Printed February 27, 2024 /Version 2

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Protein-Protein Interaction Analysis



CODE No. AM-1100M



Table of Contents

1.	Introduction	3
2.	Product Components and Storage Conditions	5
3.	Additional Materials Required	5
4.	Features of <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit	6
5.	Overview of the <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit procedure	8
6.	Photophysical Properties of <i>CoralHue</i> TM monomeric Kusabira-Green (mKG)	9
7.	Plasmid Maps and Primers of <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit	9
8.	Protocols	15
9.	Troubleshooting Guide	18
10.	References	19
11.	Appendix	20
12.	List of Figures	23
13.	List of Tables	23

1. Introduction

Amalgaam has developed, as the first in the world, the *CoralHue*TM Fluo-chase Kit which enables visualization of protein-protein interactions as fluorescent signals in mammal cells within 24 hours using the new fluorescent protein *CoralHue*TM Kusabira-Green, as a reporter protein.

Recently, numerous proteomics studies in post-genome research have been carried out. In these studies, protein-protein interaction assays are noteworthy from various views including investigation of drug discovery targets. Yeast two-hybrid (Y2H) assay is widely known as a typical example of protein-protein interaction assay. In the Y2H method, two target protein genes are fused to a DNA-binding domain gene and a transcriptional activator domain gene, respectively. When both target proteins interact, the function of the fused transcriptional activator recovers, resulting in expression of β -galactosidase, a reporter molecule. The Y2H method is not suited for interactions assay such as membrane proteins, because the protein interactions occur in the nuclei, and is also not suited for the case that protein itself has transcription activity. As a result, there is a problem that the Y2H method is not sufficient to conclude target protein interactions because it has a high false positive rate.

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit can detect protein-protein interactions as fluorescent signals using the protein fragment complementation method. The gene of *CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green (mKG), a reporter protein, is divided into two fragments (mKG_N fragment and mKG_C fragment) which are respectively fused to the target protein genes to investigate the interactions. When the expressed target proteins don't interact, mKG_N fragment and mKG_C fragment cannot approach each other and cannot emit fluorescence. However, when target proteins interact, divided mKG fragments spatially approach each other and the local effective concentration increases. As a result, mKG fragments form a steric structure before dividing and the chromophore emits fluorescence. The fluorescent signals can be detected depending on the fused target protein-protein interactions (Figure 1.).

*CoralHue*TM Kusabira-Green fluorescent protein fragment has no false positives because it cannot reconstruct the original steric structure and form chromophore unless the local effective concentration is increased by two target protein-protein interactions. Additionally, as the fluorescent proteins which constitute the chromophore cannot be dissociated, reconstructed *CoralHue*TM Kusabira-Green fluorescent proteins accumulate, resulting in high-sensitivity analysis even in weak protein-protein interactions (Figure 2.).

Various structure of protein complexes are formed by protein interactions. In some of the protein complexes for which we would like to study the interactions, there is a possibility that fluorescence cannot be detected because two fluorescent protein fragments cannot approach the interacted target protein because of steric problems and the fluorescent proteins can't be reconstructed. With the *CoralHue*TM Fluo-chase Kit, a plasmid, where each target protein gene is fused to the 5'-end and 3'-end of divided *CoralHue*TM Kusabira-Green gene N-terminal fragment and the 5'-end and 3'-end of *CoralHue*TM Kusabira-Green gene C-terminal fragment, is made. As a result, the detection rate of protein-protein interactions can be improved by making a plasmid which expresses the fused proteins with different locations between *CoralHue*TM Kusabira-Green fluorescent proteins and inserting them into culture cells with different

combinations.

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) is well known as one of the analysis technique of protein-protein interactions using fluorescent proteins. FRET can detect both the state in which target proteins are interacting (ON) and the state in which target proteins are not interacting (OFF) in real-time, while *CoralHue*TM Fluo-chase Kit can gather the history of the ON state as fluorescent signals. *CoralHue*TM Fluo-chase Kit simply measures cumulated fluorescent signals and is suited for measuring many samples while FRET needs to measure signals at certain times for imaging. Once the condition for detecting fluorescence is set, the change of interactions under various conditions including the addition of drugs such as inhibitors and the change of temperature can be analyzed with high-throughput.

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit can simply, without an enzyme or substrate, detect protein-protein interactions as fluorescent signals by introducing subcloned plasmid which targets the protein gene into cultured cells.



Figure 1. Principle of *CoralHue*TM Fluo-chase Kit

The state of No Fluorescence. Because there is no interaction between target protein A and B that are fused to the mKG fragments (Left).

The state of No Fluorescence. Divided mKG fragments spatially approach each other and local effective concentration increases by interaction of target protein A and B (Center).

The state of Fluorescence. The association between mKG_N fragment and the mKG_C fragment allows maturation to form the peptide fluorophore followed by production of a fluorescence signals (Right).

CoralHue TM Fluo-chase Kit	1 system	CODE No. AM-1100M
Components	Vial color	Form
(Plasmids)		
 phmKGN-MC 	Red	10 μg: Dry form
 phmKGC-MC 	Blue	10 μg: Dry form
 phmKGN-MN 	Yellow	10 μg: Dry form
 phmKGC-MN 	Green	10 μg: Dry form
 pCONT-1 	Violet	10 μg: Dry form
 pCONT-2 	White	10 μg: Dry form
(Primers)		
 MN-Forward primer 	Natural	1 nmol: Dry form
 MC-Reverse primer 	Natural	1 nmol: Dry form

2. Product Components and Storage Conditions

Storage Conditions: Store at -20°C. Reconstitute with sterilized distilled water. And the reconstituted solution should be kept at -20°C. See the expiration date on the product information label.

3. Additional Materials Required

You will need the following reagents and equipment

- Restriction enzymes (BamH I, Kpn I, Pst I, EcoR I, Xho I, Hind III, Not I)
- Subcloning related materials (Thermocycler, DNA polymerase, DNA Ligase)
- Competent cells, LB-Kanamycin agar plates, LB-Kanamycin medium
- Cell culture related materials (Mammalian cells, Cell culture medium, Cell culture dish, Plate)
- Transfection reagent
- Buffer for fluorescence detection (HBSS, PBS, Good's Buffer)
- Fluorometric detector (Fluorescent microscopy, Fluorescent spectrometer, Fluorescent plate reader)

4. Features of CoralHueTM Fluo-chase Kit

Feature I.

Once the maturation of peptide fluorophore is constituted by the association of mKG fragments, the bimolecular fluorescent mKG complex cannot reversibly be dissociated. Therefore reconstituted mKG fluorescent protein accumulates. This accumulation leads to the amplification of the fluorescent signal, which allows a high-sensitivity analysis even in weak protein-protein interactions (Figure 2.).

1. Interaction of target proteins



2. Detection of target proteins interaction by CoralHueTM Fluo-chase Kit



Figure 2. Accumulation of the history protein-protein interaction as a fluorescent signal

The formation of protein complex reflects equilibrium binding affinities of the interaction partners (1.). As bimolecular fluorescent complex formation is not reversible under the various conditions, the fluorescent signal derived from *CoralHue*TM Kusabira-Green protein accumulates, which allows a high-sensitivity analysis (2.).

Feature II.

To date, the wide structural diversity of intermolecular proximity of both polypeptides ends has made Bimolecular Fluorescent Complementation Assays difficult. In the case the fluorescent fragment-fused ends are located structurally distant, the optimal fluorescent signal has not been detected.

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit provides 4 cloning plasmids which making a plasmid which expresses the fused proteins with different locations between *CoralHue*TM Kusabira-Green fluorescent protein fragments and target proteins and inserting them into culture cells with different combinations (Figure 3.).



