

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。

タンパク質合成キット

第五版:2021.8

無細胞くん Quick

Cat. No. A29-0058

タンパク質合成キット

無細胞くん Quick

取扱説明書

- 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



3. キット内容

- 無細胞くん Quick A 液 540 μ L (1.5 mLチューブ) 1本
- 無細胞くん Quick B 液 320 μ L (1.5 mLチューブ) 1本
- コントロールDNA pUC-CAT† 50 μ L (1.5 mLチューブ) 1本

† 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。
* 本キットは、50 μ Lの反応で、約20サンプル分に相当します。

注意 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 Quickは、それぞれ下記手順で小分け保管し、後日使用することが可能です。ただし、小分け保存した各液は、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。
 - 無細胞くん Quick A 液: 解凍後速やかに氷上で必要量小分けします。
-80°Cで保存してください。
 - 無細胞くん Quick B 液: 解凍後速やかに氷上で必要量小分けします。
直ちに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存してください。
- * 解凍後、再凍結までの時間は可能な限り短くしてください。放置する時間が長くなると活性が低下します。

5. キット構成液主要成分

| | 無細胞くん Quick A 液 | |
|------------------|---------------------|--------------------|
| NTP | Amino acids† | HEPES (pH7.5) |
| Ammonium acetate | Polyethylene glycol | Magnesium acetate |
| tRNA | L-Glutamate | Creatine phosphate |
| DTT | cAMP | Folinic acid |

| | 無細胞くん Quick B 液 | |
|--------|-----------------|-------------------|
| 大腸菌抽出液 | Creatine kinase | T7 RNA polymerase |

† 本キットに含まれるアミノ酸は安定同位体標識されておりません。

* 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(Na₂N₃)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。

1. はじめに

このたびは、タンパク質合成キット「無細胞くん Quick」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キット化いたしました。
「無細胞くん Quick」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。

注意 取り扱いを誤った場合に、負傷を負う恐れがあります。

6. テンプレートDNA

本キットには、テンプレートDNAは含まれておりません。タンパク質の発現には、以下の図のようにT7RNAポリメラーゼでmRNAを転写可能なT7プロモーターおよび、T7ターミネーターを含むテンプレートDNAが必要です。



一般的な大腸菌用発現プラスミドをご利用いただけますが、pET系などコピー数の少ないプラスミドの場合、市販の高純度プラスミド精製キットで精製した場合であっても、RNaseAや、その他不純物のコンタミネーションの影響で発現量が少ない場合が多く見受けられます。精製後、さらにフェノール・クロロホルム抽出および、エタノール沈殿(2回)処理を行うことで発現量が改善する場合があります。また、PCRで作成した直鎖状DNAからもタンパク質を合成することができます。N末端へ付加するタグ配列の種類により発現量が大きく異なりますので、Yabukiら(Yabuki T. et al., 2007)が考案したTwo-step PCR法を用いて最適化することをお勧めいたします。クローニング不要で、短時間で様々なテンプレートDNAを調製できる簡便な方法のためぜひご検討ください。
技術情報詳細は下記URLをご参照ください。

https://stableisotope.tn-sanso.co.jp/Stableisotope_Products/Stableisotope/BiomolecularNMR/cell-free/cell-free-tech.html

7. 必要な器具・試薬類

ご使用前に以下のものをご準備ください。

- 1) テンプレートDNA
 - それぞれのテンプレートにつき、環状DNAは50 ng/ μ L以上で10 μ L以上、直鎖状DNAは100 ng/ μ L以上で10 μ L以上が必要です。反応液に対して、終濃度で1-10 ng/ μ Lの範囲で最適化することをお勧めします。
 - 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。
- 2) 滅菌済み0.6 mLサンプルチューブ サンプル数分(最大20本)
- 3) 滅菌蒸留水
- 4) アルミブロックヒーターまたは、水浴(37°C)
- 5) マイクロピペット
- 6) 卓上遠心機
- 7) 水浴

