

Cell-Free Protein Expression with the TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System

TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemによる 無細胞系タンパク質発現

By Donna Leippe, Don Creswell, Jim Hartnett and Elaine Schenborn, Promega Corporation

アブストラクト

TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemは、プロメガの機能性タンパク質の無細胞系発現製品ラインナップに新たに加わった新製品です。本製品は培養昆虫細胞からの抽出液を基に作成されています。専用のFlexi® Vectorは本システムと併用することで最適なタンパク質発現が得られるように設計されています。

イントロダクション

無細胞系の発現システムは、機能および構造プロテオミクスに利用される細胞ベースのタンパク質発現システムに変わる強力なツールです。無細胞系システムは、細胞ベースに比べて複数を同時進行あるいはハイスループットフォーマットで数多くのタンパク質を迅速に合成する際に特に有用です。プロメガのTNT® System（真核生物系転写-翻訳カップリングシステム）は、DNA情報からタンパク質合成を行える利点があり、時間のかかるRNAの合成、精製操作を省くことができます。これらのシステムは、活性を持つタンパク質の簡便、迅速な合成に使用することができます。

新しいTNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemは、タンパク質の無細胞系発現のために開発された簡便、迅速に1チューブで実施できる転写/翻訳カップリングシステムです（図1）。抽出液は汎用される*Spodoptera frugiperda* S21細胞株より調製されます（1）。しかし、この抽出液には内在的グリコシル化機構は含まれていません。全ての必要な成分はTNT® T7 ICE Master Mix (ICE=insect cell extract) に含まれています。それ以外にタンパク質合成の開始に必要なものは目的の鋳型DNAだけです。このフォーマットは反応のセットアップ操作を簡略化し、時間も削減することができます。タンパク質はT7ポリメラーゼプロモーターの下流にクローニングされた遺伝子より発現します。本システムで推奨される鋳型DNAは、翻訳効率を増加させるバキュロウ

イルスのポリヘドリン遺伝子5'および3'末翻訳領域 (UTR) 配列を含むベクターです（2）。このシステムのためにデザインされたベクターがpF25AおよびpF25K ICE T7 Flexi® Vector（カタログ番号 L1061およびL1081）です。これらの専用ベクターはTNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemで最適なタンパク質収量を得るために使用されます。また、このベクターはFlexi® Cloning System（カタログ番号C8640）に適応し、標的遺伝子配列のクローニングや他のタンパク質発現システムを利用するための他種Flexi® Vectorへ（から）のサブクローニングを容易にします。

鋳型DNAからの迅速、簡便なタンパク質合成

TNT®製品シリーズは、鋳型DNAよりタンパク質発現を開始できる無細胞系のシステムです。標準的な50µl TNT® 反応には鋳型DNA 4µgが推奨されます。TNT® の反応容量は、それに比例してDNA量を増減すれば、活性を低下させずにスケールを増減することができます（データ未掲載）。反応は28-30°Cでインキュベーションし、4時間以内に完了します（図2）。

機能性タンパク質の発現レベル

合成するタンパク質の収量は、発現させるタンパク質によって異なります。図2の実験で合成されたルシフェラーゼの発現量は約40-45µg/mlで、ルシフェラーゼ活性の測定により決定されました。その他の機能性タンパク質についてもこのシステムで発現させました（表1）。このタンパク質セットの収量は活性測定により決定し、その幅は15-75µgでした。この収量の幅は、ウサギ網状赤血球ライセートをベースにしたTNT® システムからの予想収量よりも高いものでした。全てのタンパク質は精製すること無く、TNT® 反応より直接測定されました。

標識導入によるタンパク質の検出

TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemは、FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System（カタログ番号L5001）に適応します。これは、合成タンパク質の蛍光標識および検出を迅速に行う方法を提供します。標識タンパク質は、反応をインキュベーションした後すぐにゲル電気泳動で検出することができます。pF25AまたはpF25K ICE T7 Flexi® Vectorにクローニングした11種のヒトキナーゼ遺伝子をTNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemで発現させ、FluoroTect™ Systemで検出しました（図3）。11種類全てのヒトキナーゼタンパク質を合成しましたが、TNT® 反応には検出を妨げるような内在性の蛍光は認められませんでした。

