myTXTL® Antibody/DS Cell-Free Expression Kit

無細胞タンパク質発現システム

日本語ユーザーマニュアル

Version 1.0 June 2024

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

© Daicel Arbor Biosciences
5840 Interface Drive, Suite 101
Ann Arbor, MI 48103 (USA)
+1 (734) 998-0751
info@arbor.daicel.com

お問合せ：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

ライフサイエンス事業部　バイオ試薬ソリューション部
東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone：03-3816-0851（代表）　Fax：03-3814-5080
E-mail：reagents@primetech.co.jp

MYTXTL and DAICEL ARBOR BIOSCIENCES are registered trademarks of Daicel Corporation. ZYMO and ZYMOPURE are registered trademarks of Zymo Research Corporation. NANOLIGHT is a registered trademark of Prolume Ltd.

目次

イントロダクション.....3

myTXTLへようこそ！.....3

myTXTL Antibody/DS手順の概要.....3

使用目的.....4

myTXTL Antibody/DSキットと構成品、保存条件.....4

DNAテンプレートの調製.....5

互換性のあるテンプレート.....5

テンプレートの設計.....5

DNAテンプレートの精製.....5

テンプレートの濃度.....5

最適な実践方法.....6

DNA精製と濃度.....6

ポジティブコントロール反応.....6

インキュベーションプラットフォーム.....6

反応容器と撹拌.....6

気泡.....6

パイロット試験.....6

完全長の抗体.....6

His-tag精製.....6

反応手順.....7

付録.....9

付録A. Glucコントロール反応の評価.....9

SDS-PAGEによるGlucの分析.....9

GLuc活性のアッセイ.....9

付録B. SDS-PAGEのためのmyTXTL Antibody/DS反応の調製.....10

付録C. コントロールプラスミドをリニア（直鎖状）テンプレートに変換.....11

付録D. IgGの発現.....11

トラブルシューティング.....12

イントロダクション

myTXTLへようこそ!

無細胞タンパク質発現の世界へようこそ。myTXTLは、in vivoタンパク質発現システムと比較して、DNAからタンパク質へのワークフローを加速します。myTXTLを使用することで多くの場合、クローニング、形質転換、溶解、タンパク質精製などの時間のかかるステップを省略できます。

myTXTL Antibody/DS Kit は、VHH、ScFv、Fab、IgGコンストラクトを含む、**ジスルフィド結合を含むタンパク質を発現**するために特化して設計されています。myTXTLはプラスミドおよびリニアDNAテンプレートの両方をサポートし、同一反応内で1つまたは複数のタンパク質を発現できます。収量は、ELISAやSPRなどの様々な下流アッセイに通常十分な量です。適切に発現されたジスルフィド結合を含むタンパク質は、わずか6～16時間で0.25 mg/mLを超える収量に達することができます。
.

myTXTL Antibody/DSマスターミックスは大腸菌溶解液由来で、大腸菌ベースのタンパク質発現システムで用いられるすべての恒常的発現プロモーターおよび誘導性の発現調節プロモーターをサポートしています。T7プロモーターによるタンパク質発現は、myTXTL反応にDS Helper Plasmidを加えることで実現できます。

