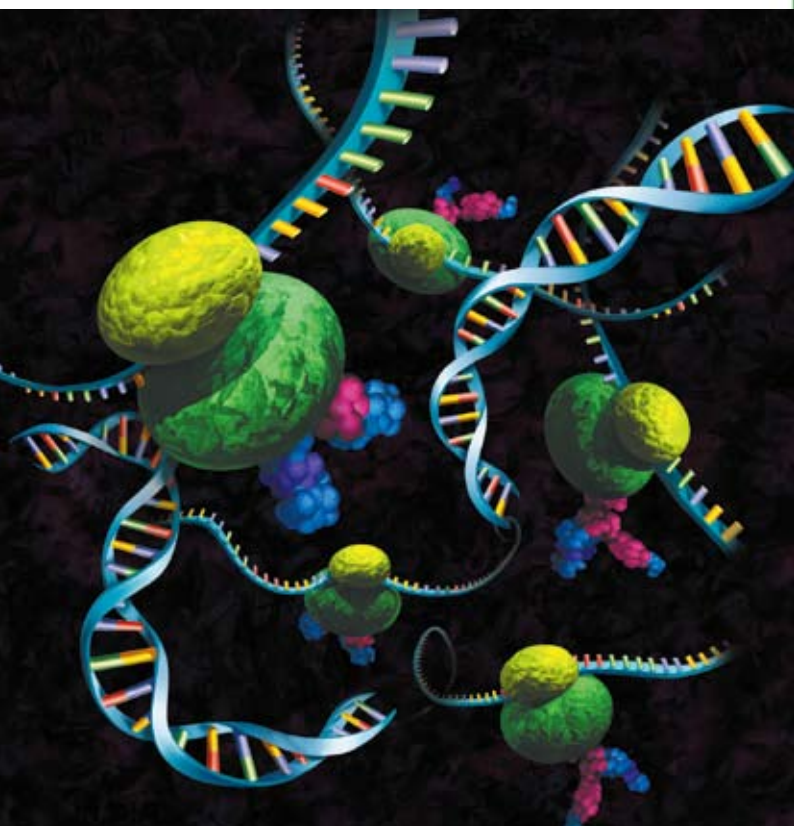


TNT[®] 無細胞発現ガイド

便利な転写&翻訳 1チューブシステム



Contents :

- イントロダクション
- ウサギ網状赤血球ライセートシステム
- 昆虫細胞抽出液システム
- 小麦胚芽抽出液システム
- 大腸菌抽出液システム

Transcription and Translation (TNT®)

転写反応と翻訳反応を1チューブ内で行います。

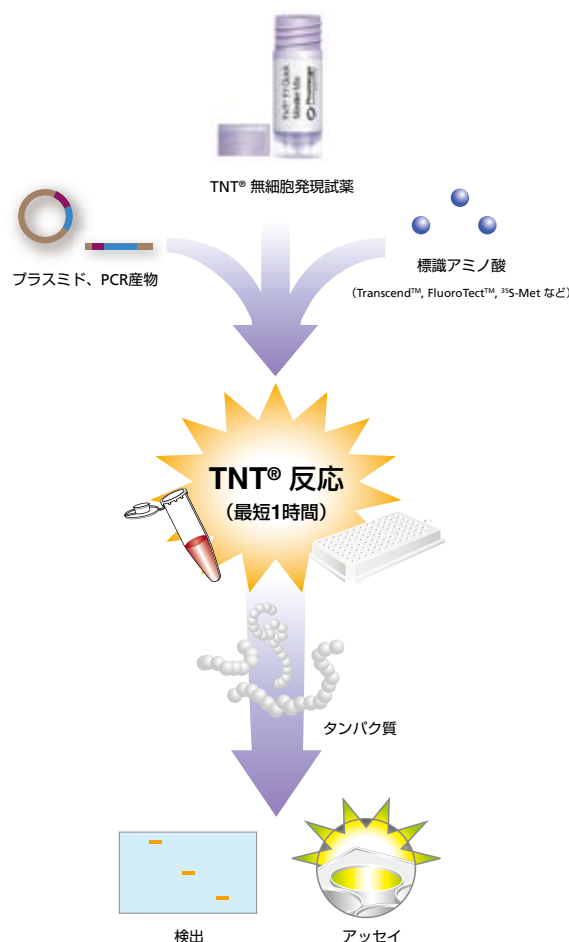
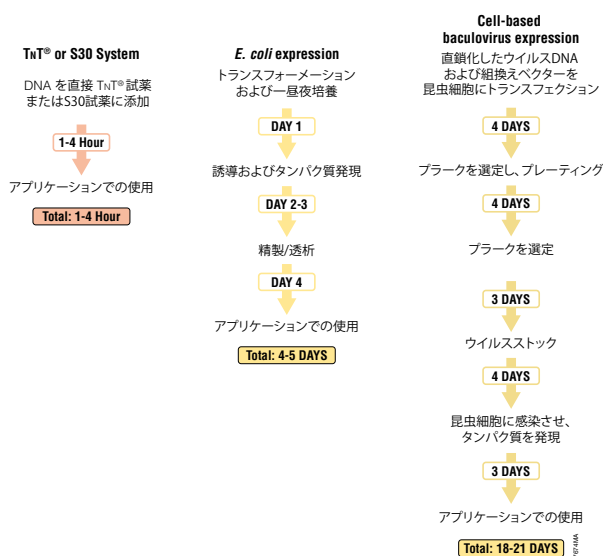
最も簡便・迅速なタンパク質発現システム

