



タンパク質合成

○ リボヌクレアーゼインヒビターの添加

タンパク質合成量を向上させるために有効な方法としては、リボヌクレアーゼインヒビターの添加があります。これは目的タンパク質の分子量が大きいほど(mRNA が長いほど)有効で、1 割から 2 割程度の増加が期待できます。反応液の最終濃度で 1U/ μ L となるように添加してください。

推奨品: RNase inhibitor(ヒト胎盤由来)タカラバイオ(2310A)、プロメガ(N2611)

○ 複合体タンパク質の合成

複数のサブユニットからなる複合体タンパク質の合成は、タンパク質合成時にそれらの mRNA を同時に添加(共発現)することで可能となります。構成比も mRNA の添加量比によってコントロールすることが可能です。

詳細は[アプリケーションデータ①](#)を参照ください。

○ 界面活性剤の添加

疎水性の高いタンパク質を合成した時、不溶化することがあります。そのような場合は、界面活性剤をタンパク質合成開始時に添加することで劇的に改善される場合があります。

非イオン性界面活性剤である TritonX-100 や NP-40 の場合は、おおよそ反応液の 1.0%(w/v)程度まではタンパク質合成に影響はありません。

○ ジスルフィド結合を持つタンパク質の合成(特注品の還元剤(DTT)無添加試薬が必要になります。詳細はお問合せ下さい。)

Transdirect(通常品)には DTT が含まれるため、ジスルフィド結合は形成されません。

そこで、DTT のような還元剤を一切含まない Transdirect 還元剤フリーキット(特注品)を開発しました。これにより大腸菌アルカリフォスファターゼ(S-S 結合 2 本)、また反応系に酸化還元をコントロールするグルタチオンやプロテインジスルフィドイソメラーゼを添加することにより、ヒトリゾチーム(S-S 結合 4 本)を活性型で合成することに成功しています(いずれの酵素も S-S 結合が活性に必須)。

詳細は[アプリケーションデータ⑤](#)を参照ください。

Transdirect 還元剤フリーは、抽出液および反応バッファに DTT のような還元剤を一切含みません。

現行製品とは仕様の異なる点がございますので、以下の点に留意ください。

① 還元剤フリー仕様となっておりますので、**一旦アルミ袋を開封した後は、ドライアイスとの共存はお避けください。**炭酸ガスにより、Insect Cell Extract に多量の沈殿が生じ、タンパク質合成能が低下する可能性があります。

② Transdirect 還元剤フリーの「**Insect Cell Extract**」、「**Reaction Buffer**」ともに使用方法は正規品と同じです。下表に 50 μ L スケール反応の例を示しました。

また、正規製品もお使いの場合には、それぞれ取り違えにご注意ください。

還元剤フリー Insect Cell Extract	25 μ L
還元剤フリー Reaction Buffer	15 μ L
4mM Methionine	1 μ L
mRNA	16 μ g
water	final 50 μ L

また、ジスルフィド結合の数が多い場合などに関しましては、反応系に酸化還元バッファとプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)を添加することにより、正しいジスルフィド結合の形成が期待できます。以下に 50 μ L スケール反応の例を示しました。



還元剤フリー Insect Cell Extract		25 μ L
還元剤フリー Reaction Buffer		15 μ L
4mM Methionine		1 μ L
25mM 酸化型グルタチオン		1 μ L
25mM 還元型グルタチオン		1 μ L
PDI		2 μ L
mRNA		16 μ g
water	final	50 μ L

REDOX バッファー:

酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンは共に生化学用もしくは特級試薬を滅菌蒸留水にて溶解したものを御使用ください。

Protein disulfide isomerase (PDI):

タカラ製 PDI(コード 7318)をメーカー付属の取説に従い、200 μ L 滅菌蒸留水にて溶解後、御使用ください。

反応温度および時間は通常どおり、25°C、4 時間程度で問題ありませんが、他の無細胞系のアプリケーションなどでは、S-S の数が多い場合(9 本など)には、反応時間を長くした方が良いといった例もございます。

これまでの発現実績

- ・ 還元剤フリー系
大腸菌アルカリフォスファターゼ(S-S 結合 2 本)
- ・ 還元剤フリー+酸化還元バッファ+PDI 系
ヒトリゾチーム(S-S 結合 4 本)
Fab フラグメント(S-S 結合 分子内 4 本 分子間 1 本)

<ご注意>

本プロトコルは、他社製試薬キットの使用に関し、いかなる使用許諾を示唆するものではありません。それぞれの製品の取扱説明書等に従い、適切にご使用をお願い致します。