ジスルフィド結合を含まないタンパク質を最大収量発現するためには

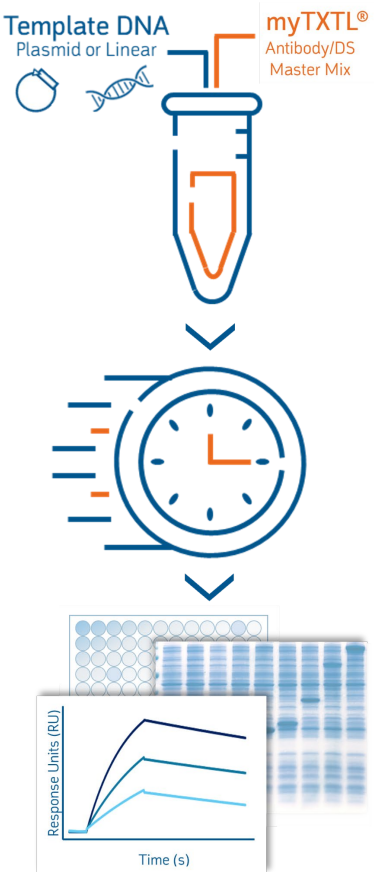
***myTXTL Pro Kit*をご利用ください**

myTXTL Antibody/DS 手順の概要

1. myTXTL Antibody/DS反応には、1つまたは複数の標的タンパク質をコードするテンプレートDNA、Helper Plasmid（T7発現用）、およびMaster Mixを加えます。

2. 目的のタンパク質収量に応じて、反応液を27℃で1～16時間インキュベートします。

3. 得られたタンパク質は、必要に応じて自由に使用・分析できます!



使用目的

myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kitは**研究目的のみで**使用されます。
この製品は、病気の診断、予防、または治療を目的としたものではありません。

myTXTL Antibody/DS キットと構成品、保存条件

myTXTL Antibody/DS Master Mixは必ず冷凍-80℃で保管してください。その他の試薬は冷凍-20°C以下で保管してください。

Catalog #	Description	Contents	Quantity	Storage Temp.
560300	myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kit, 300 µL	myTXTL Antibody/DS Master Mix	3 × 100 µL	-80°C
		T7 GLuc Control Plasmid	1 × 25 µL	≤ -20°C
		DS Helper Plasmid	1 × 20 µL	≤ -20°C
561000	myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kit, 1000 µL	myTXTL Antibody/DS Master Mix	10 × 100 µL	-80°C
		T7 GLuc Control Plasmid	1 × 25 µL	≤ -20°C
		DS Helper Plasmid	3 × 20 µL	≤ -20°C
5610ML	myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kit, 10 mL	myTXTL Antibody/DS Master Mix	10 × 1 mL	-80°C
		T7 GLuc Control Plasmid	2 × 25 µL	≤ -20°C
		DS Helper Plasmid	3 × 250 µL	≤ -20°C
503003	T7 GLuc Control Plasmid	T7 GLuc Control Plasmid	1 × 25 µL	≤ -20°C

T7 GLuc Control Plasmid は *24 nM*、*DS Helper Plasmid* は *7.2 nM* で提供されます。

キット以外に必要な試薬

Reagent	Notes
Nuclease-free, molecular biology-grade water	
Plasmid or linear DNA template encoding the desired target protein(s)	24 nM concentration in ≤ 50 mM Tris, ≤ 0.5 mM EDTA

キット以外に必要な機器・消耗品

Equipment
Sterile, nuclease-free 2 mL microcentrifuge tubes, or 0.2 mL PCR tubes/strips, or multi-well plates with tight lids Nuclease-free filter tips and pipets capable of pipetting 0.5–100 µL
Thermal block or shaker with heated lid, or enclosed incubator with water or bead bath suitable for reaction vessels Mini-centrifuge and/or microcentrifuge
Vortex mixer

DNAテンプレートの調製

互換性のあるテンプレート

myTXTL は、プラスミドDNA、およびリニアDNAの両方からの発現をサポートします。

テンプレートの設計

myTXTLは大腸菌溶解液を基に構築されています。大腸菌の転写・翻訳機構が認識するエレメントを含むテンプレートからのタンパク質発現をサポートします。また、オプションのDS Helper Plasmidを反応液に添加することで、T7プロモーターに基づく発現もサポートします。したがって、発現用テンプレートには以下の条件を満たす必要があります:

1. リニアテンプレートのみ: 50–100 bp のリーダー配列、調節エレメントを含まない
2. 誘導性または恒常性プロモーター (T7 またはネイティブな*E. coli*)
3. リボソーム結合部位
4. 開始コドン
5. 目的タンパク質のオープンリーディングフレーム（ORF）
6. 終止コドン
7. ターミネーター
8. リニアテンプレートのみ: 50–100 bp のトレーラー配列、調節エレメントを含まない

