

SYNTHETIC BIOLOGY

QuikChange HT

Protein Engineering System



より速く、1回の実験で 多くの情報を取得

- 機能部位をすばやく特定 - タンパク質全体での Site Saturation Scanning
- 標的部位へのコンビナトリアル変異により、最小限のスクリーニングで機能変化に関わるアミノ酸変異を明らかに
- 1つのタンパク質または類縁タンパク質に変異導入が可能

概要

部位特異的変異導入 (Site Directed Mutagenesis) は、タンパク質への変異導入を合理的に行う最良の方法として使われており、正確に目的とする変異体を得ることができます。

この度、正確性の高いアジレントのカスタムオリゴ DNA ライブラリと定評ある QuikChange 技術を組み合わせた新たなシステム、QuikChange HT Protein Engineering System (以降 QuikChange HT) を提供します。QuikChange HT により、対象領域の各アミノ酸残基を特定の1種類のアミノ酸で順次置換する Single Amino Acid Scanning、対象アミノ酸を他の19種類のアミノ酸で置換する Site Saturation Scanning、さらには、一つのオリゴセットに対して最大4カ所のアミノ酸を別の様々なアミノ酸で置換して組み合わせる大規模なコンビナトリアル変異導入が可能になります。このようにして網羅的かつ大規模な変異株のライブラリを設計し作製することにより、タンパク質の構造や機能に関する解析を効率よく行うことができます。

一挙両得に

変異導入ライブラリを合理的に設計することで、タンパク質の活性や結合効率や、溶解性、浸透性、立体構造、細胞内局在などの物理的特性に関する機能部位を効率的かつ網羅的に特定できます。

従来、変異導入ライブラリを無駄なく合理的に作製するには、タンパク質の立体構造情報が必要でした。結果として、大規模な部位特異的変異導入の実験は費用がかかり、ハイスループットの変異導入には課題がありました。また、エラーを誘発させる PCR (EP-PCR) は網羅的とは言えず、不要な変異が数多く発生し、複数箇所に変異が入ることもあるため、どの変異が機能上重要であるかを確認するために追加実験が必要になる場合もあります。

ハイスループットで高品質なオリゴ DNA ライブラリ合成が可能なアジレントの SurePrint 技術によって、合理的な Single Amino Acid Scanning、Site Saturation Scanning、さらにはコンビナトリアル変異導入が可能になります。QuikChange 技術との組み合わせにより、機能が向上した変異体を同定できるだけなく、構造および機能の関連性を見出すことができます。遺伝子全体を合成するためのコストを必要とせず、SurePrint 技術によって、スクリーニングするクローンの数を最小限に抑えることが可能です。

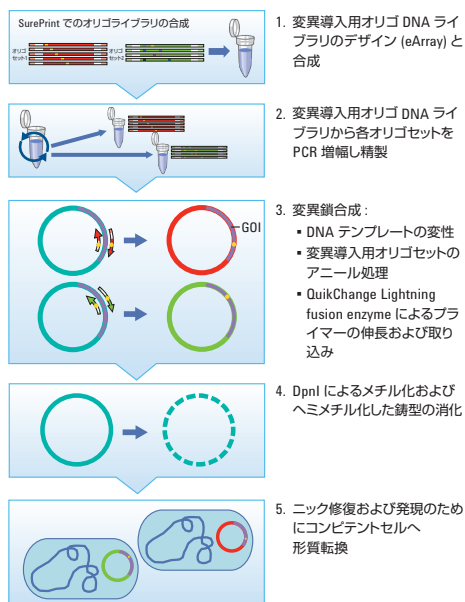


図 1. QuikChange HT の原理

QuikChange HT の応用分野

抗体工学	リン酸化部位
酵素工学	タンパク質/タンパク質相互作用
タンパク質の折り畳みおよび可溶性	タンパク質発現コドン最適化
機能性のある部位の同定	SNP 検証

QuikChange HT Protein Engineering System

より速く、より多く

- QuikChange HT における合理的な設計により、コドンの重複および偏りに加えて、縮重オリゴや EP-PCR の使用時に見られるアミノ酸をコードしていない変異、野生株および目的以外の変異の入った変異株を除去することができます。
- 高い信頼性で構造と機能の関連性を確認します。必要な変異導入だけが含まれるため、大量の目的以外の変異株のスクリーニングが不要になり、時間を効率化しコストを削減します。
- コドンを宿主生物に最適化することで、関連変異株を迅速に作製します。
- 効率的なスクリーニングにより、確認のためのシーケンシングの手間を軽減します。QuikChange HT では、特定の変異体をスクリーニングするためのコロニー数が縮重プライマーを用いて作製した変異株 (NNX/NNN) の 1/1.7 - 1/3.5 に抑えられています。
- すべての変異株が網羅的に作製されるため、知的財産の作成や保護をしやすくなります。

