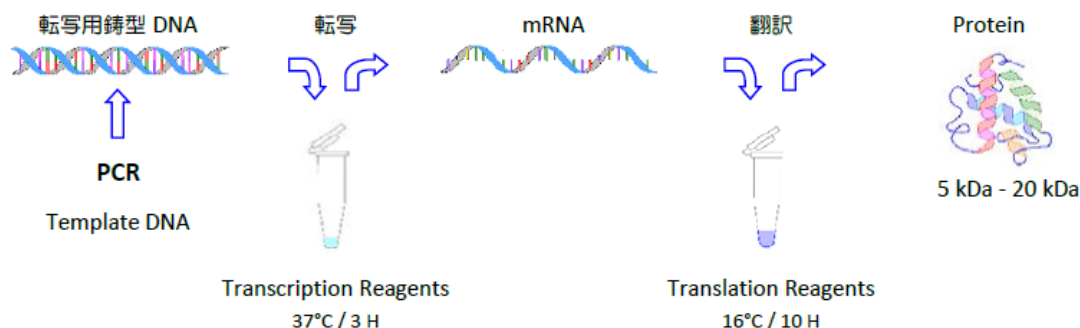

NUProtein 無細胞タンパク質合成キット
PSS3050
プロトコール

May, 2018 / V1.5
本書の一部または全部を無断転載することを禁じます

はじめに

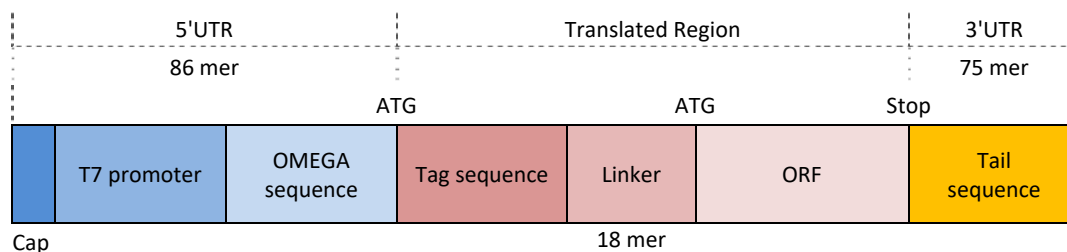
本キットを用いたタンパク質合成は、転写用鋳型の作成、転写、翻訳の3段階から構成されています。



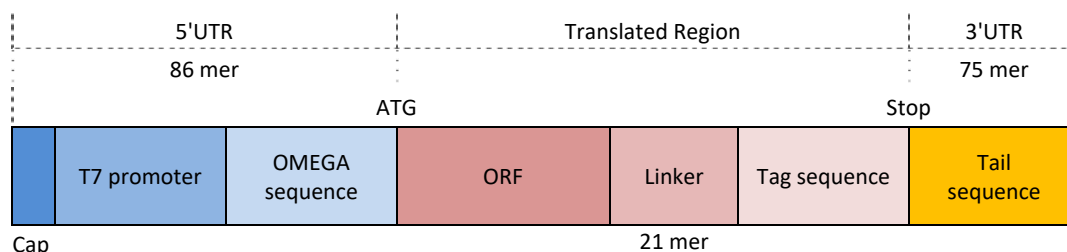
転写用鋳型の作成では、プライマーを事前に製作して頂く必要があります。

別添では5種の異なるタグ配列を示しており、2回PCRを実施頂くことで、効率的に複数のタグ配列を含む転写鋳型が作成できるようになっています。また、N末端、C末端それぞれにタグ付与が可能です。また、本プロトコルならびにプライマーリストは弊社ホームページ(<https://nuprotein.jp/knowledge-base/>)からダウンロード可能です。

N末端タグ鋳型 DNA 構造図



C末端タグ鋳型 DNA 構造図



なお、本編を通して、PCR酵素として、東洋紡株式会社 KOD®-Plus-Neo, タカラバイオ株式会社 PrimeSTAR®, PrimeSTAR® Max を用いた際のPCRプログラムを示しています。

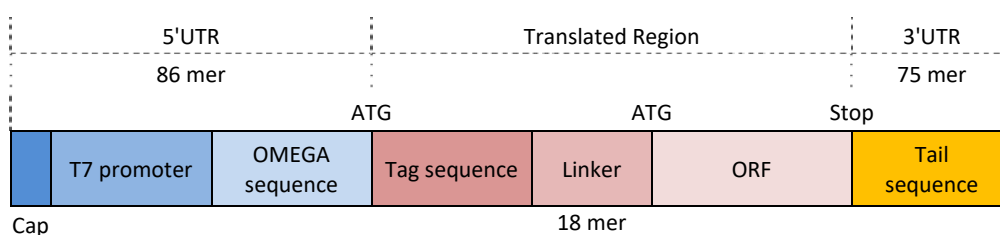
プライマーの設計

N 末端タグ鑄型 DNA の構造

N 末端タグ鑄型 DNA の構造および各パートのシーケンスは(Figure.1) および (Table. 1) のとおりです。

用意した ORF に長い配列を付加するため、プライマーの設計と PCR は通常よりも複雑になります。

(Figure.1) N 末端タグ鑄型 DNA 構造図



(Table.1)

