹立。
- ・樹立ハイブリドーマ(2株)及び培養上清(2株分)を送付。(ハイブリドーマの樹立数は相談に応じます。)

納期: 約2ヶ月
¥ 300,000

基本スケジュール



●モノクローナル抗体腹水化の受託

9,000円/匹~

腹水化のプロトコール



基本的には、腹水は1回収のみ。多数回の回収は、要相談。

polyclonal antibody

●ポリクローナル抗体作製サービス

受託名	サービス内容	納期(目安)	対応動物(系統相談)	対応抗原種類と量(目安)	価格(目安)
カスタム抗体作製サービス	<ul style="list-style-type: none"> ☆お客様の要望に応じた免疫プランをカスタマイズ ☆動物種、免疫部位、免疫方法すべての指示に対応 ☆免疫中にスケジュールの変更可能 ☆免疫プランごとにお見積りは個別対応 ☆力価測定もご要望に応じて測定可能 	ご要望通り	マウス・ラット モルモット ニワトリ ウサギ・ヤギ ヒツジ その他(要相談)	単純タンパク 糖タンパク 不活化ウイルス ペプチド その他(相談) 必要量(相談)	免疫スケジュールに依存します
おまかせ抗体作製サービス	<ul style="list-style-type: none"> ☆抗原情報と抗原送付で自動的に抗血清が到着 ☆免疫開始、抗血清発送予定日を事前に連絡 ☆スケジュールを考える必要が無く手間要らず ☆力価測定付(その後追加免疫の指定も可能) 	抗原着後約3ヵ月	マウス・ラット モルモット ニワトリ ウサギ・ヤギ ヒツジ その他(要相談)	単純タンパク 糖タンパク 不活化ウイルス ペプチド その他(相談) 必要量 約3mg (ウサギの場合)	マウス 約10万円(2匹) ウサギ 約12万円(2匹)
カスタムペプチド合成抗体作製サービス	<ul style="list-style-type: none"> ☆合成、精製が安易で安価 ☆無償抗原検索(注文する場合に限る) ☆毒性がなく免疫動物に負荷が少ない ☆合成量を増やせばアフィニティ精製が安易に可能(別途お見積り対応) 	約3ヵ月(ウサギ) 約5ヵ月(他動物)	マウス・ラット モルモット ニワトリ ウサギ・ヤギ ヒツジ その他(要相談)	ペプチド注文 最低5mg 必要量(相談)	ウサギペプチド合成代込 約25万円(2匹)
特急ペプチド合成抗体作製サービス	<ul style="list-style-type: none"> ☆上記のサービスに加え、納期を急ぐ方におススメ ☆2週間以内にペプチド合成の可否を報告 	約2ヶ月(ウサギ)	ウサギ その他(要相談)	ペプチド注文 最低5mg 必要量1mg/匹(ウサギの場合)	ウサギペプチド合成代込 約25万円(2匹)
新規技術を用いた大腸菌系による抗原作製～抗体作製	<ul style="list-style-type: none"> ☆弊社独自に開発した新規技術を用い、タンパク質を効率的に産生(特許取得済み) ☆希少なタンパク質や発現困難なタンパク質の抗体をお求めの方にオススメ ☆独自のアフィニティ精製により、タンパク質に対する特異的が高い抗体を回収可能 	約6ヶ月(ウサギ)	ウサギ その他(相談)	リコンビナント合成量(相談) 必要量(相談)	リコンビナント合成(1L培養価格) 約70万円 ウサギ免疫代 12万円
一般的な技術を用いた大腸菌による抗原作製～抗体作製	<ul style="list-style-type: none"> ☆一般的に市販されている発現ベクターを用い、大腸菌系による抗原～抗体作製まで、一括作業 ☆遺伝子配列が公知のものであれば、人工遺伝子の合成から対応可能(人工遺伝子合成料は別途) ☆抗体の納品後、抗原作製の過程で構築した発現ベクター等を提供可能 	約6ヶ月(ウサギ)	ウサギ その他(相談)	リコンビナント合成量(相談) 必要量(相談)	リコンビナント合成(1L培養価格) 約50万円 ウサギ免疫代 12万円

参考例

おまかせ抗体作製基本免疫スケジュール

