

7. タンパク質合成操作 を必ずご確認ください。

2017年1月より仕様を変更いたしました。取扱説明書をよくご確認の上、ご使用ください。

安定同位体標識タンパク質合成キット

改定: 2017.01

無細胞くんSI

Cat. No. A29-0059

安定同位体標識タンパク質合成キット 無細胞くんSI

取扱説明書

- 安定同位体標識アミノ酸は添付されておりません。安定同位体標識をされる場合は、別売りの無細胞くん用安定同位体標識アミノ酸混合物水溶液が必要です。
- ご使用にあたっては必ず本書をお読みください。
- 本書は、ご使用になるまでいつでも取り出せる場所に大切に保管してください。

- 本書の著作権は弊社に帰属するものです。本書の一部、または全部を弊社に無断で転載、複製、改変することを禁止します。
- 本書に記載された仕様、デザイン、文面等は改良のため、予告することなしに変更することがあります。
- 本書を作成するにあたり万全を期しておりますが、万一ご不明な点、記載漏れ等お気づきの点がございましたら、下記連絡先にお問い合わせください。

E-mail: Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp



1. はじめに

このたびは、安定同位体標識タンパク質合成キット「無細胞くん SI」をお買い上げいただき、まことにありがとうございます。
国立研究開発法人理化学研究所からライセンスを受け、その高度な無細胞タンパク質合成技術を安定同位体標識専用キット化したしました。
従来のものに比べ 同位体希釈を大幅に低減しています。
「無細胞くんSI」は、大腸菌細胞抽出液によるタンパク質合成系であり、テンプレートDNAとしてT7RNAポリメラーゼでmRNAを転写できる環状DNAまたは直鎖状DNAを加えるだけで、タンパク質を簡単に効率よく合成できるキットです。
ご使用の前に、本書をよくお読みいただき、正しいお取り扱い方法を十分にご理解ください。

2. 安全上のご注意

以下の点につきましては特にご注意ください。

- 本キットは試験研究用です。本キットおよび本キットにより得られたタンパク質等の成分を、人・動物の医療・臨床診断へ使用することおよび飲料品・食品へ添加することを禁止します。
- 一般的な生化学実験経験者およびマイクロピペット操作に慣れた方を対象としています。それ以外の方のご使用はご遠慮ください。
- ご使用にあたっては安全ゴーグル、手袋、白衣等、適切な保護具を着用してください。万一、溶液などが眼や皮膚に付着した場合には、清浄な流水で洗浄してください。炎症が見られる場合には、医師の診察を受けてください。
- 本書に記載されていないご使用方法により発生した安全上の問題については、弊社は責任を負いかねますので予めご了承ください。
- 安全にご使用いただくために、特にご注意ください内容に下記注意事項を表示しております。本マークに併記される注意事項は必ずお守りください。



取り扱いを誤った場合に、軽傷または軽微な物的損害の発生する恐れがあるリスク

①

3. キット内容

- 無細胞くん SI 内液 775 μ L (1.5 mLチューブ) 1本
- 無細胞くん SI 外液 8.25 mL (25 mLチューブ) 1本
- 無細胞くん 非標識アミノ酸混合物水溶液 1 mL (1.5 mLチューブ) 1本
- コントロールDNA pUC-CAT[†] 50 μ L (1 mLチューブ) 1本
- 透析カップ (25 mLチューブ入り) 1個

[†] 大腸菌由来クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を発現します。

* 本キットには安定同位体標識アミノ酸は添付されておりません。無細胞くん用安定同位体標識アミノ酸混合物水溶液を別売しておりますのでご利用ください。



本キットを素手で扱わないでください。
-80°Cになっておりますので凍傷の危険性があります。

4. 保存方法

- -80 \pm 2°Cで保存してください。
- -80°Cを大きく逸脱した温度で保存するとタンパク質合成性能が低下します。
- 運搬や一時保存は、ドライアイスを入れた発泡スチロール等の容器で行ってください。
- 一度解凍した無細胞くんSI 内液は、アイスバス上で速やかに必要量小分けした上で、液体窒素で凍結し、-80°Cで保存してください。その他の溶液は、同様に小分けし、-30°C以下で保存してください。小分け保存した液は、次回ご使用の際、使い切ってください。凍結融解を繰り返すとタンパク質合成性能が低下します。

