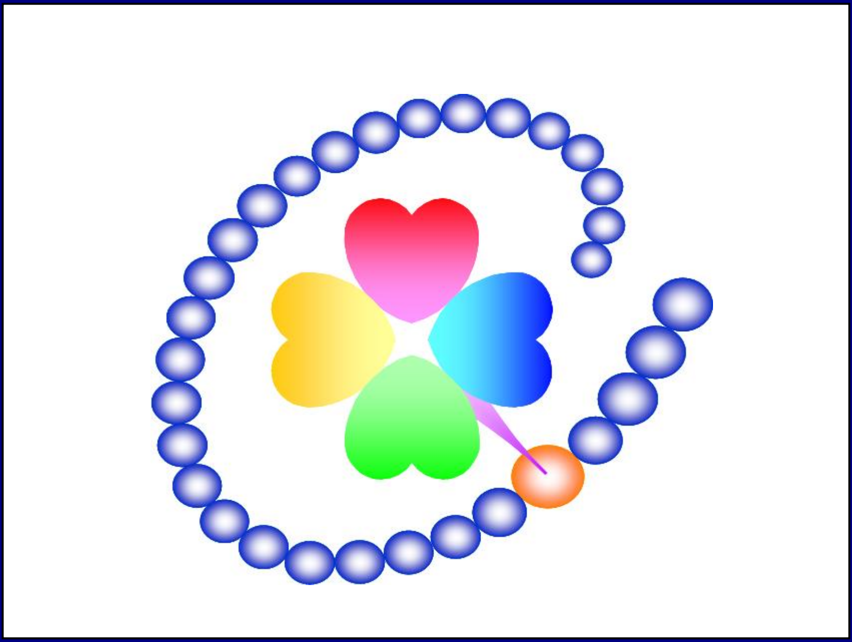


Clover*Direct*™

tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization

ProteinExpress

Catalogue 2013/04

製品概要
CloverDirect ™ 試薬について 2
CloverDirect ™を用いた非天然アミノ酸導入の原理 4
製品構成 6
実験手順 7
ご使用にあたっての注意点 8

製品リスト 9
ピンポイント蛍光標識 [for Fluorescence Labeling]
CloverDirect™ CR110-X-AF-tRNA
CloverDirect ™ HiLyte Fluor™ 488-AF-tRNA
CloverDirect ™ TAMRA-X-AF-tRNA
CloverDirect ™ ATTO 633-AF-tRNA
CloverDirect ™ ATTO 655-X-AF-tRNA

ピンポイントビオチン標識 [for Biotin Labeling]
CloverDirect ™ Biotin-AF-tRNA
CloverDirect ™ Biotin-X-AF-tRNA
CloverDirect ™ Biotin-XX-AF-tRNA

翻訳後修飾 [for Post-translational Modification]
CloverDirect ™ Tyr (PO_3H_2) -tRNA
CloverDirect ™ Lys (Me) -tRNA
CloverDirect ™ Lys (Me_2) -tRNA
CloverDirect ™ Lys (Ac) -tRNA

非天然アミノ酸導入 [for Unnatural Mutagenesis]
PEG標識アミノ酸
CloverDirect ™ PEG4-AF-tRNA
CloverDirect ™ PEG8-AF-tRNA
CloverDirect ™ PEG12-AF-tRNA

架橋アミノ酸
CloverDirect ™ BPA-tRNA
CloverDirect ™ AcPhe-tRNA

光異性化アミノ酸
CloverDirect ™ azoAla-tRNA

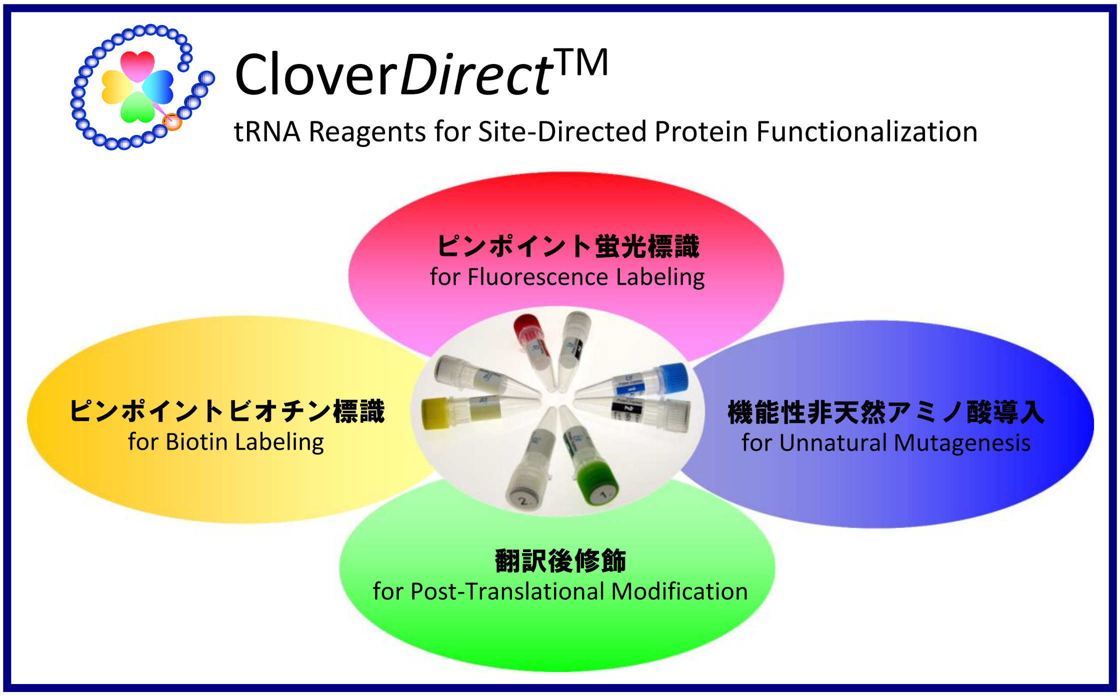
受託合成サービス 11
非天然アミノ酸tRNA受託合成サービス
非天然アミノ酸導入タンパク質の受託合成サービス