Sequences / Part

Region	Site	Sequence 5' to 3'	Tag
5'UTR	Cap	CCCGC GAAAT	
	T7 promoter	TAATA CGACT CACTA TAGGG	
	OMEGA sequence	CTCAC CTATC TCTCT ACACA AAACA TTTCC CTACA TACAA CTTTC AAC TT CCTAT T	
Translated Region		ATG	
	Tag sequence	CAT CAT CAT CAT CAT CAT	6 x His
		GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG	FLAG
		TAT CCT TAT GAC GTG CCT GAC TAT GCC AGC CTG GGA GGA CCT	HA
		GGC CTG AAC GAC ATC TTC GAG GCC CAG AAG ATC GAG TGG CAC GAA	Biotin
	Linker	CTC CAG CAG GGA GGT ACT (Leu-Gln-Gln-Gly-Gly-Thr)	
ORF	ATG + NNNNNNNNNNN		
	Stop codon	TAA, TAG, TGA	
3'UTR	Tail sequence	AAAAA AAAAA GAGCT CTTGG ATCCG GCCAT AAGGT TGGAT CCGGC CATAA GGGCC TGATC CTTGC AGGGG GGGCC	

N 末端タグ転写鑄型用プライマー作成要領

PCR は 1st PCR, 2nd PCR の 2 段階で行うため、複数種のプライマーが必要となります。(Figure. 2)

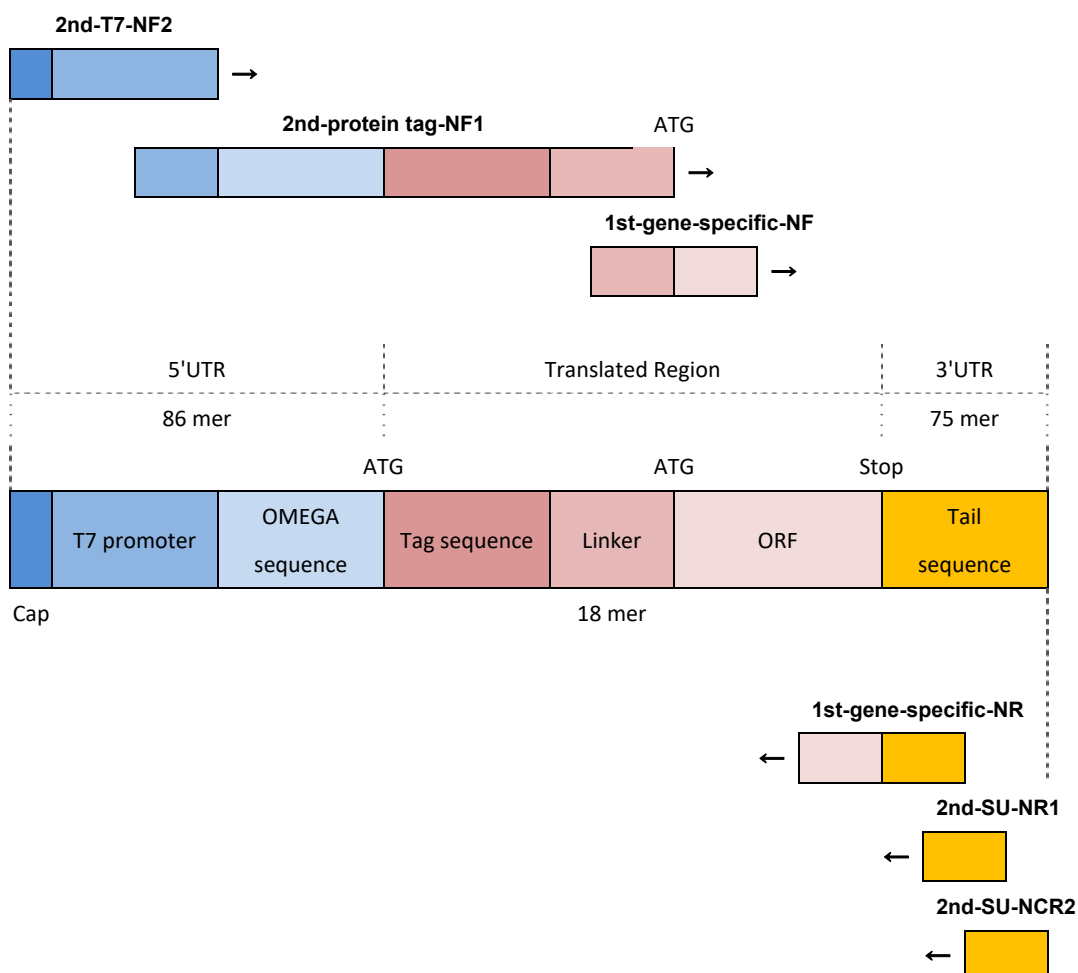
Primer List (His-tag 挿入例) は (Table.2) のとおりです。他の Tag 配列は (Table.1) を参考に赤文字の配列を変更して下さい。

