



透析法によるコムギ無細胞タンパク質合成プロトコール

株式会社セルフリーサイエンス

目次

1. はじめに	2
2. 実験の概略	2
3. 必要な試薬・消耗品・実験器具	2
3.1 弊社から提供される試薬	2
3.2 その他の試薬	3
3.3 消耗品・実験器具	3
4. プロトコール	4
4.1 転写反応	4
4.2 SUB-AMIX [®] SGC の調製	4
4.3 翻訳反応液の調製	5
4.4 透析カセットの準備	5
4.5 翻訳反応の開始	6
4.6 合成タンパク質の回収	7
5. ベンチノート	8
6. トラブルシューティング	9
7. ラベルライセンスポリシー	10
連絡先	10

1. はじめに

コムギ無細胞タンパク質合成系はタンパク質の翻訳を数日間維持することが出来るほどの高い翻訳活性を保持しています。短時間で簡便な少量タンパク質合成方法としては重層法 (Protein Research Kit をご参照下さい) をお勧めしますが、タンパク質の大量合成には翻訳バッファの連続供給と反応系から翻訳阻害副産物を除く方法が向いています。この方法を用手法で行うには弊社の自動タンパク質合成装置 **Protemist XE** などの特別な実験器具を必要としない透析法によるタンパク質合成方法が簡便です。

このプロトコールでは弊社の高翻訳活性のコムギ胚芽抽出液 **WEPRO7240** シリーズを使用した透析タンパク質翻訳方法について説明します。3 ml の翻訳反応 (コムギ胚芽抽出液を 0.5 ml 使用) で約 9 mg のクルードタンパク質 (GFP の場合) が合成出来ますが、実際のタンパク質合成量はタンパク質によって異なります。

2. 実験の概略

このプロトコールではまず始めに弊社の標準手順である SP6 RNA ポリメラーゼによる DNA から RNA への転写反応を行います。弊社の他のタンパク質合成システムで用いている pEU ベクターがそのまま使用出来ます。次に RNA をタンパク質の合成に用います。タンパク質の合成反応は翻訳バッファで満たした容器の中に沈めた透析カセットの中で行われます。透析法で合成したタンパク質は通常の方法で精製、解析出来ます。

3. 必要な試薬・消耗品・実験器具

3.1 弊社から提供される試薬

製品	カタログ番号	説明	保存温度
WEPRO [®] 7240/ WEPRO [®] 7240H/ WEPRO [®] 7240G	CFS-WGE-7240/ CFS-WGE-7240H/ CFS-WGE-7240G	WEPRO [®] 7240/7240H/7240G (コムギ胚芽抽出液) は温度や振動に敏感です。流水で解凍した後すぐに氷上に移して下さい。初めての解凍後、凍結融解を繰り返さないために分注して保存することをお勧めします。またタンパク質合成活性に影響があるため3回以上の凍結融解は避けて下さい。解凍後に本試薬を使用する際は泡立てないようにゆっくりピペティングし混合した後ご使用下さい。凍結時には液体窒素で凍結した後-80°Cで保存して下さい。	-80°C
SUB-AMIX [®] SGC (S1, S2, S3, S4)	CFS-SUB-SGC	本試薬は 40 倍濃縮された 4 つの試薬で構成されています (S1, S2, S3, S4)。-20°C以下で保存して下さい。10 回の凍結融解後にも活性に影響はありません。124 ml の 1x SUB-AMIX [®] SGC を調製する際は、それぞれ 3.1 ml の S1 から S4 までの試薬を 112 ml の nuclease free water に添加・混合して下さい。始めに 40 倍濃縮された試薬同士を混合すると沈澱が生じ、溶解に時間がかかる場合があります。1x SUB-AMIX [®] SGC	-20°C or -80°C

		は分注して-80°Cで保存し、凍結融解は避けて下さい。	
5x Transcription Buffer LM	CFS-TSC-5TB-LM	5倍濃縮された試薬です。10回の凍結融解後も活性に影響はありません。解凍後、適量ずつ分注して下さい。	-20°C
NTP Mix	CFS-TSC-NTP	ATP, GTP, CTP, UTPが終濃度25 mMで混合された試薬です。10回の凍結融解後も活性に影響はありません。解凍後、適量ずつ分注して下さい。	-20°C
SP6 RNA Polymerase	CFS-TSC-ENZ-S	50%グリセロールが添加されています。	-20°C
RNase Inhibitor		50%グリセロールが添加されています。	-20°C