タンパク質の発現実験は非常に煩雑で、結果が得られるまでに数多くの工程が含まれ、多大の労力を必要とします。無細胞発現システムは細胞ベースの発現系に比べてよりシンプルにタンパク質を取得することができます。

標準的な無細胞発現系では、まず転写反応（鋳型DNAからのRNA合成）から得られたRNAを翻訳反応（RNAからのタンパク質合成）に利用する2ステップ法が一般的に用いられています。プロメガのTNT®システムは1チューブの中で転写反応と翻訳反応を行うことができるため、取扱の困難なRNAの精製を省略できるためより簡便で効率的なタンパク質発現を行うことができます。また、多くのシステムでマスターミックスとして試薬が供給されるため、分注ステップを大幅に削減できます。

無細胞発現システムの利点

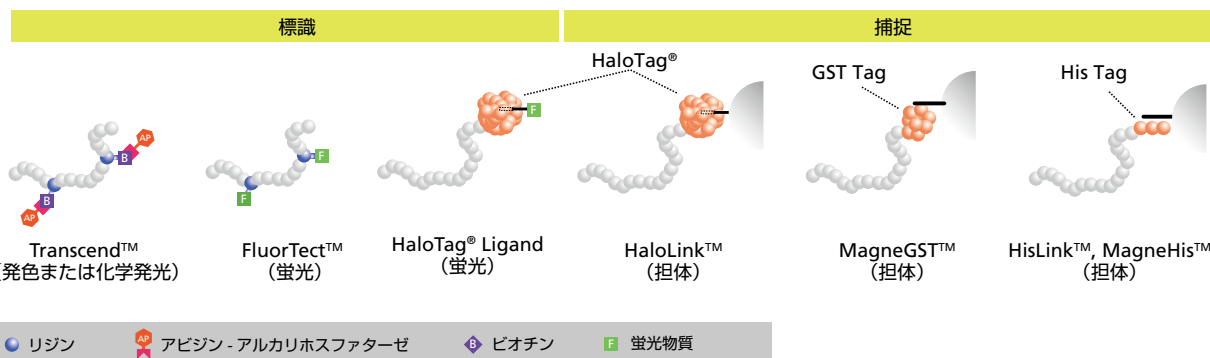
- 培養細胞/菌体ベースの発現システムに比べ迅速（数日の工程が数時間に短縮され、スクリーニング等にも最適。）
- 柔軟性のあるタンパク質発現系（タンパク質の標識が容易で抗体が無くても検出できます。キナーゼなど毒性のあるタンパク質も発現可能）
- 用途によってシステムを選択可能（真核生物系は活性/溶解性、原核生物系は収量が期待されます）



