myTXTL® Pro 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.

目次

イントロダクション.....3

myTXTLへようこそ！.....3

myTXTL Pro手順の概要.....3

使用目的.....4

myTXTL Pro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

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

deGFPポジティブコントロール反応の定性評価.....9

deGFPポジティブコントロール反応の定量評価.....9

付録B. SDS-PAGEのためのmyTXTL Pro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.....10

トラブルシューティング.....11

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 Proキットは、リニア（直鎖状）DNAまたはプラスミドDNAテンプレートを用いて、ジスルフィド結合を含まないタンパク質を発現します。1つまたは複数のタンパク質を同一反応で発現でき、様々な下流のアッセイに十分なタンパク質を生産できます。発現が良好なタンパク質は、わずか6～16時間で1 mg/mLを超える収量に達します。

myTXTL Pro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ます。T7プロモーターによるタンパク質発現は、myTXTL反応にPro 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むタンパク質を発現する場合は

***myTXTL Antibody/DS Kit*をご利用ください**

myTXTL Pro手順の概要

1. 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 Pro 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 Pro キットと構成品、保存条件

myTXTL Pro Master Mixは必ず冷凍-80°C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.
540300	myTXTL Pro Cell-Free Expression Kit, 300 µL	myTXTL Pro Master Mix	3 × 100 µL	-80°C
		T7 deGFP Control Plasmid	1 × 25 µL	≤ -20°C
		Pro Helper Plasmid	1 × 20 µL	≤ -20°C
541000	myTXTL Pro Cell-Free Expression Kit, 1000 µL	myTXTL Pro Master Mix	10 × 100 µL	-80°C
		T7 deGFP Control Plasmid	1 × 25 µL	≤ -20°C
		Pro Helper Plasmid	3 × 20 µL	≤ -20°C
5410ML	myTXTL Pro Cell-Free Expression Kit, 10 mL	myTXTL Pro Master Mix	10 × 1 mL	-80°C
		T7 deGFP Control Plasmid	2 × 25 µL	≤ -20°C
		Pro Helper Plasmid	3 × 250 µL	≤ -20°C
503002	T7 deGFP Control Plasmid	T7 deGFP Control Plasmid	1 × 25 µL	≤ -20°C
502138	P70 deGFP Control Plasmid	P70 deGFP Control Plasmid	1 × 30 µL	≤ -20°C

T7 deGFP Control Plasmid は *24 nM*、*Pro Helper Plasmid* は *2.4 nM*、*P70 deGFP Control Plasmid* は *20 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)	plasmid DNA: 24 nM; linear DNA: 96 nM

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Pro 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

プラスミド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。リニアテンプレートの場合は、96 nM（3.5 Kbp分子で約200 ng/µL）に調製してください。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 deGFP 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できます。ネイティブな*E. coli*プロモーターシステムを用いた発現には、代わりにP70 deGFP Control Plasmid（型式502138）を使用することも可能です。必要に応じて、 T7 deGFP Control plasmidは、付録Cに記載のプライマーを用いてPCRによりリニアDNAテンプレートを産生するために使用できます。発現が成功すると、反応液は緑色蛍光を発します。ポジティブコントロール反応を27℃で最低4時間インキュベートすると、精製することなくSDS-PAGEでdeGFPタンパク質（25.4 kDa）が可視化されます。16時間後には、最終濃度約1 mg/mL deGFPになることが期待されます。コントロール反応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

反応容器と撹拌速度はユーザーが選択した反応容量に応じて決定されます。反応システムに十分な酸素供給を維持するように設計されています。

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

気泡は、myTXTL Pro Master MixとmyTXTL反応液の発現効率を著しく低下させる可能性があります。ゆっくりとピペッティングし、ボルテックスは極力避けてください。

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容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。

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 Pro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」をご参照ください。

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 Pro 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つの反応サイズ例で示しています。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
Pro Master Mix	9.0 µL	37.5 µL	0.75 × V µL
Pro Helper Plasmid*	0.5 µL	2.0 µL	0.04 × V µL
Template DNA at 24 or 96 nM†	2.5 µL	10.5 µL	0.21 × V µL
TOTAL VOLUME	**12.0 µL**	**50.0 µL**	**V µL**

* *Pro Helper Plasmid*は、*T7 deGFP 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、*Pro Helper Plasmid*の代わりにヌクレアーゼフリー水を使用できます。

