

# タンパク質合成キット 無細胞くん<sup>®</sup> N 1000 取扱説明書

本製品は、非標識タンパク質合成用です。安定同位体標識タンパク質の合成には、無細胞くん SI、無細胞くん SI(PEG 不含)、無細胞くん Start をご使用ください。  
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ご理解ください。

-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、文書等は改良のため、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。

お問い合わせ窓口 E-mail: Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp  
テクニカルインフォメーションは QR コードからアクセスしてください。



## 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<sup>®</sup> N 1000」をお買い上げいただき、誠にありがとうございます。本製品は、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したしました。  
「無細胞くん<sup>®</sup> N 1000」は、大腸菌抽出液を用いたタンパク質合成系キットです。付属の透析デバイスを用いた合成反応により、一反応あたり最大数ミクログラム程度の目的タンパク質を簡単に合成できるキットです。また、合成したタンパク質は、そのまま精製などの工程に進むことができます。

## 2. 安全上の注意

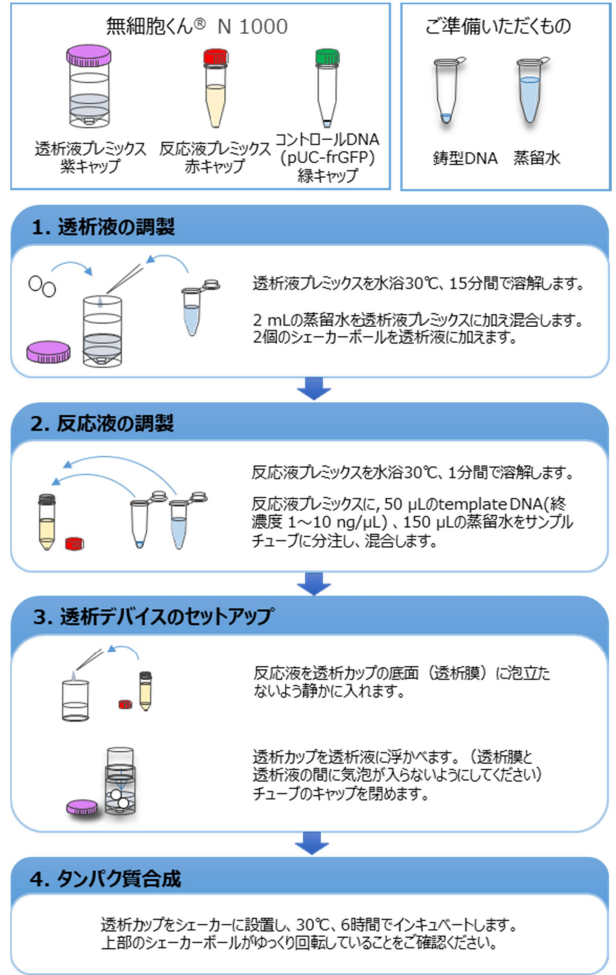
本製品は試験研究用です。本製品および本製品により得られたタンパク質等の成分を、人・動物の医療・臨床診断へ使用することおよび飲料品・食品へ添加することを禁止します。  
一般的な生化学実験経験者およびマイクロピペット操作に慣れた方を対象としています。それ以外の方のご使用はご遠慮ください。  
ご使用にあたっては安全ゴーグル、手袋、白衣等、適切な保護具を着用してください。万一、溶液などが眼や皮膚に付着した場合には、清浄な流水で洗浄してください。炎症が見られる場合には、医師の診察を受けてください。  
本書に記載されていないご使用方法により発生した安全上の問題については、弊社は責任を負いかねますので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マーク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、軽傷を負う恐れがあります。

## 3. キット内容

- 反応液プレミックス (1 mL 反応 x 1 回分) 1 本
- 透析液プレミックス (10 mL 透析 x 1 回分) 1 本
- 50 ng/μL コントロール DNA(pUC-frGFP) \* 50 μL 1 本
- \* N 末端に NHis タグと TEV プロテアーゼ認識配列が融合した frGFP が合成されます。
- シェーカーボール 2 個
- 透析カップ (MWCO: 15,000) 1 個

## クイックスタートガイド



## 4. 保存方法

-80℃±2℃で保存してください。  
-80℃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。  
一度解凍した反応液プレミックスは、氷上で速やかに必要量小分けした上で、液体窒素や粉末ドライアイスで急速凍結し、-80℃で保存してください。その他の溶液は、同様に小分けし、-30℃以下で保存してください。小分け保存した溶液は、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

反応液プレミックス		
大腸菌抽出液	酢酸マグネシウム	NTP
クリアチンキナーゼ	酢酸アンモニウム	HEPES
T7 RNA ポリメラーゼ	アミノ酸 (20 種類)	アジ化ナトリウム
tRNA	クリアチンリン酸	DTT
葉酸	L-グルタミン酸カリウム	
透析液プレミックス		
酢酸マグネシウム	クリアチンリン酸	NTP
酢酸アンモニウム	L-グルタミン酸カリウム	HEPES
アミノ酸 (20 種類)	アジ化ナトリウム	DTT
葉酸	酢酸カリウム	

劇物およ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を0.05%含みます。含有量が0.1%以下であることから上記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。

## 6. 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項のキット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ください。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。

## 7. 保証

### 保証期間

取扱説明書に貼付されており使用期限内にご使用ください。

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い場合や、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。