試薬使用量:

試薬	内容量	1反応分の試薬量	使用可能反応数
SP6 RNA Polymerase	30 µl	13.2 µl	2
RNase Inhibitor	30 µl	13.2 µl	2
5x Translation Buffer LM	210 µl	1000 µl	4
NTP Mix	105 µl	1000 µl	9
SUB-AMIX® SGC	12.5 ml	3.1 ml	4
WEPRO7240	1 ml	0.5 ml	2

3.2 その他の試薬

試薬	説明
Nuclease-free water	DNase, RNase free。DEPC処理水は推奨しません。
Creatine Kinase	Creatine KinaseはRoche Applied Scienceから購入出来ます(Catalog No. 10127566001)。Nuclease-free waterで20 mg/mlのストック溶液を調製して下さい。調製後、分注して-80°Cで保存して下さい。凍結融解は活性に影響がありますので避けて下さい。

3.3 消耗品・実験器具

消耗品・実験器具	説明
透析用カセット	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, gamma-irradiated, 10K MWCO, 3mL, from Thermo SCIENTIFIC, Product No. 66455.
注射筒	5 ml、滅菌済み
注射針	18 ゲージ、滅菌済み
容器	透析反应用容器。サイズ; 約7 cm x 11 cm x 4 cm。セクション4.2を参照下さい。
インキュベーター	温度範囲15 から 37°C.
シェーカー	インキュベーター内に設置出来るもの

4. プロトコール

安全のために:

実験室内では飲食せず、標準的な実験室作業方法にのっとり RNase フリーの環境下で作業して下さい。常に手袋、白衣を着用し、試薬は氷上に置いて下さい。

実験前後に手を洗い、目や手に試薬が付着した場合、すぐに水で洗って下さい。本実験では危険な試薬は取り扱いませんが十分注意して取り扱って下さい。

実験前にこのプロトコールをよく読み、試薬、物品等不明点があれば弊社にお問い合わせ下さい。

4.1 転写反応

以下の表に従い、1,050 μ l の転写反応液を氷上で調製する。調製後、反応液をゆっくりピペッティングして混ぜ、37°Cで6時間反応する。

試薬	液量	終濃度
Nuclease-free water	604 μ l	-
5x Transcription Buffer LM	210 μ l	1x
NTP Mix (25 mM)	105 μ l	2.5 mM
RNase Inhibitor (80 U/ μ l)	13.2 μ l	1 U/ μ l
SP6 RNA Polymerase (80 U/ μ l)	13.2 μ l	1 U/ μ l
Plasmid (circular DNA, 1 μ g/ μ l)	105 μ l	100 ng/ μ l
Total	1,050 μ l	

4.2 SUB-AMIX[®] SGC の調製

以下の表に従い、124 ml の 1x SUB-AMIX[®] SGC を調製し、ゆっくり混ぜる。

試薬	液量	終濃度
Nuclease-free water	112 ml	
40x SUB-AMIX [®] SGC (S1)	3.1 ml	1x
40x SUB-AMIX [®] SGC (S2)	3.1 ml	1x
40x SUB-AMIX [®] SGC (S3)	3.1 ml	1x
40x SUB-AMIX [®] SGC (S4)	3.1 ml	1x
Total	124 ml	

120 ml の 1x SUB-AMIX[®] SGC を次の容器に移す（以降の透析反応で使用する）。



4.3 翻訳反応液の調製

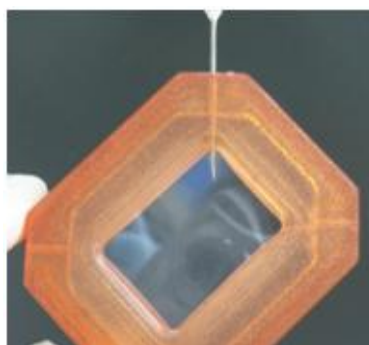
以下の表に従い 3 ml の翻訳溶液を氷上で混合し、ゆっくりピペッティングして混和する。泡立てないように注意すること。

試薬	液量	終濃度
mRNA	1 ml	1/3 vol.
1x SUB-AMIX [®] SGC	1.5 ml	
WEPRO [®] 7240/7240H/7240G (240 OD)	0.5 ml	40 OD
Creatine Kinase (20 mg/ml)	6 μ l	40 μ g/ml
Total	3 ml	