5. キット構成液主要成分

無細胞くん SI 内液		
大腸菌抽出液	NTP	Folinic acid
Creatine kinase	HEPES (pH7.5)	Ammonium acetate
T7 RNA polymerase	Polyethylene glycol	Magnesium acetate
tRNA	D-Glutamate	Creatine phosphate
DTT	0.05% Na ₃	cAMP
無細胞くん SI 外液		
NTP	Folinic acid	HEPES (pH7.5)
Ammonium acetate	Polyethylene glycol	Magnesium acetate
D-Glutamate	Creatine phosphate	DTT
0.05% Na ₃	cAMP	Potassium acetate

* 毒物及び劇物取締法における毒物指定物質のアジ化ナトリウム(Na₃)を0.05%含みます。含有量が0.1%以下であることから上記法適用外となりますが、お取り扱いおよび廃棄には十分ご注意ください。

②

6. 必要な器具・試薬類

ご使用の前に以下のものをご準備ください。

- 1) 無細胞くん用アミノ酸混合物水溶液 (1 mL) 1本
- 2) テンプレートDNA
 - 1キットあたり環状DNAでは50 ng/ μ Lで50 μ L以上、直鎖状DNAでは100 ng/ μ Lで50 μ L以上ご用意下さい。
 - lacオペレーターを含むテンプレートDNAをご使用の際は終濃度で0.5から1.0 mmol/LのIPTGを添加することで合成量が増加する場合があります。
- 3) 滅菌蒸留水
- 4) 水浴(30°C)
- 5) 透析カップ(付属品、MWCO: 15,000、4°C保存)
- 6) 恒温装置(30°C)
- 7) マグネチックスターラー
- 8) マイクロピペット
- 9) 卓上遠心機
- 10) アイスバス

7. タンパク質合成操作



本キットを素手で扱わないでください。
-80°Cになっておりますので凍傷の危険性があります。



安全ゴーグル、手袋、白衣等の保護具を着用して操作してください。
キット溶液が眼や皮膚に付着すると炎症の原因になる場合があります。

7.1. 準備

《透析カップの液漏れ確認》 * 必ずキットを解凍する前に行ってください。

- ① 付属の透析カップの袋を開封し、容器のふたから透析カップを取り外します。
- ② 透析カップに1 mLの蒸留水を入れ、底部の透析膜から水漏れが無いことを確認します。
- ③ 透析膜を傷つけないように、透析カップ内の蒸留水をマイクロピペットで除きます。
* 透析カップに漏れが確認された場合には無償で交換させていただきます。

《解凍》

- ① 本キットを開封し、無細胞くん SI 外液と無細胞くん用アミノ酸混合物水溶液を取り出し、それぞれ30°Cの水浴中で約15分間および、3分間で解凍し、アイスバス上に置きます。
- ② 予め調製したテンプレートDNAおよびコントロールDNAを解凍し、アイスバス上に置きます。
* 開封時に、ふたの緩みや容器の破損が無いことをご確認ください。
* 記載されている解凍時間は目安ですので、適宜調整してください。

③

7.2. 合成反応

*2017年1月より仕様(混合液量比)を変更いたしました。
合成方法をよく確認の上、ご使用ください。

テンプレートDNAの純度や濃度およびタグの種類等により、タンパク質発現量が異なる場合があります。予め「微量透析法」または「無細胞くん Quick」で条件検討を行ってください。「微量透析法」に関する詳しい情報は下記Webページをご参照ください。
https://stableisotope.tn-sanso.co.jp/Stableisotope_Products/Stableisotope/BiomolecularNMR/cell-free/cell-free-tech.html

- ① 解凍した無細胞くん SI 外液に、十分けん濁させた無細胞くん用アミノ酸混合水溶液を750 μ L、滅菌蒸留水 1 mLを添加し、よく攪拌します。

* 無細胞くん用アミノ酸混合水溶液中に一部のアミノ酸が完全に溶解せず沈殿が見られますが異常ではありません。

試薬	分注量(mL)	終濃度
無細胞くん SI 外液	8.25	82.5% v/v
無細胞くん用アミノ酸混合水溶液	0.75	1.5 mM each amino acid
滅菌蒸留水	1	
合計	10	