Figure 3. The mechanism of high probability detection of fluorescent signal

In the protein complex which is composed of protein A and B, the N terminal of protein A is located on the same side of the C terminal of protein B. Whereas the C terminal of protein A is on the opposite side of the N terminal of protein B. In this case, an optimal signal is produced by fusing mKG_N to the N terminal of protein A and fusing mKG_C to the C terminal of protein B.

5. Overview of the *CoralHue*TM Fluo-chase Kit procedure

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit procedure comprises the following 3 steps (Figure 4).

- 1: Cloning target gene of interest into *CoralHue*TM Fluo-chase Kit vectors
- 2: Transfection to the culture cells
- 3: Fluorescence detection by protein-protein interaction



Figure 4. Overview of the $CoralHue^{TM}$ Fluo-chase Kit procedure

6. Photophysical Properties of *CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green (mKG)

*CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green (mKG) is the mutant of orange-emitting

fluorescent protein, Kusabira-Orange from the stony coral *Fungia concinna*. In contrast to the original protein, mKG reveals bright green fluorescence with excitation

maximum at 494 nm and emission maximum at 506 nm (Table 1.). mKG sequence is codon-optimized for higher expression in mammalian cells.



Figure 5. Excitation, emission and absorption spectra of *CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green Excitation (dot line) and emission spectra (solid line) (**Panel A**). Absorption spectrum (**Panel B**). Curves are normalized.

Table 1. Photophysical Properties of *CoralHue*[™] monomeric Kusabira-Green

	Excitation/Emission maxima	Molar extinction coefficient (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Fluorescence quantum yield	pH sensitivity in fluorescence	Number of amino acids
mKG	494/506	64,200 (494 nm)	0.57	р <i>К</i> а = 6.1	218

7. Plasmid Maps and Primers of CoralHueTM Fluo-chase Kit

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit cloning vectors contains the following elements.

- cytomegalovirus (CMV) promoter for high level expression in a wide range of mammalian cells
- Kanamycin resistance gene for selection in *E. coli*.
- · Neomycin resistance gene for selection of stable line cells
- multiple cloning site (MCS) restriction enzyme site (BamH I, Kpn I, Pst I, EcoR I, Xho I, Hind III and Not I)
- Flexible linker for relieves steric hindrance between the target protein and mKG (24 amino acids)

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit provides 4 cloning plasmids which have the same basal backbone (Figure 6.). In each of 4 cloning plasmid, mKG fragments and MCS have changed places beyond the flexible linker (Figure 6.). Each of the cloning plasmids has the same restriction sites in the same frame (Figure 7., Figure 8.).



Figure 6. Map and Features of *CoralHue*TM Fluo-chase Kit vectors

CoralHueTM Fluo-chase Kit vectors

- A. Cloning vectors
- phmKGN-MC [Figure 7.]
 From the 5'-end, mKG N fragment (mKG_N), linker and MCS are located on phmKGN-MC. (Clone target gene into downstream of mKG_N)
- phmKGC-MC [Figure 7.]
 From the 5'-end, mKG C fragment (mKG_C), linker and MCS are located on phmKGC-MC. (Clone target gene into downstream of mKG_C)
- phmKGN-MN [Figure 8.]
 From the 5'-end, MCS, linker and mKG N fragment (mKG_N) are located on phmKGN-MCN. (Clone target gene into the upstream of mKG_N)
- phmKGC-MN [Figure 8.]
 From the 5'-end, MCS, linker and mKG C fragment (mKG_C) are located on phmKGC-MC. (Clone target gene into the upstream of mKG_C)

B. Positive control

• pCONT-1 [Figure 9.]

From the 5'-end, p65 partial domain from NF- κ B complex, linker and mKG N fragment (mKG_N) are located on pCONT-1.

pCONT-2 [Figure 9.]
 From the 5'-end, p50 partial domain from NF-κB complex, linker and mKG C fragment (mKG_C) are located on pCONT-2.

Sequencing Primers

- MN-Forward primer [Figure 8.] MN-Forward primer helps to sequence from the 5'-end of target gene cloned into phmKGN-MN and phmKGC-MN.
- MC-Reverse primer [Figure 7.] MC-Reverse primer helps to sequence from the 3'-end of target gene cloned into phmKGN-MC and phmKGC-MC.

Primer Name	Sequence	Amount of Oligo	DNA bases	Tm (°C)
MN-Forward primer	5'- cgc ccc att gac gca aat -3'	1 nmol	18	56.8
MC-Reverse primer	5'- agg tgt ggg agg ttt ttt a -3'	1 nmol	19	52.1

Note: Add 100 $\,\mu L$ sterile water to make 10 μM primer solution.



Figure 7. Plasmid Map and Features of MC type of $CoralHue^{TM}$ Fluo-chase Kit cloning vector

===: stop codon

MC-Reverse AAA CCT CCC ACA CCT CCC - 3'







Figure 9. Plasmid MAP of *CoralHue*TM Fluo-chase Kit Positive Control vector

For the full sequences of either *CoralHue*TM Fluo-chase Kit vector, refer to MBL web site. <u>https://ruo.mbl.co.jp/product/flprotein/dna-sequence.html</u>

8. Protocols

PLEASE READ THROUGH ENTIRE PROTOCOL BEFORE BEGINNING

A. Cloning target genes into the *CoralHue*TM Fluo-chase Kit Cloning Vectors

- 1. Amplify target genes
 - 1-1. Amplify target PCR product using standard protocol. It is important to the properly design target PCR primers that must be append an appropriate restriction enzyme.
 - **Note**: To design appropriate primers in case of partial domain of target gene The initial translation codon ATG (Methionine) must be added to the 5'-end of target gene. For MC type plasmids, stop codons are included in the MCS in all three reading frames. Depending on which restriction enzymes are used for cloning, additional amino acids may be present at the C-terminus of target protein.
 - 1-2. Go to the following step that genomic DNA, plasmid DNA, or cDNA may be used as target gene of interest.
- 2. Restriction Enzyme Digestion
 - 2-1. Digest PCR products/plasmids of target gene and *CoralHue*TM Fluo-chase Kit cloning vectors with restriction enzymes.
 - 2-2. Separate the digested target gene and *CoralHue*TM Fluo-chase Kit cloning vectors with gel electrophoresis.
- 3. Construction recombinant fusion protein
 - 3-1. Prepare the ligation reaction mixture by combining the following components (Table 2.).
 - 3-2. Transforming each plasmid mixture to the competent cells.
 - 3-3. Plate the competent cells to LB-Kanamycin plates and incubate at 37°C. Pick up the single colony and incubate with LB-Kanamycin medium.
 - 3-4. Isolate the plasmid from selected colonies using standard protocols.

Table 2.	Paradigm o	f Target	Protein A	and B	Construction
----------	------------	----------	------------------	-------	--------------

Plasmid Insert DNA	phmKGN-MC	phmKGN-MN	phmKGC-MC	phmKGC-MN
А	mKG_N - A	A _ mKG_N	mKG_C	A -mKG_C
В	mKG_N - B	B-mKG_N	mKG_C-B	B-mKG_C

Note: All of the plasmid mentioned above does not have to be constructed, when the proper positions or unsuitable positions to fuse target protein are predicted judging from the tertiary structure or the presence of signal sequence in target protein.

- 4. Analyze plasmid DNA for the presence and orientation of target gene by PCR or restriction enzyme digestion.
- **Note**: You may use *CoralHue*TM Fluo-chase Kit primers for any PCR or sequencing (See Appendix A, Figure 10.)

