Reconstituted cell-free protein synthesis kit

PURE*frex*® 2.0 mini

PF201-0.1

取 扱 説 明 書

Jun 2023_ver.1.2

目次

1．キット情報 1
1-1. PURE*frex*® *2.0 mini* 1
製品情報 1
製品内容物 1
1-2. 本製品について 2
2．PURE*frex*®について 3
2-1. PURE*frex*®とは 3
2-2. PURE system について 3
3．実験ワークフロー 4
4．鋳型 DNA の設計・調製 5
4-1. 鋳型 DNA の概要 5
目的タンパク質をコードする遺伝子の上流について 5
目的タンパク質をコードする遺伝子の終止コドンについて 5
目的タンパク質をコードする遺伝子の下流について 5
4-2. 鋳型 DNA の設計 5
設計のポイント 6
鋳型 DNA 設計のサポート 6
4-3. 2 段階 PCR による鋳型 DNA の調製方法 6
2 段階 PCR で用いるプライマーの配列例 7
1 段階目の PCR 7
2 段階目の PCR 7
4-4. PCR で鋳型 DNA を作製する際の注意点等 8
PCR 産物の純度について 8
PCR 産物の添加量について 8
DNA を溶解する際等の注意点 8
5．タンパク質の合成反応と確認 9
5-1. タンパク質の合成反応 9
用意するもの 9
プロトコル（反応液の調製から合成反応まで） 9
5-2. 合成産物の確認 10
用意するもの（クマシーブリリアントブルー（CBB）で染色する場合） 10
プロトコル（SDS-PAGE 用サンプル調製から CBB による染色まで） 11

5-3. トラブルシューティング 11
ポジティブコントロールの DHFR が合成されない 11
DHFR は合成されるが，目的のタンパク質が合成されない 11
SDS-PAGE の際、反応液にサンプルバッファーを添加すると白濁する 12
6．合成したタンパク質の評価とその後のフロー 13
6-1. 合成したタンパク質の確認後のフロー 13
6-2. 鋳型 DNA 配列の見直し 14
鋳型 DNA 設計のサポート 14
プロリンが連続する配列を含む 14
実験サポート 14
6-3. 合成したタンパク質の可溶性・活性の評価 15
可溶性の評価方法 15
可溶性評価後のフロー 15
6-4. シャペロン添加や合成条件の検討 16
条件検討の目安 16
翻訳のスピードを下げて合成する 16
シャペロンを添加して合成する 16
実験サポート 16
6-5. 合成したタンパク質のジスルフィド結合の評価 17
ジスルフィド結合が形成できる反応液の環境をつくる 17
ジスルフィド結合形成を促進させる添加剤 17
実験サポート 17
7．Appendix 18
7-1. DHFR DNA の配列情報 18
7-2. SDS-PAGE サンプルバッファーの組成 18
7-3. その他の情報 18
8．その他の関連製品とご注文の方法 19
8-1. タンパク質合成反応液 19
8-2. 添加剤 19
9．お問い合わせ 20
DHFR 鋳型 DNA の PCR による作製例 20
用意したもの 20
DNA およびプライマーの配列 20
2 段階 PCR の方法と結果 21

PCR の方法 21
PCR による鋳型 DNA の作製結果 22

DHFR の合成例 23
用意したもの 23
DHFR の合成と合成産物の確認 23
合成の方法 23
DHFR の合成結果 24

His タグ融合タンパク質の精製例（DHFR-6xHis） 25
用意したもの 25
PURE*frex*® を用いたタンパク質合成と精製 25
DHFR-6xHis の合成と精製の方法 25
合成した DHFR-6xHis の精製結果 26

FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を用いた合成産物の確認例（DHFR） 27
用意したもの 27
FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を添加した合成方法と検出 27
合成の方法 27
FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を添加した合成結果 28

分子シャペロンを添加した合成例（ルシフェラーゼ） 29
用意したもの 29
DnaK Mix を添加した Luciferase の合成方法と活性確認 29
合成の方法 29
DnaK Mix を添加した合成結果 30

