

The S30 T7 High-Yield Protein Expression System

S30 T7 High-Yield Protein Expression System

By Kate Qin Zhao, Don Creswell and Michael Slater, Promega Corporation

アブストラクト

S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemは、大腸菌抽出液ベースの無細胞タンパク質合成システムで、T7プロモーターを含むベクターにクローニングされたDNA配列の転写/翻訳を行います。タンパク質収量は、37°C、1時間以内に1ml反応液あたり数百マイクログラム（最大500µg/ml）に達します。反応容量は5µl程度までスケールダウンできるため、ハイスループット解析にも適応します。

イントロダクション

S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemは大腸菌ベースの無細胞タンパク質合成システムです。このシステムは、T7プロモーターを含むベクターにクローニングしたDNA配列の転写/翻訳を簡便に行います。供給される抽出液には、転写のためのT7 RNAポリメラーゼおよび翻訳のために必要な成分が含まれています（図1）。

抽出液は、OmpTエンドプロテイナーゼおよびLonプロテアーゼ活性を欠失した大腸菌株Bより調製されています。この結果、in vivoではプロテアーゼにより分解される場合でも、本システムを用いればより安定なタンパク質を発現させることができます。最適化されたプレミックスには、アミノ酸、rNTP、tRNA、ATP再生システム、IPTG、適切な塩を含むその他すべての必要な成分を供給します。本システムは1時間以内に高レベルの組換えタンパク質（反応液1mlあたり最大数百マイクログラム組換えタンパク質）を発現します。研究者は、T7プロモーターおよびリボゾーム結合サイト（RBS）の下流に配置されたタンパク質コード領域を含むDNAを準備するだけです。

検出方法

タンパク質を合成した後の検出にはいくつかの方法があります。S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemで合成される高レベルのタンパク質（最大500ng/µl）は、Coomassie® Blue染色されたSDS-PAGEにより検出することができます（図2、パネルA）。また、合成されたタンパク質は2種類のNon-RF検出法で検出することができます。FluoroTect™ Green_{lys} in vitro Translation Labeling System（カタログ番号L5001）は、in vitroで合成したタンパク質を蛍光標識し、Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection System（カタログ番号L5070, L5080）は標的タンパク質をビオチン化します（図2、パネルC）

鋳型の設計

S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemを用いたクローン化DNA断片からの発現には、T7プロモーターまたは強力な*E. coli* プロモーター制御下のタンパク質コード配列が必要です。発現テストで成功したベクターを表1に示します。本システムでは通常*E. coli* プロモーターよりもT7プロモーターで高い発現が認められました。

遺伝子の発現は、タンパク質のサイズ、標的遺伝子、遺伝子に内在する配列、発現条件、RBSに対するタンパク質コード配列の位置の違い(1)により大きく異なります。さらに、多くの真核生物遺伝子にはタンパク質コード領域内に原核システムでRBSとして機能する可能性のある配列が含まれており、それがメチオニンコドンの前に位置すると、内部で翻訳が開始されてしまい、予期しない短いタンパク質が合成されてしまう場合があります。また、5'および3'非翻訳領域（UTRs; 2, 3）、N-(4)またはC-(5) 融合タグ、コドン使用法(6)、mRNA2次構造（7, 8）およびmRNAの安定性（9）などS30システムでタンパク質合成に影響を与えるその他の因子が報告されています。

濃度500ng/µl以上の高純度プラスミドDNAを鋳型として使用することで最適なタンパク質収量が得られます。この転写/翻訳システムに使用する鋳型DNAの精製にはPureYield™ Plasmid Miniprep System（カタログ番号 A1221）を使用することを推奨します。鋳型DNAへ高濃度の塩やグリセロールを添加することは避けてください。鋳型DNAのエタノール沈殿には、酢酸アンモニウムよりも酢酸ナトリウムを使用して下さい。通常のタンパク質収量は50µlあたり数十マイクログラムです（最大500µg/ml）。

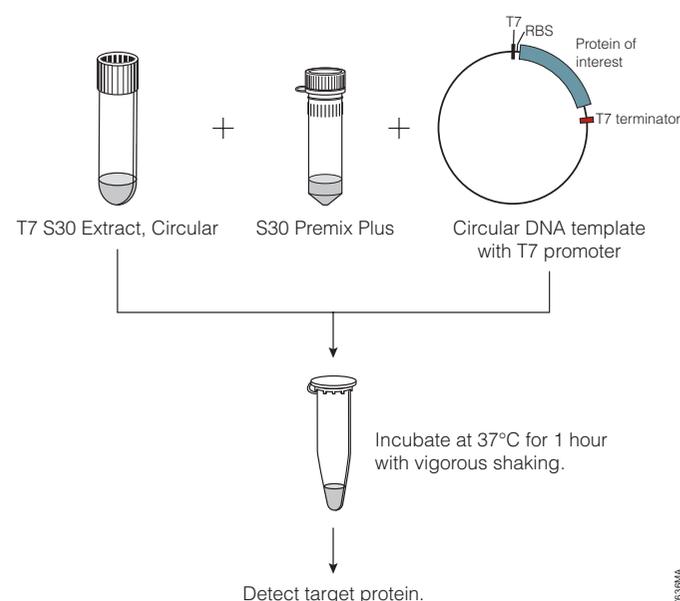


図1. S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemの概要

76380A

The S30 T7 High-Yield Protein Expression System

表1. S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemでタンパク質の合成に成功したベクター (表中に示されたタンパク質はSDS-PAGEおよびCoomassie® blue染色により検出)

