

製品コード 3281

研究用

---

**Takara**

**Human Cell-Free Protein  
Expression System**

---

説明書

v201807Da

---

Human Cell-Free Protein Expression System は、ヒト細胞株由来の細胞抽出液を利用した無細胞タンパク質合成システムです。本システムの Cell Lysate には *in vitro* でのタンパク質合成反応に必要な各種因子 (リボソーム、翻訳開始・伸長因子、tRNA 等) が含まれています。この Cell Lysate に、目的遺伝子をクローニングした pT7-IRES Vector、T7 RNA Polymerase、Mixture-3 (ATP 等やアミノ酸類)、Mixture-2 (翻訳増強因子) などを添加するだけの簡便なプロトコルで、1 チューブの中で RNA 転写からタンパク質合成まで行うことができます。

pT7-IRES Vector から転写される目的遺伝子 RNA には、タンパク質翻訳開始を促進するための IRES 配列が付加されます。また、反応液に添加する翻訳増強因子は、タンパク質合成の進行とともに不活性化する Cell Lysate 由来の翻訳開始因子を再活性化し、翻訳レベルを維持する効果があります。これらの翻訳効率増強効果により、本システムでは従来の哺乳類無細胞タンパク質合成系の欠点であった低い合成レベルが改善されるとともに、150 kDa を超える高分子量タンパク質の合成にも応用可能であることが確認されています。

本システムはシングルステップ反応系を利用したハイスループットなタンパク質合成への応用のほか、生細胞を利用した発現系では合成困難な宿主細胞の生育や細胞機能に影響を及ぼす毒性タンパク質の合成への利用が期待できます。

## I. 内容 (20 $\mu$ l 反応、10 回用)

1. Cell Lysate* <sup>1</sup>	100 $\mu$ l
2. Mixture-1	60 $\mu$ l
3. Mixture-2* <sup>2</sup>	10 $\mu$ l
4. Mixture-3* <sup>2</sup>	20 $\mu$ l
5. T7 RNA Polymerase (200 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
6. pT7-IRES Vector (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
7. Control Vector* <sup>3</sup> (0.3 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l

\* 1 : 使用直前に溶解し、ピペットマンで穏やかに十分混合した後、ただちにご使用ください。また、使用後は速やかに  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存してください。

(注) 5 回程度の凍結融解では、通常、大きな性能低下は見られませんが、できるだけ小分け分注して保存することをお勧めします。

\* 2 : Mixture-2 および Mixture-3 はタンパク質を含みます。過剰な攪拌などタンパク質の失活をまねく操作を加えないでください。Mixture-2 に含まれるタンパク質には HN タグが付加されています。

\* 3 :  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が挿入されています。

### 本製品以外に必要な試薬、器具 (主なもの)

- SDS-PAGE 電気泳動装置一式
- タンパク質ゲル染色試薬 (例: CBB 染色液)、脱色試薬類
- 各種チューブ
- サーマルサイ클ラー等 ( $32^{\circ}\text{C}$  インキュベート用)
- エアインキュベーター等 ( $37^{\circ}\text{C}$  インキュベート用)

## II. 保存 $-80^{\circ}\text{C}$

### III. 発現プラスミドの構築

発現プラスミドは、pT7-IRES Vector のマルチクローニングサイト (MCS) に目的遺伝子をコードする DNA 断片を挿入して構築します。DNA 断片の調製法としては、PCR を用いる方法やプラスミドにクローニングされた遺伝子を制限酵素消化によって切り出す方法、人工合成遺伝子を用いる方法などが挙げられます。なお、挿入配列に polyA 配列を付加する必要はありません。

目的遺伝子の DNA 断片を pT7-IRES Vector の MCS に挿入する際には、目的タンパク質の N 末端側開始コドン (ATG) が、MCS の 5' 端にある *Nco*I サイトの ATG に一致するように挿入することをお勧めします。目的遺伝子の DNA 断片を *Nco*I サイト以外 (*Bam*HI-*Xba*I) に挿入する場合には、上流の *Nco*I サイトに存在する ATG 配列を開始コドンとするアミノ酸配列に目的遺伝子の読み枠を合わせる形で挿入してください。

以下に、発現ベクター構築例として、制限酵素サイトに依存しない簡単・便利なディレクションアルクローニング技術である In-Fusion 法を用いた構築例を示します。本例では、目的タンパク質の N 末端側は *Nco*I サイトの ATG を利用する形で挿入しています。

#### In-Fusion 法を用いた構築例 (*Nco*I/*Xba*I サイトへのクローニング)

##### 1. プライマーの設計

- N 末端側プライマー：

以下の開始コドン (ATG) を含む 15 塩基の下線配列を 5' 端に連結したプライマーを設計する。

5'-ATgGCCACAACCATg (開始コドン) ——目的配列のコード領域——3'