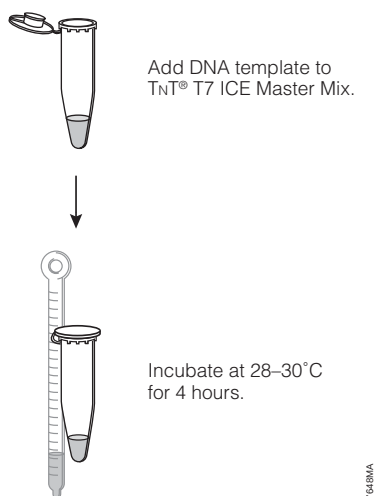


図 1. TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemの概要

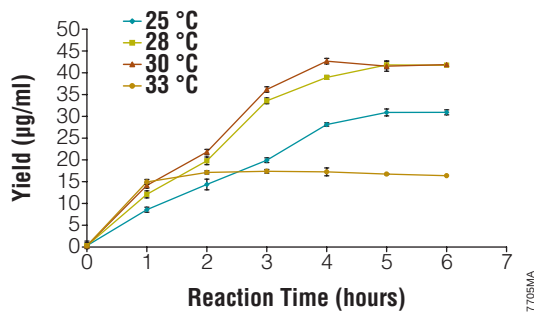


図2. インキュベーション時間、反応時間による収量の変化

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をpF25A Vectorにクローニングした。得られたプラスミドはPureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号A2492) を用いて精製し、エタノール沈殿した。DNAは水に懸濁し、吸光度260nmで定量した。50µl TnT® 反応に4µgプラスミドを使用した。反応は表示した温度と時間でインキュベーションした。ルシフェラーゼ活性は、Steady-Glo® Luciferase Assay System (カタログ番号E2510) 100µlに各反応液5µlを添加して測定した。発光はマイクロプレートルミノメーターで測定した。相対発光ユニット (RLU) は、QuantiLum® Recombinant Luciferase (カタログ番号E1701) を希釈して作成した標準曲線を用いてタンパク質濃度を見積もった。データは、TnT® 反応トリプレットの平均値および標準偏差 (+/-) で表した。

表1. 機能性と収量テストを行ったタンパク質

以下のタンパク質を発現し、活性テストを行った。タンパク質濃度は、既知比活性を持つ精製タンパク質スタンダードを用いた標準曲線より見積もった。各タンパク質定量には、ホタルルシフェラーゼ: Steady-Glo® Luciferase Assay (カタログ番号 E2510)、ウミシイタケルシフェラーゼ: *Renilla* luciferase Assay System (カタログ番号 E2810)、プロカスパーゼ-3: Caspase-Glo® 3/7 Assay (カタログ番号 G8091) (組換えカスパーゼ-8で活性化した後)、β-ガラクトシダーゼ: Beta-Glo® Assay System (カタログ番号 E4720) を用いた。HaloTag® タンパク質の活性は、TMR Ligand (カタログ番号 G8251) との共有結合をゲルイメージングにより検出した。

タンパク質	分子量 (kDa)	収量 (µg/ml)
Firefly luciferase	61	45
<i>Renilla</i> luciferase	36	15
Procaspase-3	34	75
HaloTag® Protein	33	20
β-galactosidase	118	N.D.

N.D. β-ガラクトシダーゼ酵素は機能性を有するが、産物は定量していない。

まとめ

TnT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Systemは機能性タンパク質を迅速に発現させるための無細胞発現システムです。迅速で簡便な反応セットアップを可能にする形態で、反応開始には鋳型DNAと水を加えるだけです。Flexi® Vectorは本システムでのタンパク質発現を最適化するためにデザインされており、ウサギ網状赤血球ライセートシステムよりも高い発現レベルを示します。TnT® 反応の柔軟性のあるオープンフォーマットは、標識物質を添加して合成タンパク質に組み込ませることができ、簡便な検出や下流の分析に利用することができます。

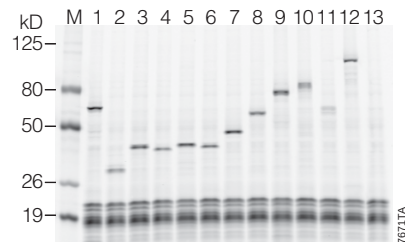


図3. ヒト-キナーゼタンパク質の発現

11種のヒト-キナーゼ遺伝子をpF25A または pF25K T7 ICE Flexi® Vectorにクローニングし、4µgの精製プラスミドを50µl TnT®反応に使用した。迅速にタンパク質を検出するためにFluoroTect™ Green_{lys} tRNA (カタログ番号 L5001) (1µl) を各反応に添加した。反応液は4時間インキュベーションし、各反応液から1µlをサンプルバッファーに加え、4-20%トリス-グリシンゲルに添加した。レーンM, molecular weight markers (Cambrex); レーン1, pF25A-ルシフェラーゼポジティブコントロール; レーン2から12: AURKC, MAPK1, AURKB, PKA, MAPK14, AURKA, SRC, SYK, PKCgamma, AKT, PI3K; レーン13, DNAなし (ネガティブコントロール); レーン14, DNA なし, FluoroTect™ Green_{lys} tRNA 不含 (ネガティブコントロール)。蛍光イメージングはTyphoon® 9410 Imager (GE Healthcare) を用いた。組込まれなかったfluorescent tRNAがゲルの下部に観察された。

参考文献

- Ezure, T. *et al.* (2006) *Biotechnol. Prog.* **22**, 1570–7.
- Suzuki, T. *et al.* (2006) *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 69–71.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
TnT® T7 Insect Cell Extract	40 x 50 µl 反応分	L1102	82,000
Protein Expression System	10 x 50 µl 反応分	L1101	23,000
pF25A ICE T7 Flexi® Vectors	20 µg	L1061	48,000
pF25K ICE T7 Flexi® Vectors	20 µg	L1081	48,000