QuikChange HT のライブラリデザイン

QuikChange HT Protein Engineering System を使用すると、1 つのオリゴセットにつき最大 50 アミノ酸領域内のコドンを正確に標的にし、1 日以内で変異導入ができます。他のオリゴセットを併用すると、並列した反応で複数の異なる部位 (同じまたは異なるタンパク質にある他の最大 50 アミノ酸領域など) に変異導入を可能にします。

変異導入デザイン設計用の無償ワークスペースソフトウェアの eArray (agilent.com/genomics/earray) にアクセスすることにより、1,000 から最大 120,000 種類の変異導入が可能なオリゴ DNA からなるオリゴ DNA ライブラリを設計することができます。

ライブラリは、1 つのタンパク質または複数のタンパク質の異なる領域を標的とした複数のオリゴセット (最大 20) で構成されています。各オリゴセットは、相同性のある DNA 配列から成り立っており、同じ遺伝子のフラグメントにハイブリッドすることができるように最大 4 ヶ所のアミノ酸を変えています。それぞれのオリゴの末端は、オリゴセットを PCR 増幅するために、もとの配列と完全に相補する配列になっています。各変異導入ライブラリは実験ごとにカスタマイズされており、研究者はこのライブラリを受け取り後、1 日以内で形質転換されたコンピテントセルのライブラリを作製できます。

	QuikChange HT	QuikChange + 縮重オリゴ	GeneMorph II
メソッド	部位特異的変異導入	部位特異的変異導入	ランダムな変異導入
構造情報が必要	×	○	×
構造情報を提供	○	○	×
(意図する変異導入の) カバー率	95~100 %	60~100 %	10~50 %
ライブラリサイズ当りのスクリーニングするクローン数	1x	1.7~3.5x (コドンの重複・偏りによる)	100x (コドンの重複・偏り、アミノ酸をコードしていない変異等による)
オリゴ DNA ライブラリから形質転換までに必要な試薬のキット化	○	×	×
コスト	¥¥	¥¥¥	¥

図 2. 変異導入メソッドの比較

QuikChange Lightning の性能によって事実上のような種類の二本鎖プラスミドでも部位特異的変異導入が可能のため、サブクローニングや ssDNA レスキューが不要になり、極めて高い正確性による DNA 合成と 80 % を超える高い効率の形質転換が可能になります。

変異導入メソッド：eArray 内の QuikChange HT 変異導入用のワークスペースを使用することで、変異導入ライブラリを容易に設計することができます。タンパク質全体または選択したドメインをカバーする 1-20 の各オリゴセットにつき、15-50 アミノ酸の領域を設定します。次に各領域ごとに QuikChange HT の 3 つの変異導入メソッド (図 3) から 1 つを選択して各オリゴセットを作成します。1 つのタンパク質または類縁タンパク質のオリゴセットを組み合わせると最大で 120,000 種類の変異導入ライブラリを作成します。

検証：GFP の Site Saturation Scanning の例

合理的に設計された変異導入ライブラリの性能を検証するために、GFP のコドンを変更した hrGFP に対して、Site Saturation Scanning を実施しました。この 1 回の実験で 40 の変異株が同定されました。そのうち 15 個の変異株は hrGFP より 15 倍明るく、しかも Vitality hrGFP II よりも明るいものでした。

興味深いことに、これらの 15 個のきわめて明るい変異株では、発色団を直接形成していない 2 つのドメインで変異導入がなされていることがわかりました。これにより、今後のコンビナトリアル変異導入のための標的領域が同定できました。

