



ENDEXT[®] Technology

ProteoLiposome Expression Kit

(Catalog No. CFS-TRI-PLE)

株式会社セルフリーサイエンス

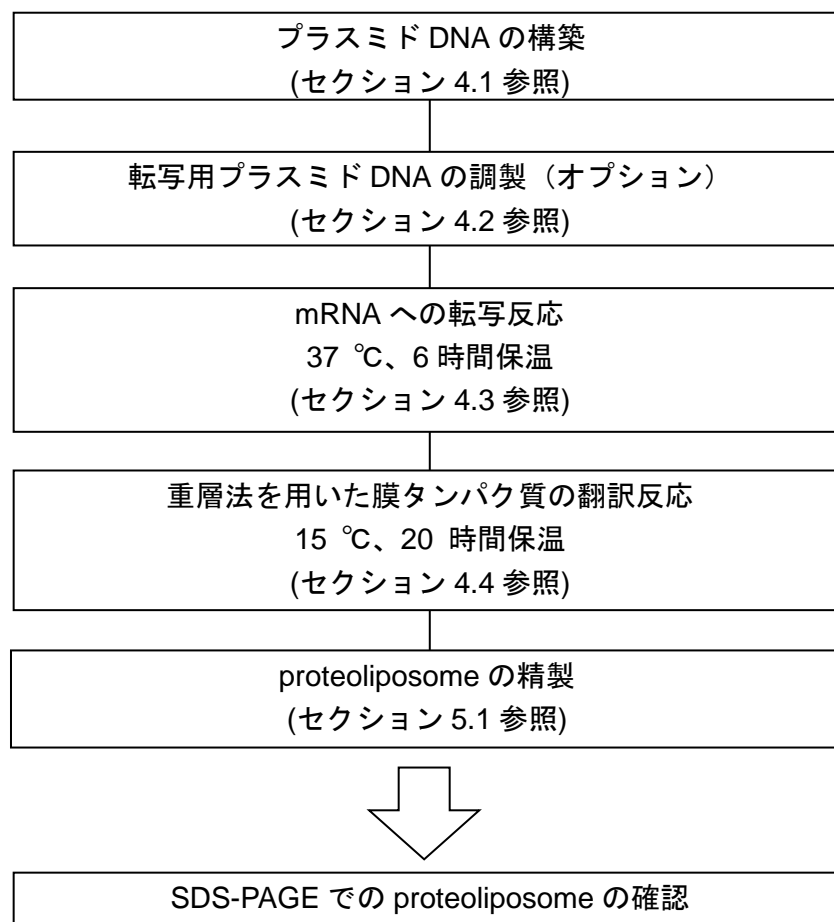
目次

1	本キットについて.....	2
2	プロトコルの概要.....	2
3	キット及び必要試薬・消耗品.....	3
3.1	キットの内容.....	3
3.2	試薬の取り扱い方法.....	3
3.3	キット以外に必要な試薬・消耗品・実験器具.....	4
3.3.1	プラスミド DNA の調製に必要な試薬.....	4
3.3.2	膜タンパク質の合成、精製に必要な試薬・消耗品・実験器具.....	4
4	膜タンパク質合成プロトコル.....	5
4.1	プラスミド DNA の構築.....	5
4.2	プラスミド DNA の高純度調製 (オプション).....	7
4.3	プラスミド DNA を鋳型とした mRNA への転写反応.....	8
4.4	重層法を用いた膜タンパク質の翻訳反応.....	9
4.4.1	Asolectin Liposome の調製 (再水和).....	9
4.4.2	翻訳反応.....	9
5	Proteoliposome の簡易精製.....	11
5.1	Proteoliposome の簡易精製.....	11
5.2	Proteoliposome の確認.....	11
6	その他.....	13
6.1	ラベルライセンスポリシー.....	13
6.2	商標.....	13
6.3	その他.....	13
7	連絡先.....	14

1. 本キットについて

本製品は、コムギ無細胞タンパク質合成システムにリポソームを共存させることで、従来法では合成困難であった膜タンパク質を proteoliposome として合成させるキットです。リポソームは大豆のアゾレクチン由来の脂質で構成されています。本キットには 6 反応分の膜タンパク質合成に必要な試薬が含まれています。

