

## #PF002

## 500 µL 反応用

Lot: 2B706F3B0

Expiry Date: May 2012

in vitro research use only

Dec 2011

ジーンフロンティア株式会社  
www.genefrontier.com〒277-0882  
千葉県柏市柏の葉 5-4-19  
東大柏ベンチャープラザ 308

## Note

PUREfreflex™ SS 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。

PUREfreflex™ SS 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。

## Support

製品に関するお問い合わせは、弊社の PUREfreflex™ テクニカルサポートまでお願い致します。

PUREfreflex™ テクニカルサポート

E-mail: purefreflex@genefrontier.com

## Introduction

## 1. PUREfreflex™ について

PUREfreflex™ 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。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)。反応液に、目的のタンパク質をコードする DNA (または mRNA) を添加して反応することにより、タンパク質を合成します。精製した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、翻訳など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。

PUREfreflex™ は、反応液に含まれるタンパク質、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ボ多糖は、反応液 1 µL あたり 10<sup>-1</sup> EU 以下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。さらに、PUREfreflex™ 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、あらゆるタグ配列を付加したタンパク質を合成し、タグにより精製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

## Introduction

## 2. PUREfreflex™ SS の特長

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、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 つのシステイン側鎖のスルフヒドリル (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酸化的な環境が必要です。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、ジスルフィド結合イソメラーゼ活性を有する酵素が必要な場合もあります。

PUREfreflex™ (#PF001) は還元剤のみを含んでいるため、PUREfreflex™ でジスルフィド結合を含むタンパク質を合成した場合、活性が無い場合があります。一方、PUREfreflex™ SS では、PUREfreflex™ に、酸化剤として酸化型グルタチオンを、ジスルフィド結合イソメラーゼとして大腸菌 DsbC を添加して合成できるため、正しいジスルフィド結合を形成したタンパク質を合成することができます。すなわち、ジスルフィド結合が必要なタンパク質を活性を有した状態で合成することが可能です。

## Kit components

開封前の保存温度は、すべて -80°C です

- **Solution I (Blue)<sup>\*1</sup> 250 µL**  
内容: アミノ酸、NTP、tRNA、酵素の基質など  
開封後保存温度: -20°C
- **Solution II (Yellow)<sup>\*1</sup> 25 µL**  
内容: タンパク質 (30% グリセロール溶液)  
開封後保存温度: -20°C または -80°C<sup>\*2</sup>
- **Solution III (Red)<sup>\*1</sup> 25 µL**  
内容: リボソーム (20 µM)  
開封後保存温度: -80°C<sup>\*2</sup>
- **Solution IV (Green) 25 µL**  
内容: 酸化型グルタチオン (60 mM)  
開封後保存温度: -20°C
- **Solution V (Green) 25 µL**  
内容: 大腸菌 DsbC (7.5 mg/mL)  
開封後保存温度: -20°C または -80°C<sup>\*2</sup>
- **Dilution Buffer 500 µL**  
内容: 30% グリセロール溶液  
開封後保存温度: -20°C
- **DHFR DNA<sup>\*1,3</sup> 10 µL**  
内容: 大腸菌 DHFR 遺伝子を含む PCR 産物 (20 ng/µL)  
開封後保存温度: -20°C

## Kit components

<sup>\*1)</sup> それぞれ、PUREfreflex™ (#PF001) に含まれる Solution I、Solution II、Solution III、DHFR DNA と同一組成の溶液です。

<sup>\*2)</sup> 使用後の残りの反応液を -80°C で保存する場合、液体窒素やドライアイス / エタノールなど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。

<sup>\*3)</sup> タンパク質合成の陽性コントロール用として使用する際は、50 µL の合成反応液に、2.5 µL を添加してください。詳細な塩基配列は、弊社の web site に掲載されています。

## Protocol

PUREfreflex™ SS を用い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、50 µL で行う場合、以下のように反応液を調整してください。

1. Solution I、IV を 30°C で 1 分間温めて融解し、氷上に置きます。
2. Solution II、III、V を氷上で融解します。
3. 融解した Solution I、II、III、IV、V 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. 以下のように反応液を調整します。  
(DNA は 1 kbp あたり 0.5-3 ng/µL になるように添加してください。)

Water	15-X µL
Solution I	25 µL
Solution II	2.5 µL
Solution III	2.5 µL
Solution IV	2.5 µL
Solution V <sup>*4</sup>	2.5 µL
Template DNA	X µL
Total	50 µL

## Protocol

5. 37°C で 2~4 時間反応させて、タンパク質を合成します。
6. 合成されたタンパク質を、それぞれの目的に使用します。

<sup>\*4)</sup> 大腸菌 DsbC の必要濃度は、合成するタンパク質によって異なります。希釈が必要な場合は、添付の Dilution Buffer で Solution V を希釈して使用してください。