DNA テンプレートの精製

不純物が含まれると、無細胞タンパク質発現を妨げる可能性があります。紫外可視分光光度計を用いてテンプレートを定量し、吸光度の比を算出してください。**DNAテンプレートは、A260/280比が1.8-2.2、A260/230比が2.0-2.3である必要があります。**

細胞からプラスミドを調製する場合、専用のプラスミドDNA抽出キットZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research社)などを使用してください。多くの場合、Zymo DNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research社) などのキットを用いてプラスミドの追加の精製を行うことで、より良好な結果が得られます。PCRやGolden Gate Assemblyなどで生成したリニアテンプレートも、PCR精製キットで精製する必要があります。**テンプレートは、ヌクレアーゼフリー水または10 mM Tris, 0.1 mM以下 EDTA（pH 7.4 - 8.0）で溶出してください。**

テンプレートの濃度

発現に1つのテンプレートを使用する場合、テンプレートを24 nM（3.5 Kbp分子で約50 ng/µL）に希釈/濃縮することを推奨します。 2つのテンプレートを同時に用いて発現させたい場合（例えば、IgGを作製するために別々のDNAテンプレートから重鎖と軽鎖を発現させたい場合）、各テンプレートの最終濃度を48 nMにすることを推奨します（詳細は付録Dをご参照ください）。これらの仕様を満たすようにテンプレートを調製する場合、**最終濃度がTrisは50 mM以下、EDTAは0.5 mM以下**であることを確認してください。

アプリケーションによって、最適または最小のテンプレート濃度は異なる場合がございます。

最適な実践方法

DNA精製と濃度

最高のパフォーマンスを得るには、「DNAテンプレートの調製」に記載されている DNA 精製手順とテンプレート濃度のガイドラインに従ってください。

ポジティブコントロール反応

T7 GLuc Control Plasmidは、ポジティブコントロール反応のテンプレートとして使用したり、必要に応じて「付録C」に記載のプライマーを用いたPCRによりリニアDNAテンプレートを生成するために使用したりできます。コントロール反応液を27℃で16時間インキュベートすると、精製することなくSDS-PAGEで可視化できる十分な量の*Gaussia*ルシフェラーゼ酵素が産生されます。GLuc酵素活性はルミネッセンスアッセイでも評価できます。コントロール反応液の評価に関する詳細は「付録A」をご参照ください。

インキュベーションプラットフォーム

反応インキュベーションは、予定した27℃でのインキュベーションの間、チューブ壁面への結露を防ぐシステムを使用してください。ヒートリッド付きのサーモシェイカーが最も柔軟性に優れていますが、他の方法でも問題ありません。ウォーターバスを使用する場合、インキュベーションの間はカバーを閉めてください。

反応容器と撹拌

選ばれた反応容量に応じて、適した反応容器と撹拌条件は異なります:

Reaction volume	Recommended vessel	Agitation
< 6 µL	0.2 mL tubes or plates, or 384-well plates	None
6-25 µL	2 mL tube, 96-well plate	None
26-100 µL	2 mL tube, 24-well plate	650 rpm
> 100 µL	6-24-well plate	300 rpm

気泡

ゆっくりとピペッティングすることで気泡を避けてください。ボルテックスは最小限にしてください。

パイロット試験

発現効率はタンパク質によって異なります。ご自身のプロジェクトに適した反応量とインキュベーション時間を決めるために、パイロット試験でタンパク質の発現を検証していただくことをお勧めします。

