

製品コード 3285

研究用

Takara

Human Cell-Free Protein Expression Maxi System

説明書

v202012Da

Human Cell-Free Protein Expression Maxi System は、従来の哺乳類無細胞タンパク質合成システムに比べて極めて高いタンパク質合成能力を有する Human Cell-Free Protein Expression System の性能を最大限に活かしつつ、透析法を利用して目的タンパク質の大量合成を可能にしたシステムです。

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を行うことができます。

Maxi System では、タンパク質合成反応の進行に伴い不足する ATP 等やアミノ酸類を透析膜を介して持続的に供給することにより、高効率で長時間のタンパク質合成反応が可能となるためタンパク質収量を大幅に増大できます。

Human Cell-Free Protein Expression System を用いたバッチ法でのスクリーニング・発現確認の後、目的タンパク質の大量合成に Maxi System をご使用ください。

また、別売のタグ融合型発現ベクターを利用することで*、用途に応じてタグ (His、c-Myc) を付加したタンパク質を大量に合成でき、ウェスタンブロット解析による発現確認や精製にも有効です。

*：各種タグ融合型発現ベクターもご利用ください。(別売)

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)

I. 内容 (5 回用)

本製品は 3 つの製品からなります。

- | | |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Human Cell-Free Protein Expression System (製品コード 3281) *1 | 2 Kits |
| 2. Supplement Buffer (Human Cell-Free Protein Expression) (製品コード 3286) | 15 ml |
| 3. Dialysis Columns & Accessories (製品コード 3287) *2 | 5 Sets |

注) 製品コード 3286 および 3287 の単品販売は行っておりません。

* 1： Human Cell-Free Protein Expression System (製品コード 3281) の内容

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

* 3：使用直前に融解し、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°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。

* 4：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。

* 5： β -ガラクトシダーゼ遺伝子が挿入されています。

* 2： 以下の内容物が含まれています。G-Biosciences 社の製品です。

- Tube-O-DIALYZER, Micro 15K MWCO (5 本)

注) チューブには保存液が充填されています。また、パッケージ内にも乾燥防止用に若干の保存液が加えられています。

- Micro Dialysis Cup (5 個)
- Float for Micro, for Dialysis Cup (5 個)



Tube-O-DIALYZER,
Micro 15K MWCO



Micro Dialysis Cup



Float for Micro,
for Dialysis Cup

II. 保存

- Dialysis Columns & Accessories (製品コード 3287) : 4℃
(このうち、Micro Dialysis Cup および Float for Micro, for Dialysis Cup は室温保存も可能です。)

注) Tube-O-DIALYZER, Micro 15K MWCO は、開封して必要数を取り出した後、残った透析膜が乾燥しないよう再度しっかりと封を閉じて保存してください。

- 上記以外： - 80℃

III. 本製品以外に必要な試薬、器具 (主なもの)

- 各種チューブ
- エアインキュベーター等 (32℃インキュベート用)
- マグネティックスターラー
- ミニスターラーバー
 - ※ ミニスターラーバー (10 × φ4 mm : AS ONE 社 Code. 1-4206-01) を推奨
 - 【注意】 推奨品以外のミニスターラーバーを使用した場合、形状によっては、マグネティックスターラーで攪拌すると、容器 (Micro Dialysis Cup) の底が削れて摩耗粉が生じ、外液 (Supplement Buffer) が白濁する場合がありますが、タンパク質合成への影響はありません。
- SDS-PAGE 電気泳動装置一式
- CBB 染色、脱色試薬類

