

キットを受け取り後、すぐにドライアイス入りの梱包箱からキットを取り出し、
-80°Cの冷凍庫で保管して下さい。冷凍内ではドライアイスと一緒に保管しないで
ください。ドライアイス（二酸化炭素）存在下での長期保存はキットの品質
に影響を及ぼすことがあります。

ENDEXT[®] Technology

ProteoLiposome PLUS Expression Kit

取扱説明書

(Catalog No. CFS-EDX-PLUS-PLE)

株式会社セルフリーサイエンス

目次

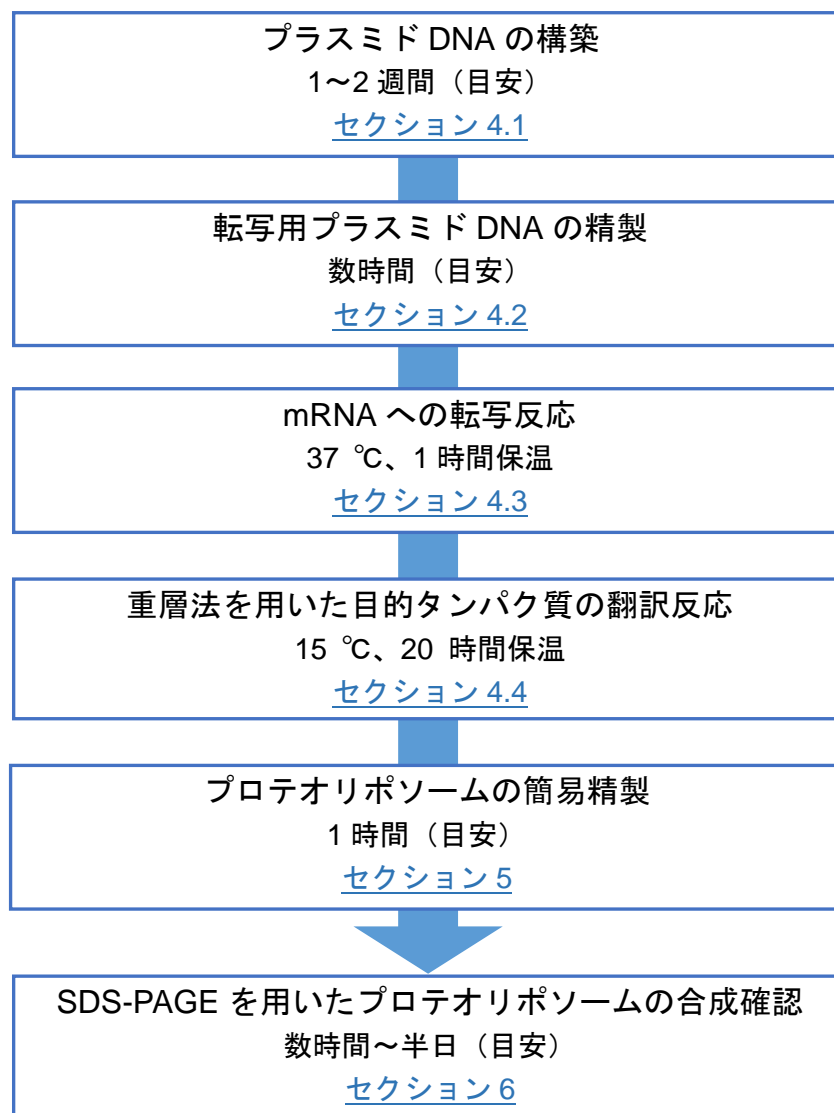
1. 本製品について	2
2. プロトコルの概要.....	2
3. キットおよび必要試薬.....	3
3.1. キットの保存条件.....	3
3.2. キットの内容.....	3
3.3. キット以外に必要な試薬・消耗品・実験器具	4
3.3.1. プラスミド DNA の調製に必要な試薬.....	4
3.3.2. 膜タンパク質合成に必要な試薬・消耗品・実験器具.....	4
4. 膜タンパク質合成プロトコル.....	5
4.1. プラスミド DNA の構築	5
4.2. 転写用プラスミド DNA の精製.....	5
4.3. mRNA への転写反応	7
4.4. 重層法を用いた目的タンパク質の翻訳反応.....	8
5. プロテオリポソームの簡易精製	10
6. SDS-PAGE を用いたプロテオリポソームの合成確認.....	11
付録: pEU-E01-MCS ベクターマップ情報.....	12
7. その他	13
7.1. ラベルライセンスポリシー	13
7.2. 商標	13
7.3. その他.....	13
8. 連絡先.....	14
9. 参考文献.....	14

