

製品コード **CLD03, CLD07**

研究用試薬


ProteinExpress



CloverDirect™ ATTO 633
tRNA Reagent for Site-Directed Protein Labeling

取扱説明書 (Version 1.0)

- 本製品には無細胞翻訳に必要な細胞抽出液などは含まれておりませんので、別途ご用意ください。(大腸菌由来の製品(ロシュ・ダイアグノスティックス社 RTS100 *E.coli* HY kit など)を推奨)
- 包装袋のラベルに記載されている有効期限内に必ずご使用ください。
- 本製品は研究用試薬ですので、臨床診断用途には使用しないでください。
- 万一、試薬などが目や皮膚に付着した場合、また飲み込んだりした場合には、すみやかに医師に相談し、その指示に従ってください。
- 廃棄される場合は、各施設の化学物質廃棄要領に従ってください。

株式会社プロテイン・エクスプレス

URL : <http://www.proteinexpress.co.jp>

〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内

TEL : 043-202-5755

FAX : 043-202-5756

E-mail : tech@proteinexpress.co.jp



目次

1. はじめに.....	2
2. 製品内容	3
3. ピンポイント蛍光標識の原理	4
4. 発現遺伝子の作製	5
5. プロトコール	8
5- 1. 無細胞翻訳.....	8
5- 2. 標識タンパク質の合成確認	11
5- 3. 精製(例:His tag 精製).....	12
6. トラブルシューティング	14
7. Q&A.....	15
8. アプリケーション.....	16
9. 参考文献	17
10. 製品紹介	17
11. 製品についてのお問い合わせ先.....	17



1. はじめに

CloverDirect™ tRNA Reagent for Site- Directed Protein Labeling は、無細胞翻訳系においてタンパク質のアミノ酸一つを蛍光色素でピンポイントに標識するための試薬です。CloverDirect™を用いた蛍光標識法は従来の化学標識や GFP などの蛍光タンパク質との融合による方法とは大きく異なり、以下のような特徴を有しています。

1) 特定部位を定量的に標識できます。

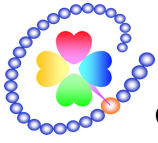
→化学標識法ではリジンやシステインなどタンパク質中のアミノ酸残基がランダムに標識されるため、特定部位を 100%の効率で標識することは難しく、また標識によりタンパク質の活性が低下あるいは消失することがあります。一方、GFP などの蛍光タンパク質との融合では、それ自体の分子量が大きいいため、標識によりタンパク質の活性が低下してしまうことがあります。CloverDirect™では N 末端領域の 1 か所のみ到低分子量の蛍光色素を定量的に導入することができ、標識するタンパク質に与える影響を最小限にできます。

2) 標識したタンパク質を 1 分子蛍光分析などに応用することができます。

→CloverDirect™では N 末端領域の 1 か所にのみ蛍光色素を標識することができるため、均一な標識タンパク質を分光学的に解析することが可能になります。特に、1 分子蛍光分析や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET) を用いたタンパク質の機能解析を行う上で、非常に強力なツールとなります。

3) 実験方法が簡単です。

→化学標識法では反応条件の最適化に労力を要しますが、CloverDirect™では、発現遺伝子にアンバーコドン変異を導入して、本製品とともに無細胞翻訳系に加えるだけで、簡単に標識タンパク質を合成することができます。



2. 製品内容

■ 本製品に含まれるもの

- ・標識アミノ酸-tRNA (注釈 2-1)
- ・tRNA buffer

※ 本製品には無細胞翻訳のための細胞抽出液などは含まれておりませんので、別途ご用意ください。(大腸菌由来の製品(ロシュ・ダイアグノスティックス社 RTS100 *E.coli* HY kit など)を推奨)

■ 保存条件

- ・-80℃

■ 品質保持期限

- ・未使用の状態：包装袋のラベルに記載
- ・tRNA buffer 溶解後は-80℃で2ヶ月

(注釈 2-1) 以下の標識アミノ酸-tRNA をご用意しています。

標識アミノ酸-tRNA	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	商品コード
HiLyte Fluor™488-tRNA	497	525	CLD01, CLD05
TAMRA-tRNA	546	575	CLD02, CLD06
ATTO 633-tRNA	629	657	CLD03, CLD07