Reverse primer は (Table.1) の配列と相補的な配列になるので注意して下さい。

non-Tag の場合、Tag 配列とその上流の ATG を除き、Linker はそのまま残して下さい。

Linker 配列は、適当なプロテアーゼ認識配列に変更可能です。

(Figure.2) N 末端タグ鑄型 DNA PCR イメージ



(Table.2)

Primer List / N-term His-tag Template DNA

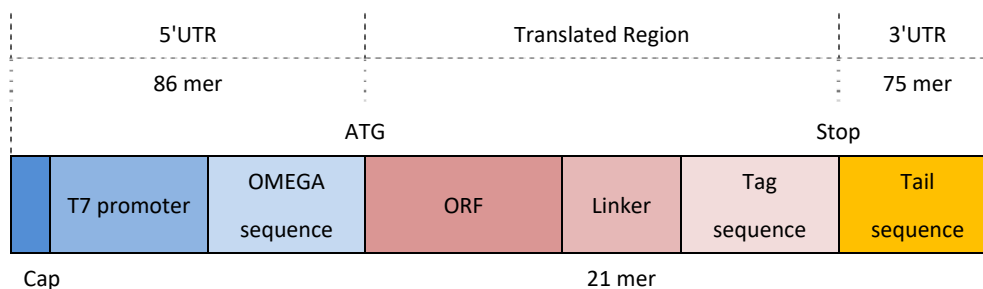
1st PCR		
primer type/name	primer form	primer sequence 5' to 3'
1st-gene-specific-NF	Gene specific 1st Fw primer	CCAGC AGGGA GGTAC T+ATG から始まる 5' 端 18 mer の配列
1st-gene-specific-NR	Gene specific 1st Rv primer	CCTTA TGGCC GGATC CAAGA GCTCT TTTT TTTT TA+Stop codon を除く 3' 端 18 mer の配列
2nd PCR		
primer type/name	primer form	primer sequence 5' to 3'
2nd-T7-NF2	Universal 2nd Fw primer	CCCGC GAAAT TAATA CGACT CACTA TAG
2nd-protein tag-NF1	2nd Fw primer-tag	CGACT CACTA TAGGG CTCAC CTATC TCTCT ACACA AAACA TTTCC CTACA TACAA CTTTC AACTT CCTAT TATGC ATCAT CATCA TCATC ATCTC CAGCA GGGAG GACT ATG
2nd-SU-NCR2	Universal 2nd Rv primer	GGCCC CCCCT CGAAG G
2nd-SU-NR1		CCCTC GAAGG ATCAG GCCCT TATGG CCGGA TCCAA

C 末端タグ鑄型 DNA の構造

C 末端タグ鑄型 DNA の構造および各パートのシーケンスは、(Figure.3) および (Table. 3) のとおりです。

N 末端タグと同様に、用意した ORF に長い配列を付加するため、プライマーの設計と PCR は通常よりも複雑になります。

(Figure.3) C 末端タグ鑄型 DNA 構造図



(Table.3)

Sequences / Part

Region	Site	Sequence 5' to 3'	Tag
5'UTR	Cap	CCCGC GAAAT	
	T7 promoter	TAATA CGACT CACTA TAGGG	
	OMEGA sequence	CTCAC CTATC TCTCT ACACA AAACA TTTCC CTACA TACAA CTTC AACTT CCTAT T	
Translated Region	ORF	ATG + NNNNNNNNNN	
	Linker	GGT CTC CAG CAG GGA GGT ACT (Gly-Leu-Gln-Gln-Gly-Gly-Thr)	
	Tag sequence	CAT CAT CAT CAT CAT CAT	6 x His
		GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG	FLAG
		TAT CCT TAT GAC GTG CCT GAC TAT GCC AGC CTG GGA GGA CCT	HA
		GGC CTG AAC GAC ATC TTC GAG GCC CAG AAG ATC GAG TGG CAC GAA	Biotin
Stop codon	TAA, TAG, TGA		
3'UTR	Tail sequence	AAAAA AAAAA GAGCT CTTGG ATCCG GCCAT AAGGT TGGAT CCGGC CATAA GGGCC TGATC CTTGC AGGGG GGGCC	

C 末端タグ転写鋳型用プライマー作成要領

PCR は 1st PCR, 2nd PCR の 2 段階で行うため、複数種のプライマーが必要となります。(Figure. 4)