1. 本製品について

ProteoLiposome PLUS Expression Kit は、膜タンパク質を簡易的に合成するためのスターターキットです。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、これまで合成が困難とされていた膜タンパク質をプロテオリポソームとして合成します。

本製品はプレミックスタイプとなっているため、リポソームの調製が不要です。また、本製品のリポソームは大豆由来のアゾレクチンで構成されています。

2. プロトコルの概要



3. キットおよび必要試薬

3.1. キットの保存条件

試薬はすべて-80°C以下で保存して下さい。

3.2. キットの内容

このキットには 8 反応分のタンパク質合成用試薬および消耗品が含まれています。

試薬・消耗品名	本数	液量	濃度	容器の形状	容器の色
pEU-E01-T1R1	1	5.0 µl	1.0 µg/µl	0.2 ml PCR Tube	緑
pEU-E01-MCS	1	5.0 µl	1.0 µg/µl	0.2 ml PCR Tube	赤
Transcription Premix LM*	8	18 µl	-	0.2 ml PCR Tube	青
WEPRO®9L*	8	21 µl	-	0.2 ml PCR Tube	紫
SUB-AMIX® SGC*	8	210 µl	-	Single-break strip well	透明
アルミシール	2	-	-	-	-

* 1 反応につき各試薬全量を使用して下さい。

試薬・消耗品名	説明
pEU-E01-T1R1	ポジティブコントロール用ベクター (T1R1: Human G Protein-Coupled Taste Receptor)
pEU-E01-MCS	目的遺伝子サブクローニング用発現ベクター
Transcription Premix LM	転写反応用試薬プレミックス
WEPRO®9L	翻訳反応用コムギ胚芽抽出液プレミックス (クレアチンキナーゼ、リボソームを含む)
SUB-AMIX® SGC	翻訳反応用バッファー
アルミシール	翻訳反応中のウェルカバーシール

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

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	99.5 %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、必ず超純水 (DNase, RNase free water) をご使用下さい。 DEPC 処理水は推奨しておりません。

3.3.2. 膜タンパク質合成に必要な試薬・消耗品・実験器具

試薬・消耗品・実験器具名	説明
超純水	DNase, RNase free DEPC 処理水は推奨しておりません。
PBS	Phosphate buffered saline プロテオリポソームの洗浄に用います。
1.5 ml 平底マイクロチューブ	DNase, RNase free
恒温槽 (インキュベーター)	37°Cおよび 15°Cの温度設定が可能なもの。
遠心機	1.5 ml tube の遠心分離が可能なもの。
SDS-PAGE	プロテオリポソームの合成確認に用います。

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巻末にある付録のベクターマップ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、付録の図の様に 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) 目的の塩基配列を挿入した pEU-E01-MCS ベクターを大腸菌 (JM109 株など) に形質転換し、培養する。
- 3) 市販品のプラスミド DNA 抽出キットを使用して、大腸菌からプラスミド DNA の抽出を行う。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 による抽出は推奨しません。