- ② 冷凍庫から無細胞くん SI 内液を取り出し、30°Cの水浴中に入れて3分間解凍し、卓上遠心機でスピンドアウンした後、アイスバス上に置きます。

* 無細胞くん SI 内液が、4°C以上にならないようにしてください。
* 解凍時間は目安ですので、適宜調整してください。解凍後は氷上に置き、直ちに使用してください。長時間放置するとタンパク質合成性能が低下します。

- ③ 無細胞くん SI 内液に無細胞くん用アミノ酸混合水溶液 75 μ L、滅菌蒸留水 100 μ L、テンプレートDNA 50 μ Lを添加し、マイクロピペットで均一になるまで泡立てないよう静かに攪拌します。

試薬	分注量(μ L)	終濃度
無細胞くん SI 内液	775	77.5% v/v
無細胞くん用アミノ酸混合水溶液	75	1.5 mM each amino acid
滅菌蒸留水	100	
テンプレートDNA (20-200 ng/ μ L)	50	1-10 ng/ μ L
合計	1,000	

4

- ④ 透析カップに③の液をマイクロピペットで透析膜を覆うように静かに入れます。この際、出来るだけ泡が立たないように注意して下さい。
⑤ 透析カップの透析膜と液面に気泡が入らないように外液容器に入れ、ふたを閉めます。



- ⑥ 30°Cに設定した恒温装置内に設置したマグネチックスターラーに、無細胞くん SI 外液容器を立て、スターラーバーが軽く回転する程度で攪拌しながら4から16時間反応を行います。
* 目的のタンパク質によって反応時間を調整してください。



- ⑦ 無細胞くんSI 外液容器から透析カップを抜き取り、無細胞くん SI 内液をマイクロピペットで回収します。
⑧ アイスバスで冷やした1.5 mLマイクロチューブに、回収した無細胞くん SI 内液を移し、氷上に置いて反応を停止させます。
⑨ 反応液(全画分)または、反応液を4°Cで12,000 \times g、5分間遠心分離した上清(可溶性画分)を目的に合わせてご使用ください。

* 反応終了後、アイスバス上で長時間放置しますと、発現したタンパク質が沈殿したり、分解するなどの可能性がありますので、直ちに回収し、適切な方法で精製してください。
* アフィニティ樹脂等で精製する場合、回収した反応液を平衡化用緩衝液で5倍程度に希釈してください。希釈しないで用いると、樹脂への目的タンパク質の吸着効率が低下することがあります。

SDS-PAGE前処理のためのアセトン沈殿

* 無細胞くんSI 内液をそのまま電気泳動にかけますと、ポリエチレングリコールによりバンドが乱れることがあります。SDS-PAGEで反応産物をご確認頂く場合は以下の方法に従ってアセトン沈殿処理を行ってください。

- 27 μ L の蒸留水に反応後の無細胞くん SI 内液 3 μ Lを加える(全画分)。
- 無細胞くんSI 内液を12,000 \times g で5分間遠心し、27 μ Lの蒸留水に、上清 3 μ Lを加える(可溶性画分)。
- それぞれに 60 μ L の冷アセトンを加えてよく混合し10分間氷冷する。
- 12,000 \times g、5分間、4°Cで遠心分離する。
- 上清を除き、ペレットを60°Cで20分間乾燥させる。
- ペレットを30 μ L の1 \times SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解させる。
- 熱変性後、SDS-PAGE用ゲルに1 μ エル当り5-10 μ L アプライする。
- 電気泳動で分離後、ゲルをクマシーブリアントブルー等で染色する。

5

8. 廃棄方法

キット内に大腸菌(遺伝子組換えでない)が残存している可能性があります。本キットの溶液および溶液が付着した容器・器具等の廃棄は、必ずオートクレーブ等で不活化処理した後、5項の構成液主要成分およびSDSをご参照の上、地域の条例等で指定された方法に従って行ってください。また、本キットで得られたタンパク質等の生成物の廃棄はお客様の責任で行ってください。