TNT® システムと菌体 / 細胞を用いた発現システムの操作時間

TNT® システムの操作概要

鋳型となる DNA および標識アミノ酸（オプション）を TNT® 反応に加えれば、数時間後に発現タンパク質を用いた実験を開始することができます。



無細胞発現タンパク質の標識とタグを付加した場合の捕捉

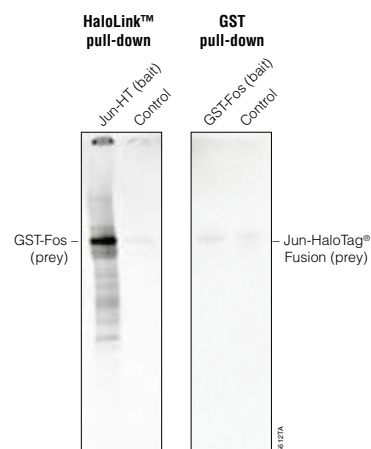
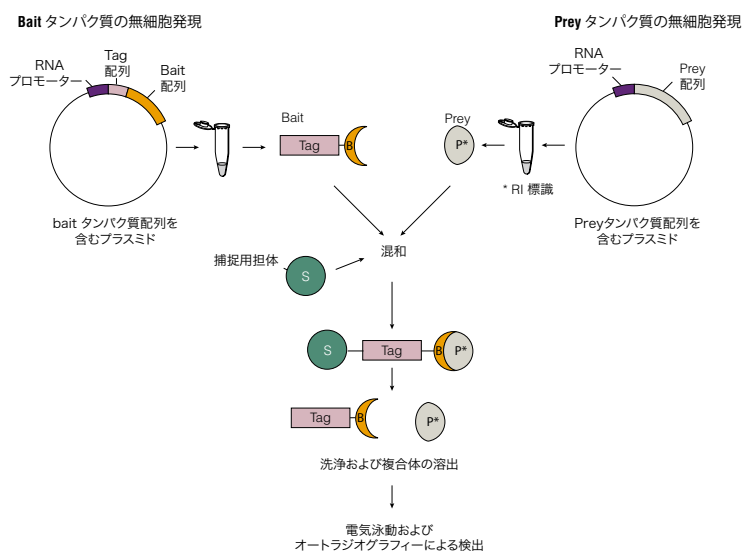
※標識試薬、捕捉用担体については 8 ページをご覧ください。

Transcription and Translation (TNT[®])

収量やアプリケーションに応じて4タイプを揃えています

哺乳動物・昆虫・植物・大腸菌

無細胞発現系は一般に細胞ベースの発現系に比べ収量が低いことが懸念されてきました。しかし、無細胞発現システムや発現ベクターの改良、新規タグの開発等により、発現量や検出感度の向上が実現し、従来よりも応用範囲が広がっています。無細胞発現系の特長であるスピード、簡便性、ミニチュア化の容易さなどを含め、タンパク質発現系として有効な選択肢の1つになっています。



共有結合タグである HaloTag[®] および HaloLink[™] Resin を用いたプルダウン法と標準的な GST を用いたプルダウン法の比較

GST-c-Fos および c-Jun-HaloTag[®] 融合タンパク質を無細胞発現系で合成し、互いに bait (未標識) あるいは prey (³⁵S-メチオニン標識) として用いた。合成完了後、未標識タンパク質および標識タンパク質パートナーからなる 2 組の反応液を混合し、タンパク質を結合させた。HaloLink[™] Resin (左パネル) または GST-結合レジン (右パネル) を用いて、タンパク質複合体をプルダウンした。左レーン: HaloLink[™] または GST レジンを用いた GST-c-Fos または c-Jun-HaloTag[®] タンパク質のプルダウン。右レーン: HaloLink[™] または GST レジンのみ。

無細胞発現系で得た bait および prey を用いたプルダウン

標準的なプルダウンアッセイでは、担体に結合するベイト (bait) タンパク質濃度を高くするために大腸菌発現系が汎用され、アフィニティータグである GST との組み合わせが多く見られます。HaloTag[®] と HaloLink[™] (担体) は強力な親和性 (共有結合) を有し、HaloLink[™] への非特異的結合が最低限に抑えられているため無細胞発現タンパク質を bait/prey の両方に用いることも可能になります。

プロメガの無細胞発現システム

システム		鋳型				アプリケーション			
製品名	抽出液由来	環状 DNA	直鎖状 DNA	RBS* 要求	Kozak 推奨	真核生物タンパク質分析	原核生物タンパク質分析	構造解析	収量*
真核	TNT [®] Quick Coupled Transcription/Translation System	ウサギ網状赤血球	✓	✓	✓	✓			最大 300ng
	TNT [®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	昆虫培養細胞	✓		✓	✓			最大 4μg
	TNT [®] SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System	小麦胚芽	✓	✓	✓	✓			最大 5μg
原核	S30 T7 High-Yield Protein Expression System	大腸菌	✓		✓		✓	✓	最大 25μg

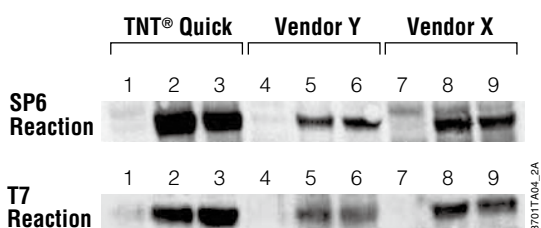
・上記以外の TNT[®] System についてはお問い合わせください。
 ※ 50μl 反応あたりの収量
 *RBS: ribosomal binding site (リボソーム結合サイト)

