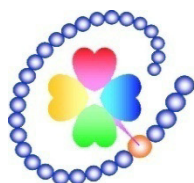


製品コード **CLD04, CLD08**

研究用試薬

  
ProteinExpress



# CloverDirect™ Biotin

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

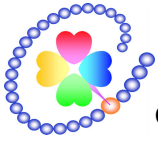
FAX : 043-202-5756

E-mail : [tech@proteinexpress.co.jp](mailto: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 ビオチン標識の原理 .....	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™ Biotin tRNA Reagent for Site-Directed Protein Labeling は、大腸菌由来の無細胞翻訳系を使用して、タンパク質のアミノ酸一つをビオチンでピンポイントに標識するための試薬です。CloverDirect™ を用いたビオチン標識法は、従来の化学標識やビオチン化タグペプチドとの融合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、ビオチンリガーゼによりビオチン化されるペプチド配列との融合法では、タンパク質内部をビオチン化することはできず、やや大きなペプチドを付加されてしまいます。CloverDirect™ Biotin ではタンパク質の特定の 1 か所のみでビオチンを定量的に導入することができます。

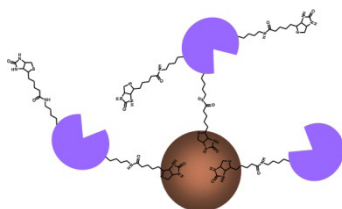
### 2) 標識したタンパク質を基板やビーズ上へ効果的に固定することができます。

→タンパク質の特定の 1 か所のみでビオチン標識することで、アビジン化基板やビーズに対して、配向を揃えてタンパク質を固定することができます。また、ビオチンには長鎖スペーサーを付加しているため、標識タンパク質はアビジンと効率良く結合することができます。

### 3) 実験方法が簡単です。

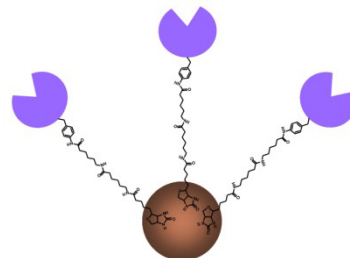
→化学標識法では反応条件の最適化に労力を要しますが、CloverDirect™ Biotin では、発現遺伝子にアンバーコドン変異を導入して、本製品とともに無細胞翻訳系に加えるだけで、簡単に標識タンパク質を合成することができます。

#### 従来の化学標識



- ・複数の箇所にビオチンが修飾される
- ・タンパク質の配向がそろわない
- ・タンパク質自体の活性が失われる場合がある

#### CloverDirect™



- ・特定のアミノ酸一か所のみをビオチンで修飾
- ・ビーズや基板上で一定の配向を持たせて固定化
- ・標識によりタンパク質の活性を失いにくい



## 2. 製品内容

### ■ 本製品に含まれるもの

- ・標識アミノ酸- tRNA (Biotin- tRNA)
- ・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



### 3. ピンポイント ビオチン標識の原理

CloverDirect™ Biotin でのタンパク質への標識は、Biotin 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、タンパク質の標識したい位置に 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 Biotin-tRNA(Figure 1)とともに無細胞翻訳系に加えると、Biotin-tRNA が UAG コドンを読み取り、指定された位置に Biotin 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になります。なお、翻訳中のタンパク質への Biotin 標識アミノ酸の取り込みはタンパク質の種類、UAG コドンの挿入位置によって大きく変動することがあります。

