

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4195039号
(P4195039)

(45) 発行日 平成20年12月10日(2008.12.10)

(24) 登録日 平成20年10月3日(2008.10.3)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 27/447 (2006.01)

GO 1 N 27/26 3 O 1 B

GO 1 N 27/26 3 I 5 H

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2006-39530 (P2006-39530)	(73) 特許権者	506054903
(22) 出願日	平成18年2月16日 (2006.2.16)		辻本 善之
(65) 公開番号	特開2007-218735 (P2007-218735A)		京都府京都市左京区下鴨半木町1-5 京
(43) 公開日	平成19年8月30日 (2007.8.30)		都府立大学大学院農学研究科内
審査請求日	平成18年2月16日 (2006.2.16)	(73) 特許権者	596053068
			京都市
			京都府京都市中京区寺町通御池上る上本能
			寺前町488番地
		(73) 特許権者	500158096
			山本 佳宏
			滋賀県大津市朝日2-14-4
		(73) 特許権者	506202076
			廣岡 青央
			京都府京都市右京区鳴滝般若寺町10-1
			2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体の前処理方法および試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エステラーゼ活性を有するタンパク質および核酸分解酵素活性を有するタンパク質を含む反応液中で検体を処理する工程を包含することを特徴とする、電気泳動に供する検体の前処理方法。

【請求項2】

エステラーゼ活性を有するタンパク質がシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来リパーゼであることを特徴とする、請求項1記載の電気泳動に供する検体の前処理方法。

【請求項3】

アルコールおよび/または界面活性剤を更に含む反応液中で検体を処理することを特徴とする、請求項1または2記載の電気泳動に供する検体の前処理方法。

10

【請求項4】

エステラーゼ活性を有するタンパク質および核酸分解酵素活性を有するタンパク質を含む、電気泳動に供する検体の前処理用試薬組成物。

【請求項5】

エステラーゼ活性を有するタンパク質がシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来リパーゼであることを特徴とする、請求項4記載の電気泳動に供する検体の前処理用試薬組成物。

【請求項6】

アルコールおよび/または界面活性剤を更に含む、請求項4または5記載の電気泳動に

20

供する検体の前処理用試薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電気泳動に供する検体の前処理方法、および前処理用試薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

電気泳動、とりわけドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) によるタンパク質の検出は、一般的、標準的なタンパク質の分析方法として広く用いられている。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、アクリルアミドを重合させたゲル中で荷電粒子に電圧を付加し、その移動度によってそれぞれの粒子を分離できることを利用している。ポリアクリルアミドゲルは分子篩として働き、ゲル中では小さい粒子ほど動きやすく大きな粒子ほど動きにくい。また、ゲルの濃度を変えることで、移動度を調整できる。しかし、タンパク質はそのアミノ酸配列により、それぞれ独特な立体構造を持ち、同じ分子量でもその移動度が異なる。またそのタンパク質を構成するアミノ酸残基の電気特性 (等電点) もそれぞれ異なり、同じ電圧でもかかる力が異なりそれが移動度にも反映する。この問題を避けるために、SDS - PAGE は負電荷界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で検体を変性させてから行なう。SDS は水溶液中では非極性基を内側にしてミセルを作る。この非極性基がタンパク質のアミノ酸残基間の疎水結合を壊すので、タンパク質はほぼ直鎖状に引き伸ばされ、また、イオン性残基の電荷はミセル表面の負電荷にマスクされ単位長さ当たりほぼ一定の電荷となる。これにより、タンパク質はその個々の性質を失いその分子量のみによって分離されるようになる。

【0003】

近年、より多くの種類のタンパク質を含む検体より個々のタンパク質を分離する方法として、二次元電気泳動が普及した。二次元電気泳動とは、異なる条件での電気的分離法の2種類を組合せて分離する方法で、一次元目に等電点電気泳動を、二次元目に SDS - PAGE を用いる方法が一般的である。この場合、等電点で分別したタンパク質をさらに分子量の違いにより分別するため、個々のタンパク質がスポットとして分離される。

