

Protein Expression (in vitro system)

Osakada

Rapid Translation System RTS 500(Roche)使用

このシステムは1 ml反応で100~500 µgのスケールでタンパク合成が行えるようにデザインされている。
以下、RTS 500取扱説明書より手順を引用した。

- 凍結乾燥試薬の再溶解(注意;ボルテックスは使用しない。再溶解は使用直前に行い、氷上で取り扱う。)
 - 溶液1 (E. coliライセート/ボトル1、赤)
0.25 mlの再溶解用バッファー(ボトル5)を凍結乾燥試薬に加え、ローリングまたはゆっくりシェイクして混ぜる。
 - 溶液2(反応ミックス/ボトル2、緑)
0.8 mlの再溶解用バッファー(ボトル5)を凍結乾燥試薬に加え、ローリングまたはゆっくりシェイクして溶かす。
 - 溶液3(フィーディングミックス/ボトル3、青)
10.5 mlの再溶解用バッファー(ボトル5)を凍結乾燥試薬に加え、ローリングまたはゆっくりシェイクして溶かす。
 - 溶液4(エネルギーミックス/ボトル4、橙)
0.6 mlの再溶解用バッファー(ボトル5)を凍結乾燥試薬に加え、ローリングまたはゆっくりシェイクして溶かす。
 - 溶液5(再溶解用バッファー/ボトル5、白)
Ready-to Use溶液。4°Cで安定だが、-20°Cでの保存も可能。
 - 溶液6(DNAテンプレート)
DNase、RNaseフリーの滅菌水で調整する。GFPの場合は、コントロールベクターGFP(pIvex2.3-GFPWT /バイアル6、無色)を使用する(滅菌水で1 µg / µlに調整してある)。
- 使用溶液の調整(注意;ボルテックスは使用しない。)
 - 供給溶液7の調整
0.5 mlのエネルギーミックス(溶液4)をフィーディングミックス(溶液3)に加える。ローリングまたはゆっくりシェイクして混ぜる。
 - 反応溶液8の調整
*E. coli*ライセート(溶液1)に、0.75 mlの反応ミックス(溶液2)、50 µlのエネルギーミックス(溶液4)、5~15 µgのDNAテンプレート*(溶液6)を加え、ローリングまたはゆっくりシェイクして混ぜる。*DNAテンプレートの添加量は最大50 µl。GFPの場合は、DNAテンプレート以外の溶液を混合し、そのうち0.5 mlを別のチューブに移して7.5 µgのGFPコントロールベクターを加える。
- 反応のセットアップ
 - 反応槽(1 ml容量)側のふた(2カ所)を両方とも開く。1 mlの反応溶液(溶液8)を丸い穴の方から注入する。このとき、長丸の穴から空気が抜けるように容器を少し斜めに傾けながら行う。気泡が反応槽からなくなった状態でふたをする。GFPの場合は反応槽に入れる反応溶液を0.5 mlにし^{*}、反応槽に空気を入れた状態で反応させる。
 - 供給槽(約10 ml容量)側のふた(2カ所)を両方とも開く。約10 mlの供給溶液(溶液7)を丸い穴の方から注入する。このとき、長丸の穴から空気が抜けるように容器を少し斜めに傾けながら行う。気泡が反応槽からなくなった状態でふたをする。しっかりとふたをし、反応槽を上にする。注意;供給槽からは完全に気泡を除去すること。
- 反応開始
 - 反応容器中の2つのマグネットスターラーバーがそれぞれの槽の底に来ていることを確認する。
 - 反応容器をRTSコントロールユニットにセットする。
 - パラメーターを設定する。一般的には回転数120~180 rpm、温度30°C(アグリゲーションを起す場合は下げた方がよい)、反応時間最大24時間(不安定なタンパク質の場合は短くする)。GFPの場合は30°C、120 rpm、24時間。

・反応をスタートさせ、コントロールユニットの上部窓から2つのスターラーバーが回転していることを確認する。

5. 反応終了

・反応溶液を回収する。GFPの場合は0.5 ml反応溶液を2 mlチューブに回収し、24時間4℃で置く[※]。

※GFPの酸化

GFPが蛍光を発するためには、翻訳後に酸素分子が必要となる。GFPの合成反応の場合、機能活性を持った形に転換するのを早めるために、反応槽の反応溶液は50%量として反応時に空気を供給できる状態にする。さらに反応後、2 mlチューブ中で4℃、24時間置くことで、適切にホールディングされ、機能活性を持ったGFPタンパク質の割合を増やすことができる。