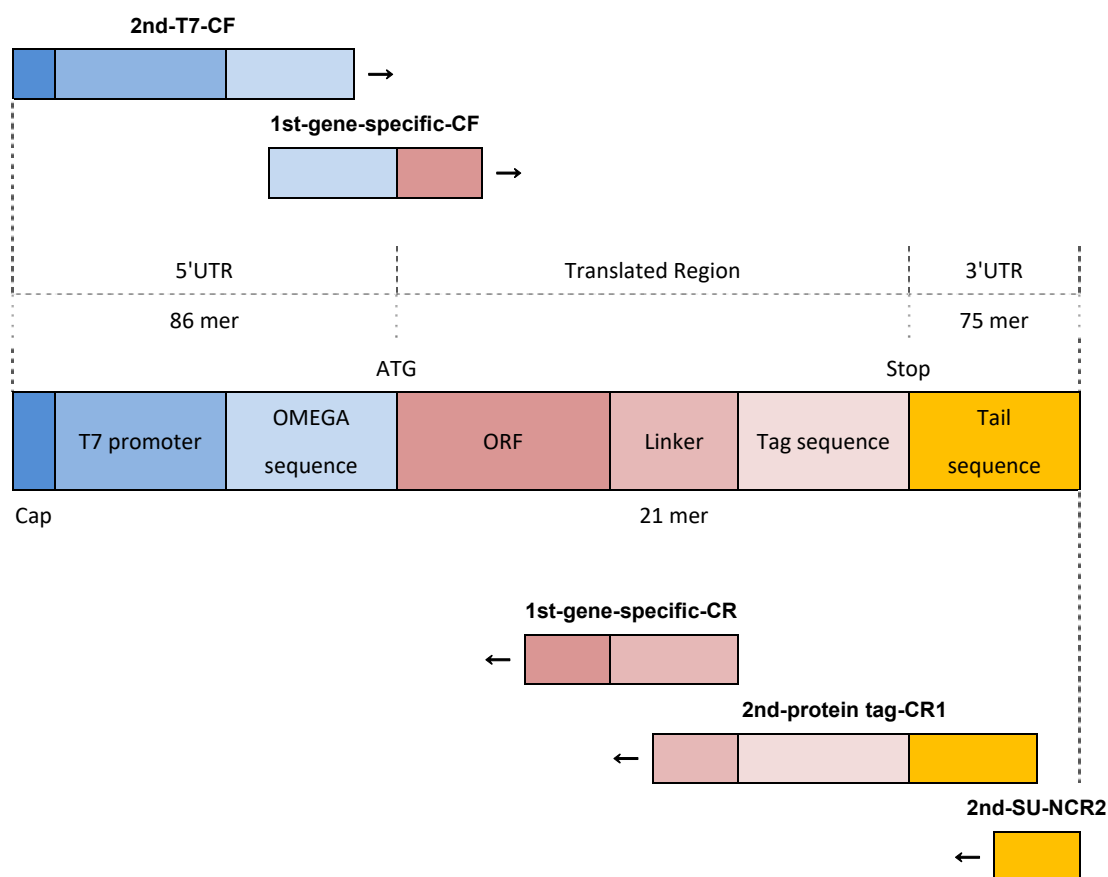
Primer List (His-tag 挿入例) は (Table.4) のとおりです。他の Tag 配列は (Table.3) を参考に赤文字の配列を変更してください。

Reverse primer は (Table.3) の配列と相補的な配列になるので注意して下さい。

non-Tag の場合、Tag 配列を除き、Linker はそのまま残して下さい。

Linker 配列は、適当なプロテアーゼ認識配列に変更可能です。

(Figure.4) C 末端タグ鋳型 DNA PCR イメージ



(Table.4)

Primer List / C-term His-tag Template DNA

1st PCR		
primer type/name	primer form	primer sequence 5' to 3'
1st-gene-specific-CF	Gene specific 1st Fw primer	CACAA AACAT TTCC TACAT ACAAC TTTCA ACTTC CTATT+ATG から始まる 5' 端 18 mer の配列
1st-gene-specific-CR	Gene specific 1st Rv primer	AGTAC CTCCT TGCTG GAGAC C+Stop codon を除く 3' 端 18 mer の配列
2nd PCR		
primer type/name	primer form	primer sequence 5' to 3'
2nd-T7-CF	Universal 2nd Fw primer	CCCGC GAAAT TAATA CGACT CACTA TAGGG CTCAC CTATC TCTCT ACACA AAACA TTTCC
2nd-SU-NCR2	Universal 2nd Rv primer	GGCCC CCCCT CGAAG G
2nd-protein tag-CR1	2nd Rv primer-tag	CCCTC GAAGG ATCAG GCCCT TATGG CCGGA TCAA GAGCT CTTTT TTTTT TTTAA TGATG ATGAT GATGA TGAGT ACCTC CCTGC TGG