B. Transfection

- 1. Prepare the mixture for transformation
 - 1-1. Mix two of the eight plasmids including target gene in a manner that mKG_N fragment and mKG_C fragment are paired (Table 3.).
 - 1-2. Mix pCONT-1 and pCONT-2 as a positive control mixture (Table 4.).
 - * 24 hours after post-transfection, fluorescence signals can be detected using fluorescent microscopy (See Appendix B and Figure 11.).
 - 1-3. Prepare the negative control mixture as Table 4. Mix two of the four plasmids which **do not** include target gene in a manner that mKG_N fragment and mKG_C fragment are paired.
 - * **24 hours after post-transfection, any fluorescence signals cannot be detected** (See Appendix C and Figure 12.)
- Note: The proper quantity of plasmid for transfection.

Although it depends on the transfection reagent you use, $1\sim 2 \mu g$ of total amount of DNA will be optimal for 35-mm dish.

2. Transfection into cultured cell

Transfect each of the plasmid mixtures into the cultured cell. Use commercially supplied transfection reagent.

Protein A Protein B	mKG_N A	AMKG_N	mKG_C-A	A -mKG_C
mKG_N B	×	×	0	0
B-mKG_N	×	×	0	0
mKG_C-B	0	0	×	×
B-mKG_C	0	0	×	×

Table 3. Preparation of Appropriate Pairs of Plasmid Mixtures Containing Target Genes

O: Appropriate pairs between mKG_N fragment and mKG_C fragment fusion proteins.

×: Inappropriate pairs between mKG_N fragment and mKG_C fragment fusion proteins.

	Plasmid				
PC-1	pCONT-1 + pCONT-2				
NC-1	phmKGN-MC + phmKGC-MC				
NC-2	phmKGN-MC + phmKGC-MN				
NC-3	phmKGN-MN + phmKGC-MC				
NC-4	phmKGN-MN + phmKGC-MN				

Table 4. Preparation of Appropriate Pairs of Plasmid Mixtures for Positive and Negative Control

C. Fluorescence detection

24 hours after post-transfection, detect or measure fluorescence with fluorometric detector. Cell cultured medium is recommended to displacement to transparent medium for fluorescent detection.

Note: The fluorescence images of positive control and negative control (See Appendix B and C, Figure 11. and 12.)

1. Fluorescent Microscopy

Use appropriate filters set for observing green fluorescence signal such as FITC. Replace cell culture medium by an achromatic pellucid buffer (HBSS, PBS, Good's Buffer, etc.).

Investigate the optimal imaging condition by using cells expressing positive control mixture.

Note 1: Cell culture dishes for Fluorescent Microscopy

Using glass bottom cell culture dishes is recommended for high-resolution fluorescence imaging. Some plastic bottom cell culture dishes can be used with low magnification objective lenses such as X10 or X20.

Note 2: To avoid photobleaching

Detect fluorescence images at weak excitation condition. Irradiation of strong excitation for a long time causes undesirable photobleaching.

2. Fluorescence Spectrometer

Fluorescent intensity and excitation/fluorescence spectra can be measured by suspending cotransfected cells in achromatic pellucid buffer (HBSS, PBS, Good's Buffer, etc.). Investigate the optimal measuring condition by using cells expressing positive control mixture.

Fluorescent signal may not be acquired in the case of the low transfection efficiency, scattering excitation light, or high autofluorescence.

Note: Measuring procedure

The excitation and emission peak of mKG is 494 nm and 506 nm (Figure 5., Table 1.). Using quartz cells for measuring your sample is recommended.

For acquiring fluorescence spectrum, excite your sample at around 440 nm to 495 nm, and acquire the fluorescence spectrum from 500 nm to 600 nm.

For acquiring fluorescence intensity, investigate the optimal excitation wavelength between 470 nm to 495 nm and the optimal slit width to avoid leakage of excitation light. Detect the fluorescent intensity at around 506 nm.

3. Fluorescent Plate Reader

Cell-based fluorescent assays can be performed with *CoralHue*TM Fluo-chase Kit. Use filters set appropriate for detecting green fluorescence signal such as FITC. To avoid autofluorescence by cell culture med, replace them by an achromatic pellucid buffer (HBSS, PBS, Good's Buffer, etc.). Investigate the optimal detecting condition by using cells expressing positive control mixture.

Fluorescent signal may not be obtained in the case that the instrument is not suited or the transfection efficiency is low.

Note: Recommended micro plate

For a cell-based fluorescent assay, black cell culture plates are recommended.

9. Troubleshooting Guide

A. Weak signals or undetectable signals

1. The case that cannot be detected by positive control mixture.

There can be problems where the measurement conditions for the fluorescent detecting instrument are not suited or the transfection efficiency is low. Please check the conditions in which the fluorescence can be detected using cells expressing positive control mixture.

- 2. The case of weak signals that can be detected by protein-protein interactions assay
 - 2-1 It is considered that target protein-protein binding is weak or the effective rate of reconstruction of mKG is low because of the location of mKG fragments. Please observe it after a while (more than 24 hours). As the mKG which formed chromophore is accumulated, fluorescent intensity can be increased by elongating the incubation time after post-transfection.
 - 2-2 In the case that target gene is long (more than 2 Kb), there is a possibility for the size of the target protein to prevent approaching and reconstitution of mKG fragments. If you know the domain of target protein interactions, fluorescent signals can be detected using only the gene arrangement of the domain in some cases.

B. High background

Many autofluorescent materials such as serum are included in cell culture medium. It is recommended to observe and measure fluorescent signals after replacing them by an achromatic pellucid buffer (HBSS, PBS, Good's Buffer, etc.).

10. References

- 1) Ogata, T., *et al., PNAS.* **111**, 3811-3816 (2014)
- 2) Ono, T., et al., J. Biol. Chem. 287, 6810-6818 (2012)
- 3) Tatematsu, M., et al., J. Biol. Chem. 285, 20128-20136 (2010)
- 4) Chi, Z. L., et al., Hum. Mol. Genet. 19, 2606-2615 (2010)
- 5) Kimura, M., *et al., J. Cell Sci.* **123**, 747-755 (2010)
- 6) Kim, J. Y., *et al., J. Biol. Chem.* **285**, 20128-20136 (2010)
- 7) Hashimoto, J., et al., J Biomol. Screen 14, 970-979. (2009)
- 8) Ueyama, T., et al., J. Immunol. 181, 629-640. (2008)

NOTE

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit Does Not Guarantee Fluorescence Detection of all Protein-Protein Interactions.

*CoralHue*TM Fluo-chase kit used in this product was co-developed with the Laboratory for Cell Function and Dynamics, the Advanced Technology Development Center, the Brain Science Institute, and the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) (lab head Dr. Atsushi Miyawaki).

The use of *CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green requires a license. MBL grants non-profit research organizations an international, royalty-free, non-exclusive, limited license to use this product for non-commercial research use only. This license excludes the right to sell or transfer this product, its components, or modifications of this product to third parties. Any other uses require a license. The use of this product by for profit organizations, for either commercial or non-commercial use, requires a license.

11. Appendix

A: Electrophoretic profile of PCR products with CoralHueTM Fluo-chase Kit primers

The following basic protocol serves as a general guideline for any PCR purification. Optimal reaction conditions (incubation times and temperatures, concentration of Taq DNA polymerase, primers, MgCl₂, and template DNA) vary and need to be optimized.

1. Additional Materials Required

- Thermocycler
- Taq DNA polymerase 2.5 U/μL
- Taq DNA polymerase buffer
- 2.5 mM dNTPs
- · Template DNA
- Sterilized distilled water

2. General reaction mixture for PCR			
10 μ M MN-forward primer		1	μL
10 μ M MC-Reverse primer		1	μL
<i>Taq</i> DNA polymerase buffer		5	μL
<i>Taq</i> DNA polymerase		0.5	μL
2.5 mM dNTPs		3	μL
Template DNA		1	μL
Sterilized distilled water		38.5	μL
	total	50	μL

3. PCR conditions

Example: Amplification of DNA fragment about 450~1100 bp.

