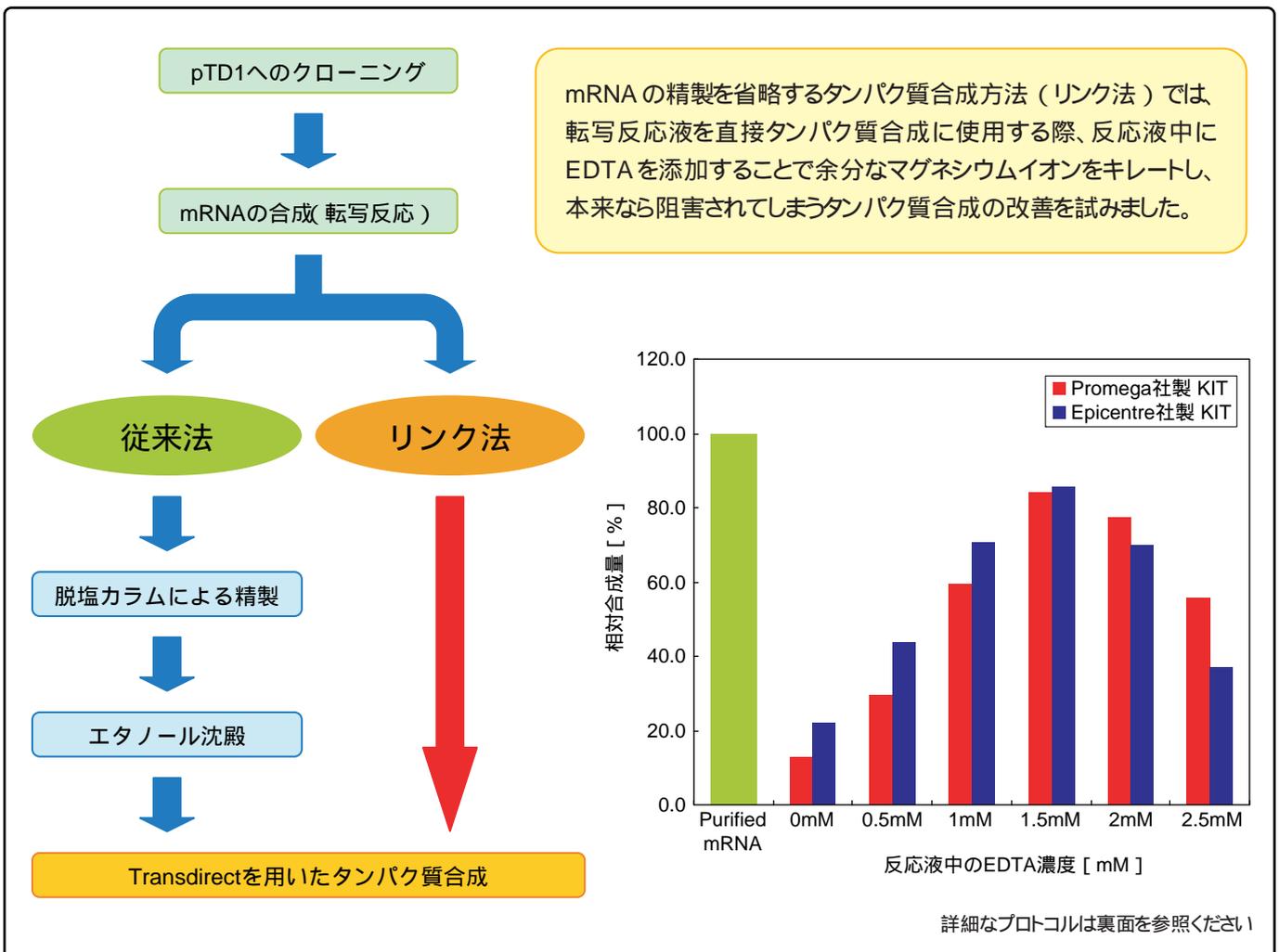


[mRNA の精製を省略したタンパク質合成方法]

