

Code No. 3360/3361/3362/3363/3364

研究用

TAKARA

Cold Shock Expression System
pCold™ DNA

说明书

目 录

内 容	Page
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 载体图谱	1
● 保 存	2
● 使用方法	2
● 多克隆位点	3
● 实验例	4
● Q&A	5
● 附 录	7
● 关联产品	10
● 参考文献	10

Purchaser's Agreement

Customer's order of pCold DNAs will be accepted only when the Purchaser's Agreement is signed by a customer and is attached with an order.

- PRODUCTS are for research or laboratory use only. PURCHASER understands and agrees that PRODUCTS shall not be administered to humans or animals, and shall not be used for pharmaceutical, in vitro diagnostic, or any commercial purposes other than internal research.
- PURCHASER shall not modify pCold Vector DNA sequences located between and including the CspA 3'UTR and CspA Promoter. The adjacent multicloning site (MCS) is exempt from this restriction.
- PURCHASER shall not utilize any partial sequences from PRODUCTS for the purpose of new plasmid construction using the Cold Shock Expression System.
- PURCHASER shall not transfer or sell copies of PRODUCTS, components of PRODUCTS, derivatives of PRODUCTS, and/or products obtained through the use of PRODUCTS (collectively " DERIVATIVES") to any third parties.

Notwithstanding foregoing, PURCHASER may transfer DERIVATIVES solely to a third party which has already been granted a license to use PRODUCTS for research purpose through purchase of PRODUCTS from TAKARA BIO, its subsidiaries or its local distributors, provided that PURCHASER shall enter into a prior separate agreement with TAKARA BIO for the transfer of DERIVATIVES to said third party.

For this Agreement, please contact to TAKARA BIO's subsidiaries or local distributors.

● 制品说明

在后基因组研究中，蛋白质结构与功能的解析是一个重要的课题，有效的蛋白质表达系统是一项必不可少的基础性技术。以大肠杆菌为宿主的表达系统广泛应用于重组蛋白质的生产中。大肠杆菌表达系统具有使用方便和成本低的优点，但是，有一些基因会出现表达困难或者表达的蛋白质不可溶等问题。为了解决这些问题，Takara 公司与 Professor Masayori Inouye (University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA)联合研发了冷休克表达载体 pCold DNA 系列，它利用了大肠杆菌的低温表达基因（冷休克基因），并具备上述优点。随着蛋白质的功能解析、结构解析工作的开展，这个系列制品成为蛋白质研究的重要工具。

[产品概述及特点]

当培养温度切换到低温时，大肠杆菌暂时停止生长，大部分的大肠杆菌蛋白质表达减少，但一类称为冷休克蛋白的蛋白质被特异性诱导表达。pCold DNA I~IV 是应用冷休克基因之一的 *cspA* 基因启动子而设计并可以有效表达蛋白质的冷休克表达载体。在 *cspA* 启动子下游插入了 *lac* operator，可以严密调控蛋白质表达。另外，在 *cspA* 启动子下游还有 5' 非编码区（5' UTR）、TEE 序列、His tag 序列、Factor Xa 切断序列和多克隆位点。因为本制品应用了大肠杆菌来源的启动子，所以大部分的大肠杆菌菌株都可以作为表达宿主使用。pCold 系列载体根据 TEE 序列、His tag 序列和 Factor Xa 切断序列的有无，分成四种 pCold 载体，可根据使用目的选择最适的载体。

● 制品内容

产品名称	Code	包装量
pCold Vector Set	3360	1 Set
1) pCold I DNA		5 µg
2) pCold II DNA		5 µg
3) pCold III DNA		5 µg
4) pCold IV DNA		5 µg
pCold I DNA	3361	25 µg
pCold II DNA	3362	25 µg
pCold III DNA	3363	25 µg
pCold IV DNA	3364	25 µg

< 大肠杆菌宿主 >

pCold DNA 应用了大肠杆菌来源的冷休克基因 *cspA* 启动子，所以大部分大肠杆菌都可以作为宿主使用。

● 载体图谱

载体	TEE序列	His tag序列	Factor Xa 切断序列	GenBank登录号
pCold I DNA	+	+	+	AB186388
pCold II DNA	+	+	-	AB186389
pCold III DNA	+	-	-	AB186390
pCold IV DNA	-	-	-	AB186391