ウサギ網状赤血球ライセート

TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation System

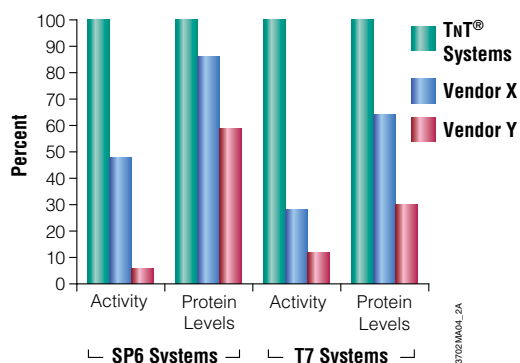
幅広いベクターよりタンパク質を発現し、修飾タンパク質も発現可能

TNT® Quick Systemsは、転写と翻訳を1チューブ内で連続して行えるより簡単で迅速なシステムです。TNT® Quick Master Mix には、転写用のRNAポリメラーゼや翻訳用のウサギ網状赤血球ライセートなどin vitro 転写/翻訳に必要なあらゆる試薬が含まれます (鋳型DNAと検出用の標識物質を除く)。T7またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含む環状プラスミドまたはT7プロモーターを含むPCR産物を標識物質とともにTNT® Quick Master Mixに加え、30℃、60-90分間インキュベーションするだけです。別売のマイクロゾームメンブレンを転写/翻訳反応に添加することによりタンパク質の修飾やプロセッシングを再現することも可能です (タンパク質に依存)。

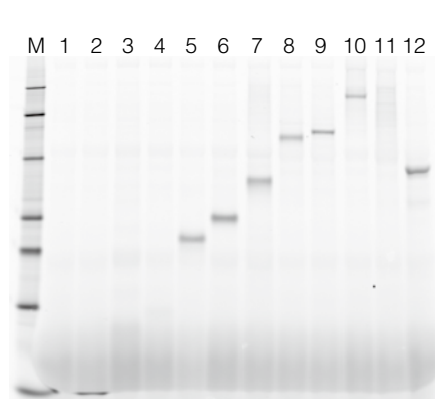


ルシフェラーゼタンパク質のウェスタン分析

TNT® Quick System (レーン 1-3) または Vendor Y (レーン 4-6) および Vendor X (レーン 7-9) の2段階転写翻訳システムの反応液 3μl をポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。Anti-Luciferase pAb (カタログ番号 G7451)、Donkey Anti-Goat IgG HRP Conjugate (カタログ番号 V8051) を利用した化学発光検出により可視化した。レーン 1, 4, 7 は DNA を含まないネガティブコントロール反応



ルシフェラーゼ活性およびタンパク質レベルにおける競合品との比較
競合品 X と Y とのルシフェラーゼの相対活性およびタンパク質レベルを比較した (TNT® Quick System の値を 100%とした場合)。



真核生物由来のタンパク質発現

転写 / 翻訳反応は TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号 L1170) および FluoroTect™ GreenLys tRNA (カタログ番号 L5001) (1 μl) を用いて行った。反応後、5μl を分取し、導入されなかった FluoroTect™ tRNA を除去するために RNase-ONE™ で処理し、SDS-PAGE に供した。レーン 1. 蛍光マーカー、レーン 2. ネガティブコントロール (No-DNA)、レーン 3-12 (下表参照)、レーン 13. ルシフェラーゼ。

無細胞発現でテストした溶解性の低いヒト - タンパク質

レーン	タンパク質	ACCN
3	Small muscular protein	BC005948
4	Melanoma antigen recognized by T cells (MLANA)	BC014423
5	B-cell translocation gene 1 anti-proliferative	NM_001731
6	Caspase-6, apoptosis-related cysteine protease	BC000305
7	Mitogen-activated protein kinase 14	NM_001315
8	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	NM_017460
9	Protein kinase C, gamma	NM_002739
10	Minichromosome maintenance deficient 5 cell division cycle 46	NM_006739
11	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	NM_004448
12	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	NM_002851

ACCN indicates GenBank® accession number.

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
TNT® 無細胞発現システム (ウサギ網状赤血球)			
発現システム			
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System	40 回分	L1170	68,000
	5 回分	L1171	18,000
TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/ Translation System	40 回分	L2080	78,000
	5 回分	L2081	20,000

内容:

- TNT® Quick Master Mix
- SP6 or T7 Luciferase Control DNA
- T7 TNT® PCR Enhancer (L1170 only)
- Methionine
- Luciferase Assay Reagent (L1170, L2080 only)
- Nuclease-Free Water (L1170, L2080 only)
- Protocol