(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。

4.2. 転写用プラスミド DNA の精製

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。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) 抽出したプラスミド 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 (セクション 3.3.1 を参照) を加え、ボルテックスミキサーで振とうする。
- 2) チューブを遠心する (15,000 rpm、室温、5 分)。
- 3) 新しいチューブに上層液 (プラスミド DNA 溶液) を移す(*1)。
- 4) ステップ 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、ボルテックスミキサーで振とうする。
- 5) チューブを遠心する (15,000 rpm、室温、5 分)。
- 6) 新しいチューブに上層液 (プラスミド DNA 溶液) を移す。
- 7) ステップ 6) のチューブにプラスミド DNA 溶液の 2.5 倍量のエタノールと 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、転倒混和する。
- 8) -20°C で 10 分間静置する。
- 9) チューブを遠心する (15,000 rpm、4 °C、20 分)。
- 10) 上清を除いた後、70 %エタノール 800 μ l を加え DNA ペレットを洗浄する。
- 11) チューブを遠心する (15,000 rpm、4 °C、10 分)。
- 12) 上清を除く。

- 13) DNA ペレットを風乾させる (10~20 分) (*2)。
- 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(*3)。
- 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(*4)。
- 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。
- 17) 濃度調整後、0.1~0.2 µg のプラスミド DNA をアガロースゲルで電気泳動し、プラスミドの品質を確認する。図 1 のように、メインバンドがスーパーコイル状のプラスミド DNA (▲印) であることが望ましい。

(備考)

- *1 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。
- *2 埃などが入らないように注意して下さい。
- *3 この段階では、DNA 濃度 1.0 µg/µl 以上になるように調整して下さい。
- *4 プラスミド DNA の純度:
吸収波長 260 nm/280 nm の値は 1.70~1.85 になるようにして下さい。推奨値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。
タンパク質合成の収量低下につながりますので、その際は再度セクション 4.2 に記載されている操作を行い、プラスミド DNA を精製し直して下さい。

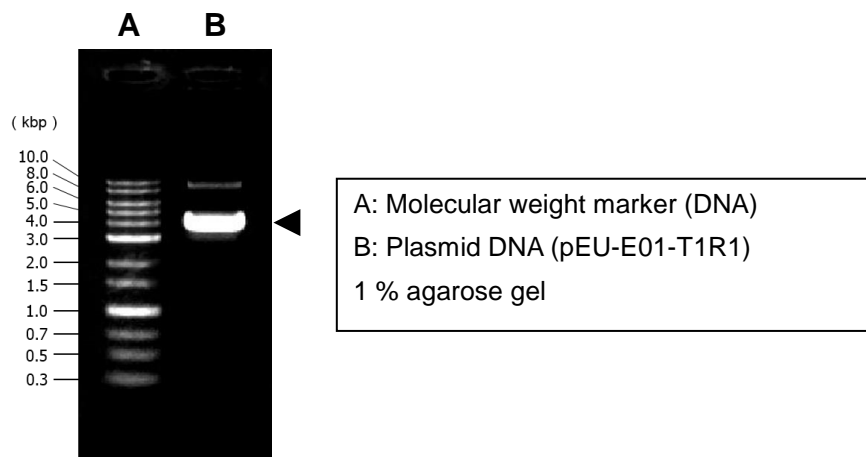


図 1 プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動例

4.3. mRNA への転写反応

ポジティブコントロールとして、pEU-E01-T1R1（**緑チューブ**）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推奨いたします。

- 1) 必要数の Transcription Premix LM（**青チューブ**）をハサミで切り離し、氷上で試薬を溶かす（*1）。未使用分はすぐに -80°C へ保存する。
- 2) 融解後、軽くスピンドウンし、チューブの内壁やキャップについた試薬をチューブの底に落とす。
- 3) Transcription Premix LM チューブにプラスミド DNA 溶液（ $1.0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を $2\ \mu\text{l}$ 加え、静かにピペティングする。