IV. 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。

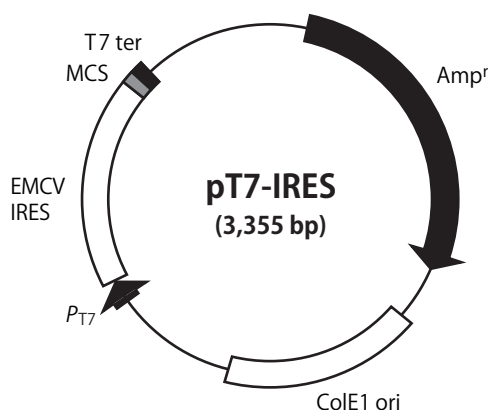


図 1. pT7-IRES Vector のベクターマップ

V. 操作

V-1. Tube-O-DIALYZER, Micro と Supplement Buffer の使用前準備

1. Tube-O-DIALYZER, Micro をパッケージから取り出し、透析膜付きキャップを外してチューブ内外の保存液を、ピペットや卓上遠心機などを使用し完全に除去する。チューブは透析反応で使用するまで埃がかからないよう保管する。
2. 滅菌済の 50 ml チューブ等に滅菌精製水を適量入れ、取り外した透析膜付きキャップを浸し軽く洗浄する。使用時までキャップの透析膜が乾燥しないよう滅菌精製水に浸して保管する。
3. Supplement Buffer を -80°C より取り出し、室温にて融解する。

V-2. タンパク質合成反応

1. Human Cell-Free Protein Expression System に含まれる以下の試薬を氷上にて融解する。適切な反応チューブに分注し、穏やかにピペティングを行いこれらを十分混合する。

Cell Lysate	36 μl
Mixture-1	24 μl
Mixture-2	4 μl

2. 室温にて 10 分間静置する。
3. 2. の 10 分間静置中に、Micro Dialysis Cup へ V-1. の 3. で融解しておいた Supplement Buffer を 3 ml 添加し、攪拌用にミニスターラーバーを投入する。使用時まで埃が入らないよう保管する。
4. 以下の各試薬を氷上にて融解し、2. の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) 反応液の粘度は非常に高いため、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	8 μl
発現プラスミド*1 (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	4 μl
T7 RNA Polymerase	4 μl

* 1 : 「IV. 発現プラスミドの構築」に従って構築した目的配列を有するプラスミド

5. V-1. で準備した透析用チューブへ 4. で調製した反応液 (80 μl) を移す。洗浄済みの透析膜付きキャップを取り出し、ピペット等で透析膜を傷つけないよう注意しながら内外の水分を除去し、透析用チューブにキャップをする。
6. 透析用チューブを反転させ反応液 (内液) をチューブ内側の透析膜に接触させる。この時、反転させたチューブ上部に反応液が残っている場合は、軽く振り下ろすことにより反応液全量をチューブ下部に落とし、反応液と透析膜を接触させる。
7. 反転させた透析用チューブを Float で固定して、3. で準備した Micro Dialysis Cup 中の Supplement Buffer (外液) へ透析膜が接触するよう設置する。
この時、透析膜と Supplement Buffer (外液) の間に気泡が入らないよう注意する。(図 3 参照)