アプリケーション 12
ピンポイント標識タンパク質の発現例
ピンポイント標識タンパク質の使用例

参考文献 14
製品についてのお問い合わせ

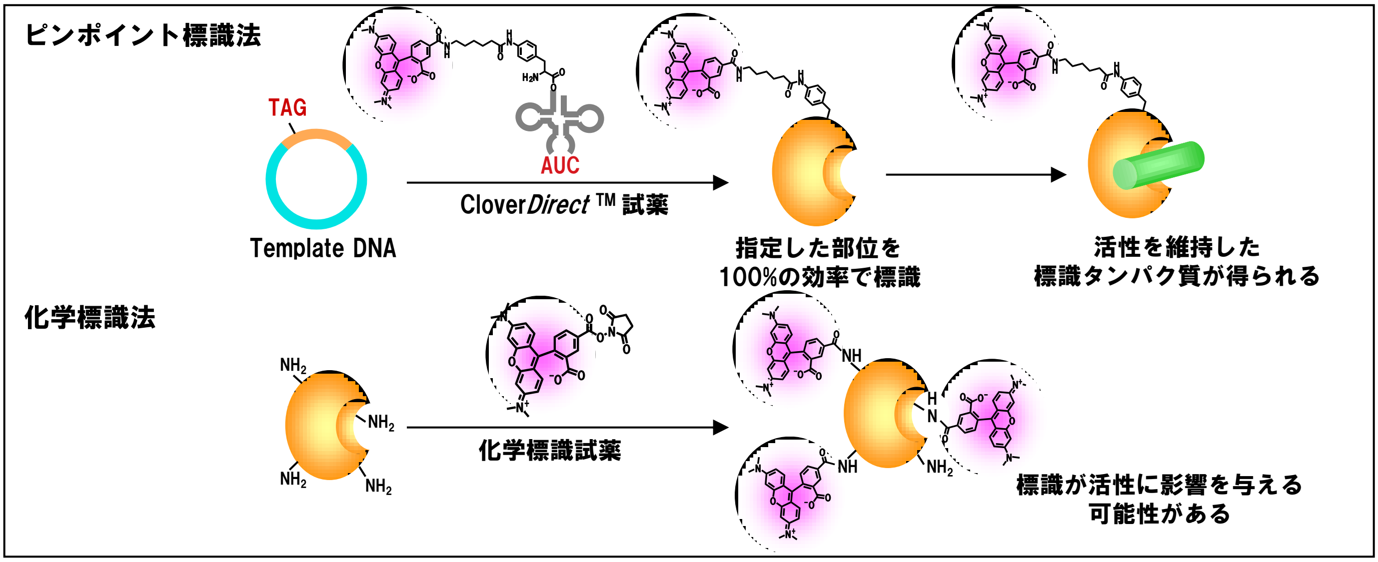
[Clover*Direct* ™ 試薬について]

Clover*Direct* ™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalizationは、無細胞翻訳系を利用してタンパク質の指定した部位に非天然アミノ酸を導入するための試薬です。蛍光基、ビオチン、PEG鎖、架橋剤を側鎖に持つ非天然アミノ酸や、翻訳後修飾アミノ酸などが用意されています。アンバーコドンまたは4塩基コドンを組み込んだ遺伝子と本製品を無細胞翻訳系に加えるだけで、非天然アミノ酸導入タンパク質を短時間で効率よく合成することができます。
Clover*Direct* ™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalizationは、以下の4つに分類されます。
なおこの他に、ご希望の非天然アミノ酸を導入する受託サービスもあります。詳細はp.11をご覧下さい。



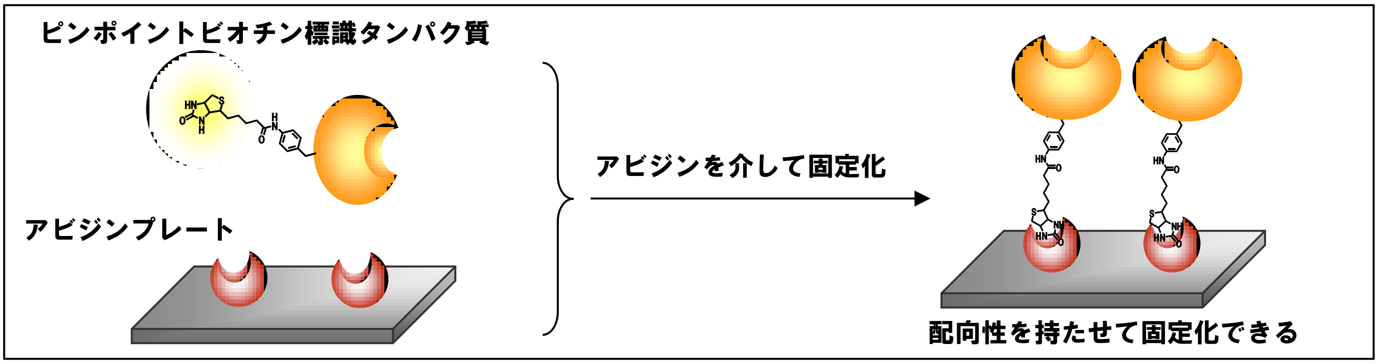
ピンポイント蛍光標識 [for Fluorescence Labeling]

化学標識法ではタンパク質中の指定した部位のアミノ酸のみを100%の効率で標識することは一般的に困難です。
Clover*Direct* ™ tRNA Reagents for Site-Directed Fluorescence Labelingは、蛍光標識した非天然アミノ酸を指定した部位のみに定量的に導入できます。蛍光基として各種レーザー (488nm, 543nm, 633nm) に対応したものが選択できます。



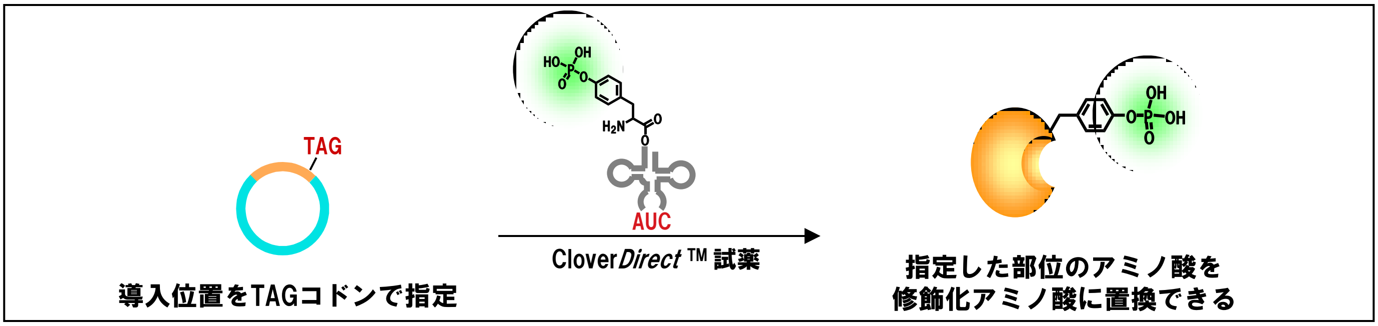
ピンポイントビオチン標識 [for Biotin Labeling]

Clover*Direct* ™ tRNA Reagents for Site-Directed Biotin Labelingは、ビオチン標識した非天然アミノ酸をタンパク質の指定した部位のみに定量的に導入できます。ビオチン標識タンパク質は、配向性を持たせて基板やビーズ表面にアビジンを介して固定化することができます。また、リンカー長の異なるものが選択できます。



翻訳後修飾 [for Post-Translational Modification]

