
TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System

カタログ番号 L1170/L1171/L2080/L2081

※この説明書は簡易型の日本語マニュアルです。詳細については
[Technical Manual No.045](#)をご覧ください。

もくじ

- A. 使用前の注意点
- B. 鋳型DNAについての注意点
- C. TNT[®] Quickによるin vitro転写／翻訳反応
- D. ルシフェラーゼコントロール
- E. RI標識導入率計測法

使用前の注意点

- ▶RNaseの混入に注意してください
- ▶Master Mixは使用時には4℃または氷上で取り扱い、使用後はすぐに-70℃に保存してください。
- ▶3回以上の凍結／融解を避けてください。

鋳型DNAについての注意点

1. 純度

- ▶大腸菌からのプラスミド精製の場合、通常のアルカリ-SDS法またはWizard[®] Minipreps DNA Purification Systemで十分な純度が得られます。
- ▶PCR産物はそのまま、またはWizard[®] PCR Preps DNA Purification Systemまたはエタノール沈殿／洗浄して使用できます。
- ▶制限酵素で消化したDNAの場合、フェノール／クロロホルム抽出＋エタノール沈殿処理またはWizard[®] PCR Preps DNA Purification Systemで不純物を除いて下さい。
- ▶鋳型DNAに含まれるエタノールは完全に除いてください。

2. コンストラクト

- ▶5'-untranslated region (UTR) の強いヘアピン構造は除いて下さい。
- ▶ポリA配列を付けると翻訳効率が上がります（ルシフェラーゼの場合 2～5倍増加）。

▲ 直鎖状DNAの場合

- ▶プロモーター上流に20bp程度のDNAの遊びが必要です。
- ▶リボゾームが停滞するのを防ぐためにストップコドン (UAA) が必要です。
- ▶SP6 Systemでは転写効率が落ちるため直鎖状DNAを鋳型にするのことはお勧めしません。
- ▶3'突出末端を持つ鋳型DNAは異常な翻訳産物合成の原因となります。

TNT[®] Quickによるin vitro転写／翻訳反応

1. 反応液調製

A反応 →RI標識の場合

B反応 →Non-RI標識の場合 (Transcend[™] tRNA使用 [カタログ番号 L5070または L5080])

C反応 →翻訳後修飾の場合

(Canine Pancreatic Microsomal Membranes 使用 [カタログ番号 Y4041])

※In vitro転写/翻訳反応に上記マイクロソームメンブレンを加えることにより、翻訳後修飾（シグナルペプチドの切断、グリコシレーションなど）の実験を行えます。

TNT 反応ミックス

	A反応	B反応	C反応
	[³⁵ S]メチオニン 標識の場合	Transcend™ tRNA標識の場合	翻訳後修飾 (+CPMM)
T N T R Quick Master Mix ¹⁾	40μl	40μl	20μl
メチオニン、1mM	–	1μl	–
[³⁵ S] メチオニン (1,000Ci/mmolで10mCi/ml) ²⁾	2μl	–	2μl
鋳型DNA ³⁾	2μl (1μg)	2μl (1μg)	2μl (0.5μg)
Transcend™ Biotin-Lysyl-tRNA ⁴⁾	–	1μl	
Canine Pancreatic Microsomal Membranes ^{6) 7)}	–	–	0.3~2.5μl
Nuclease-Free Waterで右の量までメスアップ ⁵⁾	50μl	50μl	25μl