完全長の抗体

myTXTLでIgG重鎖と軽鎖を発現する通常の手順では、テンプレートのモル比を1：1にします。全長IgG発現のセットアップ例は「付録D」をご参照ください。

His-tag 精製

myTXTL反応で発現させたHis-tag付きタンパク質を精製する際は、イミダゾールを含む結合バッファーや洗浄バッファーの使用を避けてください。

反応手順

汎用的なmyTXTL Antibody/DS反応のセットアップを説明します。「DNAテンプレートの調製」のガイドラインと「最適な実践方法」を確認し、従ってください。お客様のアプリケーションに最適な条件を、実験を通じて特定する必要がある場合があります。ご不明な点がございましたら、FAQs をご参照いただくか、reagents@primetech.co.jpにお問い合わせください。

1. **反応容量と反応容器を選択してください。**反応は通常、最終容量6-100 µLの間で設定します。目的のタンパク質の発現を初めて試みる場合、12 µLの反応から始めてください。ガイドラインとして、「最適な実践方法 – 反応容器と撹拌」を参照してください。

2. **インキュベーター、ウォーターバス、またはサーモミキサーを27°Cに予熱します。**オプションでヒートリッドを使用する場合、反応温度に近い温度に設定します。ウォーターバスを使用する場合、インキュベーション中の結露を最小限に抑えるため、反応容器全体が水またはビーズで完全に覆われていることを確認してください。ウォーターバスには蓋をしてください。

3. **キットのすべてのコンポーネントとテンプレートを室温で融解し、それからすぐに氷上に移してください。**

4. **使用直前に、myTXTL Antibody/DS Master Mixを小型遠心分離機で軽く（～1秒）スピンダウンします。次に、このMaster Mixの約50%の容量に設定したピペットでよく混合します。均一性を確保し、気泡の発生を防ぎます。**

5. **myTXTL反応を組み立てます。**以下のコンポーネントを指示された順序で混合します。各コンポーネントの容量は2つの反応サイズ例を示しています。V µLの反応サイズを使用する場合、Vに各コンポーネントごとに指示された比率を掛けてください。

Component	12 µL reaction	50 µL reaction	*V* µL reaction
Antibody/DS Master Mix	9.0 µL	37.5 µL	0.75 × *V* µL
DS Helper Plasmid*	0.5 µL	2.0 µL	0.04 × *V* µL
Template DNA at 24 nM†	2.5 µL	10.5 µL	0.21 × *V* µL
TOTAL VOLUME	**12.0 µL**	**50.0 µL**	***V* µL**

** DS Helper Plasmidは、 T7 GLuc Control PlasmidなどのT7 プロモーターを使用する場合に必要です。T7 プロモーター以外のシステムを使用する場合は、DS Helper Plasmidの代わりにヌクレアーゼフリー水を使用できます。*

*† myTXTL反応では、各テンプレートのストック濃度は24 nM、最終ターゲット濃度は5 nMにすることを推奨します。2つのテンプレートからモル比1:1 で同時に発現させる場合のガイドラインは、付録Dをご参照ください。開始濃度が高いテンプレートの場合、残りの容量をヌクレアーゼフリー水で補ってください。最適なテンプレート濃度はアプリケーションによって異なる可能性があります。**ネガティブコントロール反応では、テンプレートDNAをヌクレアーゼフリー水に置き換えてください。***

反応手順 (続き)

6. **組み立てた myTXTL 反応を軽くボルテックスし、小型遠心分離機にかけます (各ステップとも～1 秒)。**
7. **myTXTL反応液を27℃で最大16時間インキュベートします。反応液量が25 µLを超える場合は、インキュベーション中に撹拌してください。**ガイドラインについては、「最適な実践方法 - 反応容器と撹拌」をご参照ください。
8. **myTXTL反応液を氷上に置き、反応を停止させます。**
9. **ポジティブコントロール反応を評価します。**T7 GLuc Control Plasmidを使用した場合、GLuc（21.3 kDa）の発現はSDS-PAGEで可視化できます。コントロール反応の評価方法については「付録A」をご参照ください。
10. **目的のタンパク質の量や、アフィニティー、活性を評価します。**下流のアッセイによっては、精製は不要な場合があります。SDS-PAGEによるmyTXTL発現タンパク質の可視化については、「付録A」および「付録B」をご参照ください。