8. タンパク質合成操作

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

注意 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。

8.1. 準備

- ① アルミブロックヒーターまたは、水浴を37℃にセットします。
- ② コントロールDNAを含むテンプレートDNAの数量分、0.6 mL サンプルチューブを用意し、氷上に置きます。
- ③ 本キットを開封し、無細胞くん Quick A液、B液を取り出し、37℃水浴上で解凍し(約1分間)、解凍次第直ちに氷上に置きます。
 - * 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。
 - * 無細胞くんA液、B液とも4℃以上にならないようにしてください。
 - * 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。
 - 解凍後は氷上に置き、直ちに使用してください。長時間放置すると性能が低下します。
- ④ 解凍した無細胞くん Quick A液、B液を卓上遠心機でスピンドウンし、氷上に置きます。
- ⑤ 解凍したコントロールDNAおよび、予め調製したテンプレートDNAを氷上に置きます。

8.2. 合成反応

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

- ① 無細胞くん Quick A液、B液をピペティングで均一になるまで泡立てないように静かに攪拌します。
- ② 0.6 mL サンプルチューブに無細胞くん Quick A液 27 μ L、B液 16 μ L、滅菌蒸留水 3 μ L、テンプレートDNA 4 μ Lを添加し、マイクロピペットでよく攪拌し、直ちにアルミブロックヒーターまたは、水浴で37℃、1時間インキュベートします。

| 試薬 | 分注量(μ L) | 終濃度 |
|----------------------------------|---------------|------------------|
| 無細胞くん Quick A液 | 27 | 54% v/v |
| 無細胞くん Quick B液 | 16 | 32% v/v |
| 滅菌蒸留水 | 3 | |
| テンプレートDNA (12.5-125 ng/ μ L) | 4 | 1-10 ng/ μ L |
| 合計 | 50 | |

④

9. CAT活性測定法

添付のコントロールDNAによって合成されるCATタンパク質量は、比色法により定量することができます。コントロールとして定量値が必要な場合は、参考文献(Shaw W. V., 1975)または、弊社Webページをご参照いただき、定量試験を実施してください。通常、反応液当り 600 μ g/mL前後の活性CATタンパク質が得られます。

10. 廃棄方法

注意 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。キット内に大腸菌(遺伝子組み換えでない)が残存している可能性があります。

本キットで得られたタンパク質等の生成物の廃棄はおお客様の責任で行ってください。

11. 保障

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変動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。

⑥

- * 溶液の混合は、氷上で行ってください。
- * 攪拌する際は、気泡ができないよう静かに行ってください。
- * タンパク質合成は、37℃では概ね1時間で終了します。1時間以上インキュベートしても反応は持続しません。
- * タンパク質によっては、30℃、2時間反応で、より多く発現する場合がございます。

④ 反応終了後、サンプルチューブを氷上に5分置いて反応を停止させます。

⑤ 反応液(全画分)または、反応液を4℃で15,000 \times g、1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。
タンパク質によって沈殿するものがありますので、予め、後述の「SDS-PAGE前処理のためのアセトン沈殿」に従い、必ずSDS-PAGE等で発現されたタンパク質を確認してください。

- * 反応終了後、氷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、直ちにご使用頂くか、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 Quick 反応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。

- 1) 27 μ L の蒸留水に反応後の無細胞くん Quick 反応液 3 μ Lを加える(全画分)。
- 2) 無細胞くん Quick 反応液を15,000 \times gで1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)。
- 3) 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。
- 4) 15,000 \times g、1分間、4℃で遠心分離する。
- 5) 上清を除き、ペレットを60℃で20分間乾燥させる。
- 6) 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。
- 7) 熱変性後、SDS-PAGE用ゲルに1 μ L当り5-10 μ L アプラインする。
- 8) 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

12. 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
- Shaw W. V., Methods Enzymol., 43, 737-755, 1975d

13. 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等をご参照ください。
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が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PORI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、発現量が少な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。20分程度の短時間反応や、30℃、2時間の反応および、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

太陽日酸株式会社

東京都品川区小山1-3-26

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

URL : <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>

⑦