保存条件: -70℃

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/tntqck.html

昆虫細胞抽出液

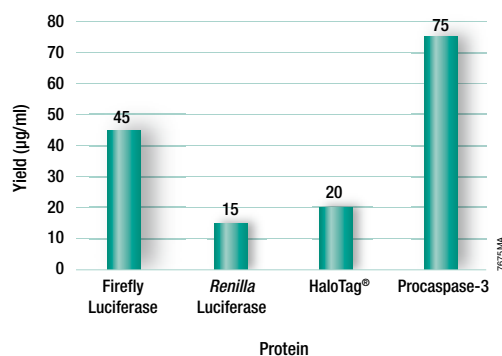
NEW

TNT[®] Insect Cell Extract Protein Expression System

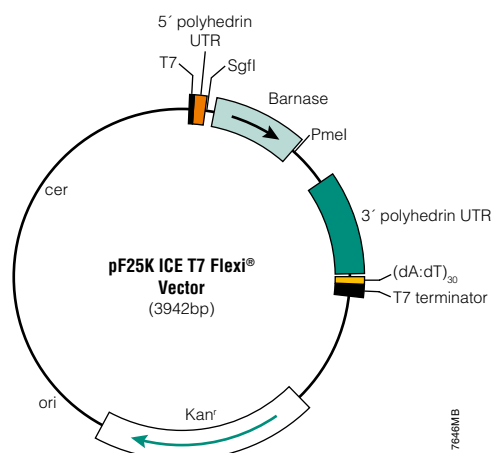
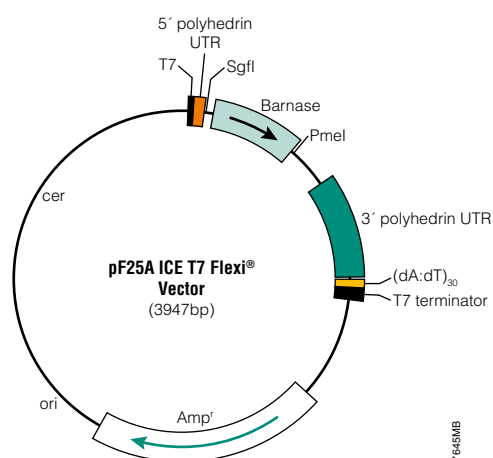
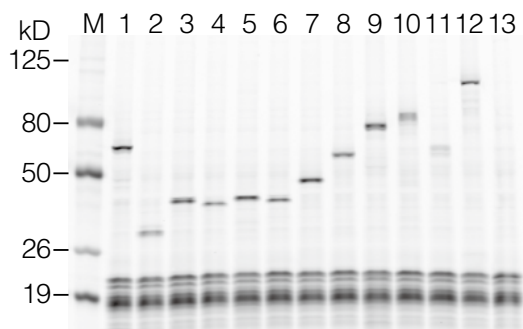
最大 75μg/ml のタンパク質を合成、より活性のあるタンパクを発現

TNT[®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System は、タンパク質の無細胞発現システムで、1 チューブで転写／翻訳を行う便利、迅速なシステムです。タンパク質合成反応は鋳型 DNA の添加で開始され、手間のかかる in vitro での RNA 合成を行う必要はありません。抽出液は汎用される *Spodoptera frugiperda* Sf21 細胞株より調製されています。転写／翻訳に必要な全ての成分は TNT[®] T7 ICE Master Mix に含まれています。反応液に鋳型 DNA を加えて 28–30℃ インキュベーションすれば 4 時間以内にタンパク質合成が完了します。

専用のベクター (pF25A および pF25K) には、翻訳効率を向上させるためにクローニング領域の 5' および 3' 末端にバキュロウイルス ポリヘドリン遺伝子の非翻訳領域 (UTR) 配列が含まれており、本システムで最適な収量が得られるようにデザインされています。TNT[®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System およびこれらのベクターを使用することにより 最大 75μg/ml の機能性タンパク質を調製することができます。



TNT[®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System で得られたタンパク質収量



pF25A/K T7 Flexi[®] Vector のベクターマップ

ヒト・プロテインキナーゼの発現

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。FluoroTect[™] GreenLys tRNA (カタログ番号 L5001) (1 μl) を各反応に添加し、4 時間インキュベーションした。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, PKC gamma, 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[™] GreenLys tRNA 不含 (ネガティブコントロール)。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

TNT[®] 無細胞発現システム (Sf21 昆虫細胞)

発現システム

TNT [®] T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	40 回分	L1102	82,000
	10 回分	L1101	23,000

内容:

- TNT[®] T7 ICE Master Mix
- Luciferase ICE T7 Control DNA
- Nuclease-Free Water
- Protocol

ベクター

pF25A T7 Flexi [®] Vector	20μg	L1061	48,000
pF25K T7 Flexi [®] Vector	20μg	L1081	48,000

保存条件: -70℃ (発現システム)、-20℃ (ベクター)