【0004】

検体がタンパク質成分のみである場合や、タンパク質以外の成分が極めて少ない検体であれば、一般に電気泳動は問題無く行なえる。しかしながら、タンパク質以外の成分を多く含む検体を電気泳動すると、タンパク質の分離が十分でない場合が多い。特に、微生物や動植物の細胞や組織を破碎して得られた検体の場合、タンパク質以外に核酸や脂質、低分子化合物などの多様な成分を含むため、明瞭なタンパク質の分離を成功させることは困難である。また、検体中の膜タンパク質を電気泳動するには、タンパク質を膜から抽出せねばならない。したがって、このような検体の電気泳動に際しては、予め何らかの処理を行なうことが必要となる。

【0005】

検体の前処理方法としては、タンパク質成分の検体からの抽出、精製が一般的に行なわれる。例えば、カラムクロマトグラフィーによるタンパク質の吸着と溶出、ゲル濾過による分画、フィルターや膜による分離などは、古くから行なわれている手法で、現在も電気泳動の前処理として常用されている。しかし、これらの方法は時間と手間がかかり、器具や装置、消耗品を使用するためコスト面での負担も大きい。また、検体を界面活性剤で処理する簡便な方法も採用されているが、タンパク質成分を可溶化させる点では有効であるものの、夾雑成分の影響を回避することは難しく、電気泳動によるタンパク質の分離が十分でない場合が多い。また、近年広く行われている、細胞や組織中で発現している全てのタンパク質を網羅的に分析するプロテオーム解析では、検体の前処理によって分析結果が変化することは望ましくないため、精製などによらず夾雑成分による影響の回避することが重要である。しかし、従来は、このような目的に使用される検体を用いて十分な分離を達成することができない場合に分離を改善する有効な手段は知られていなかった。

【 0 0 0 6 】

したがって、タンパク質以外の成分を多く含む検体の電気泳動における、簡便で低コスト、かつ効果が十分な検体の前処理方法、そのための試薬が望まれていた。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、タンパク質の電気泳動に供する検体の前処理において、従来は困難であった簡便で低コスト、かつ効果が十分な方法および試薬組成物を提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、上記課題を解決するために種々の検討を行なった。より具体的には、検体を前処理用の溶液にて処理し電気泳動に供する簡便で低コストな方法を想定し、前処理溶液の組成を種々検討することにより、電気泳動でのタンパク質の分離に対し劇的な効果のある溶液組成を見出すことに成功し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) エステラーゼ活性を有するタンパク質および核酸分解酵素活性を有するタンパク質を含む反応液中で検体を処理する工程を包含することを特徴とする、電気泳動に供する検体の前処理方法。

(2) エステラーゼ活性を有するタンパク質がシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来リパーゼであることを特徴とする、(1) 記載の電気泳動に供する検体の前処理方法。

(3) アルコールおよび/または界面活性剤を更に含む反応液中で検体を処理することを特徴とする、(1) または(2) 記載の電気泳動に供する検体の前処理方法。

(4) エステラーゼ活性を有するタンパク質および核酸分解酵素活性を有するタンパク質を含む、電気泳動に供する検体の前処理用試薬組成物。

(5) エステラーゼ活性を有するタンパク質がシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来リパーゼであることを特徴とする、(4) 記載の電気泳動に供する検体の前処理用試薬組成物。

(6) アルコールおよび/または界面活性剤を更に含む、(4) または(5) 記載の電気泳動に供する検体の前処理用試薬組成物。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

本発明により電気泳動に供する検体の前処理方法、および前処理用試薬組成物が提供される。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 1 】

本発明の電気泳動に供する検体の前処理方法は、エステラーゼ活性を有するタンパク質および核酸分解酵素活性を有するタンパク質を含む反応液中で検体を処理する工程を包含することを特徴とする。また、本発明の検体の前処理用試薬組成物は、エステラーゼ活性を有するタンパク質および核酸分解酵素活性を有するタンパク質を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

本発明の前処理方法および前処理用試薬組成物に用いるエステラーゼ活性を有するタンパク質としては、微生物や動植物に由来するエステラーゼ活性を有するタンパク質などを制限無く使用できる。