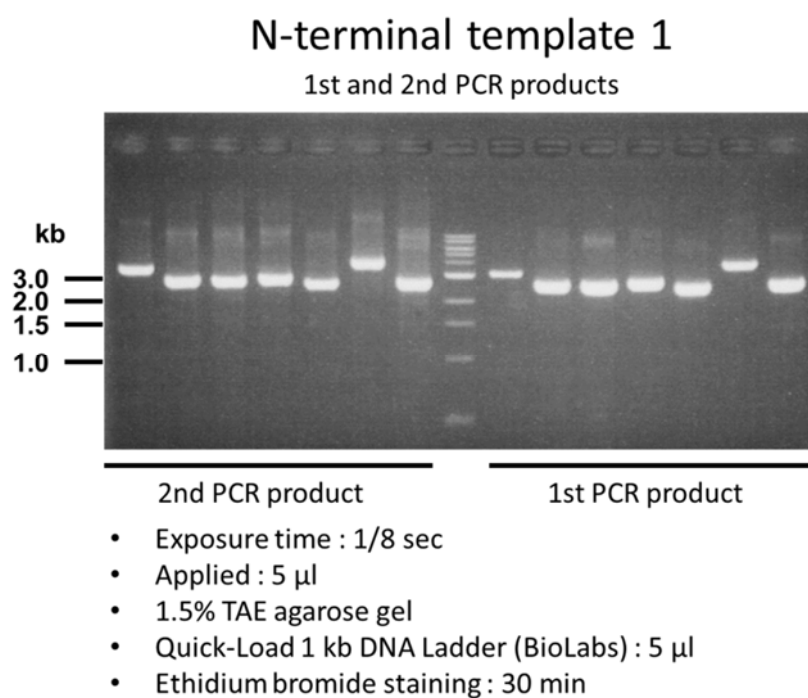
転写鋳型作成

1st PCR, 2nd PCR Product の検出

1st PCR, 2nd PCR の各段階の終了後毎に PCR 産物を以下の通り確認してください。

1. DNA サイズに応じた濃度の TAE アガロースゲルを作成し、電気泳動槽にセットする。
2. PCR Product を未精製の状態で、手順 1.のゲルに 3ul のサンプルをロードする。
3. 電気泳動完了後のゲルを、Ethidium Bromide で 30 分染色する。
4. トランスイルミネーターにより、DNA の蛍光検出を行う。

【N 末端タグ用 PCR Product の確認例】



PCR Product の確認の結果、不具合が確認される場合は次の①-③の順に再検討をします。

- ① PCR プログラムの再検討
- ② 反応溶液の組成調製
- ③ PCR プライマーの確認

1st PCR

1 サンプル分の組成及び反応プログラムを以下のテーブルに示します。
記述のプログラムは、増幅効率などを考慮し変更することも推奨します。

1st PCR 反応終了後、アガロースゲル電気泳動を用いて 1st PCR 産物 (3 µl) を確認してください。

なお、下記プログラム中 1st-gene-specific-F, 1st-gene-specific-R はそれぞれ、N 末端タグ転写鑄型用の場合、1ste-gene-specific-NF, 1st-gene-specifc-NR を示し、C 末端タグ転写鑄型用の場合 1st-gene-specific-CF, 1st-gene-specific-CR を示します。

KOD-Plus-Neo 利用時の組成と PCR プログラム

KOD-Plus-Neo ver.

Reagents	
10 X PCR buffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
25 mM MgSO ₄	3 µl
10 µM 1st-gene-specific-F	1 µl
10 µM 1st-gene-specific-R	1 µl
Plasmid	1 ng
KOD	1 µl
Sterile water	X µl
Total	50 µl

PCR program

Temp.	Time	Cycle
94°C	5 min	1
98°C	10 sec	30
55°C	30 sec	
68°C	3 min (1 min/kb)	
72°C	2 min	1
20°C	-	

PrimeSTAR 利用時の組成と PCR プログラム

PrimeSTAR ver.

Reagents	
5 X PrimeSTAR buffer	10 µl
2.5 mM dNTPs	4 µl
10 µM 1st-gene-specific-F	1 µl
10 µM 1st-gene-specific-R	1 µl
Plasmid	1 ng
Polymerase (2.5 U/µl)	0.5 µl
Sterile water	X µl
Total	50 µl

PCR program

Temp.	Time	Cycle
94°C	5 min	1
98°C	10 sec	30
55°C	30 sec	
68°C	(1 min./kb)	
72°C	2 min	1
20°C	-	

PrimeSTAR Max 利用時の組成と PCR プログラム

PrimeSTAR Max ver.