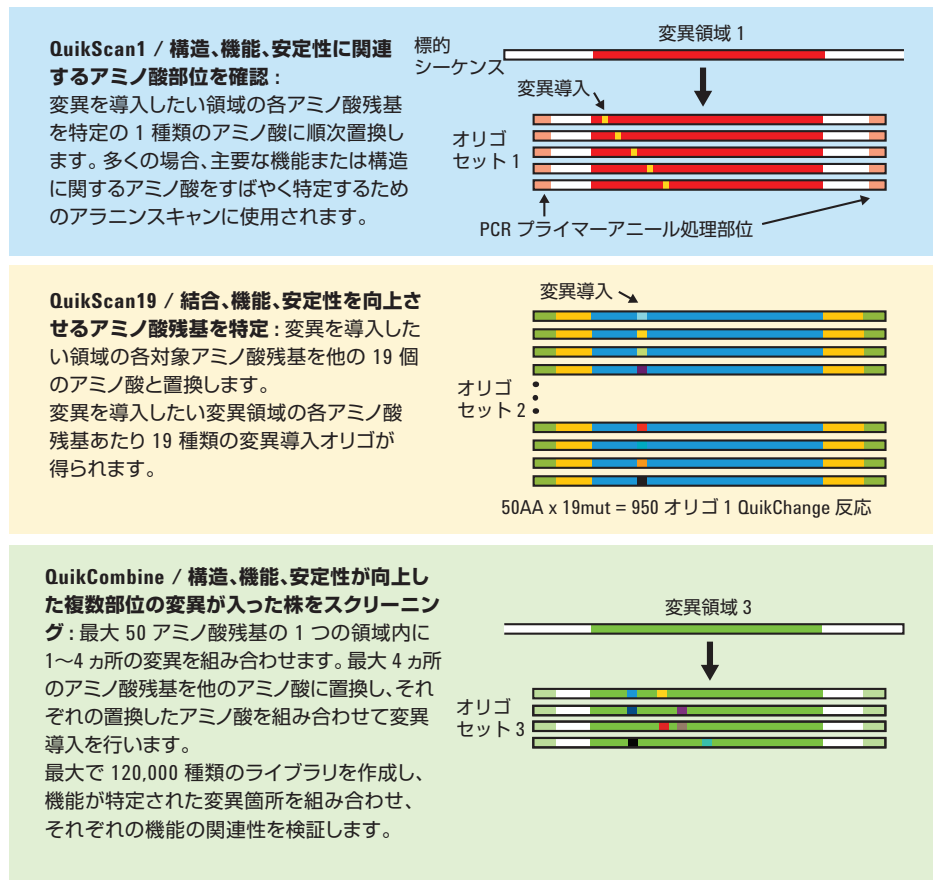
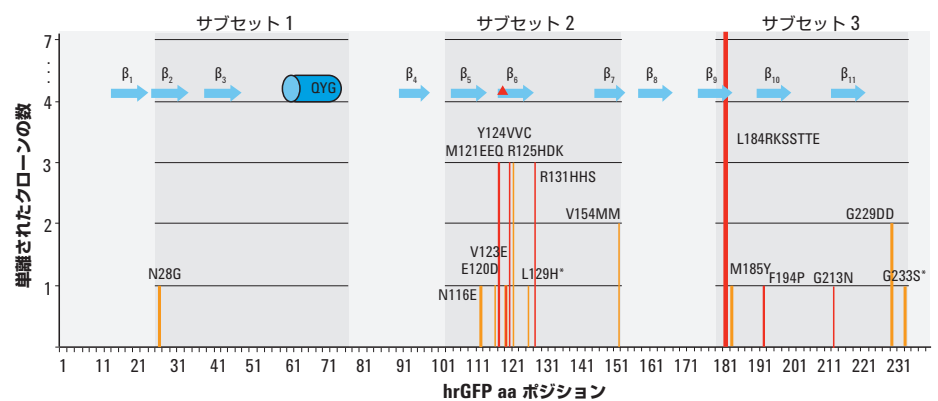


図 3. QuikChange HT 変異導入メソッド



	GFP サブセット 1 N 末端 (発色団)	GFP サブセット 2 中央	GFP サブセット 3 C 末端
変異導入したオリゴの数	7,800	14,000	8,900
スクリーニングしたクローンの数	13,200	25,000	15,400
蛍光クローンの割合 (%)	0.5 %	5.9 %	7.7 %
hrGFP/hrGFP II よりも明るい陽性数 (<i>E. coli</i>)	1/0	14/8	10/7

図 4. GFP の Site Saturation Scanning。蛍光を発する変異株の数が全体的に少なかったため、GFP 構造は変化に対してきわめて感受性が高いと考えられます。β1/β2 の立体構造は、タンパク質の方向性、完成度、および発色団の発光にとって重要です。他の酵素 (β-gal など) は、変異導入に対する寛容性がこれよりも大幅に高いものもあります。