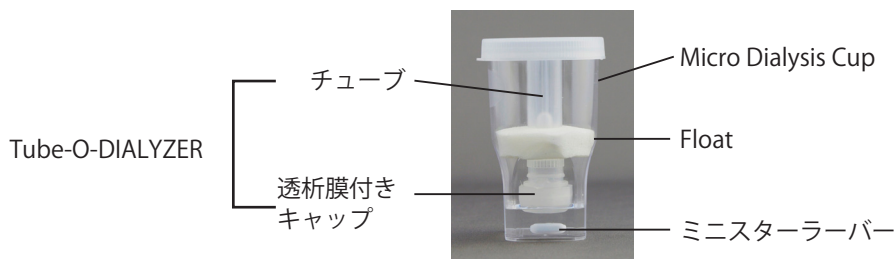


図 3. Maxi System を使用した透析法による *In vitro* Translation (IVT) 反応の設置例

-
8. エアインキュベーター中で穏やかにマグネティックスターラーで攪拌*2を行いながら透析法での *In vitro* Translation (IVT) 反応を行う。32℃で 12 ~ 24 時間*3 反応を実施する。
【注意】攪拌を開始した際に、透析膜と Supplement Buffer の間の気泡の有無を再度確認し、気泡がある場合は Micro Dialysis Cup を傾けて除去してください。
 - * 2 : 通常、十分な攪拌を行うためにマグネティックスターラーの使用を推奨しますが、シェーカーを使用した攪拌による透析反応も可能です。但し、予め使用するシェーカーでの攪拌試験を行い、十分な攪拌ができることを確認してください。
 - * 3 : 目的タンパク質によって最適な反応時間が異なる場合があります。通常は 12 ~ 18 時間の反応をお勧めします。
 9. 反応終了後、スピンドウンして反応液を透析用チューブ下部に回収する。透析膜付キャップを取り外し、保存用の新しいチューブに反応液を移す。
 10. 各種解析に使用するまで - 80℃で保存する。

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等によって検出することができます (VI. 実験例 参照)。別売のタグ融合型発現ベクターを使用すれば、目的タンパク質の用途に応じたタグ (His、c-Myc) を付加することができ、ウェスタンブロット解析による発現確認や精製にも有効です。

V-3. 操作上の注意

1. 発現プラスミドと Mixture-1 を除く各試薬は必ず氷上にて融解後直ぐに使用し、使用後は速やかに - 80℃にて保存してください。
2. Cell Lysate は小分け分注して保存することをお勧めします。
3. 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。
4. その他、Human Cell-Free Protein Expression System (製品コード 3281) の取扱説明書もご参照ください。

VI. 実験例

VI-1. Maxi System を用いた β -ガラクトシダーゼ (116 kDa) の大量発現

[方法]

プロトコールに従い β -ガラクトシダーゼ (116 kDa) の合成を行った (32°C で 18 時間反応)。比較のため、Human Cell-Free Protein Expression System を用いたバッチ法でのタンパク質合成も行った (32°C で 3 時間反応)。その後 SDS-PAGE および Agilent 2100 バイオアナライザによる解析を行い、目的タンパク質を検出した。

[結果]