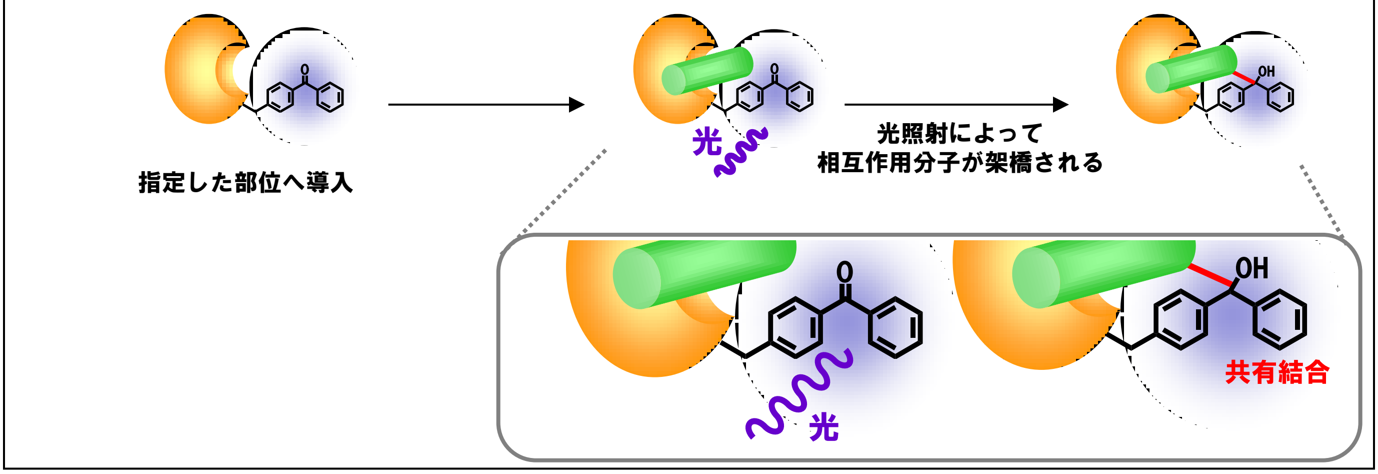
特定部位のアミノ酸を翻訳後修飾（リン酸化、メチル化等）したタンパク質を得ることは一般的に容易ではありません。Clover*Direct* ™ tRNA Reagents for Site-Directed Post-Translational Modificationは、あらかじめ修飾されたアミノ酸を導入することで、指定した部位のアミノ酸を翻訳後修飾したタンパク質が合成できます。



機能性非天然アミノ酸導入 [for Unnatural Mutagenesis]

側鎖に機能基を持つ非天然アミノ酸を導入することで、様々な人工機能タンパク質を設計・合成することができます。Clover*Direct* ™ tRNA Reagents for Site-Directed Unnatural Mutagenesisは、PEG鎖、架橋剤などの機能基を側鎖に持つ非天然アミノ酸を導入した人工機能タンパク質の合成を可能にします。

例）BPA（*p*-benzoyl-phenylalanine）

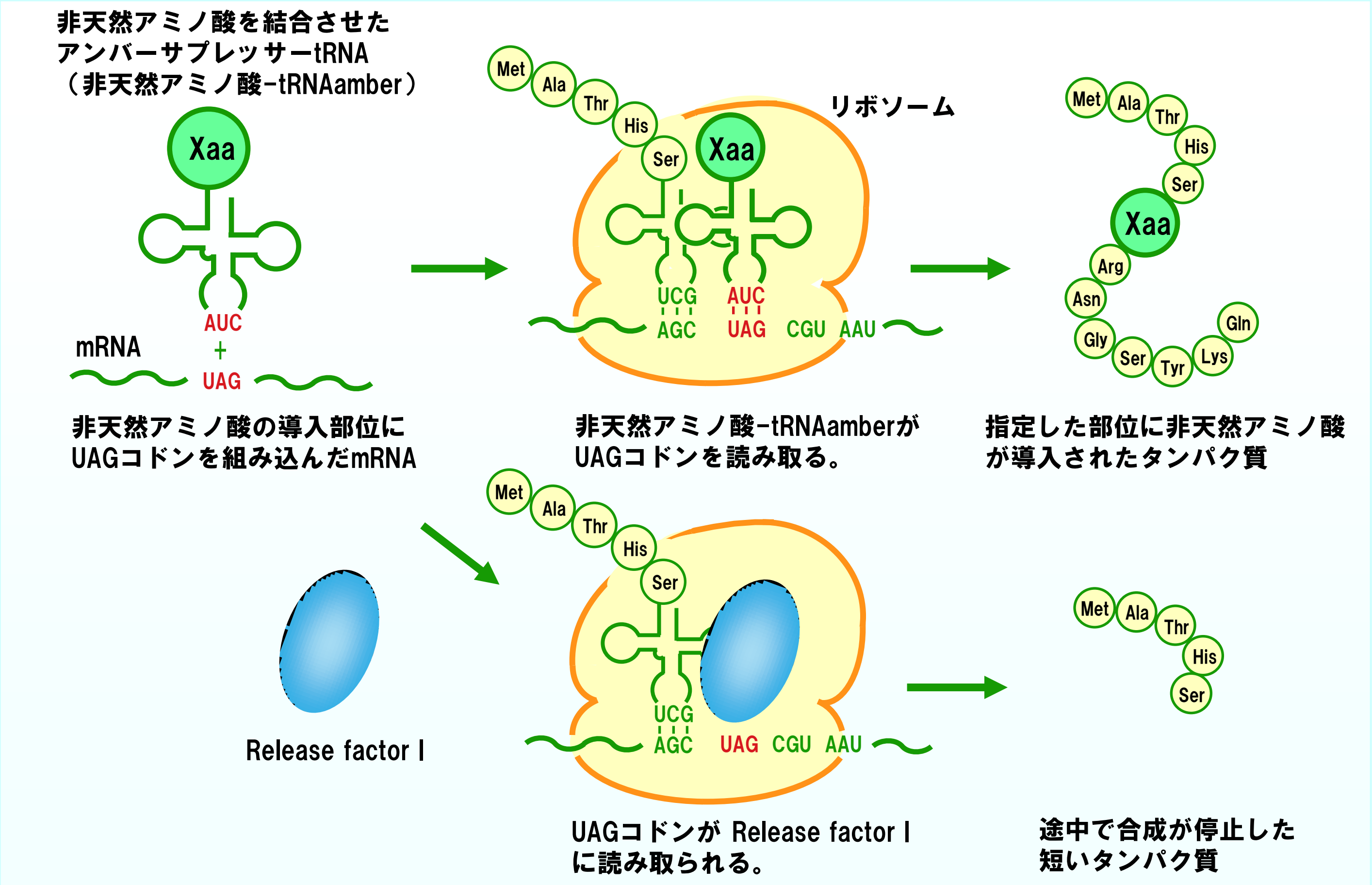


[CloverDirect™を用いた非天然アミノ酸導入の原理]

導入部位の指定は終止コドンであるUAGコドン(アンバーコドン)もしくはCGGGコドン(4塩基コドン)で行います。CloverDirect™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalizationに含まれる非天然アミノ酸-tRNAは、無細胞翻訳中でアンバーコドンもしくは4塩基コドンを読み取って、非天然アミノ酸に翻訳します。これにより、指定した部位に非天然アミノ酸の導入されたタンパク質が合成されます。
また、アンバーコドンと4塩基コドンを同時に使うことで、2種類の非天然アミノ酸をタンパク質に同時に導入することも可能ですので、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)を用いる実験などに利用できます。