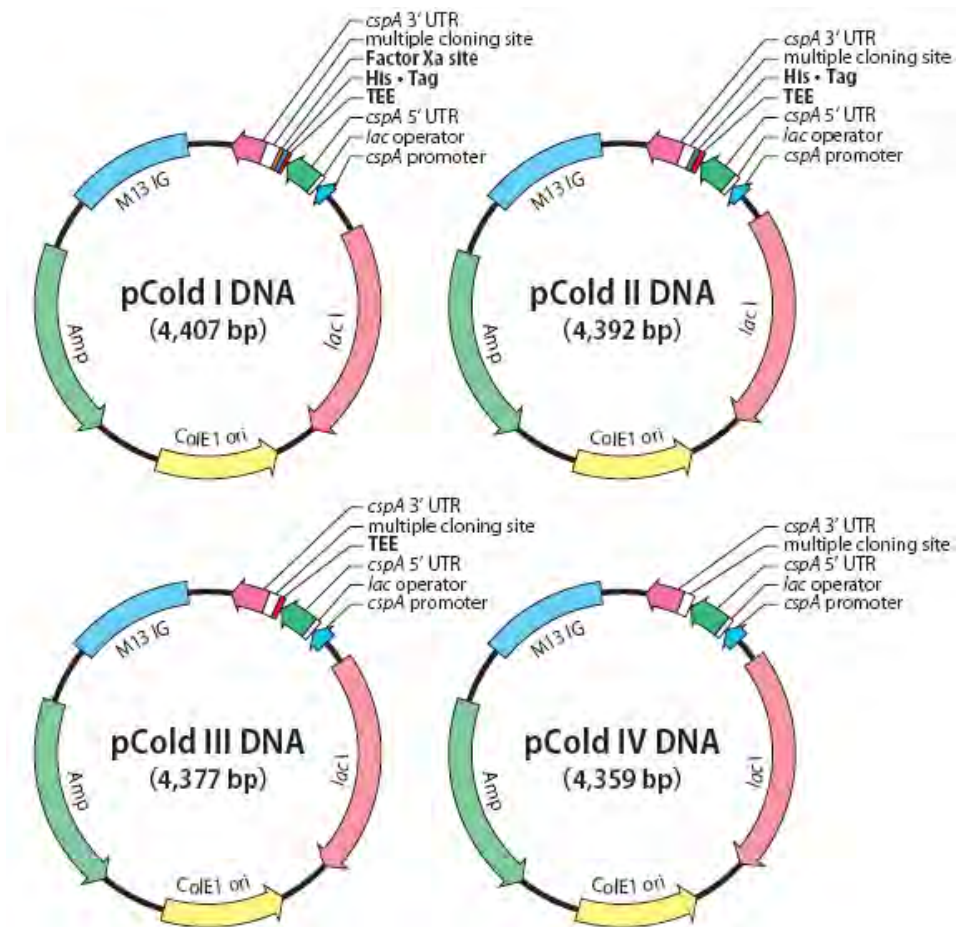


图 1. pCold DNA 冷休克表达载体图谱

- **保 存：** -20°C (运输及保存温度)

● 使用方法

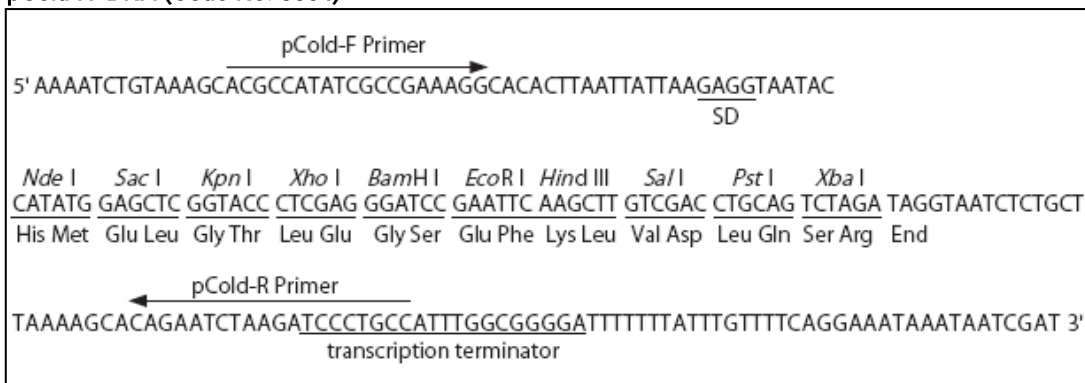
目的基因的表达方法

目的蛋白质不同，其培养、诱导条件（培养基、培养温度、通气搅拌条件、诱导时间、诱导物浓度、诱导后的培养时间等）会有所不同，所以必须对目的蛋白质的培养条件进行研讨。一般实验方法如下所述。