    His-tagのアフィニティーを用いたプルダウンにより目的のタンパク質を精製する場合、イミダゾールを含む結合バッファーおよびウォッシュバッファーは避けてください。

付録

付録 A. GLuc コントロール反応の評価

myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kitsには、T7 GLuc Control Plasmid が含まれています。このコントロールプラスミドには、N末端に8XHis-tagと5つのジスルフィド結合を含む*Gaussia* luciferase Dura proteinをコードしています。このコントロールプラスミドは、myTXTL反応の性能を評価するためにポジティブコントロールテンプレートとして使用することができます。

SDS-PAGEによるGLucの分析

1. GLuc Controlを用いたmyTXTL反応後、「付録B」のプロトコルを実施し、GLuc myTXTL反応の上清から1.5 µLサンプルを2つ準備します。「付録B-ステップ7」で、1つのサンプルペレットを18 µLの1X **非還元**SDS-PAGE ローディング色素に再懸濁し、もう1つのサンプルを18 µLの1X **還元**SDS-PAGE ローディング色素に再懸濁します。これらのサンプルの煮沸とローディングをマニュアル通りに進めてください。
2. 非還元サンプルと還元サンプルは泳動速度が異なります。非還元サンプルは還元サンプルよりも速く泳動され、小さく見えるはずです。また、還元サンプルは21.3 kDa付近に泳動します。

GLuc活性のアッセイ

myTXTLコントロール反応液を16,000 × *g* 以上で3分間、遠心分離します。遠心分離した上清 2 µL を 198 µL の PBS（pH7.4）に加え、よく混ぜます。次に、NanoLight™ GLuc GLOW Assay (NanoLight Technology, Cat. no. 320) などのシステムを使用して、100倍希釈したmyTXTLサンプル10 µLとNanoFuel GLOW working solution 50 µLを混合し、*Gaussia* luciferaseの濃度を測定します。5分後にルミノメーターで発光を測定します。コントロール反応を推奨テンプレート濃度、27℃で少なくとも 16 時間以上インキュベートした場合、元の非希釈反応液の最終的なルシフェラーゼ濃度は 10 µM または 0.2 mg/mL に近い値になるはずです。

付録 B. SDS-PAGEのためのmyTXTL Antibody/DS反応の調製

ジスルフィド結合の形成は、SDS-PAGEを用いて非還元サンプルと還元サンプルを比較することで確認できます。目的のタンパク質のバンドは、ジスルフィド結合がインタクトであるか、還元されているかによって、見かけの質量が変化するはずです。IgGやFabなどのタンパク質の場合、それを構成するポリペプチド鎖が、還元サンプルでは解離し、別々のバンドとして現れますが、還元されていないサンプルでは保持されたままになること、ご注意ください。

ジスルフィド結合を含むタンパク質は、目的のタンパク質をmyTXTL Antibody/DS Master Mixに含まれるタンパク質と視覚的に識別するために、SDS-PAGEの前に精製が必要になることがよくあります。精製の後、 SDS-PAGE分析用に元のmyTXTL反応液の2−6 µL相当量をロードしてください。

例外的によく発現しているタンパク質は、SDS-PAGEの前に精製する必要がないかもしれません。しかし、25 kDa未満のタンパク質は、ローディング前にアセトン沈殿を行った方がよい場合があります。以下のプロトコルでは、myTXTL反応液1 µL相当のアセトン沈殿およびSDS-PAGE分析について説明します。:

1. 精製または非精製 myTXTL 反応液を 16,000 × *g* 以上で 3 分間遠心分離します。
2. 1.5 µL のmyTXTL反応上清液を1.5 mL マイクロ遠心チューブに移します。
3. この1.5 µLのmyTXTL反応上清液に15 µLの氷冷アセトンを加え、タンパク質を沈殿させます。
4. 沈殿した反応物を16,000 × *g*以上、3 分間遠心分離します。
5. マイクロ遠心チューブから上清液を取り除き、ペーパータオルにピペッティングして捨てます。
6. このマイクロ遠心チューブの蓋を開けたまま、タンパク質ペレットを室温で10分間、自然乾燥させます。
7. このペレットを18 µLの1X **非還元**SDS-PAGEローディング色素に再懸濁し、95℃で3～5分間煮沸させます。
8. サンプルを氷上で軽く冷やします。
9. このSDS-PAGEサンプルを軽く遠心分離し、内容物を回収します。
10. 12 µLのSDS-PAGEサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲルにロードし、エンドポイント myTXTL 反応の 1 µL 相当を可視化します。

付録 C. コントロールプラスミドをリニア（直鎖状）に変換

タンパク質発現にリニア（直鎖状）DNAテンプレートを用いる場合、リニアポジティブコントロールは発現システムの挙動を評価するために有用です。リニアコントロールテンプレートは、T7 GLuc Control Plasmid (最終産物 969 bp) をテンプレートとして、以下のプライマーでPCR増幅することにより作製できます。:

T7LPfor: CGGCCACGATGCGTCC　　**T7LPrev**: CGACCGCTTTGGCCG

これらは、リーダー配列とトレーラー配列の両方を有しており、プロモーターからターミネーターまでの領域全体を増幅します。増幅産物の精製方法については、「DNAテンプレートの調製 – DNA精製」をご参照ください。

DNA設計をサポートするために、DNAプラスミド配列とリニアDNAテンプレートの例は下記のウェブサイトでご覧いただけます (www.arborbiosci.com/mytxtl-sequences)。

付録 D. IgGの発現

myTXTL Antibody/DSキットは、プラスミドやリニアDNAテンプレートからIgGを発現するために使用できます。以下は、myTXTL反応において、重鎖（HC）用と軽鎖（LC）用の2つの別々のDNAテンプレートからIgG発現を行うための反応液のセットアップです。なお、HC:LCのモル比は1:1です。下表は「反応手順」の表に代わるものです。下表以外の場合は、該当セクションの手順に従ってください。

Component	12 µL reaction	50 µL reaction	*V* µL reaction
Antibody/DS Master Mix	9.0 µL	37.5 µL	0.75 × *V* µL
DS Helper Plasmid*	0.5 µL	2.0 µL	0.04 × *V* µL
IgG HC DNA at 48 nM†	1.25 µL	5.25 µL	0.11 × *V* µL
IgG LC DNA at 48 nM†	1.25 µL	5.25 µL	0.11 × *V* µL
TOTAL VOLUME	12.0 µL	50.0 µL	*V* µL

* *DS Helper Plasmid*は、*T7 Gluc Control Plasmid*などの*T7 promoter*を使用する場合に必要です。*T7 promoter*を用いない発現システムの場合、*DS Helper Plasmid*の代わりにヌクレアーゼフリー水を使用できます。

† *myTXTL*反応において、*HC DNA*と*LC DNA*の最終濃度がそれぞれ*5 nM*になるように、*48 nM*のストック濃度を推奨します。テンプレート開始濃度が高い場合は、残りの容量をヌクレアーゼフリー水で補ってください。最適なテンプレート濃度はアプリケーションによって異なる場合があります。ネガティブコントロール反応では、テンプレート*DNA*の容量をヌクレアーゼフリー水で置き換えます。

トラブルシューティング

タンパク質発現効率は、どんな発現システムでもコンストラクトによって異なり、多くの条件に影響されやすいです。以下は、潜在的な問題、その一般的な原因及び関連する潜在的な解決策の一覧です。ただ、これらに限定されたものではありません。