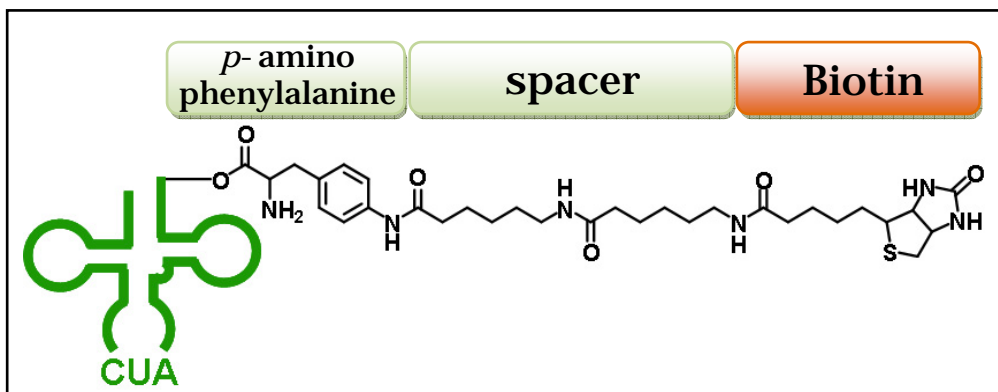


Figure 1 : Biotin-tRNA の構造

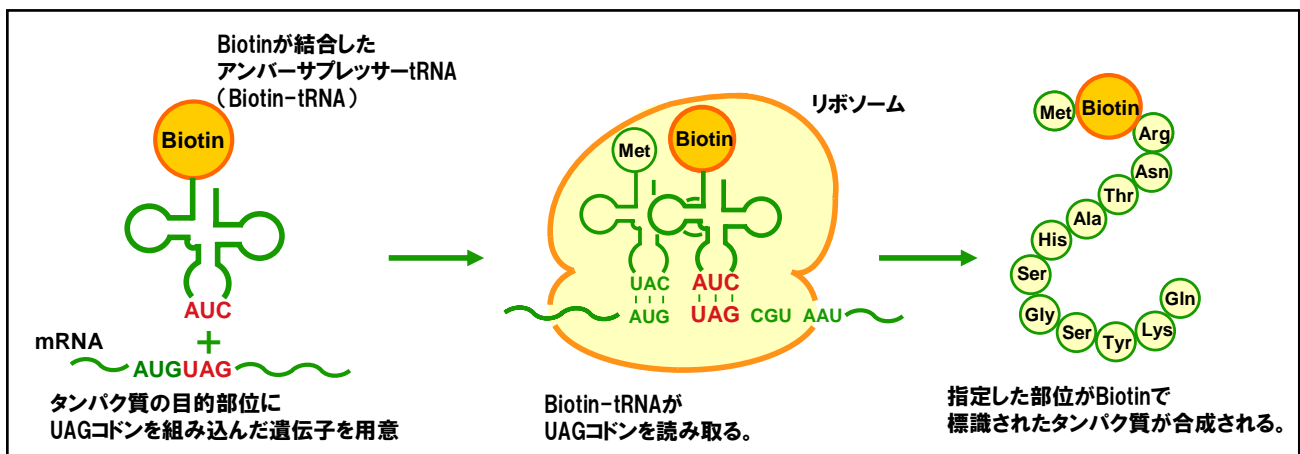


Figure 2 : Biotin-tRNA によるタンパク質の標識



#### 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、こう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、標識位置やその前後の配列によっては、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。ただし、標識位置やその前後の配列によっては、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。

※ 挿入位置、前後配列によっては標識効率が低い、もしくは標識されない場合があります。



3) N 末端タグの下流を標識する。

※ 挿入位置、前後配列によっては標識効率が低い、もしくは標識されない場合があります。

(例: FLAG tag の場合)



4) ProX® tag を用いて標識を行う。

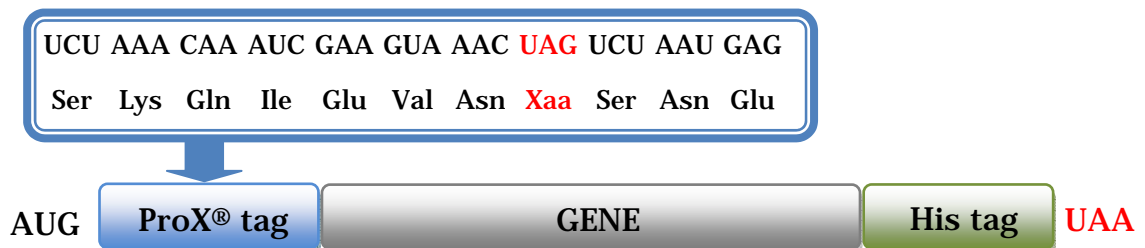
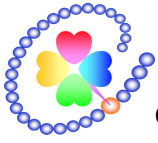


Figure 4 : UAG コドンの挿入例





## 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 (ロシュ・ダイアグノスティック社 RTS100 *E.coli* HY Kit 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、 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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、 $-80^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu\text{L}$  に対して、溶解後の標識アミノ酸-tRNA 溶液を 1  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ )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  $\mu\text{L}$  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( $\mu\text{L}$ )
RNase フリー水	5
環状 DNA (100 ng / $\mu\text{L}$ ), または直鎖状 DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ ), または mRNA (8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	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
<b>Total</b>	<b>50</b>

※ 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  と、*E.coli* ライセート 12  $\mu\text{L}$  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