# Template DNA

## 1. 鋳型 DNA の構造

PUREfrefx™ SS によるタンパク質合成に用いる DNA には、目的タンパク質をコードする遺伝子の上流に、T7 プロモーター配列およびリボソーム結合部位 (SD 配列) が必要です。また、3 種類の終止コドンはすべて使用できます。終止コドンの下流には、10 塩基以上の塩基配列を付加してください。

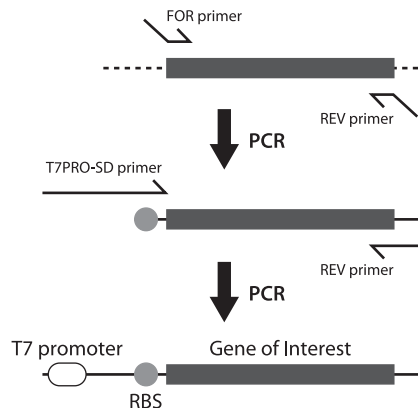
環状 DNA および直鎖 DNA のどちらも鋳型 DNA として使用できます。環状 DNA を使用する場合は、目的遺伝子の下流に T7 ターミネーターが必要です。一方、直鎖 DNA には、PCR 産物、環状 DNA を制限酵素処理した DNA などが含まれます。直鎖 DNA では、終止コドンの下流に T7 ターミネーターの付加は必ずしも必要ではありません。



# Template DNA

## 2. 鋳型 DNA の調製

PCR による PUREfrefx™ SS の鋳型 DNA の調製方法の例を示します。また、使用するプライマーの配列を 3. に示します。1 の構造を有する DNA であれば、他の方法で調製した DNA も、鋳型 DNA として使用できます。



# Template DNA

## 3. プライマーの配列

### FOR primer

5' -AAGGAGATATACCA-ATG-N (10-20) -3'  
RBS

### REV primer

5' -GGATTAGTTATTCA-TTA-N (10-20) -3'  
more than 10 any nucleotides

### T7PRO-SD primer

5' -GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACC  
T7 promoter  
ACAACGGTTTCCTCTAGAAATAATTTTGTTTA  
ACTTTAAGAAGGAGATATACCA-3'  
RBS

# Experimental data

## 実験例 . vtPA および AppA の合成

PUREfrefx™ SS を使用して、裏面に記載の Protocol に従って、vtPA (truncated version of tissue plasminogen activator) \*5、及び AppA (大腸菌酸性フォスファターゼ) \*6 を合成し、合成産物の活性を測定しました。

Dilution Buffer で 4 倍 (0.25x)、16 倍 (0.06x) に希釈した Solution V、及び希釈していない Solution V (1x) を添加した反応液に、vtPA、もしくは AppA の鋳型 DNA を加えて 37°C で 4 時間合成しました。その際、Solution V を添加しない反応液、及び Solution V を 2 倍量添加した反応液 (2x) での合成も行いました。合成後、それぞれの発色基質を用いて合成タンパク質の酵素活性を測定しました。測定結果を、最大の活性を示したサンプルの活性を 100 とした相対値で示します (図 1)。

AppA は、Solution V を添加しなくても約 50% の活性を示しました。一方、vtPA は、Solution V を添加しない場合、全く活性を示しませんでした。

この結果は、合成するタンパク質によって、Solution V (大腸菌 DsbC) に対する依存度が異なることを示しています。

# Experimental data

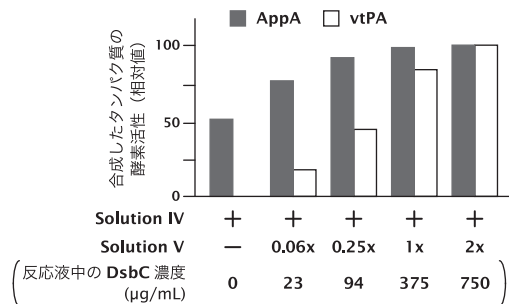


図 1. (実験例)  
PUREfrefx™ SS を用いて合成したタンパク質の酵素活性

\*5)  
vtPA (truncated version of tissue plasminogen activator)  
tPA のプロテアーゼドメインで、ジスルフィド結合が 9 カ所存在します。そのうち、8 カ所は連続していないシステイン間でのジスルフィド結合です。

\*6)  
AppA (大腸菌酸性フォスファターゼ)  
ジスルフィド結合が 5 カ所存在し、そのうち、1 カ所が連続していないシステイン間でのジスルフィド結合です。

# Memo

# Memo

# Memo