

Application Note

無細胞くん用 直鎖DNA鋳型の作成

本製品は研究用試薬ですので、人体に使用することはできません。

無細胞タンパク質合成をお試しになりたいときに、鋳型DNAの作成にハードルの高さを感じるかもしれません。ここではFree Use GFP (fuGFP)を例として、人工遺伝子合成サービスを用いてプラスミドDNAを作成し、PCRで直鎖DNA鋳型を増幅する方法をご紹介します。大腸菌培養操作を経由せずにタンパク質を合成できます。

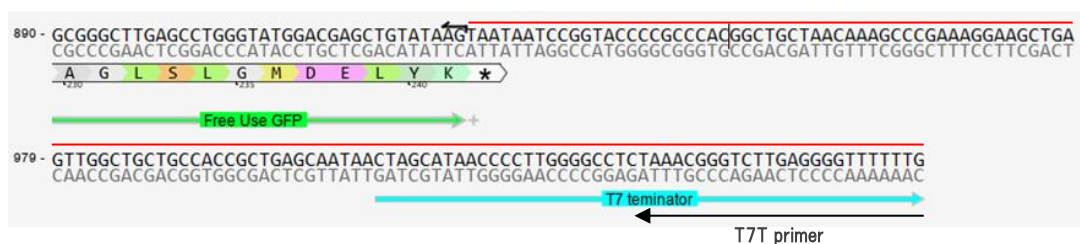
人工遺伝子合成

無細胞合成用の鋳型DNAには、T7プロモーター、RBS、T7ターミネーターが必要です。まずは、Hisタグ精製ができるようにN末端にNHisタグとTEVプロテアーゼの認識部位を付けた融合タンパク質を設計することをお勧めします。下図の赤線部分を目的遺伝子上流と下流に付加して、人工遺伝子合成をオーダーしてください。塩基配列は二次元バーコードのリンク先から該当部分をコピーしてください。

上流の付加配列



下流の付加配列



PCRによる直鎖DNA鋳型作成

T7プロモーターの上流100 bp領域、およびT7ターミネーター領域に作成したプライマー「CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA」でPCRを行い、無細胞合成用の直鎖DNA鋳型(約1.2k bp)を増幅してください。T7プロモーターの上流は、ベクターによって塩基配列が異なりますので、ご確認の上でプライマー設計をお願いします。各メーカーのPCRキットをお使い頂けますが、ここではTAKARA社 PrimeSTAR Maxを使用しました。

PCR反応液 (Total 50 μ L)

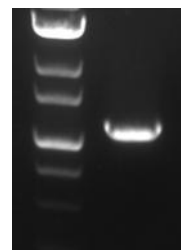
PrimeSTAR Max Premix	25 μ L
10 μ M T7P primer	1.5 μ L
10 μ M T7T primer	1.5 μ L
人工遺伝子合成プラスミド (1 μ g/mL)	2 μ L
超純水	20 μ L

PCRサイクル

98°C 10 sec
55°C 5 sec
72°C 10 sec
(5 sec/kb) x 35

アガロース電気泳動

(bp)
3,000
2,000
1,500
1,000
750



無細胞合成

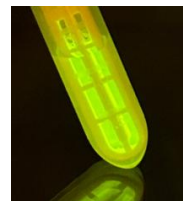
ここでは、無細胞くん N100キット反応液に、鋳型DNAとしてPCR反応液を加えてfuGFP合成を行いました。30℃で約16時間反応を行った結果、1 mLの反応液当たり約1 mgのfuGFPを合成できました。

無細胞反応液 (Total 100 μ L)

反応液プレミックス	80 μ L
直鎖DNA鋳型 (PCR反応液)	5 μ L
超純水	15 μ L

タンパク質合成キット

無細胞
くん N



Q&A

Q：PCR後に直鎖DNA鋳型を精製しなくても大丈夫でしょうか？また、適切な添加量を教えてください。

A：精製は必要ありませんが、スピンカラムなどで精製してからお使い頂いても構いません。PCRで目的のDNA断片がどのくらい効率的に増幅できたかにもよりますが、多くの場合100 μ Lの反応液に対して5～10 μ Lの添加で十分です。

Q：PCRでサブバンドが出た場合はどうしたらいいですか？

A：アニーリング温度などのPCR条件を検討するか、プライマーを再設計することで、目的のDNA断片だけが増幅する条件を見つけてください。

Q：T7プロモーター側のプライマーを上流側に設計する理由は何ですか？

A：DNA末端からの分解を遅らせること、および転写効率を保つことがその理由です。上流側にずらず、T7プロモーターと同じ塩基配列のプライマーを用いて作成した直鎖DNA鋳型では、転写効率が大幅に低下し、タンパク質合成量が低下することが分かっています。最低でも5 bp、できれば50～100 bp上流にプライマーを設計してください。

Q：T7ターミネーター側のプライマーはもっと下流に設計しなくてもいいのですか？

A：その必要はございません。実際にT7ターミネーターから、100、200、300 bp下流の位置に設計したプライマーで直鎖DNA鋳型を作成して、fuGFPを合成しましたが、合成量に差はみられませんでした。

Q：N SSキットでも直鎖DNA鋳型でタンパク質を合成できますか？

A：もちろん可能です。分泌タンパク質にはN SSキット、SI SSキットをお使いください。

製品情報

製品番号	製品名	数量	標準価格(税別)
A236-0301	無細胞くん N100	1キット (100 μ L反応×8回分)	¥ 29,000
A239-0304	無細胞くん N100 SS	1キット (100 μ L反応×8回分)	¥ 32,000

Nippon Sanso Corporation Innovation Unit Stable Isotope Division
Minatomirai Grand Central Tower 7F
4-6-2 Minatomirai, Nishi-ku, Yokohama, Kanagawa 220-8561, Japan

Tel: +81-45-872-1823
E-mail: Isotope.NS@jp.nipponsanso.com
<https://Stableisotope.jp.nipponsanso.com>



This application note is subject to change without notice.
© Nippon Sanso Corporation