Reagents	
2 X PrimeSTAR Max Premix	25 μ l
10 μ M 1st-gene-specific-F	1 μ l
10 μ M 1st-gene-specific-R	1 μ l
Plasmid	1 ng
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

PCR program

Temp.	Time	Cycle
94°C	5 min	1
98°C	10 sec	30
55°C	30 sec	
72°C	(5 sec./kb)	
72°C	2 min	1
20°C	-	

2nd PCR

1st PCR Product は未精製、濃度未調製の状態で使用してください。

2nd PCR 反応終了後、アガロースゲル電気泳動を用いて 2nd PCR 産物 (3 µl) を確認します。

記述のプログラムは、増幅効率などを考慮し変更することも推奨します。

*1st PCR 産物は通常 1 µl 用います。

2nd PCR の夫々のプログラム

N 末端タグ、C 末端タグ用共に共通です。

PCR program (KOD or PrimeSTAR ver.)

Temp.	Time	Cycle
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	┌ 10 └
60°C	1 min	
68°C	3 min (1 min/kb)	
98°C	10 sec	┌ 30 └
60°C	15 sec	
68°C	3 min (1 min/kb)	
72°C	2 min	1
20°C	-	

PCR program (PrimeSTAR Max ver.)

Temp.	Time	Cycle
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	┌ 5 └
55°C	15 sec	
72°C	(5 sec./kb)	
98°C	10 sec	┌ 30 └
60°C	15 sec	
72°C	(5 sec./kb)	
72°C	2 min	1
20°C	-	

2nd PCR の N 末端タグ用組成

KOD-Plus-Neo ver.

Reagents	
10 X PCR buffer	5 μ l
2 mM dNTPs	5 μ l
25 mM MgSO ₄	3 μ l
10 μ M 2nd-T7-NF2	1 μ l
100 nM 2nd-protein tag-NF1	1 μ l
10 μ M 2nd-SU-NCR2	1 μ l
100 nM 2nd-SU-NR1	1 μ l
1st PCR product	1-5 μ l*
KOD	1 μ l
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

PrimeSTAR ver.

Reagents	
5 X PrimeSTAR buffer	10 μ l
2.5 mM dNTPs	4 μ l
10 μ M 2nd-T7-NF2	1 μ l
100 nM 2nd-protein tag-NF1	1 μ l
10 μ M 2nd-SU-NCR2	1 μ l
100 nM 2nd-SU-NR1	1 μ l
1st PCR product	1-5 μ l*
Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

PrimeSTAR Max ver.

Reagents	
2 X PrimeSTAR Max Premix	25 μ l
10 μ M 2nd-T7-NF2	1 μ l
100 nM 2nd-protein tag-NF1	1 μ l
10 μ M 2nd-SU-NCR2	1 μ l
100 nM 2nd-SU-NR1	1 μ l
1st PCR product	1-5 μ l*
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

2nd PCR の C 末端タグ用組成

KOD-Plus-Neo ver.

Reagents	
10 X PCR buffer	5 μ l
2 mM dNTPs	5 μ l
25 mM MgSO ₄	3 μ l
10 μ M 2nd-T7-CF	1 μ l
100 nM 2nd-protein tag-CR1	1 μ l
10 μ M 2nd-SU-NCR2	1 μ l
1st PCR product	1-5 μ l*
KOD	1 μ l
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

PrimeSTAR ver.

Reagents	
5 X PrimeSTAR buffer	10 μ l
2.5 mM dNTPs	4 μ l
10 μ M 2nd-T7-CF	1 μ l
100 nM 2nd-protein tag-CR1	1 μ l
10 μ M 2nd-SU-NCR2	1 μ l
1st PCR product	1-5 μ l*
Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

PrimeSTAR Max ver.

Reagents	
2 X PrimeSTAR Max Premix	25 μ l
10 μ M 2nd-T7-CF	1 μ l
100 nM 2nd-protein tag-CR1	1 μ l
10 μ M 2nd-SU-NCR2	1 μ l
1st PCR product	1-5 μ l*
Sterile water	X μ l
Total	50 μ l

転写

転写反応溶液の調製

以下のとおり、転写反応溶液を 1.5ml チューブ中で氷上調製します。

2nd PCR Product は、10x Transcription buffer と直接混合しないように注意してください。

Reagents (one reaction)	
10 X Transcription buffer (TB)	2.5 μ l
25 mM NTPs	2.5 μ l
0.1 M DTT	1.25 μ l
T7 RNA Polymerase	1 μ l
2nd PCR product	2.5 μ l
RNase-free water (DEPC)	15.25 μ l
Total	25 μ l

転写反応

1. 調製した転写反応溶液を軽くタッピングし、壁面についた溶液を落とすために卓上遠心機で軽く遠心する。
2. 溶液の蒸発防止のため、しっかりとキャップする。
3. 37°C のウォーターバスまたはインキュベーターで約 3 時間反応させます。
* 反応時間は標準 3 時間、最長 6 時間で反応させます。