3. ピンポイント蛍光標識の原理

本製品でのタンパク質の標識は、標識された非天然アミノ酸が翻訳中に取り込まれることで行われます。この標識アミノ酸は、翻訳系に取り込まれやすいように特別にデザインされたものです。

標識部位の指定は終止コドンの1つである UAG コドン(アンバーコドン)で行います。クローニングした遺伝子上で、タンパク質の N 末端領域(2~20 残基目を推奨)に UAG コドンを挿入または置換します。この遺伝子を、本製品の標識アミノ酸-tRNA (Figure 1)とともに無細胞翻訳系に加えると、tRNA が UAG コドンを読み取り、指定された位置に標識アミノ酸が導入されます(Figure 2)。この際、UAG コドンを終結因子が読み取った場合には、その時点でタンパク質合成が停止します。従って、完全長タンパク質として合成されたものは、100%の効率で標識されていることとなります。なお、標識アミノ酸の取り込みは N 末端領域で効率が高く、20 残基目以降では効率は大きく低下する傾向があるため、標識位置は N 末端領域(2~20 残基目)に設定することが推奨されます。

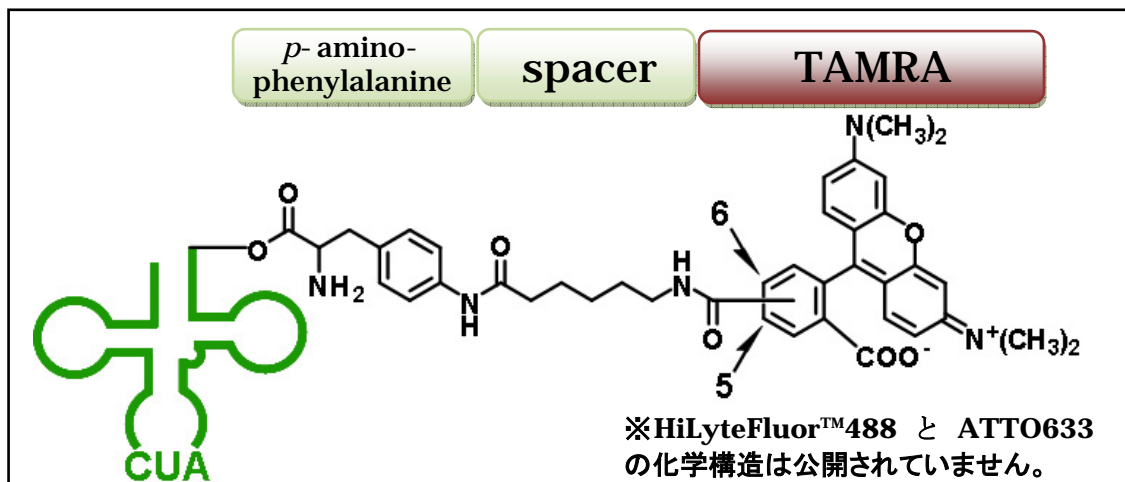


Figure 1 : 標識アミノ酸-tRNA の構造

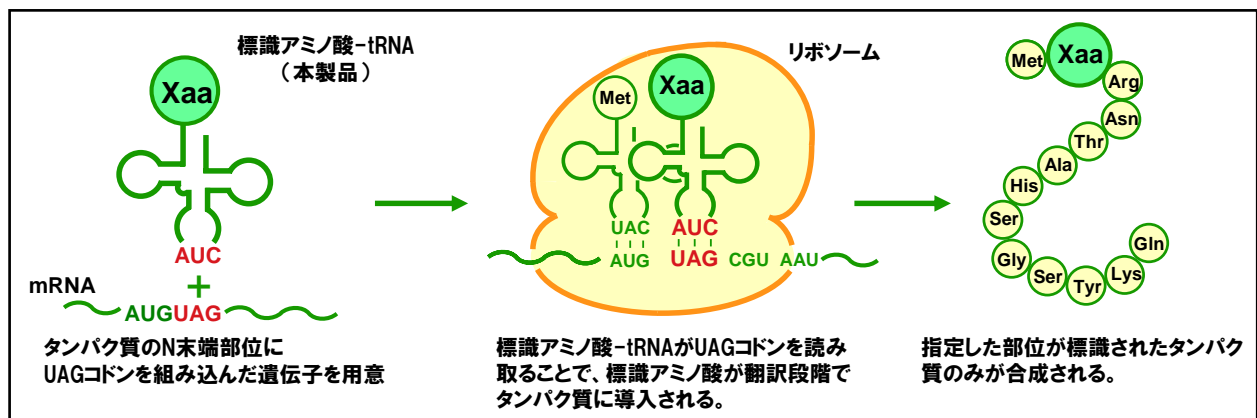


Figure 2 : タンパク質の標識



4. 発現遺伝子の作製

本製品を使用する場合、UAG コドンの挿入された遺伝子を、別途用意しておく必要があります。ご使用目的に合わせて、標識したい位置に UAG コドン挿入した遺伝子を作製してください。UAG コドンの挿入については以下をご参照ください。

1) 開始メチオニンの直後を標識する。

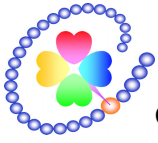
タンパク質のアミノ酸配列を変えずに標識したい場合には、開始メチオニンの直後に標識アミノ酸を挿入することが有効です。多くのタンパク質では N 末端の標識は活性や構造に大きな影響を与えないと考えられることから、開始メチオニンの直後に標識アミノ酸を挿入することで標識の影響を最小限にすることができます。また、実際にいくつかのタンパク質について、開始メチオニン直後に効率良く標識できることが確認されています (page 11 : Figure 6 参照)。

2) 任意の位置を標識する。

本製品では、使用目的に応じて、タンパク質の任意の位置を標識することができます。その場合は、標識位置のコドンを UAG に置換、あるいは UAG を挿入してください。ただし、標識位置は N 末端から 20 残基以内とすることを推奨します。20 残基目以降を標識する場合、標識タンパク質の発現効率が低い、または全く発現しない可能性があります。