		-
94°C	5 minutes	
94°C	30 seconds —	
50°C	30 seconds	25 cycle
72°C	1 minute	
72°C	7 minutes	
4°C	∞	







Fluo-chase Kit cloning vector was amplified with MN-Forward primer and MC-Reverse primer. () shows length of PCR products.

B: Fluorescence Image of Positive Control

HEK 293T cells were inoculated to the 35-mm glass bottom dish. The mixture with each pCONT-1 and pCONT-2 0.5 μ g was transfected to HEK 293T cells with commercially supplied transfection reagent. 24 hours after post-transfection, fluorescent could be detected with fluorescent microscopy.

pCONT-1 / pCONT-2



Figure 11. Fluorescence image of HEK 293T cells expressing positive control

Fluorescent microscopy images of HEK 293T cells expressing positive control (Left panel), Phase contrast (Right panel).

C: Fluorescence Images of Negative Control

HEK 293T cells were inoculated to the 35-mm glass bottom dish. The mixture with negative controls was transfected to HEK 293T cells with commercially supplied transfection reagent. 24 hours after post-transfection, fluorescent could not be detected with fluorescent microscopy.



Figure 12. Fluorescence images of HEK 293T cells expressing negative controls

Fluorescent microscopy images of HEK 293T cells expressing negative controls (Left panel), Phase contrast (Right panel). See the below or Table 4 for the combination of negative controls. NC-1: phmKGN-MC/phmKGC-MC, NC-2: phmKGN-MC/phmKGC-MN,

NC-3: phmKGN-MN/phmKGC-MC, NC-4: phmKGN-MN/phmKGC-MN

D: Properties of CoralHueTM monomeric Kusabira-Green

mKG_N: 168 amino acids

490 500 510 ACCATGTACCTGAAGCTGGAGGGCTAA T M Y L K L E G *

mKG_C: 51 amino acids

10 20 30 40 50 60 ATGGGCGGCAACCACAAGTGCCAGTTCAAGACCACCTACAAGGCCGCCAAGGAGATCCTG M G G N H K C Q F K T T Y K A A K E I L 80 90 120 70 100 110 GAGATGCCCGGCGACCACTACATCAGCCACAGGCTGGTGAGGAAGACCGAGGGCAACATC E M P G D H Y I S H R L V R K T E G N I

130 140 150 160 ACCGAGCTGGTGGAGGACGCCGTGGCCACTCCTAA T E L V E D A V A H S *

Figure 13. The DNA sequence and amino acid sequence of *CoralHue*[™] monomeric Kusabira-Green fragment

Table 5. Base Counts and Molecular Weight of *CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green

	Open reading frame (bp)	Molecular weight (kDa)
mKG_N	507	19.0
mKG_C	156	5.7

12. List of Figures

Figure 1.	Principle of <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit	4
Figure 2.	Accumulation of the history of protein interaction as a fluorescent signal	6
Figure 3.	The mechanism of high probability detection of fluorescent signal	7
Figure 4.	Overview of the <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit procedure	8
Figure 5.	Excitation, emission and absorption spectra of <i>CoralHue</i> TM monomeric Kusabira-Green.	9
Figure 6.	Map and Features of <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit vectors	10
Figure 7.	Plasmid Map and Features of MC type of $CoralHue^{TM}$ Fluo-chase Kit cloning vector.	12
Figure 8.	Plasmid Map and Features of MN type of $CoralHue^{TM}$ Fluo-chase Kit cloning vector.	13
Figure 9.	Plasmid MAP of <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit Positive Control vector	14
Figure 10.	Electrophoretic profile of PCR products with <i>CoralHue</i> TM Fluo-chase Kit primers	20
Figure 11.	Fluorescence image of HEK 293T cells expressing positive control	21
Figure 12.	Fluorescence images of HEK 293T cells expressing negative controls	21
Figure 13.	The DNA sequence and amino acid sequence of <i>CoralHue</i> TM monomeric Kusabira-Green fragment.	22

13. List of Tables

Table 1.	Photophysical Properties of <i>CoralHue</i> TM monomeric Kusabira-Green	9
Table 2.	Paradigm of Target Protein A and B Construction	15
Table 3.	Preparation of Appropriate Pairs of Plasmid Mixtures Containing Target Genes	16
Table 4.	Preparation of Appropriate Pairs of Plasmid Mixtures for Positive and Negative Control.	17
Table 5.	Base Counts and Molecular Weight of <i>CoralHue</i> TM monomeric Kusabira-Green.	22

1.	はじめに	26
2.	Kit 構成と保存方法	28
3.	必要な試薬・機器類	28
4.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit の特徴	29
5.	操作概略	31
6.	<i>CoralHue</i> ™ monomeric Kusabira-Green (mKG)の蛍光特性	32
7.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit プラスミド、プライマーについて	32
8.	操作方法	38
9.	トラブルシューティング	41
10.	参考文献	42

図の目次

Figure 1.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kitの原理	27
Figure 2.	相互作用の履歴を蛍光シグナルとして蓄積するしくみ	29
Figure 3.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit検出率向上のしくみ	30
Figure 4.	操作概略	31
Figure 5.	<i>CoralHue</i> [™] monomeric Kusabira-Greenの励起、蛍光、吸収スペクトル	32
Figure 6.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit プラスミドの基本骨格	33
Figure 7.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit プラスミド MCタイプのプラスミドマップ	
	とプライマー結合部位	. 35
Figure 8.	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit プラスミド MNタイプのプラスミドマップ	
	とプライマー結合部位	. 36
Figure 9.	<i>CoralHue</i> [™] Fluo-chase Kit ポジティブコントロールのプラスミドマップ	. 37
Figure 10.	付属プライマーにより増幅したPCR産物の電気泳動像	43
Figure 11.	HEK 293T細胞を用いたポジティブコントロールの確認	. 44
Figure 12.	HEK 293T細胞を用いたネガティブコントロールの確認	. 44
Figure 13.	mKG断片の塩基配列とアミノ酸配列	. 45

表の目次

Table 1.	<i>CoralHue</i> TM monomeric Kusabira-Greenの蛍光特性	. 32
Table 2.	目的タンパク質遺伝子A、Bを挿入したプラスミドの作製	. 39
Table 3.	融合タンパク質発現用プラスミドミクスチャーの調整	. 40
Table 4.	ポジティブコントール、ネガティブコントロールミクスチャーの調整	. 40
Table 5.	<i>CoralHue</i> ™ monomeric Kusabira-Green断片の塩基対数と分子量	. 45

付録

A:	<i>CoralHue</i> ™ Fluo-chase Kit プラスミドを鋳型に付属プライマーを用いて	
	増幅したPCR産物の電気泳動例	43
B:	ポジティブコントロールの蛍光観察像	.44
C:	ネガティブコントロールの蛍光観察像	.44
D:	<i>CoralHue</i> ™ monomeric Kusabira-Green断片の詳細	45

<u>1. はじめに</u>

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit は、有限会社 Amalgaam が世界に先駆けて開発した新規蛍光 タンパク質 *CoralHue*TM Kusabira-Green をレポーターとして、タンパク質間相互作用を、 24 時間以内に哺乳動物細胞内で蛍光シグナルとして可視化することができます。

近年、ポストゲノムにおけるプロテオミクス研究が盛んに行われています。その中でも タンパク質間相互作用解析は、創薬ターゲットの探索をはじめさまざまな視点から注目さ れています。タンパク質間相互作用解析法の代表例として、Yeast two-hybrid 法(Y2H)が 広く知られています。Y2H は、2 つの目的タンパク質遺伝子を転写活性化因子の DNA 結合 ドメインと転写活性化ドメインの遺伝子にそれぞれ融合させて、目的タンパク質同士が相 互作用した場合、融合させた転写活性化因子の機能が回復し、レポーター分子であるβガ ラクトシダーゼが発現します。Y2H では、タンパク質間相互作用が核内で起こる為に、膜 タンパク質等の相互作用解析には適しておらず、タンパク質自体が転写活性を持つ場合に も適していません。その結果、偽陽性率が高く、Y2H だけでは目的タンパク質間の相互作 用を結論付けられないという問題がありました。