ベクター	プロモーター	テストしたタンパク質
pFN6A/K	T7	firefly and <i>Renilla</i> luciferase, HaloTag® protein, Monster Green® fluorescent protein, cPKA, β-galactosidase
pFN18A/K	T7	cPKA, firefly and <i>Renilla</i> luciferase, Id
pIVEX	T7	elongation factor Ts (EF-Ts)
pIX	T7	green fluorescent protein (GFP)
pExp5	T7	calmodulin3 (CALM3)
pET32a	T7	Thioredoxin
pET43a	T7	NusA
pET3a	T7	<i>Renilla</i> luciferase
pET15b	T7	<i>Renilla</i> luciferase
pQE30	T5	firefly and <i>Renilla</i> luciferase

アプリケーション

- 特定DNA配列からの遺伝子産物の確認
- ハイスループットアプリケーションにおけるタンパク質のスクリーニング (例: 5μl程度の少量を96ウェルプレートで)
- 大腸菌に対して毒性を持つタンパク質の合成
- 親和性タグを用いた精製 (例: 金属アフィニティタグ)
- 酵素活性の分析
- タンパク質相互作用解析
- 転写および翻訳の研究(10)
- タンパク質への人工アミノ酸の導入(11)
- 翻訳に影響を及ぼす化合物のスクリーニング(12)

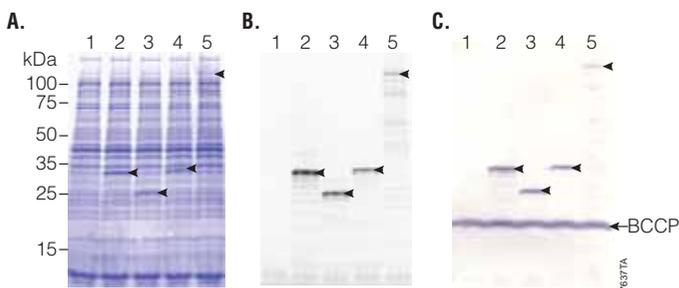


図2. S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemを用いた環状鋳型DNAの in vitro転写/翻訳カップリング反応の結果

pFN6A (HQ) Flexi® Vectorにクローニングしたタンパク質コード配列をS30 T7 High-Yield Protein Expression System Technical Manual #TM306に従い発現させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE; 4-20% Tris-glycine) により分離し、Coomassie® blue染色 (パネルA)、蛍光スキャニング (パネルB) または、PVDF膜に転写、Streptavidin Alkaline Phosphatase (カタログ番号 V5591) 処理後のWestern Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (カタログ番号 S3841; パネルC) による染色により可視化した。各ゲルについて、レーン1: DNAなし、レーン2: ウミシイタケルシフェラーゼ、レーン3: Monster Green® Fluorescent Protein、レーン4: HaloTag® タンパク質、レーン5: β-ガラクトシダーゼ (BCCP = *E. coli* biotin carboxyl carrier protein.)。

参考文献

1. Baranov, V.I. and Spirin, A.S. (1993) *Methods Enzymol.* **217**, 123–42.
2. Ahn, J.H. *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1346–52.
3. Son, J.M. *et al.* (2006) *Anal. Biochem.* **351**, 187–92.
4. Torizawa, T. *et al.* (2004) *J. Biomol. NMR* **30**, 311–25.
5. Palmer, E. *et al.* (2006) *Protein Sci.* **15**, 2842–6.
6. Chumpolkulwong, N. *et al.* (2006) *J. Struct. Funct. Genomics* **7**, 31–6.
7. Paulus, M., Haslbeck, M. and Watzel, M. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, e78.
8. Voges, D. *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 601–14.
9. Ahn, J.H., Kang, T.J. and Kim, D.M. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* **Mar 7**. [Epub ahead of print]
10. Promega Corporation (1990) *Promega Notes* **26**, 1–2.
11. Noren, C.J. *et al.* (1989) *Science* **244**, 182–8.
12. Liu, M. *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5885–9.

プロトコル

- ◆ S30 T7 High-Yield Protein Expression System Technical Manual #TM306, Promega Corporation
www.promega.com/tm306/tm306.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	24反応分	L1110	65,000
	8反応分	L1115	25,000
FluoroTect™ Green _{lys} in vitro Translation Labeling System	40反応分	L5001	50,000
Transcend™ Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System	30反応分	L5070	30,000
Transcend™ Chemiluminescent Non-Radioactive Translation Detection System	30反応分	L5080	43,000
PureYield™ Plasmid Miniprep System	50回分	A1221	12,000
	250回分	A1222	48,000