2. プロトコルの概要



3. キット及び必要試薬・消耗品

3.1 キットの内容

試薬名	本数	濃度	液量	箱の色
WEPRO [®] 7240	1	240 OD	1 ml	白
SUB-AMIX [®] SGC S1	1	40x	1.1 ml	
SUB-AMIX [®] SGC S2	1	40x	1.1 ml	
SUB-AMIX [®] SGC S3	1	40x	1.1 ml	
SUB-AMIX [®] SGC S4	1	40x	1.1 ml	
5x Transcription Buffer LM	1	5x	0.4 ml	
NTP Mix	1	25 mM	0.2 ml	
SP6 RNA Polymerase	1	80 U/μl	30 μl	
RNase Inhibitor	1	80 U/μl	30 μl	
Creatine Kinase	1	20 mg/ml	20 μl	
pEU-E01-T1R1 plasmid	1	1 mg/ml	30 μl	
Asolectin Liposome, lyophilized	6	(10 mg)	凍結乾燥品	緑

3.2 試薬の取り扱い方法

試薬名	説明	保存温度
WEPRO [®] 7240	WEPRO [®] 7240 (コムギ胚芽抽出液) は温度や振動に敏感です。流水で解凍した後すぐに氷上に移して下さい。初めての解凍後、凍結融解を繰り返さないために分注して保存することをお勧めします。またタンパク質合成活性に影響があるため3回以上の凍結融解は避けて下さい。解凍後に本試薬を使用する際は泡立えないようゆっくりピペティングし混合した後ご使用下さい。凍結時には液体窒素で凍結した後-80℃で保存して下さい。	-80℃
SUB-AMIX [®] SGC (S1, S2, S3, S4)	本試薬は40倍濃縮された4つの試薬で構成されています(S1, S2, S3, S4)。-20℃以下で保存して下さい。10回の凍結融解後も活性に影響はありません。タンパク質合成1反応に必要な4mlの1x SUB-AMIX [®] SGCを調製する際は、それぞれ0.1mlのS1からS4までの試薬を3.6mlのnuclease free waterに添加・混合して下さい。始めに40倍濃縮された試薬同士を混合すると沈澱が生じ、溶解に時間がかかる場合があります。1x SUB-AMIX [®] SGCは分注して-80℃で保存し、凍結融解は避けて下さい。	-20℃ or -80℃
5x Transcription Buffer LM	5倍濃縮された試薬です。10回の凍結融解後も活性に影響はありません。	-20℃

(次ページに続く)

(続き)

NTP Mix	ATP, GTP, CTP, UTP が終濃度 25 mM で混合された試薬です。10 回の凍結融解後にも活性に影響はありません。	-20°C
SP6 RNA Polymerase	50%グリセロールが添加されています。	-20°C
RNase Inhibitor	50%グリセロールが添加されています。	-20°C
Creatine Kinase (*)	凍結融解は活性に影響があります。付属の Creatine Kinase は一度のみの使用として下さい。	-80°C
pEU-E01-T1R1 plasmid	ポジティブコントロール (T1R1 タンパク質) のプラスミドです。	-20°C
Asolectin Liposome, lyophilized	凍結乾燥品です。詳細はセクション 4.4.1 をご参照下さい。再水和後の Asolectin Liposome は、一度のみの使用として下さい。	室温以下

(*) Creatine Kinase は Roche Applied Science から購入出来ます (Catalog No. 10127566001)。Nuclease-free water で 20 mg/ml のストック溶液を調製して下さい。調製後、分注して -80°C で保存して下さい。凍結融解は活性に影響がありますので避けて下さい。

3.3 キット以外に必要な試薬・消耗品・実験器具

3.3.1 プラスミド DNA の調製に必要な試薬

(詳細はセクション 4.2 をご参照下さい。)

試薬名	説明
フェノール/クロロホルム	フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 25:24:1, pH 7.9
クロロホルム	> 99%クロロホルム
エタノール	> 99%エタノールおよび 70%エタノール
酢酸ナトリウム	3 M, pH 5.2
TE バッファー	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0. Sterilized. TE バッファーを調製する際は、必ず nuclease-free water をご使用下さい。DEPC 処理水は推奨しません。