- C 末端側プライマー：

以下の 15 塩基の配列を 5' 端に連結したプライマーを設計する。この付加配列の後には終止コドンもしくはそれ以下の配列を配置する。(polyA 配列の付加は不要)

5'-gTTATgCTAgTCTAgTCA (終止コドン) ——目的配列のコード領域——3'

##### 2. インサート調製と In-Fusion クローニング

上記設計のプライマーを用いて正確性の高い PCR 酵素 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B) 等で PCR 増幅を行い、インサート DNA を調製する。*Nco*I と *Xba*I による切断で線状化した pT7-IRES Vector とともに In-Fusion 反応を行い、インサート DNA の挿入を行う。形質転換効率の高い *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) 等の大腸菌に導入して目的インサートを有するクローンの選択を行う。必要に応じて、対象部分の塩基配列をシーケンスにより決定する。

※ 操作方法と In-Fusion 用プライマー設計の詳細に関しては、各種 In-Fusion® クローニングキットの取扱説明書をご参照ください。

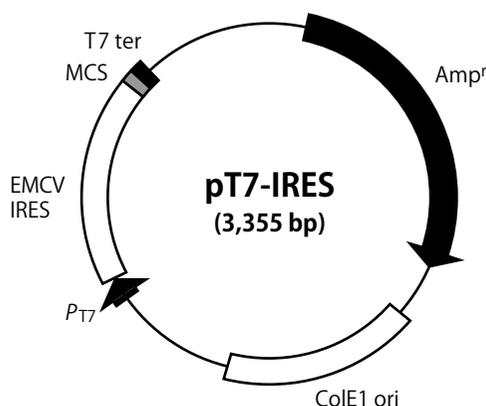


図 1. pT7-IRES Vector のベクターマップ

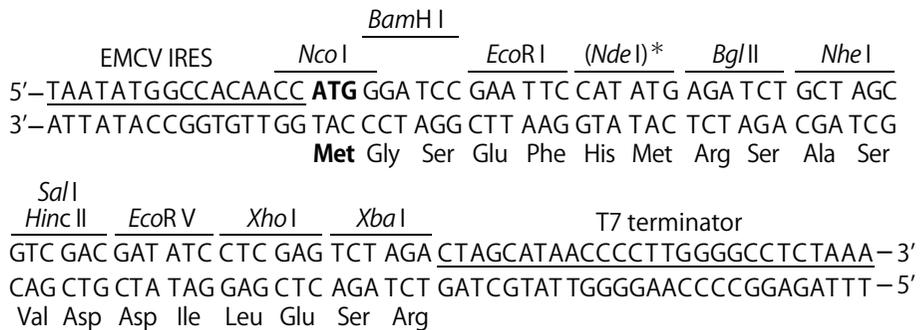


図 2. pT7-IRES Vector のマルチクローニングサイト (MCS) の塩基配列  
\* : NdeI はマルチクローニングサイトとして利用不可です。

## IV. 操作

### IV-1. 操作手順

- 以下の各試薬を氷上にて融解し、反応チューブに分注する。ピペティングにて穏やかに十分混合する。

Cell Lysate	9 $\mu$ l
Mixture-1	6 $\mu$ l
Mixture-2	1 $\mu$ l

- 室温にて 10 分間静置する。
- 以下の各試薬を氷上にて融解し、上記反応チューブに添加する。全ての試薬を添加後、反応液をピペティングにより穏やかに十分混合する。  
注) 反応液の粘度が非常に高いため、ピペティングを 10 ~ 20 回程度行い十分に混合してください。混合が不十分な場合、発現量が低下することがあります。

Mixture-3	2 $\mu$ l
Plasmid*1 (0.3 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T7 RNA Polymerase	1 $\mu$ l

- 32℃にて 1 ~ 6 時間\*2 反応する。

- \* 1 : 「III. 発現プラスミドの構築」に従って目的配列を有するプラスミドの構築を行ってください。
- \* 2 : タンパク質によって最適な反応時間が異なります。通常は 3 時間の反応を推奨しますが、6 時間まで反応を延長することが可能です。

合成されたタンパク質は SDS-PAGE やウェスタンブロット解析により検出することができます。「VI. 実験例 1 ~ 3」をご参照ください。

### IV-2. 操作上の注意

- Plasmid と Mixture-1 を除く各試薬は必ず氷上にて融解後直ちに使用し、使用後は速やかに -80℃にて保存してください。
- Cell Lysate は小分け分注して保存することをお勧めします。
- Mixture-3 添加時に不溶物が生じる場合がありますが、性能上は問題ありません。