3) N 末端タグの下流を標識する。

すでに N 末端タグを付加した発現系をご使用の場合は、タグの下流に UAG コドン挿入して標識することもできます。ただしその場合でも、UAG コドンは N 末端から 20 残基目までに挿入することを推奨します。20 残基目以降に挿入した場合、標識タンパク質の発現効率が低い、または全く発現しない可能性があります。



4) ProX® tag を用いて標識を行う。

ProX® tag (Figure 3)とは、CloverDirect™によるタンパク質の効率的な標識を目的として、弊社が開発したオリジナルのペプチドタグです。このタグは、大腸菌の無細胞翻訳系での発現量が高いタンパク質の N 末端領域の遺伝子配列を一部改変したもので、標識アミノ酸が取り込まれる位置、およびその前後の配列を最適化しています。このタグを目的のタンパク質の N 末端に付加することで、i) タンパク質発現量を向上させる、ii) 標識アミノ酸の取り込み効率を高める、という2つ効果を有します。そのため、以下のようなケースでは、ProX® tag を付加することをお勧めいたします。

```
5'- AUG UCU AAA CAA AUC GAA GUA AAC UAG UCU AAU GAG -3'  
Met Ser Lys Gln Ile Glu Val Asn Xaa Ser Asn Glu
```

Figure 3 : ProX® tag 配列

Case1. タンパク質自体の発現量が低い。

タンパク質の種類によっては、無細胞翻訳系での発現量が非常に低いものがあります。そのような場合には N 末端にタグを付加することが有効ですが、ProX® tag はその効果に加えて、標識アミノ酸の導入効率を高める効果もあるために、標識タンパク質の収量の向上が期待できます。

Case2. 非標識タンパク質の発現量が高い

UAG コドンの周辺配列によっては、UAG コドンが読み飛ばされて、目的サイズの未標識タンパク質が発現してしまう場合があります。ProX® tag は、UAG コドン前後の配列が最適化されていますので、このような場合において目的としない未標識のタンパク質の発現を低減できる可能性があります。



(発現遺伝子構築の重要事項)

- UAG コドンの前後配列や mRNA の 2 次構造、タンパク質の種類によって、標識タンパク質の発現効率が低い場合があります。
- お手持ちの遺伝子のストップコドンが UAG の場合は、他のストップコドン UAA または UGA に置換してください。
- 翻訳反応後、反応液中にはタンパク質に取り込まれなかった遊離の蛍光標識アミノ酸が残ります。ご利用目的によっては標識タンパク質の精製が必要になりますので、その場合は C 末端への His tag 等の精製 tag の付加を推奨します。