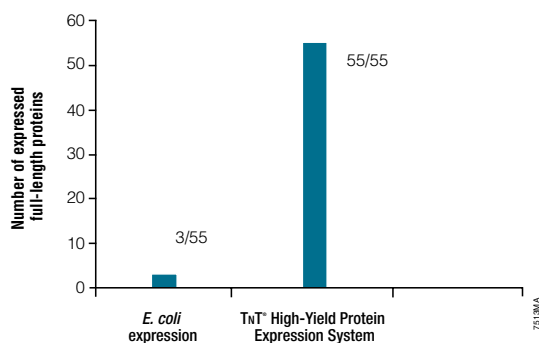
プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/tntice.html

TNT® SP6 High-Yield Protein Expression System

最大 100µg/ml のタンパク質を合成、可溶性タンパクを発現

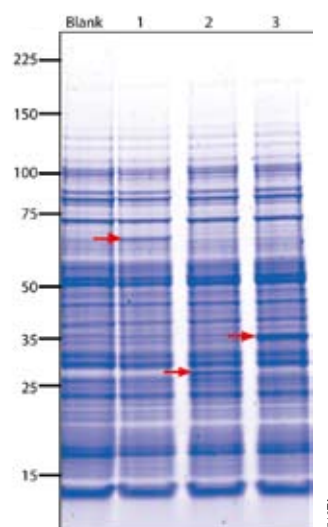
TNT® High Yield Protein Expression System は、簡便、迅速にシングルチューブで転写/翻訳のカップリング反応を行うためにデザインされており、最大100µg/mlのタンパク質収量が得られます。この無細胞発現システムには最適化された小麦胚芽抽出液をはじめ鋳型DNAから直接タンパク質を合成するために必要な全ての成分（tRNA、リボソーム、アミノ酸、ポリメラーゼ、翻訳開始・伸張・停止因子）が含まれています。このシステムはSP6プロモーターの下流にクローニングされた遺伝子を発現します。タンパク質の合成は適切な鋳型DNAの添加で開始され、25℃で2時間インキュベーションするだけです。合成タンパク質はSDS-PAGEによる分析、あるいはその他様々なアプリケーションにそのまま使用できます。最大100µg/mlのタンパク質を発現するようにデザインされていますが、透析システムを利用することにより最大 200-400µg/mlの収量が得られるため、タンパク質の機能、構造分析にも利用することが可能です。

pF3A WG (BYDV) およびpF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorは、小麦胚芽抽出液を用いたin vitro発現用にデザインされています。オオムギ黄萎ウイルス (BYDV) 由来の5'および3' UTR配列が目的のタンパク質コード領域クローニングサイトの上下流に配置されています。これらBYDV上下流UTRエレメントの相互作用により閉ループが形成され、mRNAキャッピングやポリアデニル化に対する依存性を回避した相乗的な翻訳が促進されます。



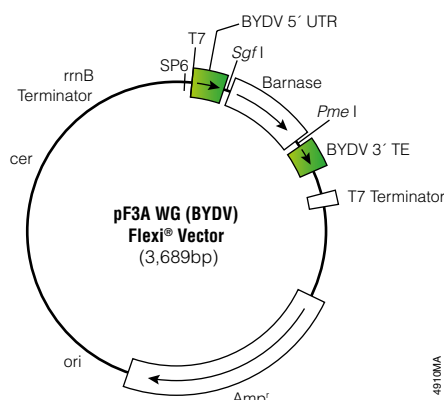
TNT® High-Yield Protein Expression System と大腸菌で発現できた完全長タンパク質数の比較

ヒト 55 種類のタンパク質で試験した結果、High-Yield Protein Expression System は大腸菌に比べて多くの完全長タンパク質を発現した。



TNT® High-Yield Protein Expression System を用いたタンパク質の合成

タンパク質は 8µg プラスミド DNA を用いて透析法を利用して発現させた。レーン 1. ホタル-ルシフェラーゼ (62kDa)、レーン 2. GFP (28kDa)、レーン 3. ウミシイタケルシフェラーゼ (36kDa)。透析法については Promega Notes No. 94 を参照ください。



pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector のベクターマップ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
TNT® 無細胞発現システム (小麦胚芽)			
発現システム			
TNT® SP6 High-Yield Protein Expression System	40 回分	L3260	75,000
	10 回分	L3261	22,000
内容:			
• TNT® SP6 High-Yield Master Mix		• Protocol	
• Nuclease-Free Water			
ベクター			
pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector	20µg	L5671	45,000
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	20µg	L5681	45,000
保存条件: -70℃ (発現システム)、-20℃ (ベクター)			
プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/tntwghigh.html			

