

PDI Set

#PF006-0.5 500 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. PUREfrex[®]について

PUREfrex[®] 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。PUREfrex[®] 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。

PUREfrex[®] 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。

PUREfrex[®] 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付加されていません。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. DsbC Set / PDI Set 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。細胞外に分泌されるタンパク質などの中には、正しい高次構造の形成や維持に、ジスルフィド結合が必要なタンパク質があります。

ジスルフィド結合は、近接する 2 つのシステインのスルフヒドリル (SH) 基が酸化されて形成される結合のため、ジスルフィド結合形成には SH 基が酸化されうる環境が必要です。また、正しいシステイン間でのジスルフィド結合形成には、ジスルフィド結合異性化活性を有する酵素が必要な場合もあります。

DsbC Set (#PF005) には、ジスルフィド結合形成が可能な環境にするための酸化剤として酸化型グルタチオン (GSSG)、及びジスルフィド結合イソメラーゼとして大腸菌の DsbC が含まれています。一方、PDI Set (#PF006) には、ヒト由来のジスルフィド結合イソメラーゼ (PDI)、PDI の酸化酵素である Ero1 α 、及び GSSG が含まれています。DsbC Set、または PDI Set を PUREfrex[®] に添加して合成反応を行うことで、正しいジスルフィド結合を形成して活性を有するタンパク質を合成することができます。

反応液に含まれる還元剤によってジスルフィド結合の形成効率が異なるため、ジスルフィド結合含有タンパク質を合成する場合は、還元剤を選択できる PUREfrex[®] 2.1 (#PF213) を使用してください。

Kit components

	容量	0.5		
• GSSG (Green)	25 μ L	x1		
	内容: 酸化型グルタチオン (60 mM) 開封後保存温度: -20°C			
• PDI (Green)	25 μ L	x1		
	内容: 200 μ M PDI (30% グリセロール溶液) 開封後保存温度: -20°C または -80°C ^{*1}			
• Ero1 α (Green)	25 μ L	x1		
	内容: 5 μ M Ero1 α (30% グリセロール溶液) 開封後保存温度: -20°C または -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

PDI Set を添加したタンパク質合成は、任意の反応液量で行うことができます。例えば、PUREfrex[®] 2.1 (#PF213) を使用し、0.5 mM Cysteine、4 mM GSH、1 mM GSSG、10 μ M PDI を添加して、液量 20 μ L で合成する場合、以下のように反応液を調製してください。

GSSG の代わりに Ero1 α を添加して合成することも可能です。その場合は、モル濃度の比が PDI : Ero1 α = 40 : 1 になるように添加してください。例えば、10 μ M PDI の場合は、0.25 μ M Ero1 α になるように添加してください。²

1. Solution I、Cysteine、GSH、GSSG 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。
2. Solution II、Solution III および PDI を氷上で融解します。
3. 融解した Solution I、II、III、Cysteine、GSH、GSSG、PDI 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。
4. GSSG を水で 3 倍に希釈します。
5. 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。)

Water	5-X	μ L
Solution I	8	μ L ^{*3}
Cysteine	1	μ L
GSH	1	μ L
GSSG (3 倍希釈)	1	μ L ^{*4}
Solution II	1	μ L
Solution III	2	μ L
PDI	1	μ L ^{*2}
Template DNA	X	μ L
Total	20	μ L

6. 37°C で 4~6 時間反応させて、タンパク質を合成します。
タンパク質合成反応は 6 時間でほぼ完了しますが、一部のタンパク質では、正しいシステイン残基のペアの間にジスルフィド結合を形成するため、より長いインキュベーション (例: 24 時間) が必要になります。
7. 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) PDI 及び Ero1 α の必要濃度は、合成するタンパク質によって異なります。必要濃度が不明な場合は、PDI の濃度を 1~10 μ M、Ero1 α の濃度を 0.025~0.25 μ M で検討してください。希釈が必要な場合は、添付の Dilution Buffer を使用してください。

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

*4) 使用する還元剤の種類と濃度、合成するタンパク質により、最適濃度が異なります。PUREfrex[®] 2.1 (#PF213) を使用し、還元剤として 4 mM GSH を添加する場合、GSSG の標準的な使用濃度は 1 mM です。GSSG の添加濃度を検討する場合、1-3 mM で検討してください。

Note

PDI Set は研究用試薬です。ヒトを含む動物などへの投与、臨床、診断など他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。

PDI Set 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。

PUREfrex[®] 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: purefrex@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

〒272-0005 千葉県市川市 273-1 シャープ柏ビル 4F