1) 開始メチオニンの直後を標識する。



2) 任意の位置を標識する。

※ N 末端から 20 残基以内の位置を推奨します。



3) N 末端タグの下流を標識する。

※ 標識位置は N 末端から 20 残基以内となるようにしてください。

(例: FLAG tag の場合)

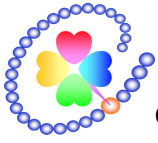


4) ProX® tag を用いて標識を行う。

UCU AAA CAA AUC GAA GUA AAC UAG UCU AAU GAG
Ser Lys Gln Ile Glu Val Asn Xaa Ser Asn Glu



Figure 4 : UAG コドンの挿入例



5. プロトコール

5-1. 無細胞翻訳

■ 別途用意する試薬

- ・無細胞翻訳系試薬 (大腸菌由来の製品 (ロシュ・ダイアグノスティック社 RTS100 *E.coli* HY Kit など)を推奨)
- ・標識部位に UAG コドンを持つ発現遺伝子(環状 DNA, 直鎖状 DNA, または mRNA)

(実験を始める前の重要事項)

- 標識アミノ酸-tRNA は、 -80°C で保存してください。一度溶解した標識アミノ酸-tRNA 溶液は、氷上に置き、使用後は速やかに -80°C に保存してください。
- 一度溶解した標識アミノ酸-tRNA は、凍結融解を 10 回程度は繰り返して使用することができます。また、 -80°C で保存すれば 2 か月まで保存可能です。適切に保存しなかった場合は、標識アミノ酸-tRNA が加水分解されてしまい、標識タンパク質の合成量が著しく低下する場合があります。
- 標識アミノ酸-tRNA はヌクレアーゼによって容易に分解されてしまいます。ヌクレアーゼの混入を防ぐために手袋を着用し、RNase, DNase フリーの反応チューブやチップの使用を推奨します。
- 非標識タンパク質の発現の有無を確認するために、標識アミノ酸-tRNA を添加しないコントロール反応を行うことをお勧めします。



以下には無細胞翻訳系としてロシュ・ダイアグノスティック社 RTS100 *E.coli* HY Kit を用いる場合の試薬の調製法について示します。他の無細胞翻訳系を用いる場合には、その製品の所定の反応組成に従って混合してください。その場合には、翻訳反応液 10 μ L に対して、溶解後の標識アミノ酸- tRNA 溶液を 1 μ L 使用してください。

※ タンパク質の種類によっては、本試薬を使用しても標識タンパク質の発現ができない場合がありますので、最初に小スケール(10 μ L)での発現確認をすることをお勧めします。また、ご使用目的に合わせて 50 μ L 以上へのスケールアップも可能です。

※ 標識タンパク質の発現量は標識アミノ酸- tRNA の濃度によって増加する場合があります。コントロール遺伝子として Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) 遺伝子を発現させた場合の発現量の比較を行っておりますのでご参照ください (page 10 : Figure 5) 。

反応組成(ロシュ・ダイアグノスティックス社 RTS100 *E. coli* HY kit を用いる場合)

成分	容量(μ L)
RNase フリー水	5
環状 DNA (100 ng / μ L), または直鎖状 DNA (100 ng/ μ L), または mRNA (8 μ g/ μ L)	5
アミノ酸	12
メチオニン	1
反応ミックス	10
標識アミノ酸- tRNA 溶液	5
<i>E. coli</i> ライセート	12
Total	50

※ 標識アミノ酸- tRNA を添加しないコントロール反応を行う場合は、標識アミノ酸- tRNA 溶液の代わりに RNase フリー水または tRNA buffer を添加してください。



操作手順

- (Step1) 標識アミノ酸-tRNA のチューブに 30 μL の tRNA buffer を加えて、完全に溶解してください。この際、標識アミノ酸-tRNA の乾燥粉末がチューブの蓋等に付着している場合がありますので、tRNA buffer を加える前に遠心して粉末をチューブの底に落としてください。
- (Step2) RNase フリー水、環状 DNA(または直鎖状 DNA, mRNA)、アミノ酸、メチオン、反応ミックスを、反应用チューブに混合してください。
- (Step3) Step1 で調製した標識アミノ酸-tRNA 溶液 5 μL と、*E.coli* ライセート 12 μL を、Step2 の反応液にすばやく混合してください。溶液が均一になるようにゆっくりピペティングした後、遮光して 30 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分~2 時間インキュベートしてください。
残った標識アミノ酸-tRNA は -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存し、2 か月以内に使用してください。
- (Step4) サンプルを氷上に移して反応を停止し、SDS-PAGE 等で発現確認を行ってください。(参照 page 11 : 5- 2. 標識タンパク質の発現確認)