3.3.2 膜タンパク質の合成、精製に必要な試薬・消耗品・実験器具

試薬・消耗品	説明
Nuclease-free water	DNase, RNase free。DEPC 処理水は推奨しません。
PBS	Phosphate buffered saline
6 well plate	細胞培養用平底 6 well culture plate。表面未処理。
プレートシール	6 well plate 上部をシールする
インキュベーター	37°C、15°C
遠心機	1.5 ml tube、50 ml tube

4. 膜タンパク質合成プロトコル

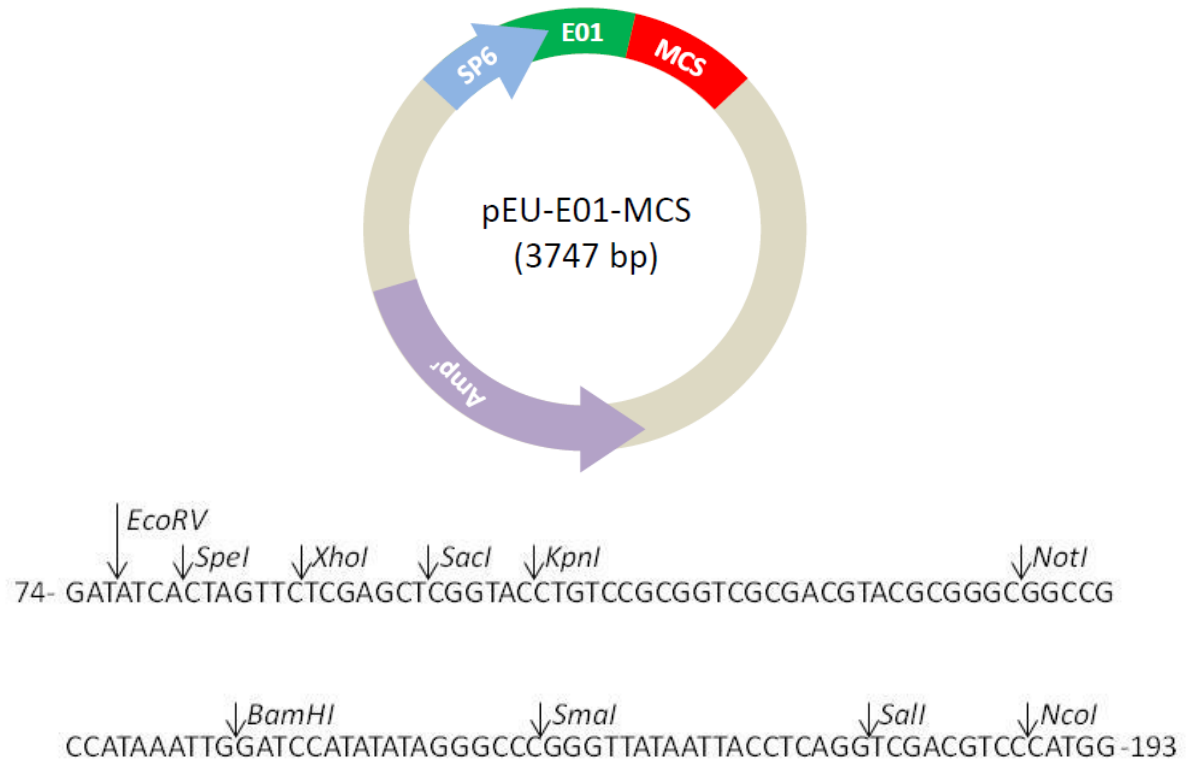
4.1. プラスミド DNA の構築

- 1) pEU-E01-MCS ベクターのマルチクローニングサイトに、目的タンパク質をコードする塩基配列を次ページのベクター情報を参考に適切な制限酵素を選択して挿入する (*1)。pEU-E01-MCS ベクターは、次ページの図の様に SP6 プロモーター、E01 翻訳促進配列、アンピシリン耐性遺伝子を持っています。
- 2) 目的塩基配列を挿入した pEU-E01-MCS ベクターを大腸菌 (例 ; JM109 株) に形質転換し、培養する。
- 3) 市販品のプラスミド DNA 精製キットを使用して、大腸菌からプラスミド DNA の抽出と精製を行う。QIAGEN 社製品を用いる場合、Plasmid Midi Kit あるいは Plasmid Maxi Kit の使用を推奨します。Miniprep による精製は推奨しません。
- 4) 精製したプラスミド DNA の濃度と純度を、吸収波長 260 nm および 280 nm での吸光度を測定し確認する。吸収波長 260 nm での吸光度からプラスミド DNA 濃度を、吸収波長 260 nm/280 nm の比からプラスミド DNA の純度を算出する (*2)。
- 5) TE バッファーを適量加えて、プラスミド DNA 濃度が 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるよう調製する。