QuikChange HT Protein Engineering System

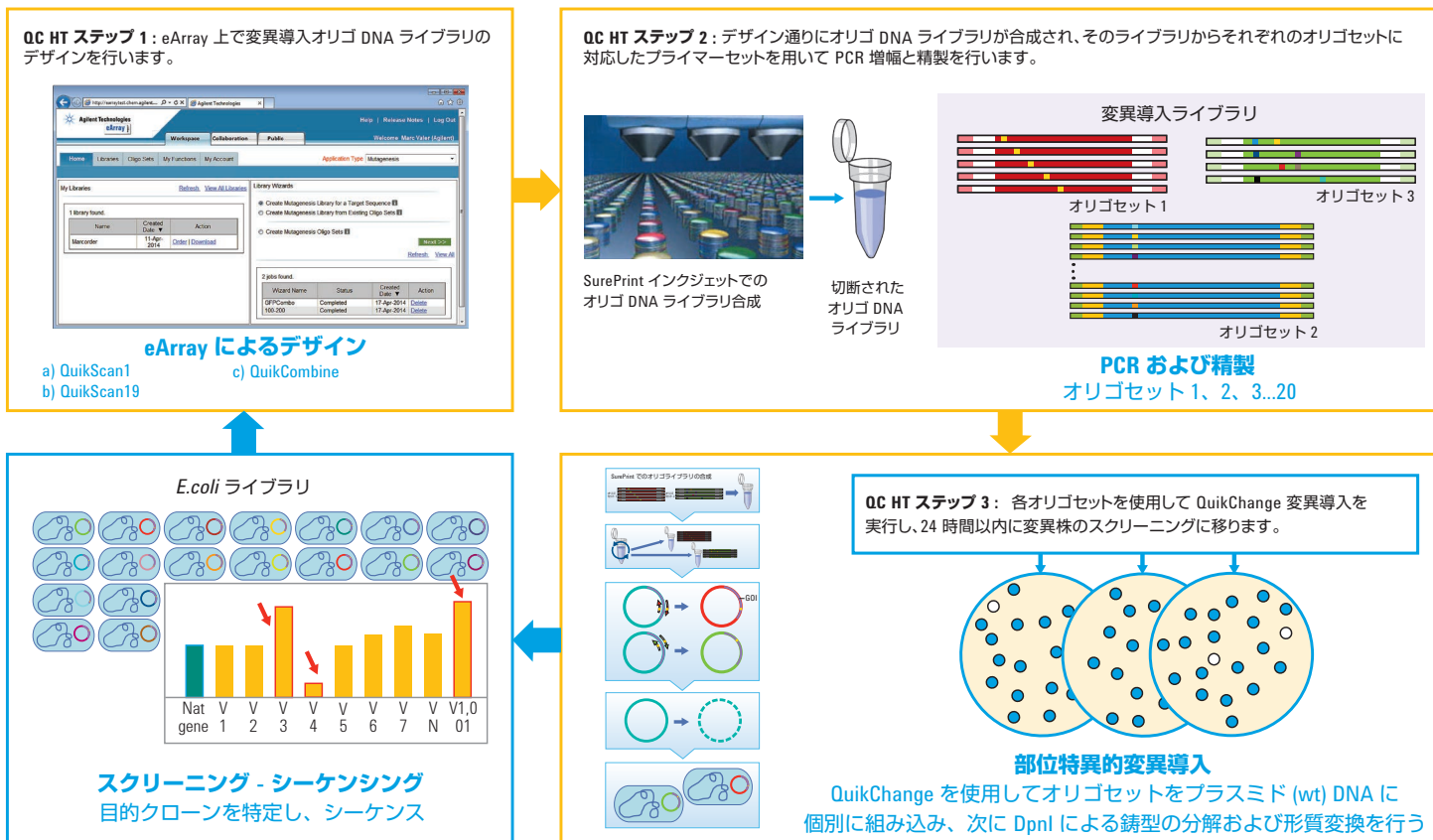


図 5. QuikChange HT のシンプルなワークフロー

QuikChange HT 製品構成

QuikChange HT Protein Engineering System には、変異株ライブラリを作製するために必要な、次の製品が含まれています。

- 最大で 120,000 種類の変異導入オリゴ DNA
- 各オリゴセットの増幅プライマーおよび増幅・精製用の試薬
- QuikChange 用の酵素および試薬
- SoloPack Gold SuperCompetent Cells

製品一覧

	品名	製品型番
営利団体・企業	QuikChange HT Protein Engineering System 150nt、10 sites	G5900A
	QuikChange HT Protein Engineering System 150nt、20 sites	G5900B
	QuikChange HT Protein Engineering System 200nt、10 sites	G5901A
	QuikChange HT Protein Engineering System 200nt、20 sites	G5901B
大学・官公庁	QuikChange HT Protein Engineering System 150nt-Academic、10 sites	G5902A
	QuikChange HT Protein Engineering System 150nt-Academic、20 sites	G5902B
	QuikChange HT Protein Engineering System 200nt-Academic、10 sites	G5903A
	QuikChange HT Protein Engineering System 200nt-Academic、20 sites	G5903B

詳細については、ホームページをご覧くださいか、カスタムコンタクトセンタまでお問い合わせください。

ホームページ: AgilentGenomics.jp
 カスタムコンタクトセンタ: **0120-477-111**

アジレント・テクノロジー株式会社
 © Agilent Technologies, Inc. 2014
 Printed in Japan, June 12, 2014
 5991-4691JAJP