参考データ

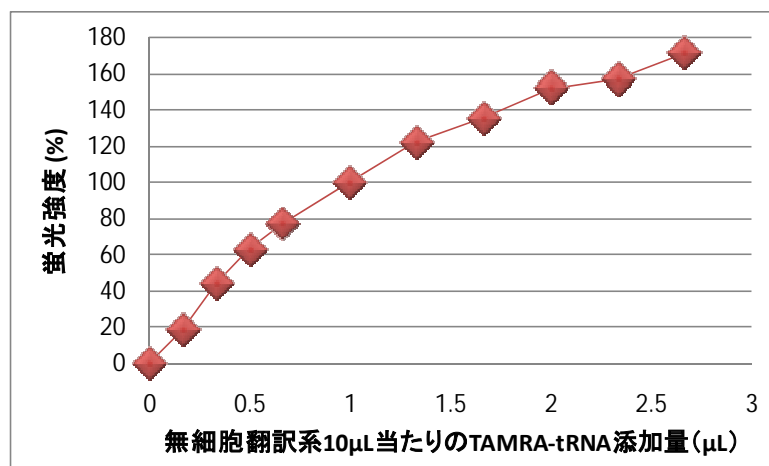


Figure 5 : TAMRA-tRNA と発現量の比較

TAMRA-tRNA (製品名: CloverDirect™ TAMRA, Cat.No.: CLD02, CLD06)を様々な濃度で添加して CAT 遺伝子を発現させた場合の標識タンパク質発現量を、SDS-PAGE ゲルの蛍光イメージ測定により比較した。

(無細胞翻訳系 10 μL 当たりの TAMRA-tRNA 添加量 1 μL の蛍光強度を 100%とした。)

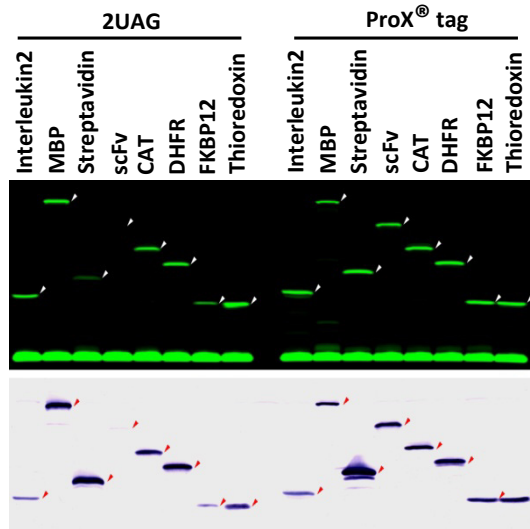


5-2. 標識タンパク質の発現確認

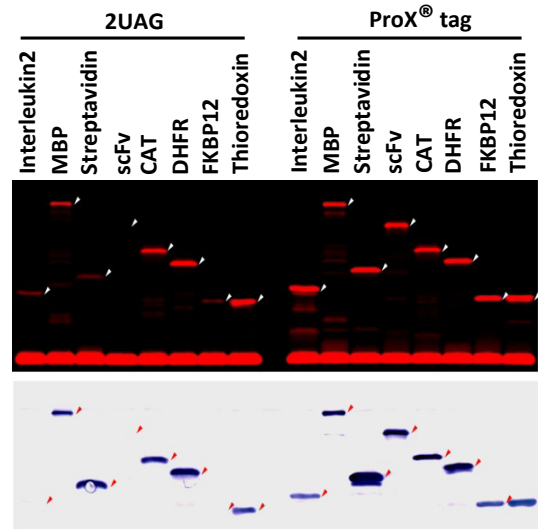
標識タンパク質は、SDS-PAGE で分離し、直接ゲルを蛍光イメージャーで検出できます。また、タグペプチド抗体などによるウエスタンブロットによっても検出することができます (Figure 6 参照)。通常は 1 レーン当たり、0.25~1 μ L の無細胞翻訳反応液で十分検出できます。