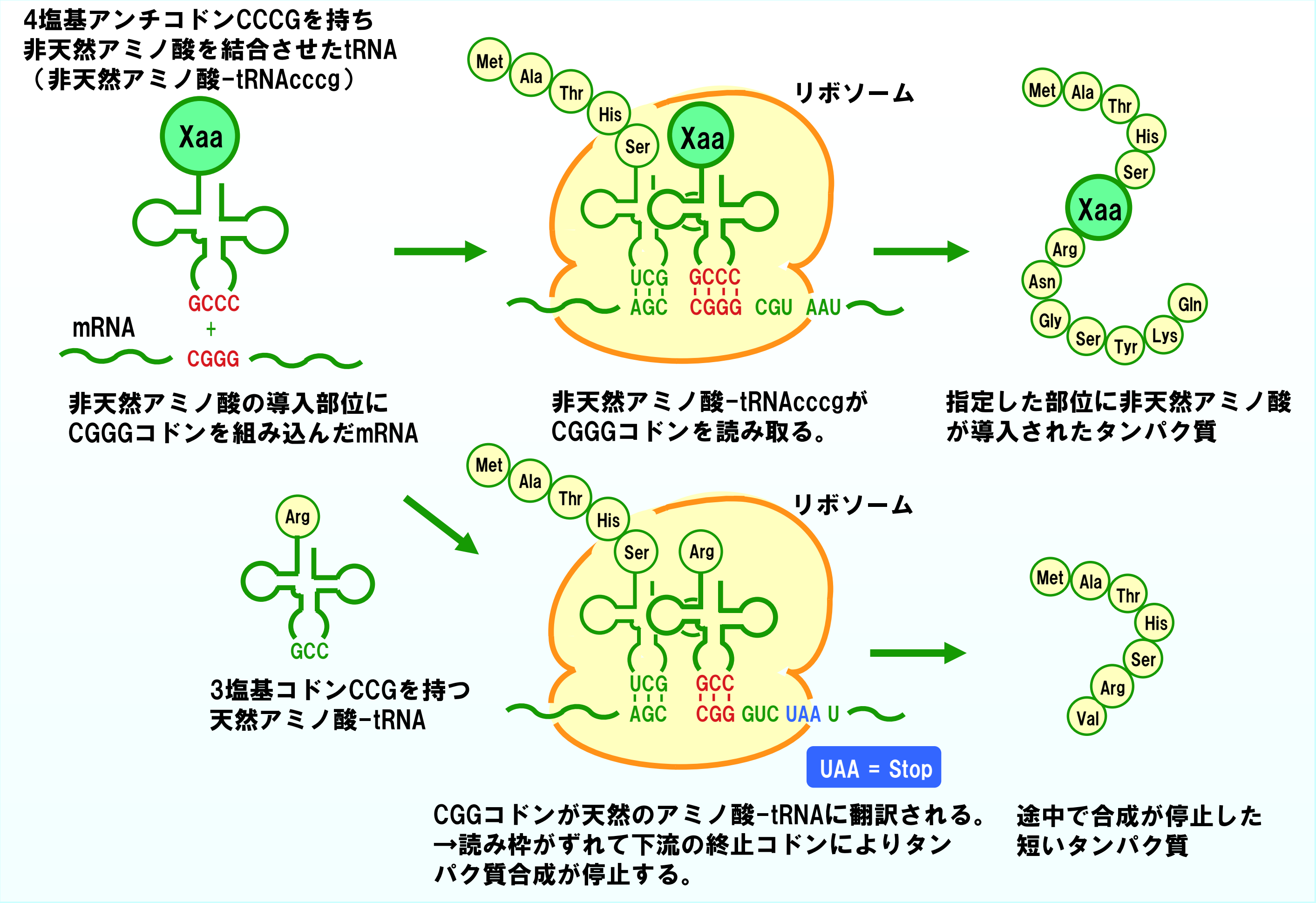
[アンバーコドン用tRNAを用いる場合]

導入部位の指定は終止コドンの１つであるUAGコドン(アンバーコドン)で行います。
まず、UAGコドンを挿入または置換した遺伝子を構築します。 この遺伝子を、本製品の非天然アミノ酸-tRNAとともに無細胞翻訳系に加えると、tRNAがUAGコドンを読み取り、指定された位置に非天然アミノ酸が導入されます。この際、UAGコドンを終結因子が読み取った場合には、その時点でタンパク質合成が停止します。したがって、完全長タンパク質として合成されたものは、100%の効率で非天然アミノ酸が導入されていることになります。
なお、非天然アミノ酸の種類によっては、導入部位によりその導入効率が大きく異なるものがありますので、使用の際は、製品の詳細にてご確認下さい。



[CGGGコドン用tRNAを用いる場合]

導入部位の指定はCGGGコドン(4塩基コドン)で行います。
まず、CGGGコドンを挿入または置換した遺伝子を構築します。 この遺伝子を、本製品の非天然アミノ酸-tRNAとともに無細胞翻訳系に加えると、tRNAがCGGGコドンを読み取り、指定された位置に非天然アミノ酸が導入されます。この際、CGGコドンを認識するArg-tRNAが読み取った場合には、読み枠がずれて下流の終止コドンによりタンパク質合成が停止しますが、CGGコドンは使用頻度が低いコドン（マイナーコドン、レアコドン）のためにその可能性は低くなっています。
なお、非天然アミノ酸の種類によっては、導入部位によりその導入効率が大きく異なるものがありますので、使用の際は、製品の詳細にてご確認下さい。



(注意) 標識のためにCGGGコドンをN末端領域(2～20残基程度)へ挿入、置換した場合、周辺配列によってはフレームシフト等の影響により、標識されていないタンパク質が発現してしまう場合があります。CGGGを使用してN末端領域を標識する場合は、弊社が開発したオリジナルのペプチドタグ(ProX®tag)を用いることをお奨めします。

5'-	AUG	UCU	AAA	CAA	AUC	GAA	GUA	AAC	CGGG	UCU	AAU	GAG	-3'
	Met	Ser	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Asn	Xaa	Ser	Asn	Glu	

ProX®tag　配列

【製品構成】

・非天然アミノ酸-tRNA	1本
・tRNA buffer	1本

※　1本につき300μLの翻訳反応が行えます。小スケールで反応を行う場合、非天然アミノ酸-tRNAを溶解して使用後、残りの溶液は、-80℃にて2ヵ月間保存できます。

【別途用意する試薬】

（タンパク質発現）

・無細胞翻訳系試薬（大腸菌由来）
（例：RYTS kit; プロテイン・エクスプレス, #CF002）

・導入部位にUAG（もしくはCGGG）コドンを持つ発現遺伝子（環状DNA, 直鎖上, またはmRNA）
（ご使用になる無細胞翻訳系に最適なベクターをご使用ください。）

（精製・バッファー置換、濃縮）

・精製用カラム（レジン）, およびバッファー
（例：His SpinTrap™ kit; GEヘルスケアバイオサイエンス, #28-9321-71）

・Ultrafiltration Membrane, およびバッファー
（例：ULTRAFREE®-0.5 Centrifugal Filter Devices 10k; ミリポア, UFV5BC00）