- (1) 在冷休克表达载体 pCold DNA 多克隆位点处插入目的基因，制备表达载体。
- (2) 用构建的表达载体转化大肠杆菌（如 BL21 ）宿主，在含有 Amp 的 LB 培养基平板上筛选转化子。
- (3) 接种转化子到含有 50~100 μg/ml Amp 的 LB 培养液中，37°C 振荡培养。
- (4) 当培养液的 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.5 时，冷却培养液到 15°C，放置 30 分钟。
- (5) 添加 IPTG 到终浓度 0.1~1.0 mM，15°C 振荡培养 24 小时。
- (6) 培养完成后，利用 SDS-PAGE 和活性测定确认目的产物的有无、表达量和可溶性。

通过筛选大肠杆菌宿主和优化培养、诱导条件（培养基、培养温度、通气搅拌条件、诱导时间、诱导物浓度、诱导后的培养时间等），蛋白质的表达量和可溶性程度都会有所改善。如果表达的蛋白质是不可溶的，可以和本公司的 Chaperone Plasmid Set (Code No. 3340) 结合使用，会有一些的效果改善。

pCold IV DNA (Code No. 3364)



● 实验例

当使用 T7 启动子表达系统表达蛋白质，出现表达量低或不可溶性表达时，我们可以尝试使用冷休克表达系统进行蛋白质表达。利用 pCold I DNA 作为冷休克表达载体和 *E. coli* BL21 作为表达宿主。利用 T7 启动子表达蛋白质时，通常先添加 IPTG，再 37°C 培养。

(1) 表达可能性的实验例

人源基因 A (推测分子量 31 kDa) 在 T7 表达系统中不能表达，但可以在冷休克表达系统中表达 (图 2)。

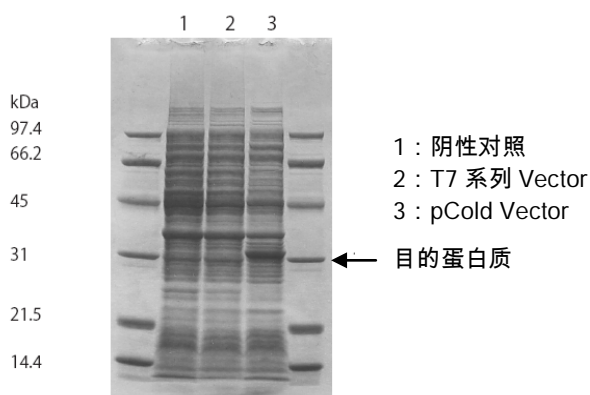


图 2：人源基因 A 的表达情况比较 (CBB 染色)

(2) 基因表达量增大的实验例

与 T7 表达系统相比，使用冷休克表达系统，提高了嗜热菌基因 B (推测分子量 30 kDa) 表达蛋白质的可溶性，同时表达量增大 (图 3)。

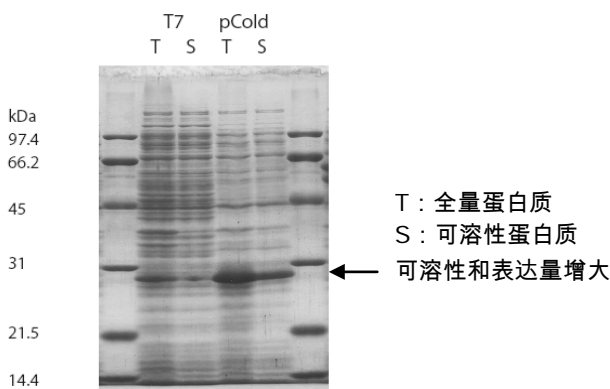


图 3：嗜热菌基因 B 的表达情况比较 (CBB 染色)