※ 反応液の中にはタンパク質に取り込まれなかった遊離の標識アミノ酸が多く含まれています。この遊離の標識アミノ酸は SDS-PAGE での検出において泳動先端に確認されます。

HiLyteFluor488



TAMRA



ATTO633

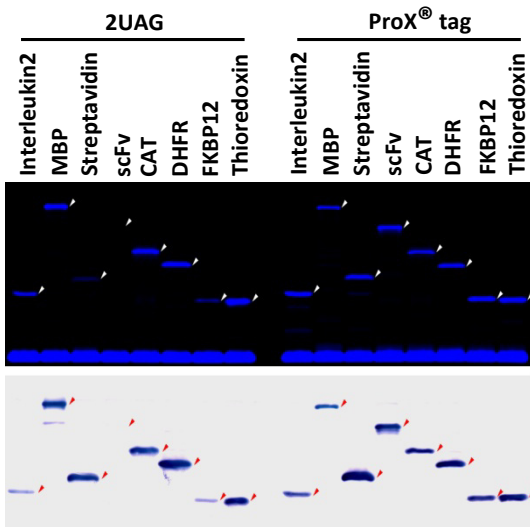


Figure 6 : 標識タンパク質の発現確認

2UAG : 開始 AUG 直後に UAG コドン挿入した遺伝子

ProX® tag : ProX® tag を付加した遺伝子

ゲルへのアプライ量 : 翻訳反応液 0.25 μ L 相当量

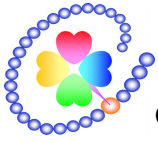
蛍光イメージャー検出波長(上図) :

HiLyteFluor488 励起 488nm / 検出 520 nm

TAMRA 励起 532nm / 検出 580 nm

ATTO633 励起 635nm / 検出 670 nm

ウエスタンブロット(下図) : 抗 His tag 抗体を使用



5-3. 精製(例:His tag 精製)

反応液の中には無細胞翻訳系のタンパク質が混在し、また標識タンパク質に取り込まれなかった標識アミノ酸も含まれていますが、His tag などのタグを使用した精製によって、標識タンパク質を単離することができます。以下には、His tag の精製カラムとしてGEヘルスケアバイオサイエンス社 His SpinTrap™ Columnを用いる場合について説明します。

※ 他の精製タグ、精製カラムを用いる場合には、そのタグ、製品の所定の方法に従って精製を行ってください。

■ 別途用意する試薬

・His SpinTrap™ Column (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)

・Wash buffer

(20 mM Phosphate buffer (pH7.4) / 0.5 M NaCl / 60 mM imidazole / 0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)

・Elute buffer

(20 mM Phosphate buffer (pH7.4) / 0.5 M NaCl / 0.5 M imidazole / 0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)

(実験を始める前の重要事項)

■ 初めて精製するタンパク質については、以下の各ステップで溶液を回収し、SDS-PAGE で確認することをお勧めします。



操作手順

- (Step1) His SpinTrap™ Column の底部を折り、2 mL チューブにセットしてください。(1.5 mL チューブを用いた場合、1 回の遠心ですべての溶液が排出されません)
- (Step2) 70~100 x *g* で 1 分間遠心してください。その後、排出液を捨ててください。
- (Step3) 500 μ L の Wash buffer をカラムに加え、70~100 x *g* で 1 分間遠心してください。その後、排出液を捨ててください。
- (Step4) 翻訳反応液 50 μ L と Wash buffer 350 μ L をカラムに加えてレジンとゆっくりと馴染ませてください。
- (Step5) 10 分間室温で放置後、70~100 x *g* で 1 分間遠心してください。
- (Step6) 排出液をチューブから取り除き、500 μ L の Wash buffer をカラムに加えてください。70~100 x *g* で 1 分間遠心してください。この操作を合計 3 回繰り返してください。
- (Step7) 最後の遠心が終わったら、カラムを新しい 2 mL チューブにセットしてください。
- (Step8) Elute buffer 200 μ L をカラムに加えて 10 分間室温で放置後、70~100 x *g* で 1 分間遠心してください。
- (Step9) 再び Step8 の操作を行ってください。
- (Step10) Step8,9 で得られた溶出溶液を合わせてください。
- ※ 溶出液は高濃度の NaCl, imidazole を含みます。測定に影響を及ぼす場合には、別途バッファ一置換を行ってください。