転写産物の精製

1. 転写反応終了後、アガロースゲル電気泳動を用いて 1 μ l の転写産物を確認します。
2. 1 サンプル (25 μ l) に対して 10 μ l の 4 M 酢酸アンモニウムを加えてよく混ぜ、100 μ l の 100% エタノールを加え転倒混和し、卓上遠心機で数秒間遠心分離した後、氷上で 20 分間静置します。
* 中和剤は酢酸アンモニウム必須です
3. 遠心分離 (15,000 rpm、20 分、4°C) します。
4. 上清をピペットマンで除去後、卓上遠心機を用い数秒間遠心する。再度上清をピペットで除去する。この時、チップの先端が沈殿に触れないように注意します。

5. 沈殿が乾燥するまで静置します。チューブの蓋をあけておくため、不純物、埃、つばが混入しないように注意してください。

*核酸乾燥機は不可

6. 1 サンプル (25 μ l の転写反応液) に対して **70 μ l** の RNase free 水 (DEPC 水) を加え、mRNA ペレットを溶解します。

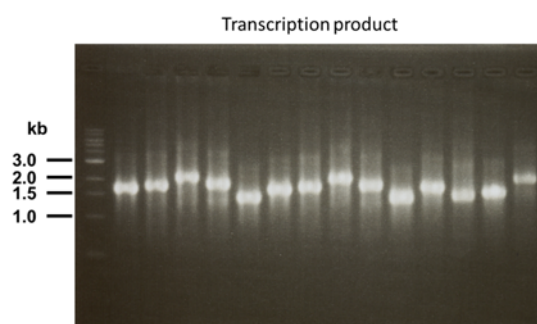
チップで沈殿をよく懸濁し、これを mRNA 溶液とします。

*チューブ壁面に mRNA が確認しにくい状態で付着している場合があるので注意

転写産物の確認

1. 転写産物(mRNA)の確認

精製完了後、電気泳動による mRNA の確認を行います。



- Exposure time : 1/15 sec
- Applied : 1 μ l
- 1.5% TAE agarose gel
- Quick-Load 1 kb DNA Ladder (BioLabs) : 3 μ l
- Ethidium bromide staining : 20 min

2. 転写産物の濃度測定

濃度測定を行う場合は、翻訳用サンプルとは別にフェノール/クロロホルム系の精製を行います。

1 転写反応からの mRNA の目標収量は、**25ug** 以上です。

翻訳

翻訳反応溶液の調製

次のとおり翻訳反応液を 1.5ml または PCR チューブ中で調合します。

翻訳溶液組成の内、mRNA 以外の試薬を先に調合し、**常温に戻してから**、mRNA 溶液に加え、泡をたてないように優しくポンピングします。

mRNA の濃度を把握していない場合、翻訳反応液へ添加する mRNA の目安は、1 転写反応で合成される mRNA を 1 翻訳反応溶液に添加します。

Reagents	
Wheat germ extract	20 μ l
Amino acid mix	20 μ l
mRNA	70 μ l
Total	110 μ l



翻訳反応 (混合法)

1. 16°C のインキュベーターへ入れ一晩 (10 時間以上) 反応させます。
2. サンプルをポンピングで軽く混ぜてエッペンチューブに回収し、遠心分離 (15,000 rpm、10 分、4°C) した後、上清を-80°Cにて保存します。

翻訳反応 (透析法)

混合法に替えて、透析法もご利用頂けます。透析法では透析カップの内側（試料溶液）に翻訳液を入れ、透析外液として追加の Amino acid mix をご利用ください。透析外液は、20 倍～100 倍容量が一般的です。

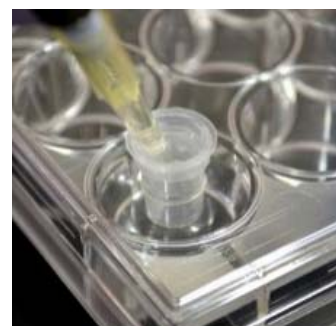
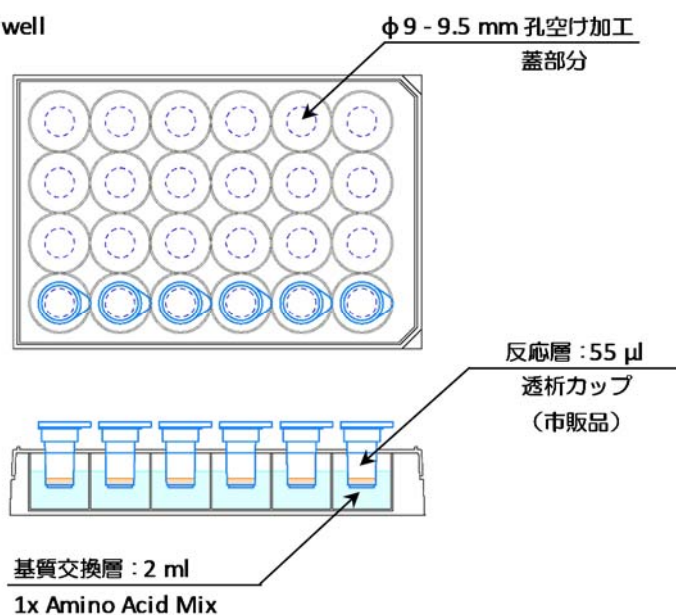
サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 Slide-A-Lyzer™ Mini 透析ツール (試料 0.1 ml、分子量カットオフ 3.5K) を利用する場合：