TNT® 無細胞発現システム (小麦胚芽)

発現システム

TNT® SP6 High-Yield Protein Expression System	40 回分	L3260	75,000
	10 回分	L3261	22,000

内容:

- TNT® SP6 High-Yield Master Mix
- Nuclease-Free Water
- Protocol

ベクター

pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector	20µg	L5671	45,000
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	20µg	L5681	45,000

保存条件: -70℃ (発現システム)、-20℃ (ベクター)

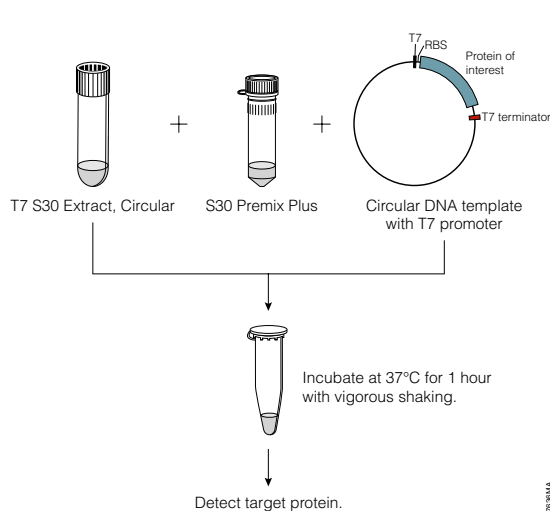
プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/tntwghigh.html

大腸菌抽出液

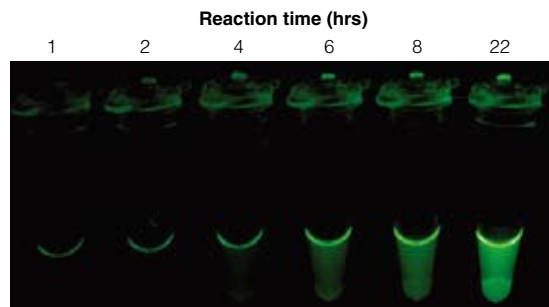
S30 T7 High-Yield Protein Expression System

最大 500 μ g/ml のタンパク質を合成

E. coli S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemは、T7プロモーターおよびリボソーム結合サイト (RBS) を含むベクターから約1~数時間以内に最大500 μ g/mlのタンパク質を発現するようにデザインされています。システムに付属する抽出液にはT7 RNAポリメラーゼが含まれており、OmpTエンドプロテイナーゼやlonプロテアーゼ活性が欠失しています。また、システムに含まれるその他の必要な試薬はタンパク質の翻訳に最適化されています。これにより、標的タンパク質の安定性が向上し、発現レベルが増加します。発現タンパク質はCoomassie[®] 染色や蛍光/ビオチン修飾 tRNAの導入により検出することができます。

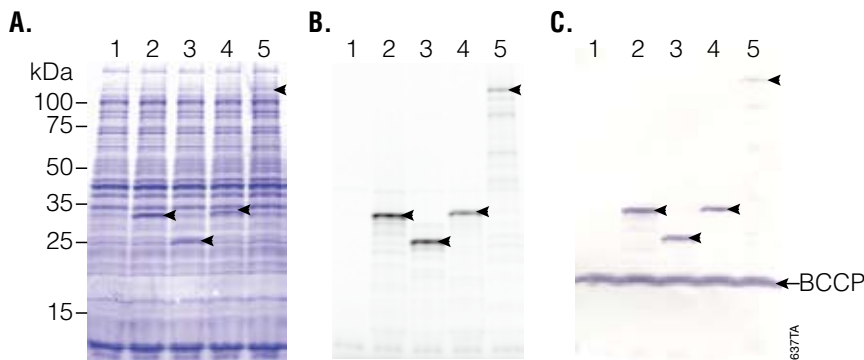


S30 T7 High Yield System の操作概要



S30 T7 High Yield System による GFP の発現

1ml 反応液に 20 μ l の鋳型 DNA (pFN6A-MonsterGreen[®] GFP) をセットし、各タイムポイントごとに 50 μ l を分取した。各反応液は、それぞれの表示時間が経過した後反応を停止させるために -20°C で保存し、全ての反応時間が経過した時点で蛍光を観察した。



環状 DNA からタンパク質を発現

タンパク質コード領域をクローニングした pFN6A (HQ) Flexi[®] Vector および FluoroTect[™] または Transcend[™] tRNA を用いて S30 T7 High-Yield Protein Expression System でタンパク質を発現させ、SDS-PAGE で分離後、Coomassie[®] blue 染色 (パネル A)、蛍光スキャン (パネル B) あるいは PVDF 膜に転写した後、Streptavidin Alkaline Phosphatase (カタログ番号 V5591) で処理し、Western Blue[®] Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (カタログ番号 S3841; パネル C) で検出した。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[®] 蛍光タンパク質; 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)。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
TNT[®] 無細胞発現システム (大腸菌)			
発現システム			
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	24 回分	L1110	65,000
	8 回分	L1115	25,000