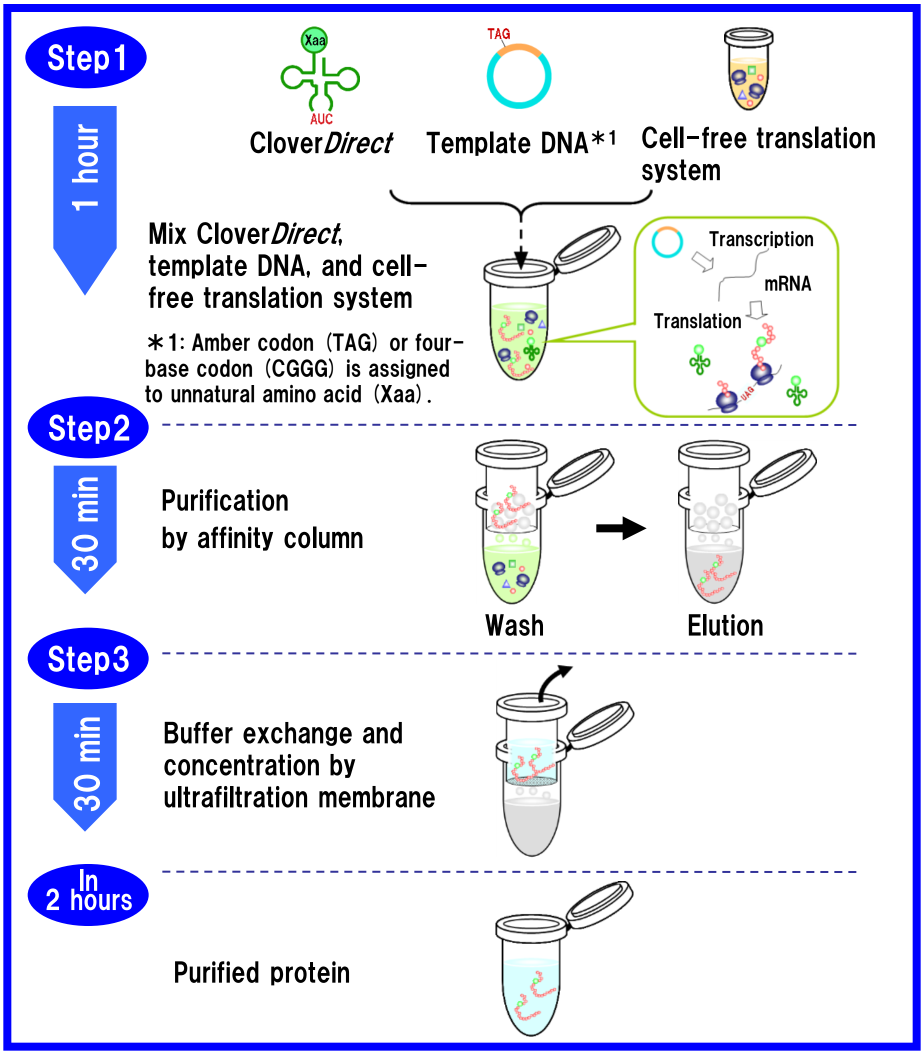
※ 他社製試薬キットの使用は一例です。ご使用目的に合わせて変更してください。

【実験手順】

Step 1 タンパク質合成
tRNA bufferに溶解させた非天然アミノ酸-tRNAを、template DNAとともに無細胞翻訳系へ添加します。これにより、UAGもしくはCGGGで指定した部位へ非天然アミノ酸が導入されたタンパク質が合成されます。

Step 2 精製
反応液の中には無細胞翻訳系由来のタンパク質が混在し、またタンパク質に取り込まれなかった非天然アミノ酸も含まれていますが、His tagなどのタグを使用した精製によって、非天然アミノ酸導入タンパク質を単離することができます。

Step 3 バッファーの置換、濃縮
限外ろ過(UF)カラムを用いることで、短時間でバッファー置換と濃縮を行うことできます。得られた非天然アミノ酸導入タンパク質は、そのまま実験に用いることができます。

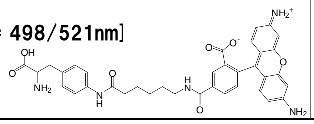


Technical Overview of CloverDirect ™

【ご使用にあたっての注意点】

1. タンパク質発現確認
ご使用になるタンパク質が、大腸菌無細胞翻訳系で発現できることを確認してください。
Wild-Type (UAGコドンやCGGGコドンを挿入していない遺伝子) にて発現量が著しく低い場合は、遺伝子配列の最適化やN末端tagの付加等により発現量の改善を行ってください。弊社では無細胞翻訳系でのタンパク質発現サービスや遺伝子合成サービスを提供しておりますのでご利用下さい。

2. 導入部位についての注意点
非天然アミノ酸の種類によっては、導入可能な部位に制限が生じる場合があります。
製品リストにてご確認ください。

ピンポイント 蛍光標識 [for Fluorescence Labeling]	導入可能部位 (注釈) N末端領域	導入可能部位 (注釈) 内部 C末端領域	認識 コドン	容量 (translation)	製品 コード
CR110-X-AF [5-CR110-X : Abs/Em = 498/521nm] 	○	×	Amber	300 µL	CLD1001
				5 X 300 µL	CLD2001
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2002

○ : 導入可能
△ : 部位によっては導入が可能
× : 導入は困難

N末端領域とは、N末端のメチオニンから20残基程度までを表します。

(注意) 導入のためにCGGGコドンをN末端領域 (2～20残基程度) へ挿入、置換した場合、周辺配列によってはフレームシフト等の影響により、標識されていないタンパク質が発現してしまう場合があります。CGGGを使用してN末端領域を標識する場合は、弊社が開発したオリジナルのペプチドタグ (ProX®tag) を用いることをお奨めします。

5'-	AUG	UCU	AAA	CAA	AUC	GAA	GUA	AAC	CGGG	UCU	AAU	GAG	-3'
	Met	Ser	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Asn	Xaa	Ser	Asn	Glu	

ProX®tag 配列

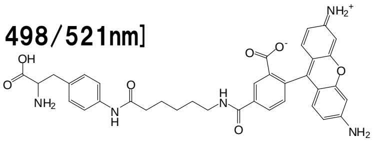
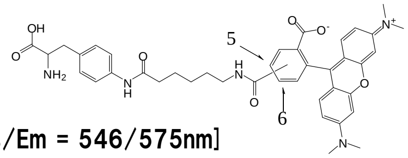
3. 非天然アミノ酸-tRNA
リスト以外に、ご希望の非天然アミノ酸 (標識アミノ酸、機能性アミノ酸など) を結合させたtRNAを作製いたします。オリジナルの非天然アミノ酸導入タンパク質の合成が可能になります。

● 非天然アミノ酸-tRNA受託合成サービス.....................................p.11

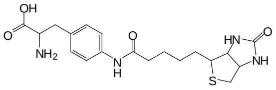
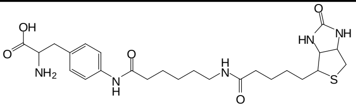
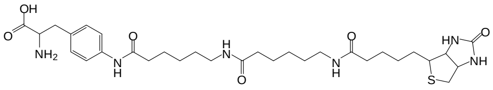
また、オプションで変異遺伝子の作製、無細胞翻訳系におけるタンパク質発現を含めた非天然アミノ酸導入タンパク質のトータルサービスもございます。