(備考)

- *1 タンパク質の合成効率を上げるため、制限酵素サイトは出来るだけ E01 翻訳促進配列 (Translational enhancer) に近い部位を選択して下さい。
- *2 必要なプラスミド DNA の純度:
吸収波長 260 nm/280 nm の比の範囲が 1.70~1.85 になるようにして下さい。比の範囲から外れていた場合、プラスミド DNA に夾雑物が含まれている可能性が考えられます。その際は、セクション 4.2 に記載されている操作を行い、プラスミド DNA を調整し直して下さい。

(Multiple cloning site information)



pEU-E01-MCS sequence

SP6 promoter: -17~1

Translational enhancer (E01):1~73

Multiple Cloning Site: 74~193

Origin: 1190~1830

Ampicillin resistance gene: 1974~2838

ポジション1はSP6プロモーター配列の最後のGに位置します。(以下の配列中の下線):
 ATTTAGGTGACACTATAGG

4.2. プラスミド DNA の高純度調製 (オプション)

タンパク質の合成には、高純度のプラスミド DNA が必要です。市販品のプラスミド DNA 精製キットで調製したプラスミド DNA の純度 (*1) が低かった場合および、転写反応後の転写産物をアガロースゲル電気泳動した際に 500 bp よりも小さな分子サイズの位置にスミアないしラダーパターン (セクション 4.3 をご参照下さい) が確認された場合には、以下の手順でフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、プラスミド DNA の精製を行って下さい。

- 1) 精製したプラスミド DNA 溶液 (セクション 4.1 を参照) に等量のフェノール/クロロホルム (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1、pH 7.9) を加え、よく混ぜる。
- 2) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心する。
- 3) 新しいチューブに上層液 (プラスミド DNA 溶液) を移す(*2)。
- 4) 3) のチューブにプラスミド DNA 溶液と等量のクロロホルムを加え、よく混ぜる。
- 5) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心する。
- 6) 新しいチューブに上層液 (プラスミド DNA 溶液) を移す。
- 7) 6) のチューブにプラスミド DNA 溶液の 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2.5 倍量の 100%エタノールを加える。
- 8) -20°Cで 10 分間静置する。
- 9) 15,000 rpm、4 °Cで 20 分間遠心する。
- 10) 上清を除いた後、冷えた 70%エタノール 800 µl を加え DNA ペレットを洗浄する。
- 11) 15,000 rpm、4 °Cで 5 分間遠心する。
- 12) 上清を除く。
- 13) DNA ペレットを風乾させる (10~20 分) 。
- 14) DNA ペレットの量に応じて適量の TE バッファーを加えて溶解させる。
- 15) 分光光度計を使用して、DNA の紫外線波長 260 nm と 280 nm の吸光度を測定する。260 nm の吸光度より DNA の濃度を、260 nm と 280 nm の吸光度比より DNA の純度を算出する(*1)。
- 16) TE バッファーを適量加えて、DNA 濃度を 1.0 µg/µl に調整する。

(備考)

*1 必要なプラスミド DNA の純度:

吸収波長 260 nm/280 nm の比の範囲が 1.70~1.85 になるようにして下さい。比の範囲から外れていた場合、プラスミド DNA に夾雑物が含まれている可能性が考えられます。その際は、再度セクション 4.2 の手順を繰り返し、調整し直して下さい。

*2 タンパク質を含んでいる中間層を吸引しないように注意して下さい。

4.3. プラスミド DNA を鋳型とした mRNA への転写反応

ポジティブコントロール用プラスミド (pEU-E01-T1R1) を使用し、目的タンパク質と併せて合成確認されることを強く推奨致します。

- 1) 5x Transcription Buffer LM 及び NTP Mix を流水で溶かす。溶かした後チューブをクイックピンし内容液をチューブの底に落とす。使用するまで氷上で保存し、使用前に内容液を混ぜる。
- 2) 次の表に従い 1.5 ml チューブにて氷上で転写反応液を調製する。