1. T N T R® Quick Master Mixは発現レベルを最大限引き出すために最適化していますが、特種な遺伝子の場合Mg²⁺（酢酸マグネシウム0.1~0.6mM）、K⁺（塩化カリウム10~50mM）の最適化が必要な場合があります。Master Mixに含まれる内因性タンパク質は100~200mg/ml程度です。
2. アマシャム社のRedivue L-[³⁵S]メチオニン（カタログ番号 AG1094）をお勧めします。この製品の使用で、ウサギ網状赤血球抽出液由来の42kDaのバックグラウンドが抑えられ、安定剤も含まれています。通常の[³⁵S]標識アミノ酸は不安定で、その酸化物は翻訳を阻害します。
3. プラスミドDNAの場合0.2~2.0μg、PCR産物の場合100~800ngの使用をお勧めします。
4. リジン含量の低いタンパク質または発現レベルが低い場合Transcend™ tRNAを増やして（1~4μl）感度を上げることができます。
5. 反応にカルシウムを加えないで下さい。
6. 添加するマイクロソームメンブレンの量は最適化を必要とします。通常、マイクロソームメンブレン量を増やすと、修飾の割合は増えますが、ポリペプチド合成量自体が減少します。
7. 添加するマイクロソームメンブレンの量は最適化を必要とします。通常、マイクロソームメンブレン量を増やすと、修飾の割合は増えますが、ポリペプチド合成量自体が減少します。
8. SP6システムの場合、マイクロソームメンブレンの添加により翻訳が阻害される傾向にあるため1.8μl以上添加しないでください。0.6μlのマイクロソームメンブレンで翻訳が約50%阻害されます。

2. 30℃で60-90分インキュベート

* 時間を短縮したい場合、37℃、30分でも可能ですが、非常に低分子量の翻訳産物ができることがあります。

3. 解析

SDS-PAGE

ルシフェラーゼコントロール

ルシフェラーゼは61kDaの単量体で、完全長のタンパク質が活性を持ち、活性化には翻訳後修飾も必要ないので、本システムのポジティブコントロールに最適です。

1. RIによる検出

1. 上記 T N T[®] Quick反応Aと同様（鋳型DNAとしてLuciferase Control DNAを使用）
2. SDS-PAGE またはRI標識導入率の計測（翻訳産物は-20℃で2ヶ月、 -70℃で6ヶ月保存可能）

2.Non-RIによる検出（ルシフェラーゼ活性測定）

1. 上記 T N T[®] Quick反応BからTranscend™ tRNAを除いた反応（鋳型DNAとしてLuciferase Control DNAを使用）
2. ルミノメーター/シンチレーションカウンターによる検出
50μlのLuciferase Assay Reagentに2.5μlのT N T[®] Quick反応液を加え、検出機器で測光する。

RI標識導入率計測法

1. 50μl翻訳反応液から2μlを98μlの1M NaOH/2%H₂O₂に混合
2. ボルテックス後、37℃で10分間インキュベート
3. 翻訳産物を沈殿させるために、氷冷した25%TCA/2%カザミノ酸 900μlを加え、氷上で30分間インキュベート
4. Whatman[®] GF/Cグラスファイバーフィルターを少量の氷冷5%TCAで濡らし、3)のTCA反応混合液250μlを吸引により濾過し、翻訳産物の沈殿を回収。フィルターを1~3mlの氷冷5%TCAで3回洗浄。1~3mlのアセトンで1回洗浄。その後、フィルターは、室温または、ヒートランプで少なくとも10分間乾燥
5. フィルターを1~3mlのシンチレーション混合液に入れ、転倒攪拌後、液体シンチレーションカウンターで計測
6. 転写/翻訳反応液のトータルカウント数を計測するために、5μlのTCA反応混合液をフィルターに直接スポットし、5)の様
に計測
7. バックグラウンドカウントを計測するために、鋳型DNAを入れなかった50μl 転写/翻訳反応から2μlをステップ1)~5)に
従って処理

8. RI標識導入率計算

$$\frac{\text{洗浄したフィルター（ステップ5）のcpm} \times 100}{\text{未洗浄のフィルター（ステップ6）のcpm} \times 50} = \% \text{ 導入率}$$

9. バックグラウンドに対するfold stimulation計算

$$\frac{\text{洗浄したフィルター（ステップ5）のcpm}}{\text{鋳型DNAなし反応液からの洗浄フィルター（ステップ7）のcpm}} = \text{fold stimulation}$$