表 1 転写反応液の調製

試薬名	量	終濃度
Transcription Premix LM	$18\ \mu\text{l}$	1x
Plasmid ($1.0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$2\ \mu\text{l}$	$100\ \text{ng}/\mu\text{l}$
合計	$20\ \mu\text{l}$	-

- 4) サーマルサイクラーまたは恒温槽を使用し、 37°C で1時間転写反応させる（*2）。
- 5) 転写反応後、 $0.5\ \mu\text{l}$ の転写反応液をアガロースゲルで電気泳動し、mRNA の合成を確認する（*3）。残りの転写反応液を以降の翻訳反応に用いる。

（備考）

- *1 ハサミを使って Transcription Premix LM チューブを切り離す際は、チューブがはじき飛びやすいのでチューブをしっかり固定した状態で切り離して下さい。
- *2 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。
- *3 低分子量（約 500 塩基以下）のスミ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 を参照）。

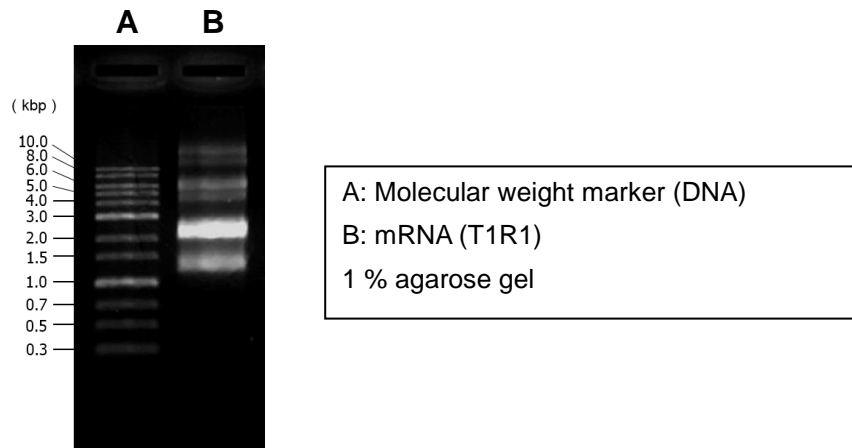


図 2 mRNA のアガロースゲル電気泳動例

4.4. 重層法を用いた目的タンパク質の翻訳反応

- 1) 必要数の WEPRO®9L (紫チューブ) と SUB-AMIX® SGC (透明ウェル) をハサミで切り離し、氷上でそれぞれの試薬を溶かす (*1)。未使用分はすぐに-80℃へ保存する。
- 2) 融解後、WEPRO®9L を軽くスピンドウンし、チューブの内壁やキャップについての試薬をチューブの底に落とす (過剰な遠心は避ける)。SUB-AMIX® SGC はアルミシールを剥がし、ウェル内で静かにピペティングして懸濁する (*2)。
- 3) 転写反応液を室温まで下げ (氷上等、低温での保温は避ける)、静かにピペティングして懸濁する (*3)。
- 4) 懸濁した転写反応液 9 µl を WEPRO®9L に加え、泡立てないように静かにピペティングする (この混合液を翻訳反応液とする)。

表 2 翻訳反応液の調製

試薬名	液量	終濃度
転写反応液 (mRNA)	9 µl	0.3 vol
WEPRO®9L	21 µl	60 OD
合計	30 µl	-

- 5) 次ページの図 2 のように翻訳反応液全量 (30 µl) を SUB-AMIX® SGC (210 µl) 入りウェルの底に注意深くゆっくりと入れ、重層を形成する。
目的タンパク質の合成収量低下につながりますので、ウェル内でこれら翻訳反応液と SUB-AMIX® SGC をピペティング等で絶対に混ぜないで下さい!!