(3) 基因可溶性表达量增大的实验例

人源基因 C (推测分子量 80 kDa) 在 T7 表达系统中大部分为不可溶性表达, 而使用冷休克表达系统可溶性表达量显著增加 (图 4)。冷休克表达系统和 T7 表达系统相比, 目的产物的表达量和可溶性都有所提高。

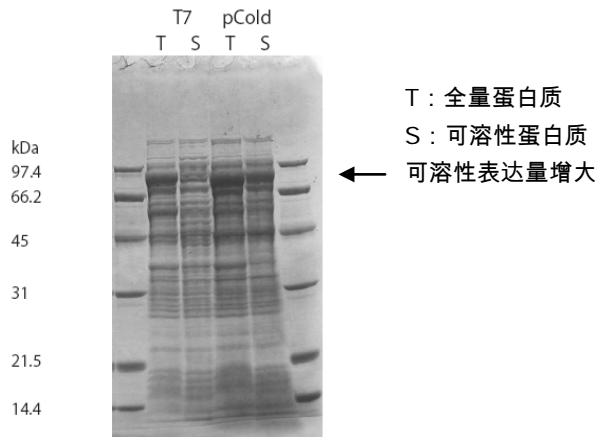


图 4.人源基因 C 的表达情况比较 (CBB 染色)

(4) 脉冲标记实验的比较

利用脉冲标记法标记人源基因 D (推测分子量 12 kDa), 比较 T7 和冷休克两种表达系统。在 T7 表达系统中, 目的蛋白质以外的大肠杆菌蛋白质也被标记, 但是在冷休克表达系统中标记的蛋白质主要是目的基因的表达产物, 目的基因可以特异性地被诱导表达 (图 5)。

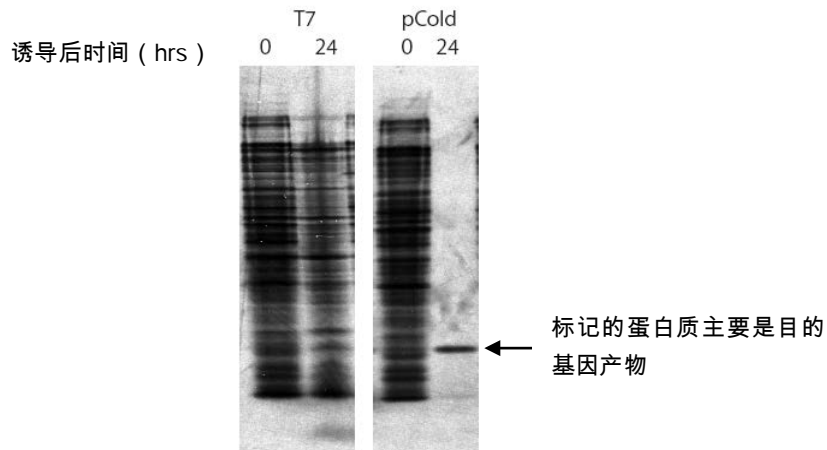


图 5.人源基因 D 的脉冲标记

• Q&A

Q1. 使用 pCold DNA 进行蛋白质表达时, 为什么在低温条件下表达效率高?

A1. pCold DNA 是以编码冷休克蛋白质的 *cspA* 基因为基础构建的, 包含 *cspA* 启动子、5' UTR 和编码 *CspA* 蛋白质 N 端的一部分碱基。

cspA 启动子在 37°C 也能进行转录, 但其下游的 5' UTR 非常不稳定, 所以不能高效地翻译。可是当温度从 37°C 下降到 15°C 后, 5' UTR 的结构变得非常稳定, 翻译效率提高, 在低温 (15°C) 下蛋白质

的合成效率非常高¹⁾。

并且，转录编码 *CspA* 蛋白质 N 端的一部分 mRNA，可以优先与核糖体结合进行翻译，而其他 mRNA 则基本不被翻译（核糖体捕获现象，Ribosome trapping）²⁾

如上所述，pCold DNA 具备以下特性：*cspA* 启动子在低温下转录活性不下降，5' UTR 在低温下结构稳定，核糖体具有捕获现象，低温下蛋白质仍然可以进行有效地表达。尽管在低温下表达蛋白质以前也实现过，但是，到目前为止，具备改进特性的 pCold DNA 是非常适合在低温条件下进行蛋白质表达的独特载体。

1) Mitta, M., et al. (1997) *Mol. Microbiol.*, **26**, 321-335.