6. トラブルシューティング

■ タンパク質の合成量が少ない、あるいは全く合成されない	
1) 試薬の使用期限が切れている。	使用期限内のものを使用してください。
2) 試薬の保存状態が適切でない。	-80°Cで保存して、一旦溶解したものは2か月以内に使用してください。
3) DNase, RNase の混入。	手袋等を着用し、ヌクレアーゼの混入には十分注意してください。
4) 遺伝子の塩基配列が適切でない。	正しい読み枠で UAG コドンが挿入されていることを確認してください。
5) 無細胞翻訳系では発現が困難な遺伝子である。	ProX® tag を使用することによって改善される場合もありますのでお試しください。

■ タンパク質の活性が低い、あるいは全くみられない。	
1) ジスルフィド結合が必要なタンパク質である。	酸化型グルタチオン(GSSG)を翻訳反応中に入れると改善される場合があります。 (終濃度 10 mM 程度)
2) 翻訳後修飾が必要なタンパク質である。	大腸菌由来の無細胞翻訳合成系では翻訳後修飾はされません。
3) タンパク質が正常にフォールディングされていない。	タンパク質の種類によっては、通常の条件下ではフォールディングされない可能性があります。 リフォールディング条件を検討してください。

■ 精製後の標識タンパク質の純度が低い。	
1) 精製がうまく行われていない。	精製条件(洗浄回数、イミダゾール濃度など)を検討してください。
2) 精製後も遊離の標識アミノ酸が混入している。	ゲルろ過などによる脱塩処理を行ってください。



■ 蛍光イメージ、ウエスタンブロットによる確認ができない。	
1) 波長が合っていない。	適切な波長に設定してください。
2) SDS-PAGEに用いるサンプル量が少ない。	用いるサンプル量を増やしてください。
3) 標識タンパク質が合成できていない。	前ページを参照してください。

■ 蛍光イメージ、ウエスタンブロットにより複数のバンドが観察される。	
1) 標識タンパク質の発現に異常がある	遺伝子配列によっては、標識アミノ酸の上流のペプチドが切除される場合があります。また、フレームシフトによって途中で翻訳が停止したものが発現する場合があります。精製操作での除去を試みてください。
2) ウエスタンブロットで非特異的なバンドが生じている。	抗体の種類によっては、無細胞翻訳系由来のタンパク質と結合する場合があります。別の抗体をお試しください。