9. 保証

保証期間

- 使用期限は台紙に記載されておりますので、使用期限内にご使用ください。

保証内容

- ドライアイス冷凍で配送されます。到着時、配送ボックス内にドライアイスが残っていなかった場合や、容器の破損、液漏れが確認された場合は、品質が低下している可能性がありますのでお問い合わせください。無償で交換いたします。

免責事項

- 保証期間内であっても以下のような場合には免責とさせていただきます。
 - 1) 誤った保存方法およびご使用方法による不具合
 - 2) 本キットの性能によらない不具合
- タンパク質の発現は、キットの性能以外の様々な要因により低下する可能性があります。そのため、タンパク質の発現を保証するものではありません。
- 本キットの不具合による逸失利益、また本キットを使用して得られた生成物による損害等について、弊社では一切責任を負いかねますので予めご了承ください。

10. 安定同位体標識アミノ酸

無細胞くん用安定同位体標識アミノ酸を別売しております。本キットとともにご利用ください。

製品番号	品名	容量	製品番号	品名	容量
A39-0072	アミノ酸混合水溶液- 15 N	1 mL	A107-0144	アミノ酸混合水溶液- 14 D	1 mL
A40-0073	アミノ酸混合水溶液- 13 C, 15 N	1 mL	A91-0128	アミノ酸混合水溶液-Lys, Arg- 13 C, 15 N	1 mL
A41-0074	アミノ酸混合水溶液- 15 N	1 mL	A92-0129	アミノ酸混合水溶液-Lys, Leu- 13 C, 15 N	1 mL
A42-0075	アミノ酸混合水溶液- 13 C, 15 N, d	1 mL	A108-0145	アミノ酸混合水溶液-SeMet	1 mL

6

11. 参考文献

- Kigawa T. *et al.*, Cell-free Protein Synthesis Methods and Protocols (Spirin, A. S. & Swartz, J. R., eds.), 83-97, 2007
- Matsuda T. *et al.*, J. Biomol. NMR., 37 (3), 225-229, 2007
- Yabuki T. *et al.*, J. Struct. Funct. Genomics, 8 (4), 173-191, 2007
- Seki E. *et al.*, Anal. Biochem., 377, 156-161, 2008
- Yokoyama J. *et al.*, Anal. Biochem., 411, 223-229, 2011
- Matsuda T. *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chem., 20, 6579-6582, 2012

12. トラブルシューティング

タンパク質が発現しない、または発現量が少ないなどの場合には、下記およびWebページのFAQ等ご参照ください。

その他ご不明な点は、お問い合わせ窓口までお願い致します。

考えられる要因	推奨する対策
キット性能の低下	① 使用期限内であることをご確認ください。 ② 適正な温度で保管されていたかご確認ください。 ③ 使用期限内で適正に保管されていた場合は、弊社までお問い合わせください。
テンプレートDNAによる問題	① テンプレートDNAの配列および濃度が適切かご確認ください。DNAは定量方法によって値が異なる場合があります。アガロースゲル電気泳動でバンドに問題がないことをご確認ください。低分子の不純物、ゲノムDNAの混入により、UV定量値より実際のテンプレートDNAの濃度が少ない場合があります。環状DNAでは、終濃度が1-10 ng/ μ L、直鎖状DNAは、2-20 ng/ μ Lになるよう添加してください。 ② フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による再精製で発現量が改善する場合があります。 ③ N末端側に精製用タグを導入することで発現量が改善される場合があります。最適なタグの検討はPCRによる直鎖状DNAを用いることをお勧めします。詳細は参考文献Yabukiraの方法をご参照ください。 ④ プラスミドはpUC等ハイコピータイプを推奨します。pET等コピー数の少ないプラスミドでは、精製時の不純物が相対的に多くなり、発現量が少くなる場合があります。 ⑤ lacオペレーターを含むテンプレートDNAをご使用の際はIPTGを終濃度で0.5から1.0 mmol/Lになるように添加すると発現量が改善する場合があります。
タンパク質の性質による問題	タンパク質によっては反応中に分解、沈殿してしまう傾向のものがあります。4時間程度の短時間反応や、界面活性剤等の添加をご検討ください。

「無細胞くん」お問い合わせ窓口

大陽日酸株式会社

メディアカル事業本部SI事業部

E-mail : isotope.TNS@tn-sanso.co.jp

U R L : <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>

7