2) Xia, B., et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35581-35588.

Q2. 蛋白质没有表达时，如何进行研讨？

A2. 需要研讨使用的载体种类、宿主和培养、诱导条件等。

- 载体种类变更（pCold I~IV DNA）。N 末端带有 TEE 序列和 His 标签，蛋白质可能会被表达。
- 检查密码子的使用频率。根据基因不同，有可能会受到密码子使用频率的影响。有时候使用含有稀有密码子的商品化大肠杆菌（如 Rosetta™2）有利于改善表达状况。
- 预培养的有无、待表达克隆子的保存方法也会对表达有影响。（参考 Q8）
- 冷休克基因诱导时机的影响。某些情况下，诱导过迟会将低表达水平，因此，早期诱导可能提高表达水平。
- IPTG 添加前，培养液需要充分冷却（标准是 15°C，30 分钟以上），IPTG 添加后也是 15°C 培养。

Q3. 表达蛋白质不可溶时，如何研讨？

A3. 不同目的蛋白质的最适培养、诱导条件各不相同。培养、诱导条件和使用的的大肠杆菌宿主、提取方法等参考以下事项进行研讨。

- 变更诱导时间（从对数期初期到末期之间）
- 变更诱导剂 IPTG 的浓度（0.1 ~ 1.0 mM）
- 研讨诱导后的培养温度和时间（通常是 15°C、24 小时最合适）
- 研讨宿主大肠杆菌的种类和使用伴侣蛋白。可以利用 Chaperone Plasmid Set 进行伴侣蛋白共表达，也可以尝试利用能促进蛋白质可溶性表达的宿主大肠杆菌（Origami™ 等）
- 变更提取方法。使用商品化的大肠杆菌裂解用试剂，不能充分使其细胞裂解并释放蛋白质。超声波处理时加入 0.1~1% 的表面活性剂（Octyl Glucoside、NP-40、Triton X-100 等）会比较有效。

Q4. 可以表达的蛋白质分子量是多少？

A4. 从数 kDa 到 100 kDa 的蛋白质都可以获得表达。

Q5. 迄今为止，表达过哪些物种的基因？

A5. 有大肠杆菌、嗜热菌、超嗜热菌、人、小鼠和植物等。

Q6. pCold DNA 选择的标准是什么？

A6. pCold I、II、III DNA 有 TEE 序列，可以促进蛋白翻译。同时，如果使用含有 His 标签的载体（pCold I、II DNA），就能够使用镍柱纯化表达的蛋白质。如果不希望目的蛋白质 N 末端有附加的氨基酸序列，可以利用 Factor Xa 切断标签序列，此时可以选择用 pCold I DNA，或者推荐使用没有 TEE 序列和 His 标签的质粒 pCold IV DNA。

使用 pCold I-IV DNA 表达目的蛋白，出现目的蛋白不表达或者是不可溶性表达时，推荐使用可以表达可溶性标签的融合载体，pCold TF DNA 或 pCold ProS2 DNA。

Q7. 1 L 培养基的蛋白质表达量有多少？

A7. 根据目的基因的不同，通常能有几 mg ~ 几十 mg/L 的表达量。进行小规模表达实验时，利用粗提液进行 SDS 电泳，然后通过 CBB 染色确认蛋白质的表达水平，3 L 培养液可以精制回收 mg 级的蛋白质。