【 0 0 1 3 】

本明細書において「エステラーゼ活性」とは、エステルを加水分解する活性をいう。また、本明細書において「リパーゼ活性」とは、グリセロールエステルを加水分解して脂肪酸を遊離する活性をいう。リパーゼ活性を有するタンパク質の例としては、トリグリセリド反応性リパーゼが挙げられる。また、トリグリセリド反応性リパーゼの例としては、リ

10

20

30

40

50

ポロテインリパーゼが挙げられる。

【0014】

本発明において、エステラーゼ活性を有するタンパク質としては、産業用酵素として一般に利用されている微生物や動物由来のトリグリセリド反応性リパーゼを使用することが、コスト低減のために好ましい。このような酵素として、例えばシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来リパーゼ、カンジダ (Candida属) 酵母由来リパーゼ、またはリゾプス (Rizopus属) カビ由来リパーゼおよびこれらの混合物を用いることが好適である。本発明の実施例には、シュードモナス・アエルギノサ (Pseudomonas aeruginosa) 由来リポプロテインリパーゼを使用した。この酵素は、コレステロールやその他のステロール、各種ラクトン類などに対するエステラーゼ活性を有している。本酵素は、既に臨床検査薬用酵素として産業利用されている。例えば、東洋紡績株式会社から市販されているリポプロテインリパーゼとしてである。尚、本酵素活性は1分間に1マイクロモルのGlycerol (1/2マイクロモルのQuinoneimine色素) を生成する酵素量を1単位 (U) として表される (東洋紡績株式会社ウェブサイト参照、<http://www.toyobo.co.jp/e/seihin/xr/enzyme/pdf/205LPL-311.pdf>)。

10

【0015】

本発明におけるエステラーゼ活性を有するタンパク質の使用量は、前処理反応液中終濃度で0.001~10U/mlであるのが好ましく、0.02~2U/mlであるのがより好ましい。ここで「U」は国際単位を表す。上記エステラーゼ活性を有するタンパク質の量が0.001U/ml未満であると、夾雑脂質成分の分解が不十分で電気泳動によるタンパク質の分離能が低くなってしまふ可能性があり、また上記エステラーゼ活性を有するタンパク質の量が10U/mlを超えると、このタンパク質自体が電気泳動で他のタンパク質の分離に悪影響を及ぼし、タンパク質の検出効率が低下する可能性がある。当業者は、処理の有効性、分離への影響などを考慮して適切に使用量を決定することができる。

20

【0016】

本発明に係る核酸分解酵素活性を有するタンパク質としては、市販のDNA分解酵素、RNA分解酵素などを制限無く使用できるが、両酵素 (DNA分解酵素とRNA分解酵素) を組み合わせて使用することが効果的である。例えば、基質となる核酸 (DNA、RNA) の形態 (一本鎖、二本鎖) にかかわらずランダムに分解するエキソ型の酵素を好適に用いることができる。このような酵素として、例えばウシ膵臓由来DNase Iやその他の動物由来DNase、ウシ膵臓RNase Aやその他の動物由来RNase、およびこれらの混合物を用いることが好適である。

30

【0017】

本発明における核酸分解酵素活性を有するタンパク質の使用量は、前処理反応液中終濃度で0.001~10U/mlであるのが好ましく、0.04~4U/mlであるのがより好ましい。ここで、DNaseの一例であるDNase Iの1単位 (U) は、poly (dA-dT) をテンプレートプライマーとして用いて、37℃で30分間に全体として10nmolのデオキシリボヌクレオチドを酸沈殿画分に取り込ませる酵素量として定義され、RNaseの一例であるRNase Aの1単位 (U) は、Kunitzの方法に従ってRNAを基質として25℃で測定した場合に、1分間に吸光度A (終末の吸光度) をBまで減少 (AからBへの減少は全減少量に相当する) させるのに必要な酵素活性として定義される。上記核酸分解酵素活性を有するタンパク質の量が0.001U/ml未満であると、夾雑核酸成分の分解が不十分で電気泳動によるタンパク質の分離能が低くなってしまふ可能性があり、また上記核酸分解酵素活性を有するタンパク質の量が10U/mlを超えると、電気泳動で他のタンパク質の分離に悪影響を及ぼし、タンパク質の検出効率が低下する可能性がある。当業者は、処理の有効性、分離への影響などを考慮して適切に使用量を決定することができる。

