

DnaK Mix

#PF003-0.5 500 μ L 反応用

(タンパク質合成試薬は添付されていません)

In vitro research use only

開封前保存温度: -80°C

Introduction

1. PUREfrefx[®]について

PUREfrefx[®] は、PURE system を基に開発された再構成型無細胞タンパク質合成キットです。PUREfrefx[®] に、目的のタンパク質をコードする DNA (または mRNA) を添加してインキュベートするだけで、目的タンパク質を合成できます。

PURE system は、東京大学大学院の上田卓也教授のグループにより開発された再構成型無細胞タンパク質合成系で、転写・翻訳・エネルギー再生に必要なタンパク質、リボソームを個別に精製した後、アミノ酸、NTP などと混合した合成系です (Ref. 1, 2)。精製因子を混合した反応液を使用するため、組成を自由に調節できる、タンパク質合成に無関係なタンパク質をほとんど含まないなどの特長があります。

PUREfrefx[®] は、反応液を構成するタンパク質、リボソーム、tRNA の調製方法を改良し、純度を高めた合成反応液です。特に、混入していた大腸菌由来のリポ多糖は、反応液 1 μ L あたり 1 EU 未満にまで低減されています。また、RNase、 β ガラクトシダーゼなどの混入タンパク質も減少しています。

PUREfrefx[®] に含まれる翻訳因子などのすべてのタンパク質には、精製、検出用のタグ配列が追加されていません。そのため、タグ配列を付加したタンパク質を合成し、タグ配列により精製、検出することが可能です。

References) 1. Shimizu *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, p. 751
2. Shimizu *et al.* (2005) *Methods*, vol. 36, p. 299

2. DnaK Mix について

リボソームで合成されたタンパク質が機能を発現するためには、正しい高次構造を形成する必要があります。合成されたタンパク質の高次構造の形成・維持に関与するタンパク質として Hsp70 や Hsp60 などの分子シャペロンが知られています。PUREfrefx[®] は、転写、翻訳反応に必要な因子のみから再構成されており、分子シャペロンは含まれておりません。そのため、合成するタンパク質によっては正しい高次構造形成ができず、不溶性となる場合もあります。このような場合、分子シャペロンを添加して合成することで可溶性となり、機能を発現するタンパク質もあります。

DnaK は大腸菌の Hsp70 で、新生タンパク質の構造形成や、タンパク質の品質管理に関与していることが知られています。DnaK は ATPase であり、DnaJ、GrpE と協調して働きます。DnaJ は、DnaK の ATP 加水分解反応を促進し、タンパク質の疎水領域への結合活性も有しています。GrpE は、DnaK 上の ADP/ATP 交換反応を促進します。

DnaK Mix は、高度に精製した大腸菌由来の DnaK、DnaJ、GrpE を適切な濃度比であらかじめ混合した溶液です。PUREfrefx[®] (#PF001、#PF201、#PF213) や DsbC Set (#PF005) あるいは PDI Set (#PF006) を添加した反応液でのタンパク質合成時に、さらに DnaK Mix を添加することにより、単独では高次構造を形成しにくいタンパク質を活性を有した状態で合成しやすくします。

Kit components

	容量	0.5		
• DnaK Mix (Orange)	25 μ L	x1		
	内容: 100 μ M DnaK, 20 μ M DnaJ, 20 μ M GrpE (30% グリセロール溶液) 開封後保存温度: -80°C ^{*1}			
• Dilution Buffer (Clear)	500 μ L	x1		
	内容: 30% グリセロール溶液 開封後保存温度: -20°C			

開封前の保存温度は、全て-80°Cです。

*1) 使用後に残りの試薬を-80°Cで凍結保存する場合、液体窒素(あるいはドライアイスとエタノールを混合した寒剤)で急速凍結してから保存してください。必要に応じて分注し、凍結融解の繰り返しをできるだけ避けてください。

Protocol

DnaK Mix は、PUREfrefx[®] (#PF001、#PF201、#PF213)、または DsbC Set (#PF005) あるいは PDI Set (#PF006) を添加したタンパク質合成反応で使用できます。例えば、PUREfrefx[®] を用いたタンパク質合成反応を 20 μ L で行う場合、以下のように添加して使用できます。

- Solution I を、室温~37°C で 5 分間ほど温めて完全に溶解し、室温に置きます。
- Solution II、Solution III および DnaK Mix を氷上で融解します。
- 融解した Solution I、II、III、DnaK Mix を軽くボルテックスした後、遠心して内容物をチューブ下部に集めます。
- 以下のように反応液を調製します。(DNA は 1 kbp あたり 0.5-3 ng/ μ L になるように添加してください。)

	#PF001	#PF201
Water	7-X μ L	6-X μ L
Solution I	10 μ L	10 μ L
Solution II	1 μ L	1 μ L
Solution III	1 μ L	2 μ L
DnaK Mix ^{*2}	1 μ L	1 μ L
Template DNA	X μ L	X μ L
Total	20 μ L	20 μ L

	#PF213
Water	6-X μ L
Solution I	8 μ L ^{*3}
Cysteine	1 μ L
GSH	1 μ L
Solution II	1 μ L
Solution III	2 μ L
DnaK Mix ^{*2}	1 μ L
Template DNA	X μ L
Total	20 μ L

- 37°C で 2~4 時間 (#PF001) または 4~6 時間 (#PF201、#PF213) 反応させて、タンパク質を合成します。
- 合成されたタンパク質を、それぞれの目的に使用します。

*2) DnaK Mix の標準的な使用濃度は、5 μ M DnaK, 1 μ M DnaJ, 1 μ M GrpE です。DnaK Mix の必要量は、合成するタンパク質によって異なる場合があります。希釈が必要な場合は、添付の Dilution Buffer で DnaK Mix を希釈して使用してください。

*3) PUREfrefx[®] 1.0 (#PF001)、PUREfrefx[®] 2.0 (#PF201) とは使用量が異なりますので、ご注意ください。

Note

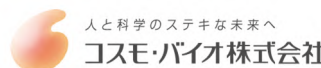
DnaK Mix は研究用試薬です。ヒトを含む動物などへの投与や、臨床、診断などの用途への使用を禁じます。また、食品、家庭用には使用しないでください。

DnaK Mix を使用する際には、RNase フリーの水、試薬、器具類を使用してください。また、手袋、マスクの着用をお勧めします。

PUREfrefx[®] は、ジーンフロンティア株式会社の登録商標 (第 5443077 号) です。商用利用をご希望の場合は、事前に弊社までお問い合わせください。

e-mail: purefrefx@genefrontier.com

Distributor



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL: <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL: (03) 5632-9610 FAX: (03) 5632-9619

TEL: (03) 5632-9620

Manufacturer



GeneFrontier

www.genefrontier.com

ジーンフロンティア株式会社

〒277-0005 千葉県柏市柏 273-1 シャープ柏ビル 4F