CoralHueTM Fluo-chase Kit は、タンパク質断片コンプリメンテーション法(Protein fragment complementation method)を基にした、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出するキットです。レポータータンパク質である緑色蛍光タンパク質 CoralHueTM monomeric Kusabira-Green (mKG)の遺伝子を2つに分割し、その遺伝子断片(mKG_N 断片/mKG_C断片)にそれぞれ相互作用解析したい目的タンパク質の遺伝子を融合します。発現した目的タンパク質同士がタンパク質間相互作用を起こさない場合、mKG_N 断片とmKG_C 断片は、互いに近づくことができず、蛍光を発することができません。しかし、目的タンパク質同士が相互作用をすると、分割されていた mKG 断片同士が空間的に近接し、局所的な実効濃度が上昇します。その結果、mKG 断片は分割する以前の立体構造を形成し、 蛍光を発するための発色団を形成します。すなわち、融合した目的タンパク質間の相互作用に依存して蛍光シグナルを検出する事ができます(Figure 1.)。

CoralHue[™] Kusabira-Green 蛍光タンパク質断片は、2 つの目的タンパク質同士の相互作 用による局所的な実効濃度が上昇しない限り、本来の立体構造を再構成し発色団を形成で きないため、偽陽性がありません。更に、発色団を形成した蛍光タンパク質は解離するこ とがないとされているため、再構成された *CoralHue*[™] Kusabira-Green 蛍光タンパク質が 蓄積し、弱いタンパク質間相互作用においても高感度な解析が行えます(Figure 2.)。

タンパク質間相互作用により形成されるタンパク質複合体の構造は多種多様です。相互 作用を解析したいタンパク質複合体によっては、相互作用した目的タンパク質に対して、2 つの蛍光タンパク質断片が、立体的な不具合から近接できず、蛍光タンパク質再構成が起 こらないために蛍光を検出できないという可能性も考えられます。そこで、CoralHueTM Fluo-chase Kit では、分割された CoralHueTM Kusabira-Green 遺伝子 N 末端断片の 5'末端側、 3'末端側、また、CoralHueTM Kusabira-Green 遺伝子 C 末端断片の 5'末端側、3'末端側にそ れぞれの目的タンパク質遺伝子を融合したプラスミドを作製します。その結果、CoralHueTM Kusabira-Green 蛍光タンパク質断片と目的タンパク質の位置関係をかえた複数の融合タン パク質を発現するプラスミドを作製し、組み合わせをかえて培養細胞に導入することによ って、タンパク質間相互作用の検出率を向上させています(Figure 3.)。

蛍光タンパク質を用いたその他のタンパク質間相互作用の解析技術として、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer; 蛍光共鳴エネルギー移動)が知られています。 FRET では目的タンパク質が相互作用をしている状態(ON 状態)、相互作用をしていない 状態(OFF 状態)の両方をリアルタイムで検出するのに対して、*CoralHue*[™] Fluo-chase Kit では ON 状態の履歴を蛍光シグナルとして蓄積します。イメージング等、一定時間のシグ ナル計測を必要とする FRET に対して、*CoralHue*[™] Fluo-chase Kit は蓄積された蛍光シグ ナルを測定するだけでよく、多検体測定に適しています。一度、蛍光検出可能な条件を設 定すれば、阻害剤などの薬剤添加、温度変化など様々な条件下での相互作用の変化をハイ スループットに解析することもできます。

このように、*CoralHue*TM Fluo-chase Kit では、酵素や基質等を必要とせずに、目的タン パク質遺伝子をサブクローニングしたプラスミドを培養細胞に導入するだけで、簡単にタ ンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出できます。



Figure 1. CoralHue[™] Fluo-chase Kit の原理

- 左: 目的タンパク質間で相互作用が無く、mKG_N 断片と mKG_C 断片が近接できず蛍光を発することがで きない状態。
- 中: 目的タンパク質間での相互作用により、mKG_N 断片と mKG_C 断片の局所的な実効濃度が急激に上昇 する。
- 右:mKG_N断片とmKG_C断片が結合し、再構成されることによって蛍光を発することができる状態。

<u>2. Kit 構成と保存方法</u>

CoralHue TM Fluo-chase Kit	1 system	CODE No. AM-1100M
構成品	Vial color	Form
(プラスミド)		
 phmKGN-MC 	赤	10 μg: 乾燥品
 phmKGC-MC 	青	10 μg: 乾燥品
 phmKGN-MN 	黄	10 μg: 乾燥品
 phmKGC-MN 	緑	10 μg: 乾燥品
 pCONT-1 	紫	10 μg: 乾燥品
• pCONT-2	白	10 μg: 乾燥品
(プライマー)		
 MN-Forward primer 	無色	1 nmol: 乾燥品
 MC-Reverse primer 	無色	1 nmol: 乾燥品

保存方法

-20°C で保存して下さい。各構成品は、滅菌水に溶解して下さい。溶解後は-20°C で保存してください。有効期限はキットのラベルをご確認ください。

3. 必要な試薬・機器類

- 各種制限酵素(BamHI、KpnI、PstI、EcoRI、XhoI、Hind III、NotI)
- ・ サブクローニング関連(サーマルサイクラー、DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼなど)
- 大腸菌培養関連(コンピテントセル、カナマイシン含有 LB プレート・培地など)
- トランスフェクション試薬
- 細胞培養関連(哺乳類培養細胞、細胞培養用培地、細胞培養用ディッシュ・プレートなど)
- 無色透明な観察用緩衝液(HBSS、PBS、Good's Buffer など)
- 緑色蛍光検出可能な機器(蛍光顕微鏡、蛍光分光光度計、蛍光プレートリーダーなど)

4. CoralHue[™] Fluo-chase Kit の特徴

<u>特徴 |</u>

分割した蛍光タンパク質断片同士の再構成によって、発色団を形成した蛍光タンパク質 は解離することがないとされています。そのため、再構築された CoralHue[™] Kusabira-Green 蛍光タンパク質は蓄積され、目的タンパク質の相互作用している時間が 短い場合や、相互作用が弱い場合でも、シグナルは増幅され、高感度な解析が行えます (Figure 2.)。

1, 目的タンパク質AとBの相互作用



2, 目的タンパク質AとBの相互作用をCoralHue[™] Fluo-chase Kitで検出した場合



Figure 2. 相互作用の履歴を蛍光シグナルとして蓄積するしくみ

相互作用する目的タンパク質をAとBとします。相互作用の状態は、状況により変化します (1)。タンパ ク質AとBそれぞれに *CoralHue*TM Kusabira-Green 蛍光タンパク質断片を融合させた場合、再構成された *CoralHue*TM Kusabira-Green 蛍光タンパク質は解離することがないとされているため、蛍光シグナルが蓄 積します。その結果、シグナルを増幅させる事ができ、高感度な解析が行えます (2)。

特徴Ⅱ

相互作用を解析したいタンパク質が複合体となったとき、それぞれのポリペプチド末 端の距離には多様性が生じます。末端同士の距離が離れている場合は、蛍光タンパク質 の再構成が起こらないために蛍光を検出できないという可能性も考えられます。そこで、 *CoralHue*TM Fluo-chase Kit では、*CoralHue*TM Kusabira-Green 蛍光タンパク質断片と目的 タンパク質の位置関係をかえた複数の融合タンパク質を発現するプラスミドを作製し、 組み合わせをかえて培養細胞に導入することによって、タンパク質間相互作用の検出率 を向上させています (Figure 3.)。