- Q8. 插入目的基因的pCold DNA转化到大肠杆菌后，其平板可以保存在4°C吗？
- A8. 不推荐4°C保存平板。插入目的基因的pCold DNA转化到大肠杆菌后，如果平板4°C保存，有可能导致细胞中目的蛋白质的背景表达。应当尽早制备成甘油保存样，然后-80°C保存。
- Q9. 使用Chaperone Plasmid Set共表达时，5种伴侣蛋白质粒如何选择？
- A9. 使用pCold DNA表达系统与含tig序列的伴侣蛋白进行共表达，可获得好的表达结果。首先，推荐与pG-Tf2或者pTf16共表达进行研讨。
- Q10. 诱导后，15°C 24小时培养时，OD₆₀₀大约有多少？
- A10. OD₆₀₀的值根据大肠杆菌菌株和插入目的基因的种类不同有所差异。使用BL21作为宿主时，OD₆₀₀大约在1.2左右。
- Q11. 迄今为止，使用过的大肠杆菌宿主有哪些？
- A11. 使用过的宿主是大肠杆菌BL21。Merck公司的Origami™、Rosetta™等都可以使用。pCold DNA使用大肠杆菌由来的*cspA*启动子，大部分的大肠杆菌宿主都可以使用，不过，首先推荐使用BL21。
- Q12. pCold DNA表达系统在降低培养温度、诱导目的蛋白质表达时，应该加入IPTG吗？
- A12. 因为 pCold DNA 使用冷休克蛋白的启动子，原本目的蛋白质在 37°C 几乎是不表达的。但是有些插入片段会产生微量的背景表达，所以应用了 *lac operon* 作为辅助性的调控系统。
- 对于pET载体来说，因为表达的调控只由IPTG的添加来控制，在IPTG还没有添加时，表达是否得到控制成为一个重要的问题。另一方面，pCold DNA是通过温度变化调控诱导，当温度换成低温后，对于是否依赖于*lac operon*的调控，就不重要了。尽管如此，添加IPTG仍是有必要的，因为任何一种调控都有可能有不适合的情况。
- lac operator*调控的强度也随使用宿主大肠杆菌的不同而变化。JM109等有*lac I^q*进行调控、BL21等有大肠杆菌自有的*lac I*进行调控，它们调控的强度有所不同。但是，当换成低温后，调控强度就不是那么重要了，不需要特异选择*lac I^q*的菌株。

● 附 录

【构建编码大肠杆菌硫氧还蛋白基因的表达载体】

1. pCold表达载体的构建概述

- (1) 根据编码目的蛋白质的DNA序列在pCold DNA的阅读框中选择合适的限制酶酶切位点。
- (2) 制备编码目的蛋白质DNA片段。
- (3) 限制酶消化载体。
- (4) 消化后的载体和DNA片段进行连接，转化到适合的大肠杆菌中。
- (5) 利用得到的克隆子制备质粒，筛选出正确插入目的DNA的质粒。
- (6) 将纯化得到的质粒用于表达实验。

DNA片段制备方法有PCR方法、通过限制酶消化质粒切出目的基因和全基因合成等方法。如果目的基因没有合适的限制酶酶切位点，可以使用In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Lab., Inc.)快速方便地直接进行克隆。

以下是通过PCR方法的一般克隆实验例。

2. 大肠杆菌硫氧还蛋白表达质粒的制备

(1) 引物设计说明 (引物设计方法及注意事项)

- ① 在多克隆位点上选择2种不能切断目的基因序列的限制酶。
- ② 设计目的基因的引物时，应在引物的5'端添加①中所选择的酶切位点。调整插入的DNA片段和限制酶酶切位点之间的碱基数，以便DNA片段的读码框与pCold DNA N末端的读码框相吻合。最好在终止密码子后直接插入一个限制酶酶切位点。

- ③ 在限制酶酶切位点外侧任意增加4个碱基。因为大多数的限制酶需要在其酶切位点外侧添加保护碱基以提高酶切效率。如果没有保护碱基，酶切效率会比较差。

[引物设计例]

在pCold DNA 的多克隆位点 *Nde*I/*Xho*I 处插入：

*Nde*I 位点：引物1 (上游引物)



*Xho*I 位点：引物2 (下游引物)



*1：应用 *Nde*I 酶切位点时，应调整硫氧还蛋白的基因起始密码子ATG的位置与 *Nde*I 的ATG的位置相吻合。

*2：含有终止密码子的硫氧还蛋白基因的互补链。

(2) Insert DNA的制备：

[PCR扩增目的基因 (约350 bp) 实验例]

① PCR扩增目的基因

按如下成分配制反应混合液 (建议使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Code No.R010))。

Template DNA (5 ng) ^{*1}	1 μ l
5 \times PrimeSTAR Buffer ^{*2}	10 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each) ^{*2}	4 μ l
Primer 1 (10-50 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (10-50 pmol/ μ l)	1 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 units/ μ l)	0.5 μ l
灭菌蒸馏水	32.5 μ l
Total	50 μl

*1: 以质粒为模板时添加量为 10 pg~1 ng，以 cDNA 和基因组 DNA 为模板时添加量为 5 ~ 200 ng。

*2: 5 \times PrimeSTAR Buffer 和 dNTP Mixture 附带在 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 中。

使用 Takara Thermal Cycler Dice (Code No. TP600)按如下程序对目的基因进行 PCR 扩增。

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	5 ~ 15 sec.	
72°C	1 min.	