市販の RNA 大量合成キットは、T7RNA ポリメラーゼなどのファージ由来 RNA ポリメラーゼを利用しており、この転写反応液中には高濃度のマグネシウム塩が含まれています。一方で、タンパク質合成(翻訳反応)においては、その合成活性がマグネシウム塩の濃度に強く依存しているため、転写反応液を直接使用できず、mRNA の精製が必要とされてきました。しかしながら、この精製工程には時間がかかり、操作も煩雑であるという意見が多く聞かれます。そこで今回は、Transdirect *Insect cell* を用いたタンパク質合成における mRNA の精製を省略する方法について検討しましたので報告させていただきます。



Promega社製、Epicentre社製、いずれのRNA大量合成キットを用いた場合にも反応液中の EDTA の濃度は 1.5mM が至適であり、精製した mRNA を用いた場合の約 85% の合成量を見込めることが明らかとなりました。

本手法 (リンク法) を用いた場合、これまで mRNA の精製に要していた時間が大幅に短縮可能であり、さらに mRNA を精製した場合の約 85% のタンパク質合成が可能であることを示すことが出来ました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

方法

・ mRNA の合成

Control DNA(β -ガラクトシダーゼ遺伝子をコード)を鋳型とし、T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System(Promega、P1320)、AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit(Epicentre、ASF3257)を用いて、それぞれmRNA合成を行った。

・ タンパク質合成

mRNA合成反応液2 μ Lを直接使用し、50 μ Lスケールにてリンク反応を行った。反応液組成を表1に示す。その際に、25mM EDTA溶液¹を表2に示す割合で反応液に添加し、EDTAの反応液中における濃度を0mMから2.5mMにコントロールした。反応終了後、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定し²、精製したmRNAを用いた場合とタンパク質合成量を比較した。

1 EDTA溶液は蒸留水に溶解後、121℃で20分オートクレーブ処理して調製

2 β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer(Promega、E2000)を使用

表1：リンク反応における反応液組成

mRNA合成反応液	2 μ L
Reaction Buffer	15 μ L
Insect Cell Extract	25 μ L
4mM Methionine	1 μ L
25mM EDTA溶液	表2参照
滅菌蒸留水	50 μ Lに調整

表2：EDTA溶液の添加量と反応液中での最終濃度

EDTA最終濃度 [mM]	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
25mM EDTA添加量 [μ L]	0	1	2	3	4	5

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL (075)823-1351

WEB <https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html>

E-Mail t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect *insect cell* (P/N 292-30000-91)

- キット内容
- ・ Insect Cell Extract (黄) × 5本
 - ・ Reaction Buffer (青) × 1本
 - ・ 4mM Methionine (赤) × 1本
 - ・ 0.5 μ g/ μ L Control DNA (白) × 1本
 - ・ 0.5 μ g/ μ L pTD1 Vector (緑) × 1本
 - ・ 取扱説明書

■反応回数：40回(50 μ L合成反応系)

■保存温度：-80

■価格：31,185円(税込)

- ご注意
- ・ 試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
 - ・ 概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
 - ・ 本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット(受注生産のため、詳細はお問い合わせください。)

■価格(税込)

20キット相当分	Transdirect <i>insect cell</i> バルクキット20 (P/N 292-30000-92)	404,250円
50キット相当分	Transdirect <i>insect cell</i> バルクキット50 (P/N 292-30000-93)	924,000円
100キット相当分	Transdirect <i>insect cell</i> バルクキット100 (P/N 292-30000-94)	1,617,000円

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。



価格は2008年10月1日現在のものです。
仕様および価格は改良のため、予告なく変更することがありますので、ご了承ください。

 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1 (075) 823-1351

<http://www.shimadzu-biotech.jp/>

取次店