## V. コントロール反応 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼの合成)

IV-1. 操作手順に従って反応を行います。ステップ3で Control Vector を 1  $\mu$ l 使用し、ステップ4の反応時間は3時間に設定します。反応後は下記の方法で  $\beta$ -ガラクトシダーゼを検出します。

### 発色試験 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼの検出)

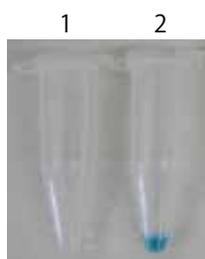
1. 以下の試薬を反応チューブに分注し、ピペティングにて十分混合する。

上記コントロール反応液	1 $\mu$ l
X-Gal solution (25 mg/ml) *	1 $\mu$ l
滅菌精製水	18 $\mu$ l

\* : N,N-Dimethylformamide に溶解して調製

2. 37°Cのエアインキュベーターにて30分間~1時間反応する。

正常にタンパク質が合成された場合、図3のように青色の発色が確認できます。



30分後の発色

チューブ1: Negative control (発色無)

チューブ2: + Control Vector (発色有)

図3. 発色試験 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼの検出) 結果

### 【参考】 $\beta$ -ガラクトシダーゼの経時的発現と翻訳増強因子 (Mixture-2) の効果

[方法]

IV-1. 操作手順に従って8本の反応チューブ (Control Vector を各 1  $\mu$ l 使用) を用意し、32°Cで  $\beta$ -ガラクトシダーゼの合成反応を行った。反応開始0、0.5、1、2、3、4.5、6、8時間でそれぞれ反応チューブを抜きとり、ONPG (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) を基質として  $\beta$ -ガラクトシダーゼを検出した。比較のため、翻訳増強因子を添加しない系でも同様の実験を行った。

[結果]

翻訳増強因子の添加により著しいタンパク質合成量の増加が確認できました。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの合成量は、約8時間まで経時的に増加しました。

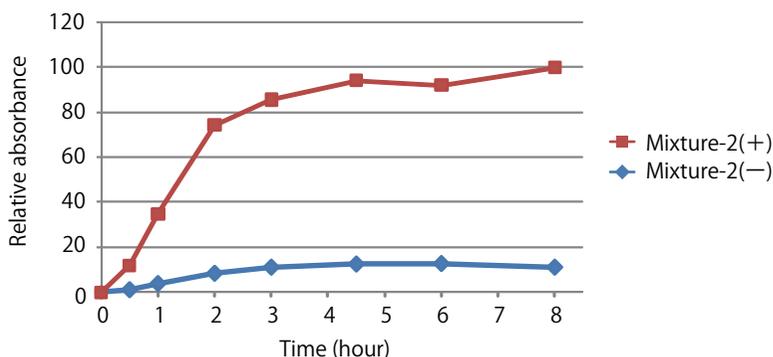


図4.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ合成量のタイムコース

## VI. 実験例

### 実験例 1：本システムを用いた高分子量タンパク質 (170 kDa、200 kDa) の発現

#### [方法]

プロトコールに従いタンパク質合成反応を行った。SDS-PAGE を行い、CBB 染色にて目的タンパク質の検出を行った。

#### [結果]

CBB 染色にて目的サイズ (170 kDa、200 kDa) のタンパク質を検出できました。

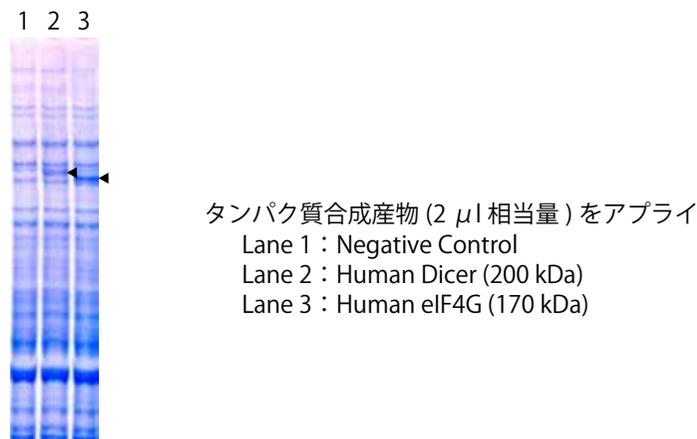


図 5. SDS-PAGE 結果

### 実験例 2：翻訳増強因子 (Mixture-2) の効果

#### [方法]

翻訳を促進する因子を添加した場合 (通常プロトコール) および無添加の場合でタンパク質合成反応を比較した。SDS-PAGE を行い、CBB 染色にて目的タンパク質の検出を行った。