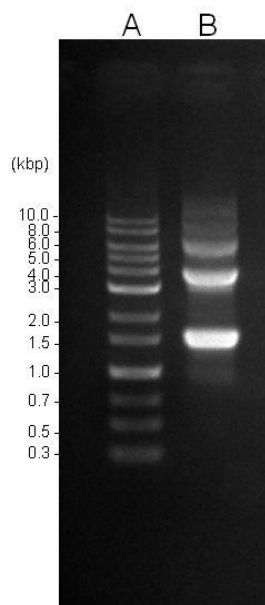
Reagents	Working vol.	Final conc.
Nuclease-free water	115 μ l	-
5x Transcription Buffer LM	40 μ l	1x
NTP Mix (25 mM)	20 μ l	2.5 mM
RNase Inhibitor (80 U/ μ l)	2.5 μ l	1 U/ μ l
SP6 RNA Polymerase (80 U/ μ l)	2.5 μ l	1 U/ μ l
Plasmid (circular DNA, 1 μ g/ μ l)	20 μ l	100 ng/ μ l
Total	200 μ l	

- 3) 37°Cで6時間保温する。(*1)
- 4) 転写反応後、1 μ l の転写産物をアガロースゲル電気泳動し、mRNA の合成を確認する。
(*2)

(備考)

- *1 転写反応中に溶液が白濁することがありますが、ピロリン酸マグネシウムの合成によるものであり、転写産物自体に問題はありません。
- *2 低分子量 (約 500 塩基以下) のスメア状バンドまたはラダー状バンドが検出される場合、RNase による mRNA の分解が考えられます。その場合、再度プラスミド DNA の調製を行って下さい (セクション 4.2 をご参照下さい) 。

mRNA のアガロースゲル電気泳動例



A: DNA ladder marker
 B: mRNA
 *1% agarose gel

4.4. 重層法を用いた膜タンパク質の翻訳反応

4.4.1 Asolectin Liposome の調製（再水和）

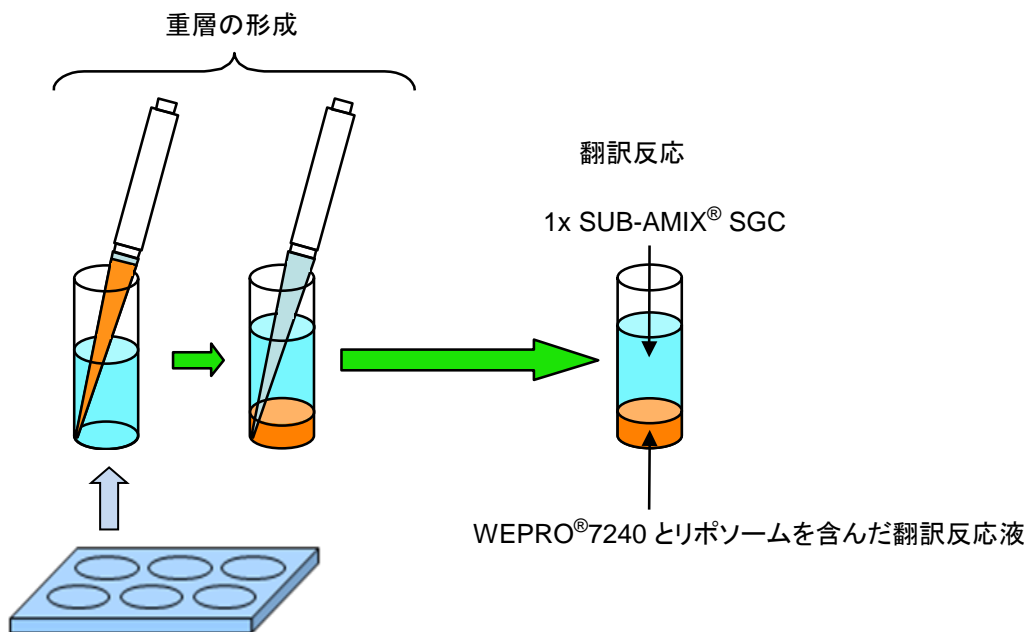
- 1) Asolectin Liposome, lyophilized が入ったバイアルの外蓋及び中蓋を開ける。
- 2) 1x SUB-AMIX[®] SGC を 200 μ l、バイアルの底の中央にゆっくり滴下する。
- 3) バイアルの内蓋をした後、室温で 10 分間静置する。
- 4) バイアルを 30 秒~1 分間ボルテックスして混和する。
- 5) バイアルを 50 ml チューブに入れ遠心する（500xg, 1min）。
- 6) Asolectin Liposome 溶液をバイアルから 1.5 ml チューブに移す。