Figure 3. CoralHue[™] Fluo-chase Kit 検出率向上のしくみ

図中の目的タンパク質 A と B が相互作用をした場合、タンパク質 A の N 末端とタンパク質 B の C 末端の 距離が近接しています。しかしながら、タンパク質 A の C 末端とタンパク質 B の N 末端の距離は離れて います。この場合、タンパク質 A の N 末端とタンパク質 B の C 末端に mKG 断片を融合させたプラスミド の組み合わせにおいて、効率良く蛍光タンパク質の再構成が起こります。

5. 操作概略

CoralHue[™] Fluo-chase Kit は、以下の3つのステップからなります。

- 1: 各プラスミドへの目的タンパク質遺伝子の挿入
- 2: 目的タンパク質遺伝子を含むプラスミドを組み合わせて、培養細胞ヘトランスフェク ション
- 3: 発現したタンパク質によるタンパク質間相互作用の蛍光検出



Figure 4. 操作概略

6. CoralHue[™] monomeric Kusabira-Green (mKG)の蛍光特性

*CoralHue*TM monomeric Kusabira-Green (mKG) は、イシサンゴに属するヒラタクサビ ライシ (*Fungia concinna*) から単離された、蛍光タンパク質 *CoralHue*TM Kusabira-Orange の変異体です。mKG は単量体として機能します。励起ピーク波長 494 nm、蛍光ピーク波 長 506 nm を示し、緑色の明るい蛍光を発します。また mKG 遺伝子のコドンは、哺乳類由 来の培養細胞で高効率に発現するよう最適化されています。



Figure 5. *CoralHue*[™] **monomeric Kusabira-Green の励起、蛍光、吸収スペクトル** mKG の励起(点線)、蛍光(実線)スペクトル(A)。mKG の吸収スペクトル(B)。 数値は規格化しています。

Table 1.	<i>CoralHue</i> TM	monomeric	Kusabira-Green	の蛍光特性
----------	-------------------------------	-----------	-----------------------	-------

	Excitation/Emission maxima	Molar extinction coefficient (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Fluorescence quantum yield	pH sensitivity in fluorescence	Number of amino acids
mKG	494/506	64,200 (494 nm)	0.57	р <i>К</i> а = 6.1	218

<u>7. CoralHueTM Fluo-chase Kit プラスミド、プライマーについて</u>

CoralHue[™] Fluo-chase Kit のプラスミドは全て同じ基本骨格を用いています (Figure 6.)。 抗生物質は、カナマイシンとネオマイシンが利用できます。サイトメガロウイルス (CMV) 由来のプロモーターを用いており、哺乳類由来の培養細胞で目的タンパク質遺伝子と mKG_N断片またはmKG_C断片との融合タンパク質を高効率に発現させることができます。 それぞれのプラスミドは、リンカーをはさんで mKG の部分断片とマルチプルクローニング サイト (MCS)が入れ替わった配置になっています。リンカーはフレキシブルな三次構造を 形成すると予測される 24 アミノ酸残基から構成され、目的タンパク質と mKG の立体構造 形成に対する障害を軽減します。

MCSには、BamHI、KpnI、PstI、EcoRI、XhoI、Hind III、NotIの7つの制限酵素認 識配列が配置されています。すべてのプラスミドでは上記の制限酵素認識配列が、5'末端側 から同じ順序、同じフレームで配置されています。



Figure 6. CoralHue[™] Fluo-chase Kit プラスミドの基本骨格

<u>各プラスミドの説明</u>

- A. 目的タンパク質遺伝子挿入用プラスミド
- ・phmKGN-MC [Figure 7.]
 5'末端側から mKG の N 末端断片(mKG_N)、リンカー、MCS の順に配置されたプラス ミドです。(目的タンパク質を、mKG_N の 3'末端側に挿入します。)
- phmKGC-MC [Figure 7.]
 5'末端側から mKG の C 末端断片 (mKG_C)、リンカー、MCS の順に配置されたプラスミドです。(目的タンパク質を、mKG_C の 3'末端側に挿入します。)

 phmKGN-MN [Figure 8.]
 5'末端側から MCS、リンカー、mKG の N 末端断片(mKG_N)の順に配置されたプラス ミドです。(目的タンパク質を、mKG_N の 5'末端側に挿入します。)
 phmKGC-MN [Figure 8.]

・ primiting C-IMN [Figure 8.] 5'末端側から MCS 、リンカー、mKG の C 末端断片(mKG_C)の順に配置されたプラ スミドです。(目的タンパク質を、mKG_C の 5'末端側に挿入します。)

- B. ポジティブコントロール プラスミド
- **pCONT-1** [Figure 9.]
 5'末端側から NF-κB 構成分子である p65 の部分配列、リンカー、mKG の N 末端断片 (mKG_N)の順に配置されたプラスミドです。
- pCONT-2 [Figure 9.]
 5'末端側から NF-κB 構成分子である p50 の部分配列、リンカー、mKG の C 末端断片 (mKG_C)の順に配置されたプラスミドです。

<u>各プライマーの説明</u>

- MN-Forward primer [Figure 8.]
 5'末端側から phmKGN-MN と phmKGC-MN に挿入された目的タンパク質遺伝子を、 遺伝子配列解析する事ができるプライマーです。
- MC-Reverse primer [Figure 7.]
 3'末端側から phmKGN-MC と phmKGC-MC に挿入された目的タンパク質遺伝子を、 遺伝子配列解析する事ができるプライマーです。

プライマー名	塩基配列	包装量	塩基数	Tm (°⊂)
MN-Forward primer	5' - cgccccattgacgcaaat - 3'	1 nmol	18	56.8
MC-Reverse primer	5' - aggtgtgggaggtttttta - 3'	1 nmol	19	52.1

Note: 各プライマーを滅菌水 100 µL に溶解すると、10 µM 溶液となります。





HindIII

F

XhoI

: stop codon=

→ MCS BamHI

NotI

MC-Reverse

AAA CCT CCC ACA CCT CCC -3'

KpnI

PstI

CAA GGA GGA TCC TCA GGT ACC GGA ACT GCA GCA GAG AAT TCG GGA AAC TCG AGA ACA AAG CTT GAA Q G G S S G T G T A A E N S G N S R T K L

TAA GCG GCC GCG ACT CTA GAT CAT AAT CAG CCA TAC CAC ATT TGT AGA GGT TTT ACT TGC TTT AAA

EcoRI



Figure 8. *CoralHue*[™] Fluo-chase Kit プラスミド MN タイプ (phmKGN-MN/phmKGC-MN) の プラスミドマップとプライマー結合部位





プラスミドの全配列については以下の Web で公開しています。 <u>https://ruo.mbl.co.jp/product/flprotein/dna-sequence.html</u>