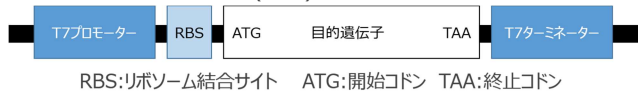
- 1) 誤った保存方法およびご使用方法による不具合
- 2) 本キットの性能によらない不具合

タンパク質の発現量は、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免失利益、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

## 8. テンプレート DNA

本製品でのタンパク質の発現には、以下の図のように目的遺伝子以外に、T7 RNA ポリメラーゼによる mRNA の転写に必要な T7 プロモーター、T7 ターミネーターおよび、転写開始に必要なリボソーム結合サイト(RBS)を含むテンプレート DNA が必要です。



5

## 合成反応

- ① 透析液を調製します。透析液プレミックスに滅菌蒸留水を 2 mL 添加後よく攪拌し、室温に置きます。
- ② 透析液にシェイカーボール 2 個を透析液がはねないように入れます。
- ③ 反応液を調製します。反応液プレミックスをピペティングで均一になるまで泡立っていないように静かに混合します。
- ④ サンプルチューブに反応液プレミックスを 800  $\mu$ L、テンプレート DNA、コントロール DNA 50  $\mu$ L、蒸留滅菌水 150  $\mu$ L を添加し、気泡ができないよう静かにマイクロピペットで混合します。

試薬	分注量 ( $\mu$ L)	終濃度
反応液プレミックス	800	80%
テンプレート DNA [50 ng/ $\mu$ L(20~200 ng/ $\mu$ L)]	50	2.5 (1~10) ng/ $\mu$ L
滅菌蒸留水	150	-
合計	1000	

- ⑤ 透析カップに反応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。この際できるだけ泡立たないように注意してください。
- ⑥ 透析液に透析カップを浮かべます。透析膜と液面に気泡が入らないようにセットし、ふたを閉めます。
- ⑦ 30°C に設定した恒温振とう装置に⑥を設置し、振とうを開始します。この際、上部のシェイカーボールがゆっくり回転する速度で振とうしてください。  
【回転振とう例】  
振幅 25-30 mm の場合 70 rpm
- ⑧ 振とうしながら 6 時間反応を行います。不安定なタンパク質の合成には、より短時間の反応が適する場合があります。また、タンパク質によっては、長時間の反応で合成量が上がる場合があります。
- ⑨ 透析液から透析カップを抜き取り、反応液をマイクロピペットで回収します。
- ⑩ 1.5 mL サンプルチューブに、回収した反応液を移し、氷上に 5 分間置いて反応を停止させます。不溶性画分を含む全画分が必要な場合はこのままご使用ください。
- ⑪ 可溶性画分が必要な場合は、反応液を 4°C で 15,000 x g、1 分間遠心分離した上清（可溶性画分）をご使用ください。

7

## 9. 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。  
低温のため、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。

### 必要な器具・試薬類

- 1) テンプレート DNA (環状 DNA のご使用をお勧めします。
  - ・それぞれのテンプレート DNA につき、20 ng/ $\mu$ L 以上で 50  $\mu$ L 以上必要です。反応液に対して、終濃度で 1~10 ng/ $\mu$ L の範囲で最適化することをお勧めします。
  - ・テンプレート DNA の準備方法は、ホームページをご参照ください。
- 2) 滅菌蒸留水 3) マイクロピペット一式 4) 卓上遠心機 5) 水浴 (30°C)
- 6) 恒温振とう機 (30°C) 7) 氷浴 8) サンプルチューブ

### 準備

- ① 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) 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な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は無償で交換させていただきます。
- ② 透析液プレミックスを 30°C 水浴で解凍し (約 15 分間)、解凍後は室温に置きます。
- ③ コントロール DNA および、テンプレート DNA を解凍し氷上に置きます。
- ④ 反応液プレミックスを 30°C 水浴で解凍し (約 1 分間)、解凍次第直ちに氷上に置きます。
  - ・解凍前に、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。
  - ・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。
- ⑤ 解凍した反応液プレミックス、コントロール DNA および、テンプレート DNA を卓上遠心機でスピンドウンし、氷上に置きます。

6

- ・タンパク質によっては沈殿する場合がありますので、必ず SDS-PAGE 等で発現状況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、分解する可能性があります。直ちに使用いただく、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 5~10 倍程度に希釈してからアプライしてください。希釈しない場合、樹脂への目的タンパク質の吸着効果が低下することがあります。

## 10. 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, 1975
- Wald GS. *et al.*, Nat Biotechnol., 17 (7), 691-5, 1999

## 11. 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、ホームページの FAQ 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いたします。

考えられる原因	推奨する対策
キット性能の低下	適正な温度で保管されていたかご確認ください。 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 の配列及び濃度が適切かご確認ください。テンプレート DNA の濃度を 260 nm の吸光度で定量した場合、不純物由来の吸光のため実際よりも低い錐型 DNA 濃度で合成している場合があります。ゲノム DNA などが混入していないか電気泳動でご確認ください。 ②テンプレート DNA にプラスミド抽出時に用いた RNase が残留していることがあります。(1) フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿、もしくは、(2) 市販の PCR 産物精製キットによる再精製で RNase を除去することで発現量が向上する場合があります。 ③N 末端の配列が発現量に影響します。N 末端にタグを導入する/タグを変更することで発現量が向上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、合成中に分解、沈殿してしまう性質のものがあります。 短時間反応や、界面活性剤の添加をご検討ください。

## 大陽日酸株式会社

東京都品川区小山 1-3-26

TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION

8