4.4.2 翻訳反応

- 1) 転写反応液を室温まで下げ（氷上等、低温での静置は避けること）、クイックスピンし静かにピペティングして懸濁する。
- 2) WEPRO[®]7240、Creatine Kinase を流水で溶かす。溶かした後クイックスピンしすぐに氷上に静置する。使用前に静かにピペティングして懸濁する。泡立てないように注意すること。
- 3) 1x SUB-AMIX[®] SGC (セクション 3.2 を参照)を 6 well plate のウェルに 3.5 ml 入れる。
- 4) 次の表に従い 1.5 ml チューブにて氷上で翻訳反応液を調製する。泡立てないように注意すること。

Reagents	Working vol.	Final conc.
1x SUB-AMIX [®] SGC	123 μ l	
mRNA	150 μ l	
WEPRO [®] 7240 (240 OD)	125 μ l	60 OD
Creatine Kinase (20 mg/ml)	2 μ l	80 μ g/ml
Asolectin Liposome (50 mg/ml)	100 μ l	10 mg/ml
Total	500 μ l	

- 5) 重層反応を行う。
翻訳反応液全量 (500 μ l) を 1xSUB-AMIX[®] SGC (3.5 ml) 入りウェルの底の中央に注意深く入れ、重層を形成して下さい。チップを斜めに傾けると入れやすくなります。下のイラストのように、翻訳反応液が下層、SUB-AMIX[®] SGC が上層となります。ウェル内でこれらの試薬をピペティング等で混ぜないで下さい (重要!!)。
- 6) プレートのウェルをプレートシールで密封する。
- 7) 15 °Cで 20 時間保温する。



5. Proteoliposome の簡易精製

5.1. Proteoliposome の簡易精製

- 1) 6 well plate 内で合成タンパク質溶液をしっかりとピペッティングして懸濁し、1.5 ml チューブ 4 本に 1 ml ずつ分注する (U 底のチューブの使用は避けること : 以降の操作での上清除去時に proteoliposome の沈澱が剥がれやすいため)。
- 2) ウェル内の残存リポソームを回収するため合成タンパク質溶液が入っていた 6 well plate のウェルに PBS を 1 ml 入れておく。以降の洗浄操作時に使用する。
- 3) 1.5 ml チューブに分注した proteoliposome を遠心する (15,000 rpm、4°C、10 分)。
- 4) 上清を取り除く (proteoliposome のペレットはルーズにチューブの底に集まっている。ロスを防ぐため、上清を少し残して除去する)。
- 5) ステップ 2) で 6 well plate に入れた PBS をピペッティングし、ステップ 4) で上清除去したペレットに加え、ペレットを懸濁する。順次ペレットを懸濁していき proteoliposome を 1.5 ml チューブ 1 本にまとめる。
- 6) チューブを遠心する (15,000 rpm、4°C、10 分)。
- 7) 上清を取り除く (ロスを防ぐため上清を少し残して除去する)。
- 8) PBS を 1 ml 加え懸濁する。
- 9) ステップ 6)~8) を 2 回繰り返す (計 3 回洗浄する)。
- 10) 最後の遠心後、上清を除去し、終量 500 μ l になるよう PBS を添加・懸濁する。