<u>8. 操作方法</u>

*CoralHue*TM Fluo-chase Kit ご使用前に、必ず操作方法をお読み下さい。

A. 遺伝子構築

- 1. 目的タンパク質遺伝子の増幅
 - 1-1. PCR により目的タンパク質遺伝子 (ここでは目的タンパク質遺伝子を A、B とします。)を増幅し、*CoralHue*TM Fluo-chase Kit プラスミドへ挿入する場合、mKG 断片と翻訳フレームを合わせた制限酵素認識配列を付加したプライマーを用意します。
 - Note: 目的タンパク質遺伝子の部分配列を用いる場合のプライマー設計 目的タンパク質遺伝子の部分配列の 5'末端に、翻訳開始のための開始コドン (ATG)を付加して 下さい。MC タイプの MCS には、3 フレームで終止コドンが設定されています。サブクローニ ングの際に終止コドンを導入する必要はありませが、使用する制限酵素によって MCS 配列由来 のアミノ酸残基が付加される場合があります。
 - 1-2. すでに *CoralHue*[™] Fluo-chase Kit プラスミドの mKG 断片と翻訳フレームが合っ た制限酵素認識配列が利用できる目的タンパク質遺伝子を含むプラスミドがある 場合、そのまま次のステップに進みます。
- 2. *CoralHue*[™] Fluo-chase Kit プラスミド及び目的タンパク質遺伝子の制限酵素消化
 - 2-1. *CoralHue*TM Fluo-chase Kit プラスミド及び増幅した目的タンパク質遺伝子AとB、 または目的タンパク質遺伝子AとBを含んだプラスミドを制限酵素で消化します。
 - 2-2. アガロースゲル電気泳動を行い、制限酵素消化した *CoralHue*[™] Fluo-chase Kit プ ラスミド及び目的タンパク質遺伝子の精製を行います。
- 3. 融合タンパク質発現用プラスミドの作製
 - 3-1. 精製した *CoralHue*TM Fluo-chase Kit プラスミドと目的タンパク質遺伝子 A、B の ライゲーションを行います。目的タンパク質遺伝子 A、B それぞれにおいて、 mKG_N 断片の 5'末端側と 3'末端側、mKG_C 断片の 5'末端側と 3'末端側に融合さ れた4種類のプラスミド、計8種類のプラスミド作製を行います (Table 2.)。
 - 3-2. ライゲーション後、コンピテントセルにトランスフォーメーションします。
 - 3-3. カナマイシン含有 LB プレートへ撒種し、シングルコロニーを単離します。 カナマイシン含有 LB プレート培地で培養後、プラスミドを精製します。

Plasmid Insert DNA	phmKGN-MC	phmKGN-MN	phmKGC-MC	phmKGC-MN
А	mKG_N - A	A _ mKG_N	mKG_C	A -mKG_C
В	mKG_N - B	B-mKG_N	mKG_C-B	B-mKG_C

Table 2. 目的タンパク質遺伝子 A、B を挿入したプラスミドの作製

Note: 8 種類のプラスミド作製が必要ではない場合

目的タンパク質の立体構造から mKG 断片の最適融合位置がわかっている場合、またシグナル配列や 構造上、タンパク質融合が不適とわかっている位置がある場合には、上記 8 種類すべての融合タン パク質発現用プラスミドを作製する必要はありません。

4. 融合タンパク質発現用プラスミドの目的タンパク質遺伝子挿入確認

- 4-1. コロニーPCR、精製したプラスミドを鋳型とした場合の PCR、精製したプラスミドの制限酵素消化、シークエンシング等により目的タンパク質遺伝子の挿入確認を行います。各種 PCR、シークエンシングについては、市販の試薬を用いて、試薬のプロトコールに従って行って下さい。
- Note: 付属プライマーのご利用について 各種 PCR、シークエンシングによる遺伝子配列の確認には付属のプライマーをご利用頂けます。 (付録 A、Figure 10.をご参照下さい。)
- B. トランスフェクション
- 1. プラスミドミクスチャーの作製
 - 1-4. 融合タンパク質発現用プラスミドをmKG_N断片とmKG_C断片および目的タンパ ク質が相補的になるように等量ずつ組み合わせて混ぜ、8 通りのプラスミドミクス チャーを作ります (Table 3.)。
 - 1-5. ポジティブコントロールとして、pCONT-1 と pCONT-2 を等量混ぜたミクスチャー を作ります (Table 4.)。 * トランスフェクション後24時間で蛍光が観察できます。(付録B、Figure 11.をご参照ください。)
 - 1-6. ネガティブコントロール として、目的タンパク質遺伝子挿入用プラスミド phmKGN-MC、phmKGN-MN、phmKGC-MC、phmKGC-MN を mKG_N 断片と mKG_C 断片が相補的になるよう組み合わせたミクスチャーを用いることができま す (Table 4.)。
 - * トランスフェクション後 24 時間でも蛍光は観察されません。(付録 C、Figure 12.をご参照くだ さい。)
- Note: トランスフェクションに使用するプラスミド量について 35 mm ディッシュ使用の場合は、プラスミド量の合計が、1~2 μg が適量です。
- 2. 培養細胞へのトランスフェクション それぞれのプラスミドミクスチャーを、用意した培養細胞にトランスフェクションします。 トランスフェクションは、市販の試薬を用い、そのプロトコールに従って行って下さい。

Protein A Protein B	mKG_N A	AMKG_N	mKG_C-A	A mKG_C
mKG_N B	×	×	0	0
B-mkg_N	×	×	0	0
mKG_C-B	0	0	×	×
B-mKG_C	0	0	×	×

Table 3. 融合タンパク質発現用プラスミドミクスチャーの調整

O: mKG_N 断片と mKG_C 断片および目的タンパク質が相補的な組み合わせ

×: mKG_N 断片と mKG_C 断片および目的タンパク質が相補的ではない組み合わせ

Table 4. ポジティブコントール、ネガティブコントロールミクスチャーの調整

	Plasmid		
PC-1	pCONT-1 + pCONT-2		
NC-1	phmKGN-MC + phmKGC-MC		
NC-2	phmKGN-MC + phmKGC-MN		
NC-3	phmKGN-MN + phmKGC-MC		
NC-4	phmKGN-MN + phmKGC-MN		

C. 蛍光検出

トランスフェクション 24 時間後、蛍光検出機器による観察または蛍光強度の測定を行いま す。細胞培養培地は、無色透明な緩衝液に置換して観察に用いて下さい。

Note: ポジティブコントロール、ネガティブコントロールの蛍光像については、付録 B、C、Figure 11.、 12.をご参照下さい。

<u>蛍光検出機器について</u>

1. 蛍光顕微鏡

細胞培養培地を無色透明な観察用緩衝液に置換して、FITC など緑色の蛍光を検出するフィルターで観察を行って下さい。その際、ポジティブコントロールプラスミドをトラン スフェクションした培養細胞を用いて条件検討を行って下さい。

Note 1: 蛍光観察用のディッシュについて

蛍光観察に使用する培養用ディッシュは、底面が平底ガラスのものが最も適しています。対物レン ズが低倍率 (10~20 倍)であれば、底面が平底プラスチックのものでも観察できる場合があります。 Note 2: 退色を防ぐために

励起光はできるだけ減光して下さい。強い励起光を長時間照射すると、mKG が退色します。

2. 蛍光分光光度計

トランスフェクションした培養細胞を回収した後、無色透明な観察用緩衝液に懸濁し石 英セルにて蛍光強度、励起スペクトル、蛍光スペクトルを測定する事ができます。その 際、ポジティブコントロールプラスミドをトランスフェクションした培養細胞を用いて 条件検討を行って下さい。

トランスフェクション効率が低い場合や、励起光の散乱や細胞の自家蛍光による影響が ある場合には、蛍光を検出できない可能性もあります。

Note: 測定方法

蛍光スペクトルを測定する場合、励起する波長範囲は 440~495 nm (mKG の励起ピーク波長は 494 nm)、測定する蛍光波長範囲は 500~600 nm (mKG の蛍光ピーク波長は 506 nm)に設定して下さい。 蛍光強度を測定する場合、励起波長 470~495 nm の範囲で蛍光スペクトルを取得し、励起光が漏れ こまない条件 (励起波長、スリット幅など)を検討します。蛍光測定波長は蛍光ピーク波長である 506 nm 前後に設定して下さい。

3. 蛍光プレートリーダー

蛍光プレートリーダーを用いて、トランスフェクションしたプレート上の培養細胞の蛍 光強度を測定する事ができます。細胞培養培地を無色透明な観察用緩衝液に置換して、 FITC など緑色の蛍光を検出するフィルターを用いて下さい。その際、ポジティブコント ロールプラスミドをトランスフェクションした培養細胞を用いて条件検討を行って下さい。