40

【0018】

1つの実施態様において、本発明の検体の前処理方法は、アルコールおよび/または界面活性剤を更に含む溶液中で検体を処理することを特徴とする。

50

【0019】

本発明に係るアルコールとしては、特に制限されないが、コスト面からメタノール、エタノール、イソプロパノールなどの安価なアルコールが好適である。

【0020】

本発明におけるアルコールの使用量は、前処理反応液中終濃度で1～20重量%であるのが好ましく、2～10重量%であるのがより好ましい。

【0021】

本発明に係る界面活性剤としては、Triton X - 100、Triton X - 200、Triton X - 400、Tween 20、Tween 80、CHAPSなどの非イオン系または両性イオン系の界面活性剤が好適である。

10

【0022】

本発明における界面活性剤の使用量は、前処理反応液中終濃度で0.01～12重量%であるのが好ましく、0.02～1.7重量%であるのがより好ましい。

【0023】

本明細書において「検体」とは、それに含まれるタンパク質を分析しようとする検体をいう。本発明の前処理方法および前処理用試薬組成物は、電気泳動において十分な分離が達成されない場合に有効に使用される。従って、対象となる検体としては、電気泳動の際に分離に悪影響を及ぼすタンパク質以外の成分を多く含む検体、例えばタンパク質以外に核酸や脂質、低分子化合物などの多様な成分を含む検体などが挙げられる。具体的には、微生物や動植物の細胞あるいは組織を破碎して得られた検体、細胞の膜画分などが挙げられる。例えば、上記のように、細胞や組織中で発現している全てのタンパク質を網羅的に分析するプロテオーム解析では、検体の前処理によって分析結果が変化することは望ましくないので、精製などによらず夾雑成分による影響の回避することができる本発明の前処理方法および前処理試薬組成物は、プロテオーム解析に供する検体の前処理に有用である。

20

【0024】

本発明を活用して電気泳動し得るタンパク質（目的タンパク質）としては、特に限定されない。細胞質や各種オルガネラの可溶性タンパク質、細胞外分泌タンパク質、膜タンパク質、不溶性タンパク質や凝集体、および糖やリン酸などで修飾を受けたタンパク質などが対象として挙げられる。なお、ここで取り上げられるタンパク質は低分子ペプチドも含む広義のものである。

30

【0025】

本発明の前処理方法における各条件は、用いる溶液の組成や検体の種類、電気泳動の手法や条件によって適宜選択でき、特に限定されるものではない。以下、検体としてタンパク質以外の成分を多く含む酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) や大腸菌 (*Escherichia coli*) の破碎物を用い、前処理試薬組成物として0.001～1 U/mlのシュードモナス (*Pseudomonas*) 属細菌由来リパーゼ、0.001～1 U/mlのDNase (DNA分解酵素)、0.001～1 U/mlのRNase (RNA分解酵素)、0.01～0.1%のTriton X - 100、1～5%のメタノールを含む50 mMリン酸カリウム (pH 7.0) 緩衝液を用い、前処理後に二次元電気泳動を行なう場合を例に挙げて、具体的に説明する。

40

【0026】

検体として細胞や組織を用い、細胞内タンパク質や膜タンパク質を分析する場合、予め検体を破碎する必要がある。破碎方法としては、ソニック破碎、ビーズ破碎やフレンチプレス破碎などの物理的な破碎方法、酵素による細胞壁溶解と浸透圧による破碎など、通常の方法を利用することができる。また、タンパク質の分解や構造変化を防ぐために、細胞や組織をプロテアーゼ阻害剤や有機溶媒などを含む溶解バッファーに懸濁することや、更に物理的破碎を加えるなどの方法も有効である。

【0027】

これらの方法で検体を処理した後、本発明の前処理試薬組成物と混合して反応を行なう

50

。前処理試薬組成物と検体との混合比率は、検体の種類、濃度などにより異なるため一概に言えないが、前処理試薬組成物を検体に対し1 / 20 ~ 2倍容量加えることが好ましく、一般的には1 / 5 ~ 等量加えると好適である。