内容:

- T7 S30 Extract, Circular
- S30 Premix Plus
- S30 T7 Control DNA
- Nuclease-Free Water
- Protocol

保存条件: -70°C

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/s30t7hy.html

無細胞発現関連ツール

Templates, Labeling, Processing

発現実験のリソースから検出までをサポート

無細胞発現系に使用できる鋳型としてヒトORFが組込まれたクローンや発現ベクター、標識アミノ酸、タンパク質修飾研究に利用できるミクロゾームメンブレンもご利用いただけます。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
発現用ヒト-ORF クローン			
HaloTag® N 末端融合ヒト - タンパク質発現クローン			
Flexi® HaloTag® Type	1 クローン	FHCxxxxx	50,000
pFN21A をベースとしたヒト ORF クローンで T7 プロモーターおよび RBS を含むため原核生物由来の無細胞発現系にもそのままご利用いただけます。			

ヒト - タンパク質発現クローン (タグ無し)			
Flexi® Cloning Type	1 クローン	FXCxxxxx	30,000
pF1K をベースとしたヒト ORF クローンで T7 プロモーターおよび RBS を含むため原核生物由来の無細胞発現系にもそのままご利用いただけます。			

無細胞発現用ヒト-ORF クローンの詳細、オンライン注文については www.promega.co.jp/flexiclone/ をご覧ください。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
発現用ベクター			
HaloTag® N 末端融合			
pFN19A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	20µg	G1891	48,000
pFN19K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	20µg	G1841	48,000
HaloTag® C 末端融合			
pFC20A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	20µg	G1681	48,000
pFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	20µg	G1691	48,000
HQ タグ N 末端融合			
pFN6A (HQ) Flexi® Vector	20µg	C8511	45,000
pFN6K (HQ) Flexi® Vector	20µg	C8521	45,000
HQ タグ C 末端融合			
pFC7A (HQ) Flexi® Vector	20µg	C8531	45,000
pFC7K (HQ) Flexi® Vector	20µg	C8541	45,000
GST タグ N 末端融合			
pFN2A (GST) Flexi® Vector	20µg	C8461	45,000
pFN2K (GST) Flexi® Vector	20µg	C8471	45,000
タグなし			
pF1A T7 Flexi® Vector	20µg	C8441	42,000
pF1K T7 Flexi® Vector	20µg	C8451	42,000

※ 上記 Flexi® Vector についての詳細は www.promega.co.jp/flexiclone/ をご覧ください。

※ HaloTag® は新規なりリガントと特異的に結合する受け皿タンパク質。蛍光リガント、ビオチンリガントなどを用いて細胞内イメージング、タンパク質間相互作用実験に使用 (www.promega.co.jp/halotag/)

※ HQ タグは His タグに変わる金属結合タグで低濃度イミダゾールでの溶出が可能

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
タンパク質の標識			
蛍光検出 (タグ - タンパク質)			
HaloTag® TMR Ligand	15µl	G8252	45,000
	30µl	G8251	75,000
HaloTag® AlexaFluor® 488 Ligand	15µl	G1002	45,000
	30µl	G1001	75,000

※その他の蛍光リガントについてはお問い合わせ下さい。

蛍光検出			
FluoroTect™ Green _{lys} in vitro Translation Labeling System	40 回分	L5001	50,000
化学発光検出			
Transcend™ Chemiluminescent Non-Radioactive Translation Detection System	30 回分	L5080	43,000
発色検出			
Transcend™ Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System	30 回分	L5070	30,000

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
タンパク質の捕捉 / 固定			
HaloTag® 融合タンパク質の捕捉			
HaloLink™ Magnetic Beads	1ml	G9311	16,000
HaloLink™ Resin	2ml	G1911	27,000
	5ml	G1912	58,000

GST 融合タンパク質の捕捉			
MagneGST™ Particles	4ml	V8611	18,000
	20ml	V8612	65,000

His/HQ 融合タンパク質の捕捉			
HisLink™ Protein Purification Resin	50ml	V8821	44,000
	5ml	V8823	5,000
MagneHis™ Ni-Particles	2ml	V8560	19,000
	10ml	V8565	65,000

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
タンパク質のプロセッシング			
ミクロゾームメンブレン			
Canine Pancreatic Microsomal Membranes	50µl	Y4041	39,000

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本 社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2008年12月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店：