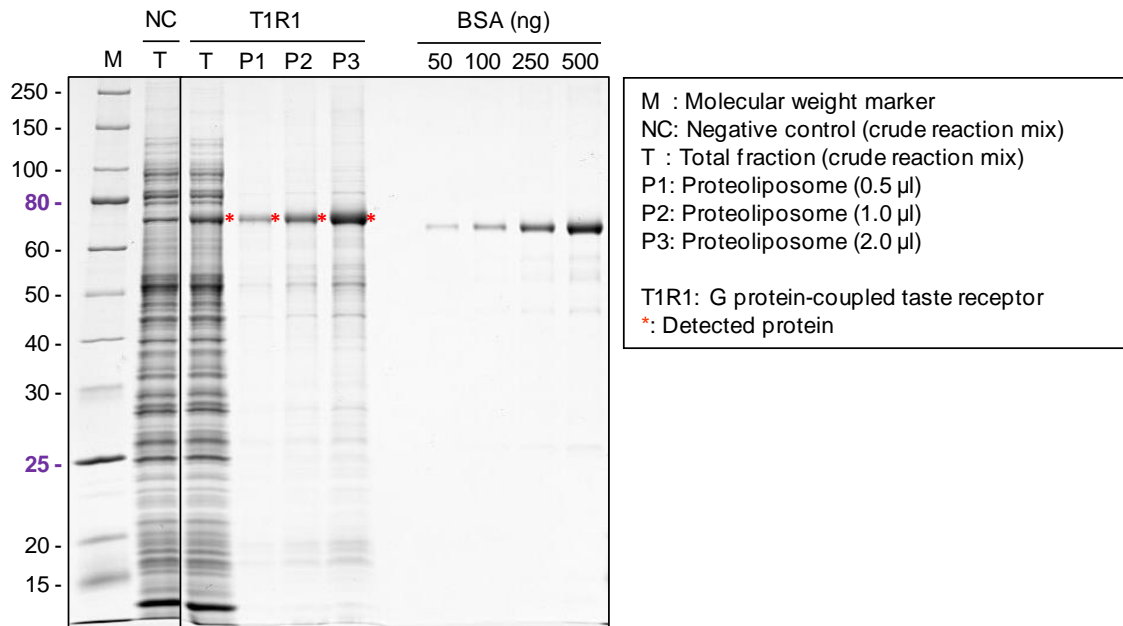
5.2 Proteoliposome の確認

精製した proteoliposome の確認は SDS-PAGE と CBB 染色にて行って下さい。

※Proteoliposome を SDS サンプルバッファー (2x SDS サンプルバッファーの組成例 ; 150 mM Tris-HCl (pH6.8), 1.2% SDS, 24% Glycerol, 0.1% Bromophenol Blue, 4% 2-mercaptoethanol) に溶解した後、**サンプルの加熱処理は行わないで下さい。(加熱処理を行うとバンドの確認ができなくなります。)**

通常、1 サンプルあたり 0.5 ~ 4 μ l を用いれば proteoliposome のバンドを確認できます。結果に応じてサンプル量を増減させ再度泳動を実施して下さい。

(Proteoliposome の SDS-PAGE による合成確認例)



6. その他

6.1 ラベルライセンスポリシー

ProteoLiposome Expression Kit をご購入のお客様は、セクション 3.1 にリストされている試薬のうち、いずれか 1 つの容器キャップを開封した時点で以下のラベルライセンスポリシーの条件を遵守する事に同意したものといたします。

<< ラベルライセンスポリシー >>

ENDEXT®テクノロジーおよび本テクノロジーを使った製品は、重層法及び WEPRO®に関する、日本、米国その他の国において出願中または登録された特許（特許 3753358、特許 3768190、特許 3675804 など）により保護されております。

お客様は、製品、製品の内容物を、お客様の監督のもとで研究目的に使うことができる権利を有します。この権利は譲渡できません。お客様は、製品、製品の内容物およびこれらを使うことにより得られた物質について、第三者に譲渡、販売したり、商業目的で使ったりすることはできません。また、お客様は、製品の使用を通じて得られた情報や物質については、これを 1) いかなる第三者にも譲渡しないこと、および 2) 譲渡された情報や物質は研究目的のみに使用し商業目的には使用しないこと、を承知した共同研究者にかぎって提供することができます。

研究以外の目的における本製品の購入に関しましては、株式会社セルフリーサイエンスの知的財産室までご連絡下さい。

6.2 商標

ENDEXT®、WEPRO®、SUB-AMIX® は株式会社セルフリーサイエンスの登録商標です。

6.3 その他

製品の仕様は、事前の予告なしに変更される場合があります。

7. 連絡先

技術サポート

E-mail: tech-sales-JP@cfsciences.com

株式会社セルフリーサイエンス

〒230-0046

神奈川県横浜市鶴見区小野町 75-1

リーディングベンチャープラザ 201 号

TEL : 045-500-2119

FAX : 045-500-2117

Web site: <http://www.cfsciences.com>