【0028】

前処理の反応条件も、検体の種類、濃度などにより異なるため一概に言えないが、使用する酵素活性を有するタンパク質の作用に適切な条件が選択される。例えば、反応温度に関しては10以上の反応温度で10 ~ 100分間反応させるのが好ましい。本発明の実施例では、室温(20 ~ 30)にて30分間反応させている。さらに、適切な反応pHとなるように、反応液中にリン酸緩衝液などの緩衝液を含めることが好ましい。

【0029】

本発明の検体の前処理方法および本発明の検体の前処理試薬組成物は任意の電気泳動に有効であり、例えば、ゲルを用いるタンパク質の分析のための電気泳動に適用することができる。特に、等電点電気泳動、SDS-PAGE、およびその組み合わせである二次元電気泳動に適用することが好ましい。例えば、二次元電気泳動の場合、前処理反応後、常法にしたがい検体をまず等電点電気泳動に供し、ついで二次元目のSDS-PAGEを行なうことにより、タンパク質が十分に分離し、明瞭な二次元電気泳動結果を得ることができる。

【実施例】

【0030】

以下、実施例及び比較例によって更に本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって何等限定されるものでない。尚、以下の実施例等に於いて、二次元電気泳動の一次元目の等電点電気泳動はpIが3.5 ~ 7の範囲となるよう調製したゲルを使い、ディスク電気泳動装置(日本エイドー製)を用いて実施した。また二次元目のSDS-PAGEは、17%ゲルを使い、恒温式2連スラブ電気泳動装置(日本エイドー製)を用いて実施した。一次元目の等電点電気泳動のゲルと二次元目のSDS-PAGEのゲルとは、アガロースゲル(ナカライテスク製)を用いて接着した。二次元電気泳動試薬やその他の必要な試薬はナカライテスクより購入し、メーカーのプロトコールにしたがい実施した。

【0031】

(実施例1) 酵母ミクロソーム画分(膜画分)の二次元電気泳動

(1) 前処理試薬組成物の調製

以下の組成の前処理試薬組成物を調製し、実験に供した。

50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)

1 U/ml シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)由来リポ蛋白質インリパーゼ(東洋紡製)

1 U/ml DNase I(シグマ製)

1 U/ml RNase A(ナカライテスク製)

0.1% Triton X-100

5% メタノール

【0032】

(2) 検体(酵母ミクロソーム画分)の調製

サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C株(独立行政法人・製品評価技術基盤機構より入手)の菌体を細胞壁分解酵素Zymolyase 100T(生化学工業製)で処理後、遠心分離により酵母細胞のスフェロプラストを回収した。等張液に再懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いて細胞を破壊した。細胞破碎液を常法に従って、遠心分離によって細胞内オルガネラを分離し、ミクロソーム画分を得、検体として用いた。

【0033】

(3) 前処理反応

(2)で調製した検体に等量の(1)で調製した前処理試薬組成物を加え、室温(20 ~ 30)で30分間静置して前処理反応を実施した。その後、そのサンプルを実験に供した。

10

20

30

40

50

【0034】

前処理後の検体を、通常通りの方法にて二次元電気泳動に供し染色した。結果を図1に示す。タンパク質が十分に分離し、明瞭な二次元電気泳動結果が得られていることが分かる。

【0035】

(実施例2)大腸菌可溶性画分の二次元電気泳動

(1)前処理試薬組成物の調製

実施例1と同じ組成の前処理試薬組成物を調製し、実験に供した。

【0036】

(2)検体(大腸菌可溶性画分)の調製

大腸菌(*Escherichia coli*) K12 MG1655株(国立遺伝学研究所より入手)の菌体を以下の組成のLysis Bufferに懸濁し、超音波処理により細胞を破戒した。菌破砕液を遠心分離し、不溶性画分と未破壊細胞を除去した。得られた上清を検体として用いた。