● 非天然アミノ酸導入タンパク質の受託合成サービス.....................p.11

ピンポイント蛍光標識 [for Fluorescence Labeling]

製品	導入可能部位（注釈） N末端領域	導入可能部位（注釈） 内部 C末端領域	認識コドン	容量 (translation)	製品コード
CR110-X-AF [5-CR110-X : Abs/Em = 498/521nm] 	○	×	Amber	300 µL	CLD1001
			Amber	5 X 300 µL	CLD2001
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2002
HiLyte Fluor™ 488-AF [HiLyte Fluor™ 488 : Abs/Em = 497/525nm] 構造は非公開	○	×	Amber	300 µL	CLD01※1
			Amber	5 X 300 µL	CLD05※1
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2004
TAMRA-X-AF  [5(6)-TAMRA-X : Abs/Em = 546/575nm]	○	×	Amber	300 µL	CLD02※1
			Amber	5 X 300 µL	CLD06※1
			CGGG	オリンパス社より販売	
ATTO633-AF [ATTO633 : Abs/Em = 629/657nm] 構造は非公開	○	×	Amber	300 µL	CLD03※1
			Amber	5 X 300 µL	CLD07※1
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2008
ATTO655-X-AF [ATTO655-X : Abs/Em = 663/684nm] 構造は非公開	○	×	Amber	300 µL	CLD1009
			Amber	5 X 300 µL	CLD2009
			CGGG	300 µL	CLD1010
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2010

ピンポイントビオチン標識 [for Biotin Labeling]

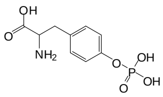
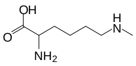
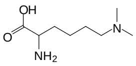
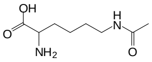
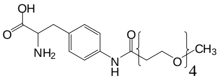
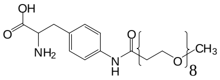
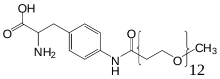
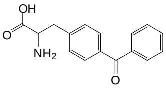
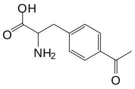
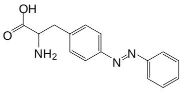
製品	N末端領域	内部 C末端領域	認識コドン	容量 (translation)	製品コード
Biotin-AF [Biotin] 	○	○	Amber	5 X 300 µL	CLD2101
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2102
Biotin-X-AF [Biotin-X] 	○	○	Amber	5 X 300 µL	CLD2103
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2104
Biotin-XX-AF [Biotin-XX] 	○	△	Amber	300 µL	CLD04※1
			Amber	5 X 300 µL	CLD08※1
			CGGG	5 X 300 µL	CLD2106

［価格はお問い合わせ下さい］

（注釈）導入可能部位

非天然アミノ酸の種類によって、導入可能な部位が異なります。
○：導入可能
△：部位によっては導入が可能
×：導入は困難

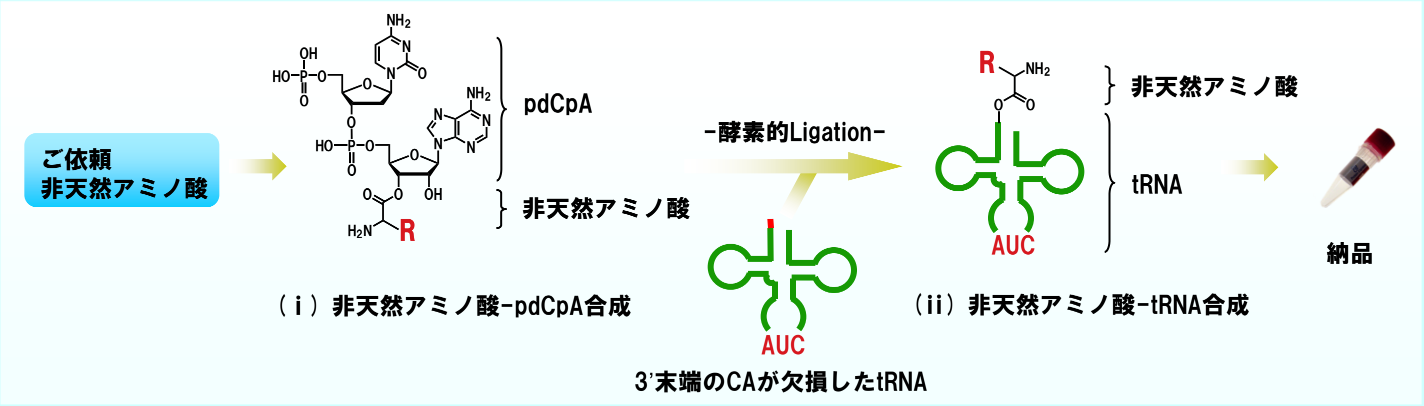
※1：フナコシ社から購入できます。

	導入可能部位		認識コドン	容量 (translation)	製品コード
翻訳後修飾 [for Post-Translational Modification]	N末端領域	内部 C末端領域			
Tyr (PO_3H_2) [*O*-phospho-Tyr] 	○	△	Amber	5 X 300 μL	CLD2201
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2202
Lys (Me) [ε-methyl-Lys] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2203
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2204
Lys (Me_2) [ε-dimethyl-Lys] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2205
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2206
Lys (Ac) [ε-acetyl-Lys] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2207
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2208
非天然アミノ酸導入 [for Unnatural Mutagenesis]					
PEG標識アミノ酸					
PEG4-AF [Methyl-PEG4] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2301
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2302
PEG8-AF [Metyl-PEG8] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2303
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2304
PEG12-AF [Methyl-PEG12] 	○	△	Amber	5 X 300 μL	CLD2305
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2306
架橋アミノ酸					
BPA [*p*-benzoyl-phenylalanine] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2321
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2322
AcPhe [*p*-acetyl-phenylalanine] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2323
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2324
光異性化アミノ酸					
azoAla [*p*-phenylazophenyl-alanine] 	○	○	Amber	5 X 300 μL	CLD2331
			CGGG	5 X 300 μL	CLD2332

[価格はお問い合わせ下さい]

[非天然アミノ酸-tRNA受託合成サービス]