トランスフェクション効率が低い、また検出機器の感度の問題から蛍光を検出できない 場合もあります。

Note: マイクロプレートについて

マイクロプレートは、平底の細胞培養用プレート、又は、蛍光観察用のブラックプレートが適して います。

9. トラブルシューティング

A. シグナルが弱い、またはシグナルが検出されない

- ポジティブコントロールミクスチャーで蛍光が検出されない場合 蛍光検出機器の測定条件が適していない、又はトランスフェクション効率が低い問題が 考えられます。ポジティブコントロールミクスチャーをトランスフェクションした培養 細胞を用いて、蛍光が検出できる条件を検討して下さい。
- 2. タンパク質間相互作用解析で検出された蛍光シグナルが弱い場合
 - 2-1. 目的タンパク質同士の結合が弱い事、もしくは mKG 断片同士の位置関係により、 mKG の再構成の効率が低い事が考えられます。さらに時間を置いて (24 時間~) 観察を行ってみて下さい。発色団を形成した mKG は蓄積することから、トランス フェクション後のインキュベーションの時間を長くすることにより蛍光強度を増 幅させることができます。

2-2. サイズの大きな (~2 Kb 以上)目的タンパク質遺伝子を全長で用いている場合には、 目的タンパク質自体の大きさが、mKG 断片同士の近接、および再結合を妨げる可 能性が考えられます。目的タンパク質同士の相互作用を行うと予測されるドメイン 部分が分っている場合には、ドメイン部分の遺伝子配列のみを用いることによって、 蛍光シグナルを検出できる場合があります。

B. バックグラウンドが高い

血清など、細胞培養培地には自家蛍光物質が多く含まれています。無色透明な観察用緩衝液 (HBSS、PBS、Good's Buffer など)に置換して、蛍光観察や測定を行うことをお勧めします。

10. 参考文献

- 1) Ogata, T., et al., PNAS. 111, 3811-3816 (2014)
- 2) Ono, T., et al., J. Biol. Chem. 287, 6810-6818 (2012)
- 3) Tatematsu, M., et al., J. Biol. Chem. 285, 20128-20136 (2010)
- 4) Chi, Z. L., et al., Hum. Mol. Genet. 19, 2606-2615 (2010)
- 5) Kimura, M., et al., J. Cell Sci. 123, 747-755 (2010)
- 6) Kim, J. Y., et al., J. Biol. Chem. 285, 20128-20136 (2010)
- 7) Hashimoto, J., et al., J Biomol. Screen 14, 970-979. (2009)
- 8) Ueyama, T., et al., J. Immunol. 181, 629-640. (2008)
- 注) CoralHue[™] Fluo-chase Kit は、すべてのタンパク質間相互作用の蛍光検出を保証する ものではありません。

CoralHue[™] Kusabira-Green は、独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム (宮脇敦史チームリーダー)との共同研究で開発されたもので あり、MBL が実施権を有し、ライセンスしています。

monomeric Kusabira-Green の改変・改良は、NEDO 化合物等を活用した生物システム制御基盤 技術開発(夏目徹チーム長)での共同開発の成果です。 付録

A: Kit 構成プラスミドを鋳型に付属プライマーを用いて増幅した PCR 産物の電気泳動例

- 1. 用意するもの
- ・サーマルサイクラー
- Taq DNA polymerase 2.5 U/μL
- Taq DNA polymerase buffer
- 2.5 mM dNTPs
- ・鋳型プラスミド
- ・滅菌水
- 2. マスターミックスの調整

10 μM MN-forward primer		1	μL
10 μM MC-Reverse primer		1	μL
<i>Taq</i> DNA polymerase buffer		5	μL
<i>Taq</i> DNA polymerase		0.5	μL
2.5 mM dNTPs		3	μL
鋳型プラスミド		1	μL
滅菌水		38.5	μL
	total	50	μL

3. PCR cycle

94°C	5 min	
94°C	30 sec	_
50°C	30 sec	25 cycle
72ºC	1 min	
72ºC	7 min	
4ºC	∞	



Lane 1. 100 bp Ladder Lane 2. phmKGN-MC (815 bp) Lane 3. phmKGC-MC (464 bp) Lane 4. phmKGN-MN (828 bp) Lane 5. phmKGC-MN (477 bp) Lane 6. pCONT-1 (1,098 bp) Lane 7. pCONT-2 (735 bp)

Figure 10. コロニー付属プライマーにより増幅した PCR 産物の電気泳動像

lane 1: DNA マーカー (100 bp ladder)、lane 2~7: *CoralHue*[™] Fluo-chase Kit プラスミドを MN-Forward primer、MC-Reverse primer を用いて PCR で増幅した PCR 産物の電気泳動像を示しています。()内は PCR 産物のサイズを示しています。

B: ポジティブコントロールの蛍光観察像

pCONT-1 と pCONT-2 を、それぞれ 0.5 μg ずつ混合した後、市販のトランスフェクション 試薬により HEK 293T 細胞(35 mm ガラスボトムディッシュ)にトランスフェクションし ました。24 時間後に蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を確認しました。



Figure 11. HEK 293T 細胞を用いたポジティブコントロールの確認

ポジティブコントロールプラスミドを発現させた HEK 293T 細胞の蛍光像 (左図)、位相差像 (右図)を示しています。

<u>C: ネガティブコントロールの蛍光観察像</u>

phmKGN-MC/phmKGC-MC (NC-1)、phmKGN-MC/phmKGC-MN (NC-2)、phmKGN-MN/ phmKGC-MC (NC-3)、phmKGN-MN/phmKGC-MN (NC-4)の組み合わせでそれぞれプラスミ ドを 0.5 µg ずつ混合した後、市販のトランスフェクション試薬により HEK 293T 細胞 (35 mm ガラスボトムディッシュ) にトランスフェクションしました。24 時間後に蛍光顕微鏡 で観察した結果、蛍光は検出されませんでした。



Figure 12. HEK 293T 細胞を用いたネガティブコントロールの確認

ネガティブコントロールプラスミドを発現させた HEK 293T 細胞の蛍光像 (左図)、位相差像 (右図)を示し ています。

<u>D: CoralHueTM monomeric Kusabira-Green 断片の詳細</u>

mKG_N: 168 amino acids

 190
 200
 210
 220
 230
 240

 TCCCACGTGTTCGCCTACGGCCACAGGGTGTTTACCAAGTACCCAGAGAGATCCCAGAC
 S
 N
 V
 F
 A
 Y
 G
 H
 N
 F
 T
 K
 Y
 P
 E
 I
 P
 D

490 500 510 ACCATGTACCTGAAGCTGGAGGGCTAA T M Y L K L E G *

mKG_C: 51 amino acids

 10
 20
 30
 40
 50
 60

 ATGGGCGGCGCAACCACAAGTGCCAGTCCAAGGACCACCTCAAGGGCCGCCAAGGAGATCCTG

 M
 G
 G
 N
 H
 K
 C
 Q
 F
 K
 T
 T
 Y
 K
 A
 K
 E
 I
 L

 70
 80
 90
 100
 110
 120

 GAGATGCCCGGGGGGCACCACTACATCAGCCACAGGCTGGTGAGGAAGACCGAGGGGAACATC
 E
 M
 P
 G
 D
 H
 Y
 I
 S
 H
 R
 L
 V
 R
 K
 T
 E
 G
 N
 I

130 140 150 160 ACCGAGCTGGTGGAGGAGGCCGTGGCCCACTCCTAA T E L V E D A V A H S *

Figure 13. CoralHue[™] monomeric Kusabira-Green 断片の塩基配列とアミノ酸配列

Table 5. CoralHue[™] monomeric Kusabira-Green 断片の塩基対数と分子量

	Open reading frame (bp)	Molecular weight (kDa)
mKG_N	507	19.0
mKG_C	156	5.7