② 确认扩增产物

取反应液 5 μ l 电泳，确认扩增片段条带单一、正确。

③ 纯化扩增产物

扩增产物为单一条带时，建议使用酚/氯仿抽提或使用NucleoSpin® Gel和PCR Clean-up (Code No. #740609.10/.50/.250)处理除去 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 等蛋白质。扩增产物为多条带时，需进行 Agarose 凝胶回收，再使用 TaKaRa RECOCHIP(Code No.9039)等类似方法进行进一步纯化。

④ 扩增产物限制酶消化

使用 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切精制后的 DNA 片段。

a. 配制酶切反应液

Insert DNA	0.5 ~ 1 μ g
10 \times K Buffer	3 μ l
<i>Nde</i> I (10 units/ μ l)	1 μ l
<i>Xho</i> I (10 units/ μ l)	1 μ l
灭菌蒸馏水	up to 30 μ l
Total	30 μl

- b. 37°C反应 1 小时。
- c. 反应液进行乙醇沉淀，回收 DNA。*
- d. 凝胶电泳、测定 OD₂₆₀ 确认 DNA 片段的大小和浓度。

*：乙醇沉淀可以使 *Nde*I 和 *Xho*I 失活。如果乙醇沉淀不能使限制酶完全失活，反应液需要进行酚处理。此外，可以通过凝胶回收进一步纯化，酶切产生的小片段能够完全除去。

[乙醇沉淀方法]

- ① 按样品体积的 1/10 加入 3 M 醋酸钠 (pH5.2),混匀(例如 30 μl 酶切混合液加入 3 μl 3 M 的醋酸钠)。
- ② 按样品体积的 2~2.5 倍加入 100%冷乙醇 如 33 μl 含有醋酸钠的酶切混合液加入 66 μl 的 100%冷乙醇),混匀,-20°C 放置 30 分钟以上。
- ③ 4°C, 12,000 rpm 离心 10~15 分钟,除去上清液。
- ④ 加入 70%冷乙醇,4°C, 12,000 rpm 离心 5 分钟。
- ⑤ 除去上清,干燥。
- ⑥ 加入 10~50 μl 的 TE buffer,溶解 DNA。

(3) pCold DNA 限制酶消化

使用与消化扩增片段一样的限制酶,消化冷休克载体 pCold DNA,然后精制。精制后的 DNA 用 TE buffer 溶解,测定吸光度,确定 DNA 浓度。

- ① 按如下成分配制反应液

pCold Vector	1 μg
10×K Buffer	3 μl
<i>Nde</i> I (10 units/μl)	1 μl
<i>Xho</i> I (10 units/μl)	1 μl
灭菌蒸馏水	up to 30 μl
Total	30 μl

- ② 37°C反应 1~2 小时。
- ③ 反应液进行乙醇沉淀,回收 DNA。*
- ④ 用适当 TE Buffer 溶解。
- ⑤ 测定吸光度 (OD₂₆₀),计算 DNA 浓度。dsDNA: 1 OD₂₆₀ = 50 μg/ml
- ⑥ 调整浓度到 100 ng/μl。

*：限制酶消化后,用 Alkaline Phosphatase [BAP (Code No. 2120A), CIAP (Code No. 2250A)] 进行去磷酸化反应会更好一些。但是,如果只用一种限制酶消化时,则必须进行去磷酸化反应。建议完全除去酶切产生的小片段 DNA,可以使用琼脂糖凝胶电泳切胶回收纯化载体。

(4) DNA 片段插入 pCold 载体后转化

- ① 连接反应

限制酶消化后的载体和 DNA 片段混合,使用 DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Code No. 6023A) 进行连接反应。我们推荐载体和 insert 的摩尔比为 1 : 3~1 : 10。