目的サイズ (116 kDa) のタンパク質を検出できました。バッチ法に比べて透析法の方が同じ容量あたり約 4 倍の高収量の発現が確認できました。

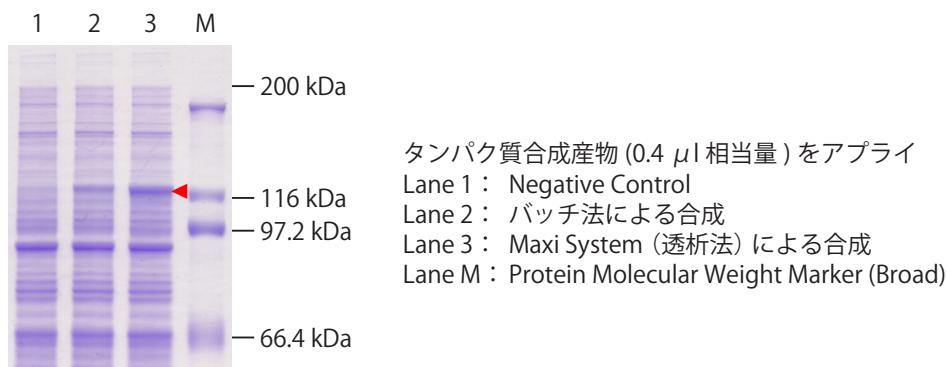


図 4. SDS-PAGE (CBB 染色) 解析結果

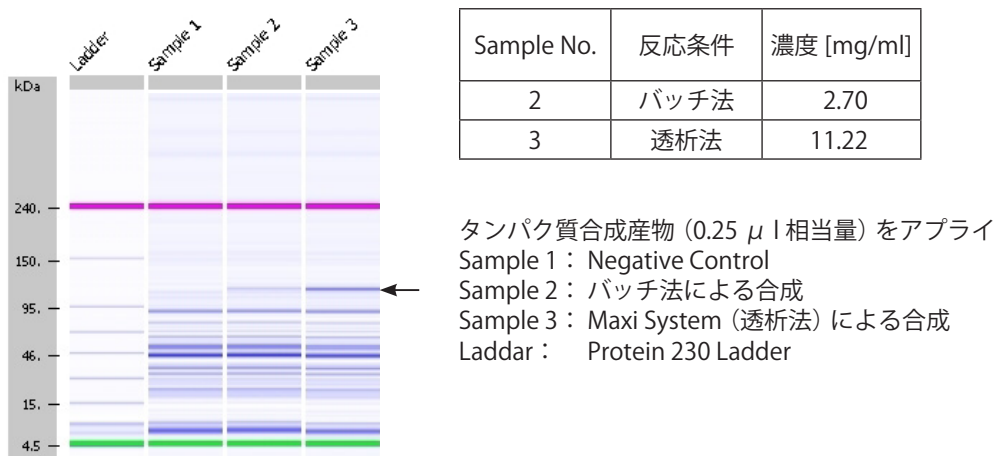


図 5. Agilent 2100 バイオアナライザ解析結果

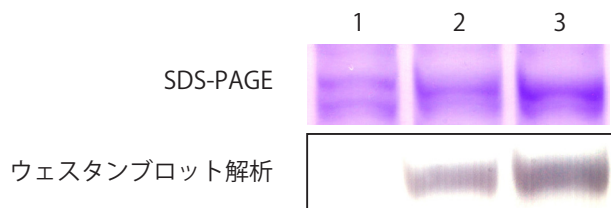
VI-2. Maxi System を用いた Human Ago2 (約 80 kDa) の大量発現

[方法]

プロトコールに従い Human Ago2 タンパク質 (約 80 kDa) の合成を行った (32°C で 18 時間反応)。比較のため Human Cell-Free Protein Expression System を用いたバッチ法でのタンパク質合成も行った (32°C で 3 時間反応)。その後 SDS-PAGE および Anti-Human Ago2, Monoclonal (Clone 1B1) (製品コード M211) を用いたウェスタンブロット (発色法) により、目的タンパク質を検出した。

[結果]

目的サイズ (約 80 kDa) のタンパク質を検出できました。バッチ法に比べて透析法の方が高収量の発現が確認できました。



タンパク質合成産物 (2 μ l 相当量) をアプライ (SDS-PAGE)

Lane 1 : Negative Control

Lane 2 : バッチ法による合成

Lane 3 : Maxi System (透析法) による合成

図 6. SDS-PAGE (CBB 染色) およびウェスタンブロットによる検出結果

VII. トラブルシューティング

1. 目的タンパク質の発現が確認できない。

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、エタノール沈殿を行ってください。この際、エタノ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、エタノール沈殿を行ってください。この際、エタノ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。
 - エタノ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. 透析法による目的タンパク質の合成量増加が確認できない。

透析法によるタンパク質の合成量は、目的とする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。こうした目的タンパク質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。

- 透析反応を行う際、反転させたチューブ上部に反応液が残り、透析が十分に行われていない。
 - 反転させたチューブ上部に反応液が残っている場合は、軽く振り下ろすことにより反応液全量をチューブ下部に落とし、反応液と透析膜をしっかりと接触させてください。
- Supplement Buffer (外液) と透析膜の間に気泡が入り、透析が十分に行われていない。
 - Supplement Buffer (外液) と透析膜を接触させる際、気泡が入らないよう十分注意してください。反応開始後、時々気泡が入っていないことを確認してください。特に攪拌を開始すると、気泡が出現することがあるので、その際は除去してください。
- 反応液 (外液) の攪拌が不十分だった。
 - 攪拌の状態により、ミニスターラーバーが停止し、攪拌が不十分となる場合があります。反応開始後、攪拌が問題なく行われていることを時々確認してください。

※ その他、Human Cell-Free Protein Expression System (製品コード 3281) の取扱説明書もご参照ください。

VIII. 関連製品

Human Cell-Free Protein Expression System (製品コード 3281)
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 など)
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)

[ヒスチジンタグ融合タンパク精製]

Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit (製品コード 635710)
TALON® Metal Affinity Resin (製品コード 635501 など)
His60 Ni Superflow Resin (製品コード 635659 など)

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、TALON は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。Capturem は Takara Bio USA, Inc. の商標です。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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社