表 3 重層の形成

試薬名	液量	終濃度
翻訳反応液	30 µl	0.125 vol
SUB-AMIX® SGC	210 µl	1x
合計	240 µl	-

- 6) 蒸発を防ぐため、付属のアルミシールを使用してウェルを密封する(*4)。その際、重層が混ざらないようにできる限りウェルは揺らさないように注意する。
- 7) 恒温槽を使用し、15 °Cで 20 時間翻訳反応させる。
- 8) 翻訳反応後、反応液を静かにピペティングし、以降の実験に用いる。

(備考)

- *1 ハサミを使って切り離す際は、チューブやウェルがはじき飛びやすいのでチューブやウェルをしっかりと固定した状態で切り離して下さい。
- *2 ウェルは倒れやすいので、取り扱いには十分注意して下さい。
- *3 転写反応溶液中にピロリン酸マグネシウムの合成による白濁ができた場合、白濁ごと全体を懸濁して下さい。
- *4 付属のアルミシールは適当な大きさに切って使用して下さい。

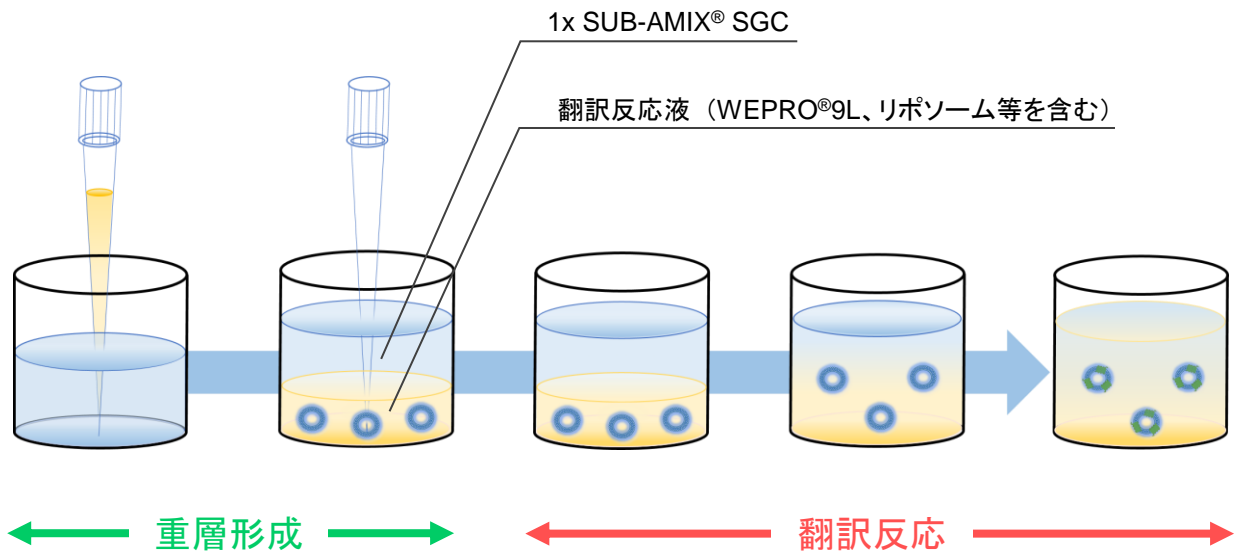


図3 重層形成と翻訳反応 (イメージ図)

5. プロテオリポソームの簡易精製

- 1) ウェル内で合成タンパク質溶液をしっかりとピペティングして、1.5 ml 平底マイクロチューブに 200 μ l 分注する(*1)。
- 2) ウェル内の残存プロテオリポソームを回収するために、合成タンパク質溶液が入っていたウェルに PBS を 170 μ l 入れておく。以降の洗浄操作時に使用する。
- 3) 1.5 ml 平底マイクロチューブに分注したプロテオリポソームを遠心する (15,000 rpm、4°C、10 分)。
- 4) 上清を取り除く。上清は完全に取り除かずに少し残しておく(*2)。
- 5) ステップ 2) でウェルに入れた PBS をピペティングし、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。
- 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。上清は完全に取り除かずに少し残しておく(*2)。
- 8) PBS を 170 μ l 加え、ペレットを懸濁する。
- 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、上清を除き、終量 200 μ l になるよう PBS を加えて懸濁する。
- 11) 以降の実験ですぐに使用しない場合は、必要量に応じて小分け分注し、液体窒素で凍結して-80°C以下で保存する(*3)。