尿素(ナカライテスク製)	8 M
NP-40(シグマ製)	2 %
2-メルカプトエタノール(ナカライテスク製)	5 %

【0037】

(3)前処理反応

(2)で調製した検体と(1)で調製した実施例1と同じ組成の前処理試薬組成物とを、検体：前処理溶液 = 5 : 1の容量比で混合し、室温(20 ~ 30)で30分間静置して前処理反応を実施した。その後、そのサンプルを実験に供した。

【0038】

前処理後の検体を、通常通りの方法にて二次元電気泳動に供し染色した。結果を図2に示す。タンパク質が十分に分離し、明瞭な二次元電気泳動結果が得られていることが分かる。

【0039】

(比較例1)酵母ミクロソーム画分(膜画分)の二次元電気泳動

本発明の前処理を実施しない他は、実施例1と同様の操作にて実験を行なった。結果を図3に示す。タンパク質の分離が不十分で、明瞭な二次元電気泳動結果が得られていない。

【0040】

(比較例2)大腸菌可溶性画分の二次元電気泳動

本発明の前処理を実施しない他は、実施例2と同様の操作にて実験を行なった。結果を図4に示す。タンパク質の分離が不十分で、明瞭な二次元電気泳動結果が得られていない。

【産業上の利用可能性】

【0041】

本発明は、電気泳動に供する検体の簡便で低コストな前処理方法及びそのための試薬組成物を提供するものであり、本発明の方法、試薬組成物を用いれば、従来法に於ける、時間と手間がかかりコスト面での負担が大きいという問題を生じさせることなく、電気泳動により高分解能でタンパク質を分離し得るという効果を奏するので、タンパク質の研究、開発、分析等に貢献するところ極めて大なる発明である。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】実施例1における電気泳動分析結果を示す図である。

【図2】実施例2における電気泳動分析結果を示す図である。

【図3】比較例1における電気泳動分析結果を示す図である。

【図4】比較例2における電気泳動分析結果を示す図である。

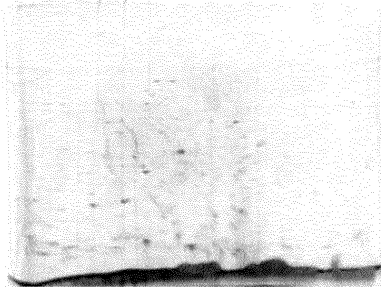
10

20

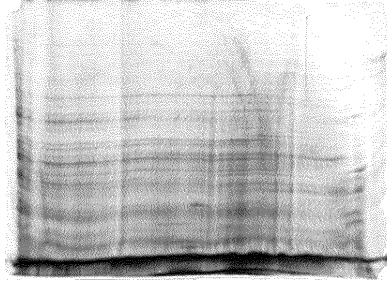
30

40

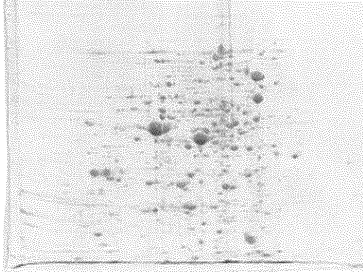
【 図 1 】



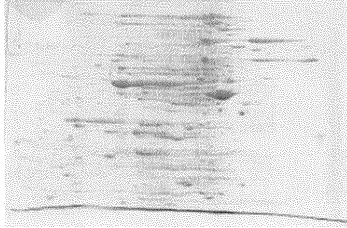
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(73)特許権者 000003160

東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100116311

弁理士 元山 忠行

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 辻本 善之

京都府京都市左京区下鴨半木町1-5 京都府立大学大学院農学研究科内

(72)発明者 山本 佳宏

京都府京都市下京区中堂寺南町134番地 京都市産業技術研究所工業技術センター内

(72)発明者 廣岡 青央

京都府京都市下京区中堂寺南町134番地 京都市産業技術研究所工業技術センター内

(72)発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開平09-178752(JP,A)

特開平3-262967(JP,A)

特表2005-526509(JP,A)

特表2002-502020(JP,A)

特表2000-516454(JP,A)

国際公開第2004/053500(WO,A1)

国際公開第03/005039(WO,A1)

国際公開第00/071700(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 27/447

G01N 33/48

C12N 7/00

C12N 9/00

JSTPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)