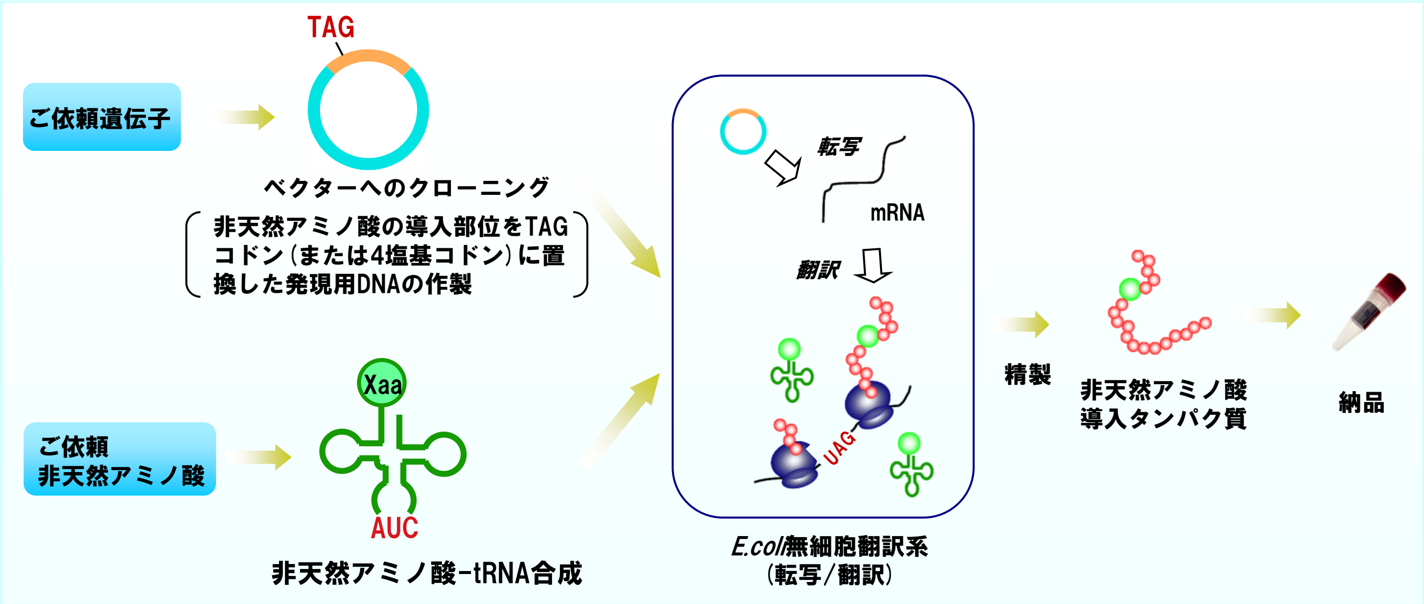
ご希望の非天然アミノ酸を結合させたtRNAを作製いたします。オリジナルの非天然アミノ酸導入タンパク質の合成が可能になります。



非天然アミノ酸-tRNA受託合成サービス

[非天然アミノ酸導入タンパク質の受託合成サービス]

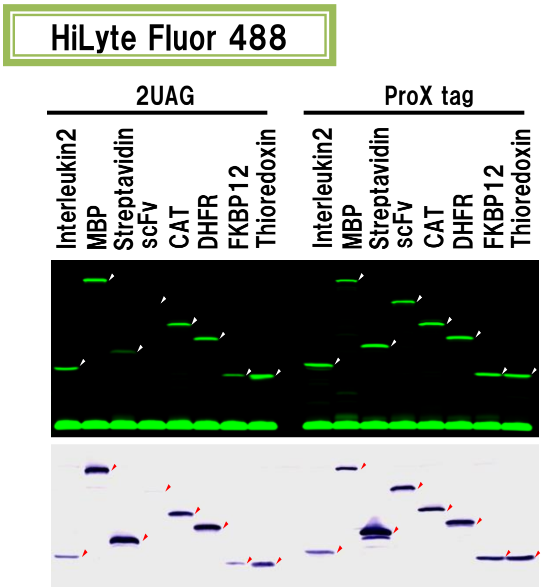
UAGコドンあるいはCGGGコドンを用いて、ご希望の非天然アミノ酸を目的の部位へピンポイントに導入したタンパク質を、*E.coli*由来の無細胞発現系を用いて合成いたします。また、設立以来、組み換えタンパク質生産の専門技術を持つ会社として蓄積されたタンパク質発現に関わる知識とノウハウを活かして、遺伝子の合成からタンパク質の精製までトータルサポート致します。

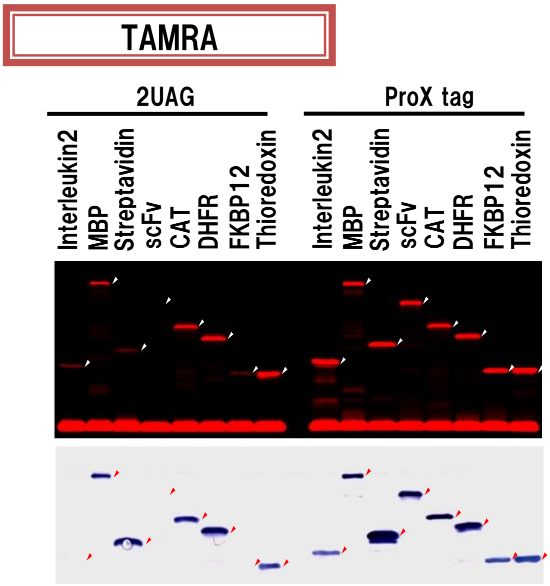


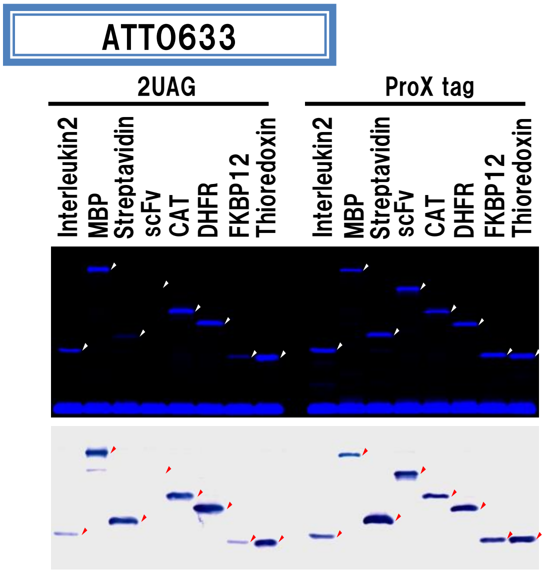
非天然アミノ酸導入タンパク質のトータル受託合成サービス

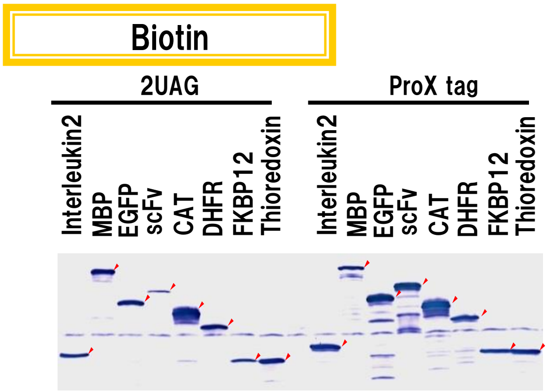
[ピンポイント標識タンパク質の発現例]

非天然アミノ酸導入タンパク質は、SDS-PAGEで分離し、蛍光色素の場合は、直接ゲルを蛍光イメージャーで検出できます。また、その他非天然アミノ酸を導入した場合は、タグペプチド抗体などによるウエスタンブロットによっても検出することができます。通常は1レーン当たり、0.25～1 µLの無細胞翻訳反応液で十分検出できます。
※ 反応液の中にはタンパク質に取り込まれなかった遊離の標識アミノ酸が多く含まれています。この遊離の標識アミノ酸はSDS-PAGEでの検出において泳動先端に確認されます。