(備考)

- *1 1.5 ml 丸底マイクロチューブは、以降の操作で上清除去時にプロテオリポソームの沈澱が剥がれやすいため、使用は避けて下さい。
- *2 プロテオリポソームのペレットはチューブの底に緩く集まっています。プロテオリポソームの損失を防ぐため、上清は少し残して除去して下さい。
- *3 融解後は、一度のみの使用とし、再凍結は避けて下さい。

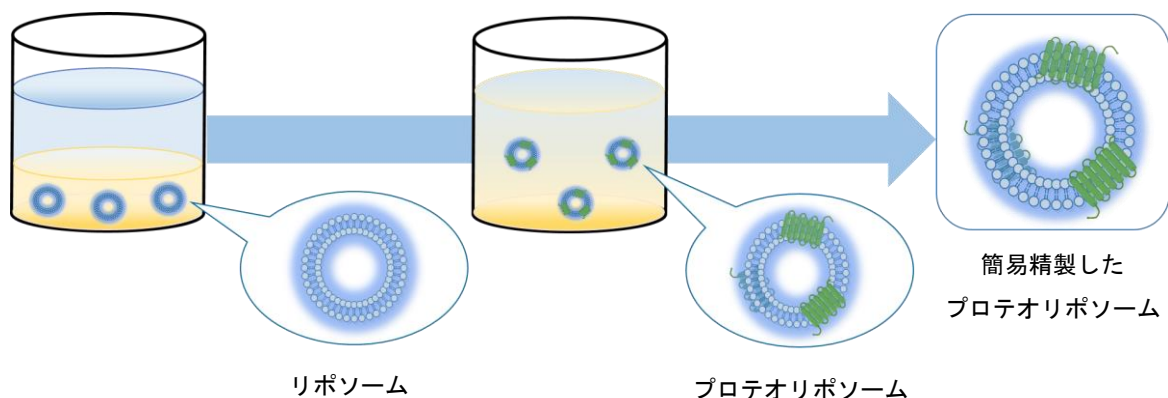


図 4 プロテオリポソームの形成 (イメージ図)

6. SDS-PAGE を用いたプロテオリポソームの合成確認

簡易精製したプロテオリポソームは、SDS-PAGE 及び CBB 染色により確認して下さい。またポリアクリルアミドゲルは、高分解能かつ適切な濃度のものご使用下さい。通常、1 サンプルあたり 0.5~4 μ l を用いればプロテオリポソーム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。

※プロテオリポソームを SDS サンプルバッファー(*1)に溶解した後、
サンプルの加熱処理は行わないで下さい!! バンドの確認ができなくなります。

(備考)