上記の解決法で改善できない場合は弊社までご相談ください。

7. Q&A

Q：無細胞翻訳系としてロシュ・ダイアグノスティックス社の RTS100 を推奨していますが、他社や自作の大腸菌無細胞翻訳系でも使用できますか？

A：基本的には使用できます。ただし、メーカーによっては標識タンパク質の発現効率が低い場合があります。

Q：大腸菌以外の無細胞翻訳系に使用できますか？

A：本製品は大腸菌の無細胞翻訳系用に開発した試薬です。

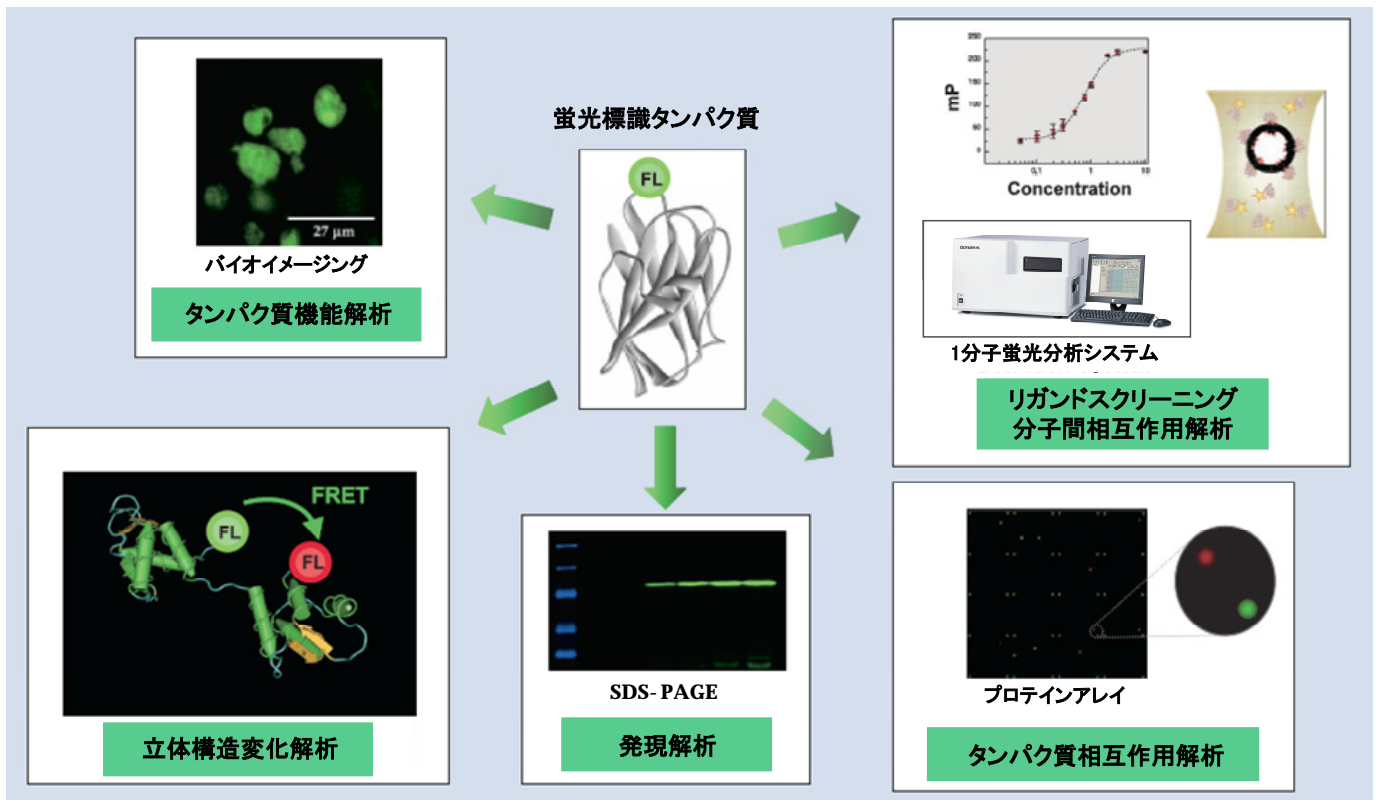
それ以外の無細胞翻訳系でも使用できる可能性はありますが、標識効率が低下する場合があります。



8. アプリケーション

本試薬を用いて合成した蛍光標識タンパク質は、以下のような測定に用いることができます。

- 1 分子蛍光分析を利用したリガンドスクリーニング
※1 分子蛍光分析システム MF20(オリンパス株式会社)
<http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/genome/>
- 分子間、分子内における蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)
(参考文献 1 および 2)
- 細胞内でのタンパク質機能分析
- タンパク質アレイを利用した相互作用解析
- SDS-PAGE によるタンパク質発現解析





9. 参考文献

1) FRET analysis of protein conformational change through position- specific incorporation of fluorescent amino acids

Daisuke Kajihara, Ryoji Abe, Issei Iijima, Chie Komiyama, Masahiko Sisido, Takahiro Hohsaka

Nature Methods, 3, 923- 929 (2006).

2) 遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成系の開発と応用

芳坂 貴弘, 生物物理, 47(2), 124- 128 (2007).

10. 製品紹介

標識アミノ酸- tRNA	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	商品コード
HiLyte Fluor™488- tRNA	497	525	CLD01, CLD05
TAMRA- tRNA	546	575	CLD02, CLD06
ATTO 633- tRNA	629	657	CLD03, CLD07
Biotin- tRNA	—	—	CLD04, CLD08

11. 製品についてのお問い合わせ先

株式会社プロテイン・エクスプレス

URL : <http://www.proteinexpress.co.jp>

〒260- 0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1- 8- 15

千葉大亥鼻イノベーションプラザ内

TEL : 043- 202- 5755

FAX : 043- 202- 5756

E- mail : tech@proteinexpress.co.jp



Memo