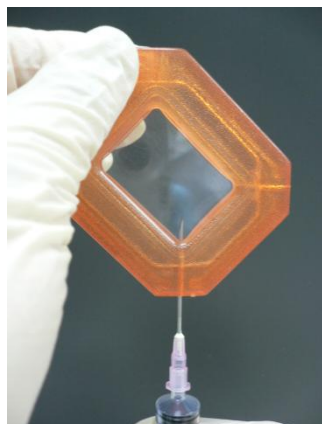
4.4 透析カセットの準備

実験を始める前に、透析カセットに問題がないか確認すること。メーカーの指示書を読み、使用したシリンジポートの位置を記録すること。シリンジポートは 1 箇所につき一度のみの使用とすること。

- 約 2 ml の nuclease-free water を注射針付きのシリンジに吸引する
- 透析カセットに注射針を挿入し、ゆっくりと nuclease-free water を注入する。注射針を挿入したままにする。透析膜を傷つけないように注意すること。



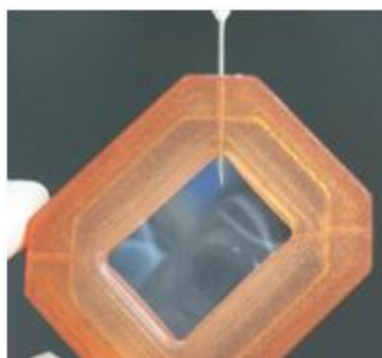
- 透析膜から液漏れがないことを確認する
- 注射針の先端が上を向くように透析カセットの向きを変える



- 透析カセットに入れた nuclease-free water をシリンジで吸引して取り除く
- 透析カセットから注射針を取り外す
- 透析カセットを 1x SUB-AMIX® SGC が入った容器に約 2 分間浸す
- 透析カセットを取り出し、カセット周辺部の液滴をペーパータオルで拭き取る。透析膜を乾燥させないように注意すること。

4.5 翻訳反応の開始

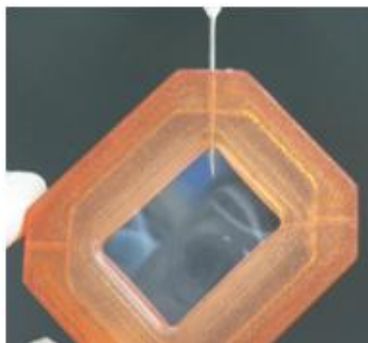
- 注射針付きのシリンジで翻訳溶液 3 ml を吸引する。
- 透析カセットの未使用のシリンジポートに注射針を挿入する。透析膜を傷つけないよう注意すること。



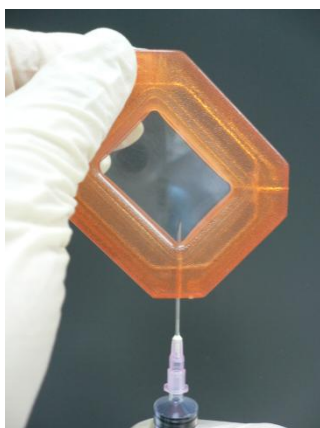
- ゆっくり翻訳溶液を注入する。注射針を挿入したままにする。
- 翻訳溶液を注入後、シリンジでカセット内の空気を抜く。
- 透析カセットからゆっくり注射針を抜く。
- 透析カセットを 1x SUB-AMIX® SGC が入った容器に沈め、フタをする。
- 容器をシェーカーで揺らしながら 15°C で 72 時間インキュベートする。

4.6 合成タンパク質の回収

- 容器から透析カセットを取り出し、カセット周辺部の液滴をペーパータオルで拭き取る。
- 注射針付きのシリンジで空気を約 3 ml 吸引する。
- 透析カセットの未使用のシリンジポートに注射針を挿入し、ゆっくり空気を注入する。注射針を挿入したままにする。



- シリンジが上に向くようにカセットの向きを変える



- シリンジでゆっくり合成タンパク質溶液を回収する。
- 透析カセットからゆっくりシリンジを抜く
- タンパク質溶液を適宜チューブに移し、以降の実験に用いる。

5. ベンチノート

印刷してご使用下さい。

転写反応液の調製:

試薬	液量	終濃度	チェック
Nuclease-free water	604 μ l	-	
5x Transcription Buffer LM	210 μ l	1x	
NTP Mix (25 mM)	105 μ l	2.5 mM	
RNase Inhibitor (80 U/ μ l)	13.2 μ l	1 U/ μ l	
SP6 RNA Polymerase (80 U/ μ l)	13.2 μ l	1 U/ μ l	
Plasmid (circular DNA, 1 μ g/ μ l)	105 μ l	100 ng/ μ l	
Total	1,050 μ l	INCUBATE 6 h at 37°C	

SUB-AMIX[®] SGC の調製:

試薬	液量	終濃度	チェック
Nuclease-free water	112 ml		
40x SUB-AMIX [®] SGC (S1)	3.1 ml	1x	
40x SUB-AMIX [®] SGC (S2)	3.1 ml	1x	
40x SUB-AMIX [®] SGC (S3)	3.1 ml	1x	
40x SUB-AMIX [®] SGC (S4)	3.1 ml	1x	
Total	125 ml		

翻訳溶液の調製

試薬	液量	終濃度	チェック
mRNA	1 ml	1/3 vol.	
1x SUB-AMIX [®] SGC	1.5 ml		
WEPRO [®] 7240/7240H/7240G (240 OD)	0.5 ml	40 OD	
Creatine Kinase (20 mg/ml)	6 μ l	40 μ g/ml	
Total	3 ml	INCUBATE 72 h at 15°C	

- 透析膜に液漏れがないか確認すること: 2 ml の水で透析カセット内を洗浄する
- 翻訳溶液を透析カセットに入れる: 常に新しいシリンジポートを使うこと
- SUB-AMIX[®] SGC が入った容器に透析カセットを浸し、15°Cで72時間、シェーカーで揺らしながら反応させる
- 合成タンパク質溶液を透析カセットから取り出す

6. トラブルシューティング

本実験には反応液の調製等の分注・ピペッティングに精度が求められます。添加液量の間違い、試薬の混合・添加忘れはタンパク質合成に影響があります。各試薬の添加の前に各試薬チューブを確認して下さい。

各試薬の分注後にベンチノートに記録して下さい。

各試薬の分注後にはピペッティングチップを交換して下さい。違う試薬の分注の際や試薬の混合の際には同じピペッティングチップを使用しないで下さい。

プラスミド DNA を添加し忘れるとタンパク質は合成出来ません。

透析カセットの透析膜を傷つけないよう注意して下さい。

タンパク質が合成出来なかった場合、少量スケールのタンパク質合成を行い、各試薬、DNA 鋳型に問題がないか確認して下さい。もし結果が不明瞭な場合、問題を明確にするために転写反応と翻訳反応に分けて原因究明して下さい。

不明点ありましたら弊社技術サポートまでご連絡下さい。

7. ラベルライセンスポリシー

セクション 3.1 にリストされている試薬をご購入されたお客様は、容器のキャップを開封した時点で以下のラベルライセンスポリシーの条件を遵守する事に同意したものといたします。

<< ラベルライセンスポリシー >>

ENDEXT[®]テクノロジーおよび本テクノロジーを使った製品は、重層法及び WEPRO[®]に関する、日本、米国その他の国において出願中または登録された特許（特許 3753358、特許 3768190、特許 3675804 など）により保護されております。

お客様は、製品、製品の内容物を、お客様の監督のもとで研究目的に使うことができる権利を有します。この権利は譲渡できません。お客様は、製品、製品の内容物およびこれらを使うことにより得られた物質について、第三者に譲渡、販売したり、商業目的で使ったりすることはできません。また、お客様は、製品の使用を通じて得られた情報や物質については、これを 1) いかなる第三者にも譲渡しないこと、および 2) 譲渡された情報や物質は研究目的のみに使用し商業目的には使用しないこと、を承知した共同研究者にかぎって提供することができます。

研究以外の目的における本製品の購入に関しましては、株式会社セルフリーサイエンスの知的財産室までご連絡下さい。

連絡先

技術サポート

E-mail: tech-sales-JP@cfsciences.com

株式会社セルフリーサイエンス

〒230-0046

神奈川県横浜市鶴見区小野町 75-1

リーディングベンチャープラザ 201 号

TEL : 045-500-2119

FAX : 045-500-2117

Web site: <http://www.cfsciences.com>

透析法によるコムギ胚芽無細胞タンパク質合成プロトコール_ver.1.1, Feb, 2015

©2015 CellFree Sciences Co., Ltd. All rights reserved.