*1 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

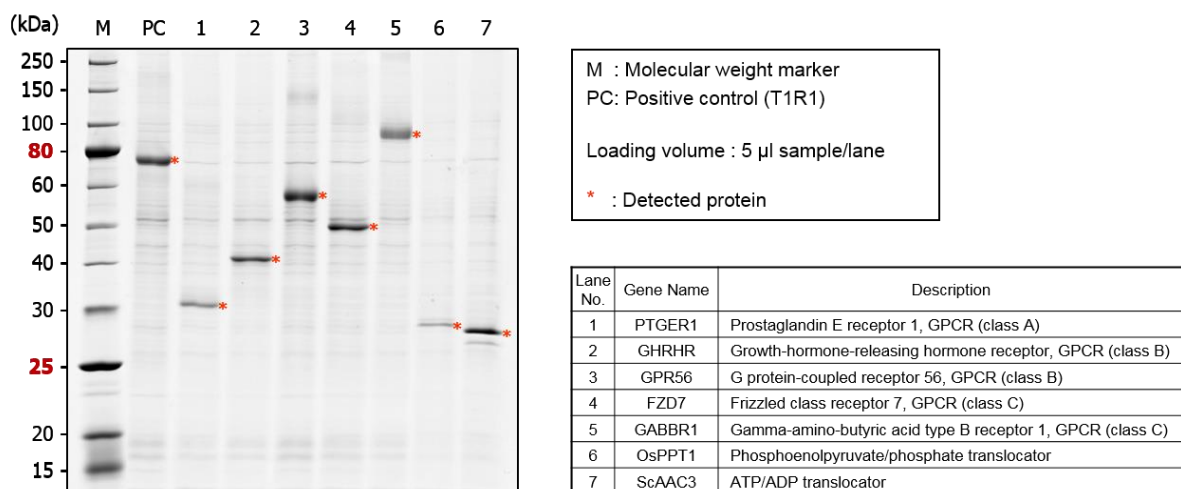
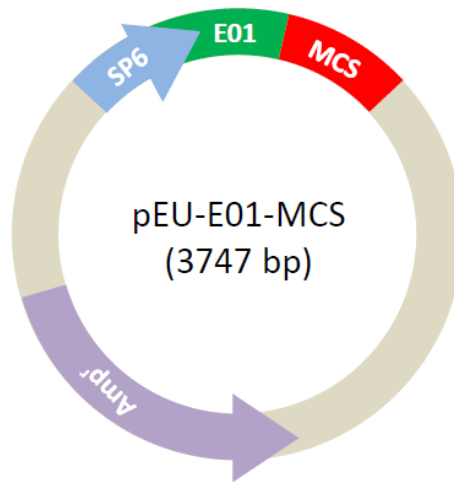


図5 SDS-PAGE によるプロテオリポソームの電気泳動例

付録: pEU-E01-MCS ベクターマップ情報



マルチクローニングサイト (MCS)

```

      ↓EcoRV
74- GATATCACTAGTTCGAGCTCGGTACCTGTCCGCGGTCGCGACGTACGCGGGCGGCCG
      ↓SpeI  ↓XhoI  ↓SmaI  ↓KpnI
                                     ↓NotI

      ↓BamHI  ↓SmaI  ↓Sall  ↓NotI
CCATAAATTGGATCCATATATAGGGCCCGGGTTATAATTACCTCAGGTCGACGTCCCATGG -193
  
```

pEU-E01-MCS

SP6 プロモーター (SP6): -17~1

翻訳促進配列 (E01): 1~73

マルチクローニングサイト (MCS): 74~193

複製起点 (Ori): 1190~1830

アンピシリン耐性遺伝子 (Amp^r): 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。

配列中の下線 : ATTAGGTGACACTATAG

プライマー

For 5' end sequence: SP6 Primer

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'

For 3' end sequence

5'-CCTGCGCTGGGAAGATAAAC-3

7. その他

7.1. ラベルライセンスポリシー

ProteoLiposome PLUS Expression Kit をご購入のお客様は、セクション 3.2 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スサイエンスの知的財産室までご連絡下さい。

7.2. 商標

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

7.3. 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。

8. 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>

9. 参考文献

Takeda et.al., (2015). Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. *Sci Rep.* **5**, 11333.

Y. Endo and T. Sawasaki (2004). High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 45-57.

T. Sawasaki, T. Ogasawara, R. Morishita and Y. Endo (2002). A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14652-14657.

T. Sawasaki, Y. Hasegawa, M. Tsuchimochi, N. Kamura, T. Ogasawara and Y. Endo (2002). A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett.* **514**, 102-105.

K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawara and Y. Endo (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 559-564.

ProteoLiposome PLUS Expression Kit_J_ver.1.0, Aug 1, 2016.

©2016 CellFree Sciences Co., Ltd. All rights reserved.