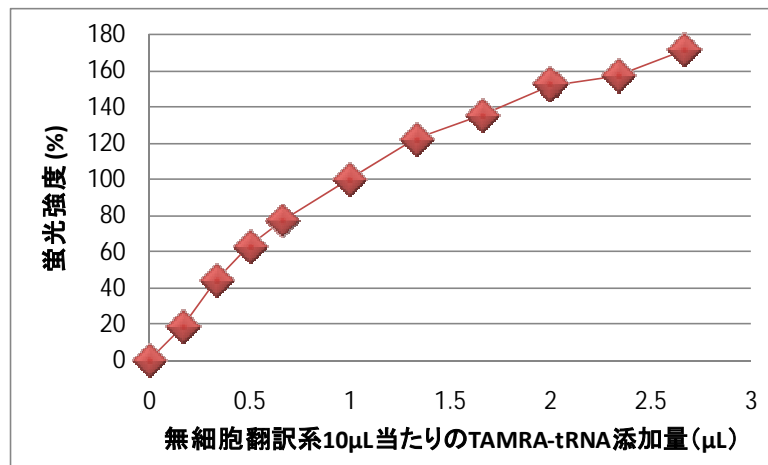


Figure 5 : TAMRA-tRNA と発現量の比較

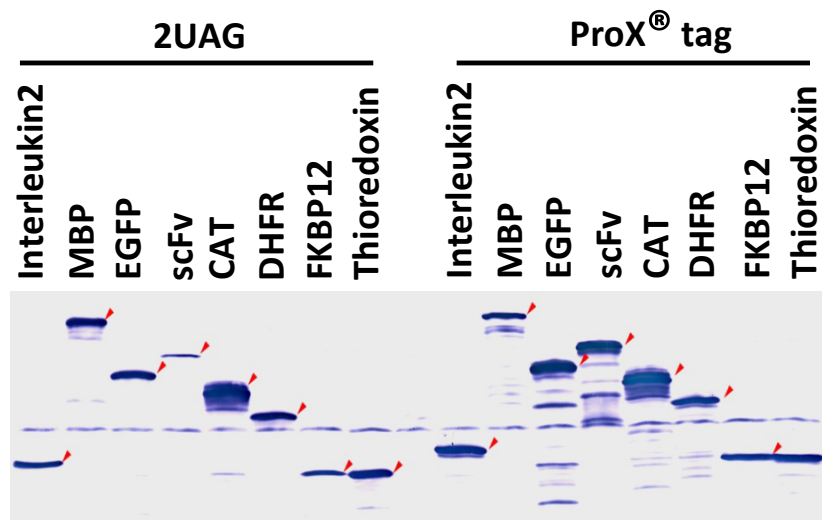
TAMRA-tRNA (製品名: CloverDirect™ TAMRA, Cat.No.: CLD02, CLD06)を様々な濃度で添加して CAT 遺伝子を発現させた場合の標識タンパク質発現量を、SDS-PAGEゲルの蛍光イメージ測定により比較した。

(無細胞翻訳系 10 $\mu\text{L}$  当たりの TAMRA-tRNA 添加量 1 $\mu\text{L}$  の蛍光強度を 100%とした。)



## 5-2. 標識タンパク質の発現確認

ビオチン標識タンパク質は、SDS-PAGE で分離し、抗ビオチン抗体あるいは抗タグペプチド抗体などを使用したウエスタンブロットによって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  $\mu$ L の無細胞翻訳反応液で十分検出できます。



**Figure 6 : ビオチン標識タンパク質の発現確認**

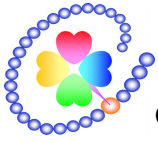
抗ビオチン抗体によるウエスタンブロット

2UAG : 開始 AUG 直後に UAG コドンを挿入した遺伝子

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  $\mu$ L 相当量

ウエスタンブロット: 抗ビオチン抗体を使用



### 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 μL 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 μL と Wash buffer 350 μL をカラムに加えてレジん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 μL 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 μL 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) 無細胞翻訳合成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。



■ウエスタンブロットによる確認ができない。

- |                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| 1) 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。 |
| 2) 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。     |

■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。

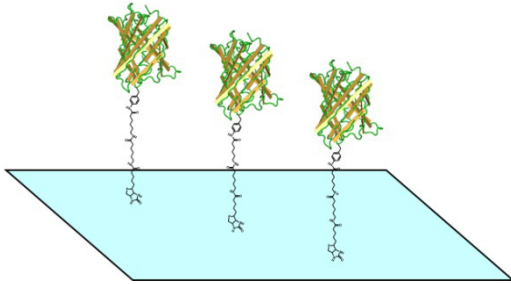




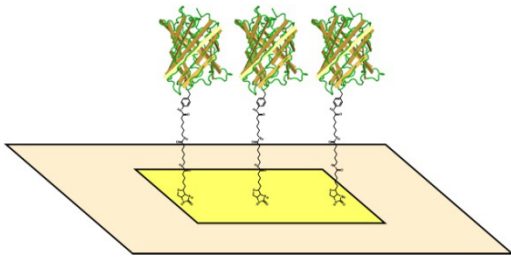
## 8. アプリケーション

本試薬を用いて合成した Biotin 標識タンパク質は、アビジンを固定化した基板、チップ、あるいはビーズなどを用いた、以下のような測定に使用することができます。

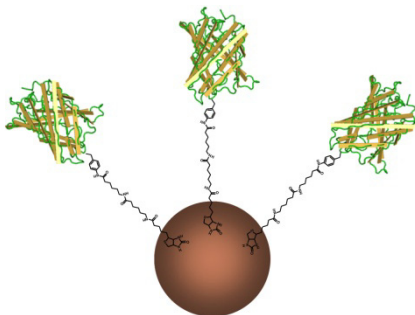
### ■ プロテインアレイ作製のための固定化



### ■ SPR 測定のためのセンサーチップへの固定化



### ■ 磁気ビーズへの固定化





## 9. 参考文献

- 1) Position-specific incorporation of biotinylated non-natural amino acids into a protein in a cell-free translation system  
Takayoshi Watanabe, Norihito Muranaka, Issei Iijima, and Takahiro Hohsaka  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361, 794- 799 (2007)
- 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](mailto:tech@proteinexpress.co.jp)



**Memo**