1. **目的のタンパク質が発現せず、ポジティブコントロールはうまく発現した。**
   発現不足や失敗の、一般的な原因と解決策には次のようなものがあります:
   a. DNAテンプレートの純度が十分ではなかった: これは、発現不足の際に最もよくある原因です。「DNAテンプレートの調製 – DNAテンプレートの精製」を注意して従ってください。自作プラスミド精製プロトコルのパフォーマンスをチェックするために、myTXTL T7 GLuc Control Plasmid を *E. coli* (Amp^r) で増殖・複製し、精製することができます。ご自身で作製したプラスミドからの GLuc発現と、myTXTL T7 GLuc Control Plasmid発現を、同等の myTXTL 反応容量でロードし、SDS-PAGEで比較します。同様の発現結果が得られた場合、その自作精製プロトコールは問題ない可能性が高いです。
   b. テンプレートに重要な構造的な要素が欠けていた: 「DNAテンプレートの調製 - テンプレートの設計」をご参照ください。
   c. 目的のタンパク質が不溶性であった: 発現後、そのタンパク質が不溶性かどうかを確認してください。
      i. myTXTL反応液を3分間、16,000 × *g* 以上遠心分離し、その上清液の全てを新しい容器に移します。
      ii. 反応上清液と同量の 1X 還元 SDS-PAGE ローディング色素を用いて、myTXTL 反応に接触していた反応容器の表面を繰り返しピペッティングし、不溶物を再懸濁します。不溶物が目に見えないことを確認します。
      iii. 再懸濁したサンプル1 µLまたは2 µLを1X還元SDS-PAGEローディング色素11 µLまたは10 µLに希釈し、95℃、5分間煮沸します。
      iv. サンプルを冷却した後、12 µLをSDS-PAGEゲルにロードし、 1–2 µL反応相当の不溶物を可視化します。
   d. 目的のタンパク質には翻訳後修飾が必要であった: myTXTL反応系では翻訳後修飾はできません。
   e. 使用されたプロモーターが、内在性*E. coli* プロモーターでもT7プロモーターでもなかった: プロモーターシステムをT7または*E. coli*で一般的に使用されているものに切り替えてください。
   f. 目的のタンパク質の発現が誘導因子の制御下にあった: 誘導因子をその反応に添加したことで望ましい収量が得られない場合は、プラスミド濃度を20 nMまで上げることを検討してください。下表をご参照ください:

Promoter	Inducer	Recommended inducer concentration in final reaction	Recommended plasmid template concentration in final reaction
T7lac	IPTG	1 mM	10 nM
TetA	aTc	20 µg/mL	20 nM
araBAD	L-Arabinose	2%	20 nM

g. 1つまたは複数の試薬が、テンプレートとともに導入された可能性があり、反応を阻害した: myTXTL反応における各種添加剤の最大許容濃度（終濃度）は下記の通りです:

Glycerol:	0.1%
DMSO:	1.0%
EDTA:	0.1 mM
Tris-HCl (pH 8):	50 mM
$CaCl_2$:	1.0 mM
$MgCl_2$:	1.0 mM
NaCl:	50 mM

2. ポジティブコントロールの発現が失敗した。

a. その反応が過度に撹拌されたか、または撹拌が不十分だったか: 「最適な実践方法 -反応容器と撹拌」の通りに行っているか確認してください。

b. キット構成品が適切な温度で保管されていなかった: myTXTL Antibody/DS Master Mixは-80℃で保管する必要があります。それ以外の構成品は -20℃ 以下で保管可能です。

3. SDS-PAGEで目的のタンパク質が確認できたが、期待した活性レベルを示さなかった。

a. そのタンパク質の活性には翻訳後修飾が必要であった: myTXTL発現システムでは翻訳後修飾はできません。

b. そのタンパク質には異なる反応条件が必要であった: インキュベーション温度を下げたり、適切なフォールディングを促進するために補酵素やシャペロンを追加したりしてください。

4. His-tag精製後、目的のタンパク質を少量または全く回収できなかった。

a. 結合バッファーおよび/または洗浄バッファーにイミダゾールが含まれていた: 使用する緩衝液の構成を確認し、イミダゾールを含まないものに置き換えてください。