標識タンパク質の発現確認
2UAG ：開始AUG直後にUAGコドンを挿入した遺伝子
ProX tag ：ProX tag（UAG）を付加した遺伝子
ゲルへのアプライ量：翻訳反応液 0.25µL相当量
蛍光イメージャー検出波長（上図）
HiLyteFluor488 励起488nm / 検出520 nm
TAMRA 励起532nm / 検出580 nm
ATTO633 励起635nm / 検出670 nm
ウエスタンブロット（下図）：抗His tag抗体を使用
（ビオチン標識タンパク質の検出には抗ビオチン抗体を使用）

[ピンポイント標識タンパク質の使用例]

本試薬を用いて合成した蛍光標識タンパク質は、以下のような測定に用いることができます。

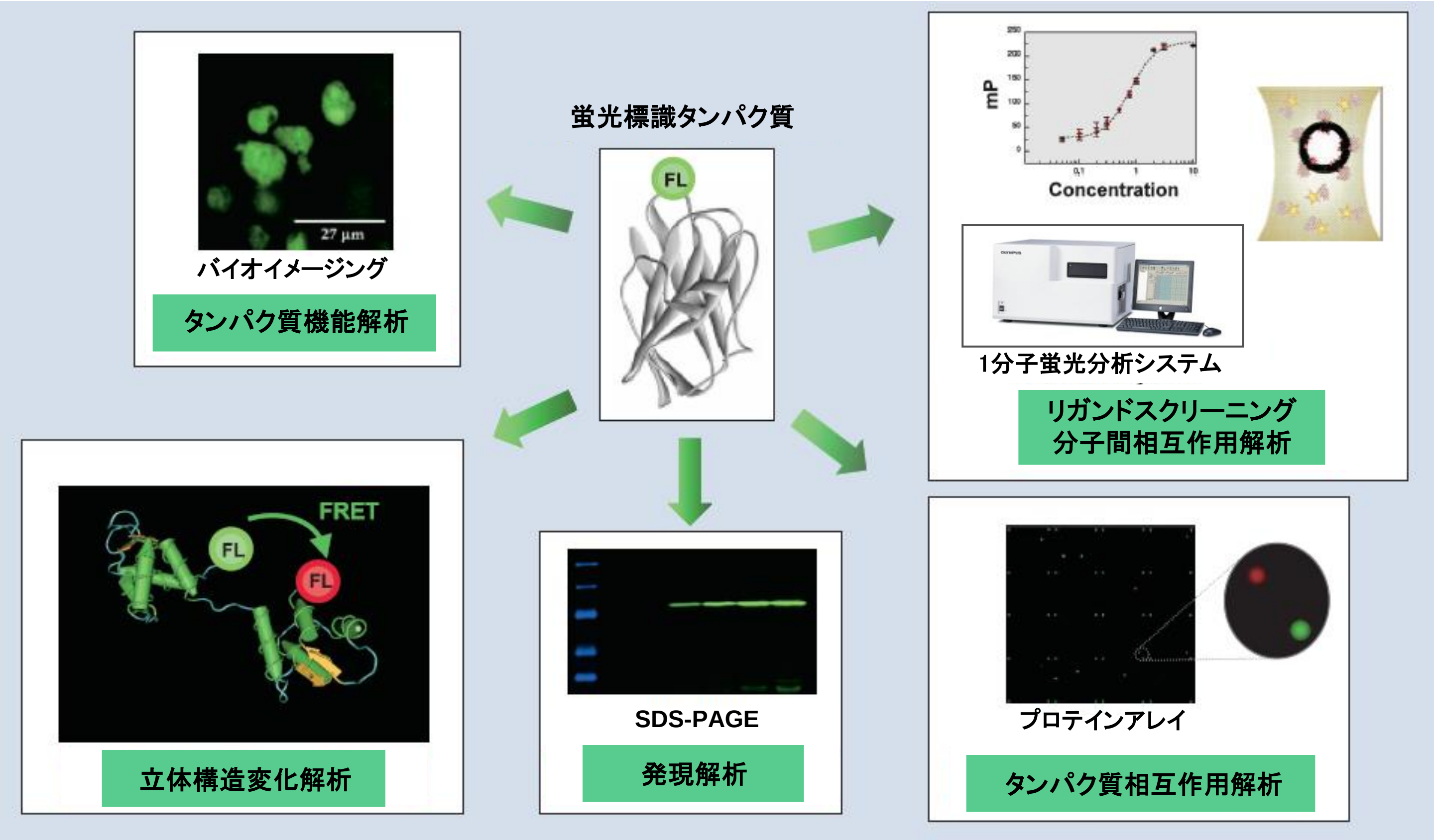
・1分子蛍光分析を利用した相互作用解析

・分子間, 分子内においての蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)

・細胞内でのタンパク質機能分析

・タンパク質アレイを利用した相互作用解析

・SDS-PAGEによるタンパク質発現解析



[参考文献]

1) FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids
Daisuke Kajihara, Ryoji Abe, Issei Iijima, Chie Komiyama, Masahiko Sisido, Takahiro Hohsaka
Nature Methods., 3, 923-929 (2006).

2) Position-specific incorporation of biotinylated non-natural amino acids into a protein in a cell-free translation system
Takayoshi Watanabe, Norihito Muranaka, Issei Iijima, Takahiro Hohsaka
Biochem. Biophys. Res. Commun., 361, 794-799 (2007)

3) Comprehensive screening of amber suppressor tRNAs suitable for incorporation of non-natural amino acids in a cell-free translation system
Hikaru Taira, Yosuke Matsushita, Kenji Kojima, Kaori Shiraga, Takahiro Hohsaka
Biochem. Biophys. Res. Commun., 374, 304-308 (2008).

4) Efficient Incorporation of Nonnatural Amino Acids with Large Aromatic Groups into Streptavidin in In Vitro Protein Synthesizing Systems
Takahiro Hohsaka, Daisuke Kajihara, Yuki Ashizuka, Hiroshi Murakami, Masahiko Sisido
J. Am. Chem. Soc., 121, 34-40 (1999).

5) 遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成系の開発と応用, 芳坂貴弘
生物物理, 47(2), 124-128 (2007).

6) 無細胞翻訳系における非天然アミノ酸の導入技術の開発とその応用, 芳坂貴弘
生化学, 72(3), 247-253 (2007).

[製品についてのお問い合わせ]

株式会社プロテイン・エクスプレス
URL : http://www.proteinexpress.co.jp
〒260-0856　千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-15
　　　　　　千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL : 043-202-5755
FAX : 043-202-5756
E-mail : tech@proteinexpress.co.jp

CloverDirect™

tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization

株式会社プロテイン・エクスプレス

URL：http://www.proteinexpress.co.jp

〒260-0856　千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-15

千葉大亥鼻イノベーションプラザ内

TEL：043-202-5755

FAX：043-202-5756

E-mail：tech@proteinexpress.co.jp

ProteinExpress

Catalogue 2013/04