- 24 穴タイタープレート 1 ウェルに超純水で 4 倍希釈した Amino Acid Mix を 2ml 入れ、プレートの蓋をします。
* 2 ml のエッペンドルフチューブが透析カップと合致しますので、2 ml のエッペンドルフチューブで透析可能です。
- プレートの蓋に透析カップを挟み込みます。
- 調製した翻訳反応溶液 110 μ l を全量吸い取り、透析カップに泡が入らないようにやさしく注入します。
ピペットの 2 段階プッシュは泡立ちの原因となります。その後、透析カップの蓋を閉じます。この時、試料溶液(反応層)の液面と透析外液(Amino Acid Mix)の液面が同じレベルか、試料溶液の液面が若干低いようにセットしてください。
- 16°C のインキュベーターへ入れ一晩 (10 時間以上) 反応させます。

また、24 穴タイタープレートに 9mm 程度の穴あけを行い、透析カップを配置することで、収まりの良い透析が可能ですが、穴あけ加工が困難な場合はマイクロチューブ用のフローターを使用します。

* キットには透析法に十分量の Amino acid mix は含まれておりませんので、透析法を行う場合は、透析法 4 反应用 別売 Amino acid mix(製品名：AAMX004)をお買い求めください。

Titer plate/24 well



タンパク質の確認

アクリルアミドゲルの電気泳動により、翻訳産物を下記の通り確認します。

1. 翻訳反応終了後、超純水により翻訳反応溶液を3倍量までFill upし、穏やかに攪拌する。
2. 15,000rpm, 20min, 4℃にて遠心後、上清を回収する。
3. 1-2ul程度のサンプルをアクリルアミドゲルで電気泳動する。
4. 染色方法に応じた検出をする。

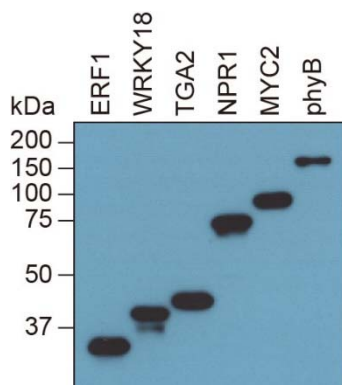
上記手順について

手順1. について、Fill upの目的は、検出用サンプルの節約やオーバーロード回避のため、また、可溶化されていない合成物の可溶化のために行います。3倍量までのFill upであれば反応溶液の緩衝能力を維持していますが、これを超えてFill upする場合は注意します。特に必要がなければ、この手順は省略します。

手順2. について、沈殿物にはWheat Germ由来の成分の他、可溶化されていない目的物も含まれることがあります。必要であれば、沈殿物を適当なBufferで再懸濁して目的物をさらに回収します。上清からの目的物回収量に疑問があるときは、この操作により可溶化率を把握し、翻訳反応液の最適化による改善をします。

手順3. について、電気泳動用サンプルの量は、ウエスタンブロット、銀染色、CBB染色、いずれも1-2ul程度で検出します。免疫染色以外の検出では、Wheat Germ成分も検出される為、多量のサンプルロードは推奨されません。

下記は、本キットを用いてFLAG®融合タンパク質を合成し、抗FLAG®抗体を用いたウエスタンブロットでこれらタンパク質を検出した結果です。





無細胞タンパク質合成キット(PSS3050)は研究用試薬です。

「KOD®」ならびに「KOD-Plus-Neo」は東洋紡株式会社の登録商標または商標です。

「PrimeSTAR®」ならびに「PrimeSTAR® MAX」はタカラバイオ株式会社の登録商標または商標です。「FLAG®」は Sigma-Aldrich Co. LLC の登録商標です。「Slide-A-Lyzer™」は Thermo Fisher Scientific Inc.の商標です。

その他記載されている会社名・商品名などは、各社の商標および登録商標です。

記載の試薬、製品などには、必ずしも商標表示 ((R)、TM) を付記していません。

お問合せ先：

NUProtein 株式会社

本店

〒650-0045 神戸市中央区港島 9-1

神戸インキュベーションオフィス 305 号室

☎ 078-599-8421 📠 078-599-8423

✉ contact@nuprotein.jp

🌐 <http://nuprotein.jp/>

徳島研究所

〒770-0942 徳島市昭和町 3-20-1