† プラスミド*DNA*テンプレートの場合、*myTXTL*反応における最終濃度が*5 nM*になるよう、ストック濃度を*24 nM*にすることを推奨します。リニア*DNA*テンプレートの場合、*myTXTL*反応における最終濃度が*20 nM*になるよう、ストック濃度を*96 nM*にすることを推奨します。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 deGFP Control Plasmid, P70 deGFP Control Plasmid, またはリニア誘導体を用いたポジティブコントロール反応を行った場合、発現が成功すると反応液は目視可能な緑色の蛍光を発します。ポジティブコントロール反応液を27℃で少なくとも4時間インキュベートすると、deGFPタンパク質（25.4 kDa）が精製なしでSDS-PAGEゲル上に観察できるはずです。16時間後には、約1 mg/mLのdeGFPが期待できます。コントロール反応の評価に関する詳細は、「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、精製が不要な場合もあります。25 kDa未満のタンパク質をSDS-PAGEで可視化するためには、ガイダンスとして「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洗浄バッファーは避けてください。

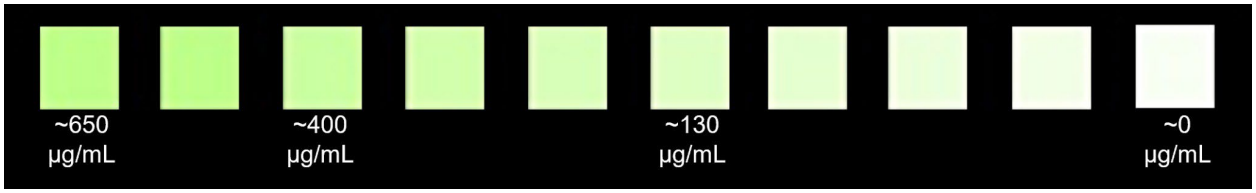
付録

付録A. deGFPコントロール反応の評価

myTXTL Pro Cell-Free Expression Kitsには、T7 deGFP Control Plasmid が含まれています。これは改変型緑色蛍光タンパク質（deGFP）をコードしています。このコントロールプラスミドは、myTXTL 反応のパフォーマンスを評価するための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。deGFPは、発現の成功を示す、定性的（視覚的）指標と、発現効率の定量的指標の両方を提供します。

deGFPポジティブコントロール反応の定性評価

コントロール反応液を室温で16,000 × *g*以上、3分間遠心分離します。チューブを白い紙の上に置きます。反応液の緑色の濃さを下図のカラーストリップと比較することで、deGFP濃度を概算します。推奨されるコントロールテンプレート濃度を用いて、反応液を27℃で少なくとも16時間インキュベートした場合、その反応液の色は左端のカラーストリップよりも色が濃くなるはずです。



deGFPポジティブコントロール反応の定量評価

以下の方法では、分光光度計を使用してコントロール反応の発現効率を定量化できます。

1. T7 deGFP Positive Control反応の希釈液を調整します
    a. 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。
    b. PBSを希釈液として用い、コントロール反応液の10倍希釈液を3つ調製します。
2. UV分光光度計を用いて、波長488 nmで吸光度を測定します
    a. PBSを用いて装置のブランク補正をします。
    b. ポジティブコントロール反応の希釈液を測定し、平均吸光度（A）を計算します。
3. ポジティブコントロール反応におけるdeGFPの平均濃度を計算します
    a. Aに4.616を掛けて、もともと（希釈前）のコントロール反応におけるdeGFP濃度（mg/mL）を推定します（光路長1 cmを想定; ご使用の分光光度計の光路長をご確認ください）。
    b. 推奨されるコントロールテンプレート濃度を用いて、反応液を27℃で少なくとも16時間インキュベートした場合、deGFP濃度は1 mg/mLに近くなるはずです。

付録B. SDS-PAGEのためのmyTXTL Pro反応の調製

25 kDa以下のタンパク質をSDS-PAGEによって適切に可視化するためには、追加の処理が必要です。このようなタンパク質に対しては、下記プロトコルのアセトン沈殿を推奨しています。下記プロトコルでは、1 µLのエンドポイントmyTXTL反応の可視化に対応しています。

1. 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）テンプレートに変換

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 deGFP Control Plasmid (最終産物 1.05 kbp) 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の精製」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)。

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 myTXTL 反応で発現不足の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 deGFP 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 deGFP 発現と、myTXTL T7 deGFP 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ジスルフィド結合が含まれていた: ジスルフィド結合を含むタンパク質用に設計された、myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kit（型式: 560300, 561000, 5610ML）を使用してください。
   e. 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。
   f. 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。

g. 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

h. 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が ~1 mg/mL 濃度まで達しなかった。

a. その反応が過度に攪拌されたか、または攪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を確認してください。
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 Pro Master Mixは -80°Cで保管する必要があります。それ以外の構成品は -20°C 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. そのタンパク質にはジスルフィド結合が含まれていた: ジスルフィド結合を含むタンパク質用に設計された、myTXTL Antibody/DS Cell-Free Expression Kit（型式: 560300, 561000, 5610ML）を使用してください。
b. 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。
c. 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。