#### [結果]

翻訳増強因子を添加することによりタンパク質発現が向上し、CBB 染色にて良好な発現を確認できました。

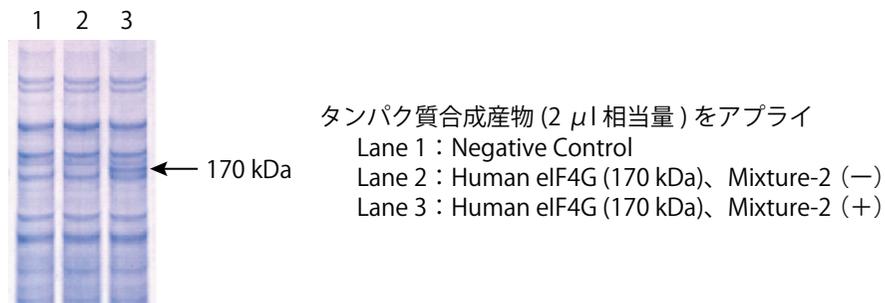


図 6. SDS-PAGE 結果

### 実験例 3：本システムを用いたタグ配列付加タンパク質の発現 (ウェスタンブロット解析)

#### [方法]

プロトコールに従いタンパク質合成反応を行った。SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロット解析にて目的タンパク質の検出を行った。検出には「DYKDDDDK」タグ配列認識抗体を使用した。

#### [結果]

ウェスタンブロット解析にて目的サイズ (80 kDa、200 kDa) のタンパク質を検出できました。

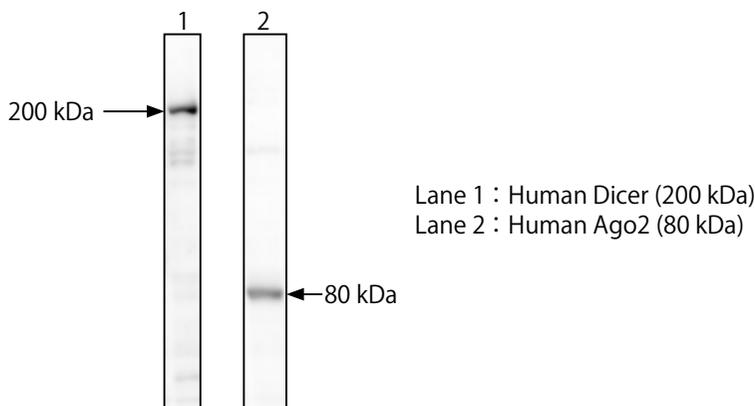


図 7. ウェスタンブロット解析結果

## VII. トラブルシューティング

### 1. 目的タンパク質の合成が確認できない。

目的タンパク質の合成量は、目的遺伝子の由来や配列、転写 RNA や合成タンパク質の反応液中での安定性などに大きく依存します。こうした目的遺伝子に起因する原因以外にも、操作に起因する合成量低下の原因として、以下の要因が挙げられます。

- ・反応時に各試薬の混合が不十分だった。  
→ Cell Lysate など粘性の高い溶液があるため、各反応液調製時にはピペティングで穏やかに十分混合してください。
- ・調製したプラスミドに高濃度のヌクレアーゼが含まれている。  
→ フェノール/クロロホルム抽出を行い、アルコール沈殿を行ってください。この際、アルコール洗浄にて十分洗浄を行い、フェノールが残存しないように注意してください。
- ・プラスミドの純度が低い。  
→ フェノール/クロロホルム抽出を行い、アルコール沈殿を行ってください。この際、アルコール洗浄にて十分洗浄を行い、フェノールが残存しないように注意してください。
- ・プラスミドの濃度が薄い。  
→ アルコール沈殿により濃縮を行ってください。
- ・各試薬の保存状態がよくない。  
→ 適切な温度にて保存してください。

### 2. コントロール反応における青色発色が薄い。

- ・反応時に各試薬の混合が不十分だった。  
→ Cell Lysate など粘性の高い溶液があるため、各反応液調製時にはピペティングで穏やかに十分混合してください。
- ・各試薬の保存状態がよくない。  
→ 適切な温度にて保存してください。

## VIII. 関連製品

Human Cell-Free Protein Expression Maxi System (製品コード 3285)  
pT7-IRES His-N DNA (製品コード 3290)  
pT7-IRES His-C DNA (製品コード 3291)  
pT7-IRES Myc-N DNA (製品コード 3292)  
In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639648/639649/639650)  
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer (製品コード 639633/639634/639635)  
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin (製品コード 639639/639640/639641)  
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023)  
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (製品コード 6024)  
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)  
Protein Molecular Weight Marker (Low) (製品コード 3450)  
Protein Molecular Weight Marker (High) (製品コード 3451)  
Protein Molecular Weight Marker (Broad) (製品コード 3452)  
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside) (製品コード 9031)

## IX. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・PrimeSTARはタカラバイオ株式会社の、In-FusionはTakara Bio USA, Inc.の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**