在冰上配制连接反应液：

Digested pCold DNA; 100 ng (~0.03 pmol)	1 μl
Insert DNA fragment (0.1-0.3 pmol)	4 μl
<u>Ligation Mix (from DNA Ligation Kit<Mighty Mix>)</u>	<u>5 μl</u>
Total	10 μl

16°C反应 1 小时。

- ② 连接反应液 10 μl 全量转化到 100 μl *E. coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052),在含有 100 μg/ml 的 Amp 的 LB 平板上 37°C 过夜培养,形成单菌落。
 - a. *E. coli* JM109 Competent Cells 使用前冰中融化。
 - b. 连接反应液 10 μl 全量加至 100 μl Competent Cells 中,冰中放置 30 分钟。

- c. 42°C加热 45 秒钟后，然后在冰中放置 1~2 分钟。
- e. 加入(37°C保温)SOC 培养基至终体积为 1 ml，37°C振荡培养 60 分钟。
- f. 在含有 Amp(100 μg/ml)的 L-琼脂平板培养基上 37°C过夜培养，形成单菌落。

(5) 质粒的制备与确认

(4)-②所得克隆接种到适量的含有 Amp(100 μg/ml)的 LB 培养液中，37°C过夜培养，然后提取质粒。使用 *Nde* I 和 *Xho* I 消化提取的质粒，电泳确认是否含有插入片段 DNA。当确认提取的质粒含有插入片段 DNA 时，还需测序确认 DNA 片段的序列，含正确序列 DNA 的质粒可以作为表达载体使用。测序时使用引物如下所示：

上游引物 pCold-F Primer: 5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG

下游引物 pCold-R Primer: 5'-GGCAGGGATCTTAGATTCTG

该引物不能作为 PCR 引物，因为扩增时会多出约 500 bp 的片段。

● 关联产品

< 用于重组蛋白可溶性表达 >

- Chaperone Competent Cells BL21 Set (Code No. 9120)
- Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21 (Code No. 9121)
- Chaperone Competent Cell pGro7/BL21 (Code No. 9122)
- Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21 (Code No. 9123)
- Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21 (Code No. 9124)
- Chaperone Competent Cell pTf16/BL21 (Code No. 9125)
- TaKaRa Competent Cell BL21 (Code No. 9126)
- Chaperon Plasmid Set (Code No. 3340)

< *E. coli* Competent Cells >

- E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)
- E. coli* DH5α Competent Cells (Code No. 9057)
- E. coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052)
- E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)
- E. coli* DH5α Electro-Cells (Code No. 9027)
- E. coli* JM109 Electro-Cells (Code No. 9022)

< 其它 >

- IPTG (Isopropyl-β -D-thiogalactopyranoside) (Code No. 9030)
- pCold™ TF DNA (Code No. 3365)
- pCold™ ProS2 DNA (Code No. 3371)

● 参考文献

- 1) Masayori Inouye *et. al.* (2004) *Nature Biotechnology* **22**, 7, 877-882.
- 2) Xia B, Etchegaray JP and Masayori Inouye (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38, 35581-35588.
- 3) Kunitoshi Yamanaka, Masanori Mitta and Masayori Inouye (1999) *J. Bacteriology* **181**, 20, 6284-6291.
- 4) Li Fang, Yan Hou and Masayori Inouye (1998) *J. Bacteriology* **180**, 1, 90-95.
- 5) Li Fang, Weining Jiang, Weonhye Bae and Masayori Inouye (1997) *Molecular Microbiology* **23**(2), 355-364.
- 6) Weining Jiang, Li Fang and Masayori Inouye (1996) *J. Bacteriology* **178**, 16, 4919-4925.
- 7) Hiroyuki Tanabe, Joel Goldstein, Maozhou Yang and Masayori Inouye (1992) *J. Bacteriology* **174**, 12, 3867-3873.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L13a] pCold™ vectors

This product is covered by the claims of U.S. Patent No.5,981,280, 6,686,174 and their foreign counterpart patent claims, assigned to the UMDNJ.

This product is covered by the claims of U.S. Patent No.6,479,260, 6,897,042 and their foreign counterpart patent claims.

[M9] pCold™ vectors

This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 6,479,260 and its foreign counterpart patent claims.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All marks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686

4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201301Da