ジスルフィド結合含有タンパク質の合成例（アルカリフォスファターゼ） 31
用意したもの 31
AP の合成と活性確認 32
AP の合成方法 32
合成した AP の活性測定 32
AP の合成と活性測定の結果 33

イムノグロブリン（IgG, Trastuzumab）の合成例 34
用意したもの 34
IgG の合成と結果 35
IgG の合成方法 35
IgG の合成結果 36

1．キット情報

1-1．PURE*frex*® *2.0 mini*

製品情報

キット開封前は、-80℃で保存してください。

製品番号	製品名称	容量	使用期限
PF201-0.1	PURE*frex*® *2.0 mini*	100 µL 反応分	添付説明書に表示

製品内容物

試薬名	容量	内容	保存温度
Solution I	125 µL	アミノ酸、NTP、tRNA、酵素の基質など	-20℃以下
Solution II	12.5 µL	タンパク質（30%グリセロール溶液）	-20℃以下*
Solution III	25 µL	リボソーム（20 µM）	-80℃*
DHFR DNA	10 µL	タンパク質合成の陽性コントロール用鋳型 DNA (20 ng/µL) 大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子を含む	-20℃以下
T7PRO-SD primer	5 µL	鋳型 DNA の 5'UTR に必須の T7 プロモーターと SD 配列を含む全タンパク質共通のプライマー	-20℃以下
RNase-Free Water	500 µL	RNase フリーの水	-20℃以下

*-80℃での保存方法：使用後の残りの Solution II、III を-80℃で凍結保存する場合、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保存してください。また、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。

1-2. 本製品について

PURE*frex*®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。国内法規制（化学物質排出把握管理促進法、労働安全衛生法、毒物及び劇物取締法）に該当する物質は含まれていません。

本製品は、国立大学法人東京大学より、特許第 4931135 号の使用許諾を得た製品です。PURE*frex* 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

2．PURE*frex*®について

2-1．PURE*frex*®とは

本キットは、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システム（PURE system）を基に、PURE*frex*®として製品化したものです。キットに含まれる試薬は 3 種類に分かれており、Solution I にはアミノ酸、NTP などの低分子化合物のほか、tRNA が含まれています。Solution II には、転写酵素、翻訳因子などのタンパク質が含まれ、Solution III には精製リボソームが含まれています。各構成成分は、タンパク質合成活性が最も高くなる濃度で再構成されています。Solution I、II、III を混合し、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。

PURE*frex*®では、最初に報告された PURE system（参考文献 1）と比較して、反応液を構成するタンパク質、リボソーム、tRNA の調製方法が改良されています。その結果、タンパク質合成に無関係な物質の混入が抑えられています。例えば、大腸菌由来のリポ多糖の混入は、反応液 1 μL あたり 0.1 EU 程度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、PURE*frex*®に含まれる翻訳因子などのすべてのタンパク質は、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、付加したタグにより精製・検出することが可能です。

2-2．PURE system について

PURE system は、東京大学大学院新領域創成科学研究科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す（参考文献 1、2）。大腸菌で翻訳反応に関与する開始因子（IF1、IF2、IF3）、伸長因子（EF-Tu、EF-Ts、EF-G）、終結（解離）因子（RF1、RF2、RF3）、リボソーム再生因子（RRF）、20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素（ARS）、メチオニル tRNA フォルミル基転移酵素と、転写反応に必要な T7 RNA ポリメラーゼ、エネルギー再生に必要な 4 種類の酵素タンパク質を個別に精製した後、アミノ酸、NTP、tRNA、精製リボソームなどと混合して再構成した新規の無細胞タンパク質合成系です。ほかの無細胞タンパク質合成系のように細胞抽出液を使用せず、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、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すぐれた特長を有しています。

＜参考文献＞　1. Shimizu Y. et al. (2001) Nat. Biotechnol., vol. 19, p. 751

2. Shimizu Y. et al. (2005) Methods, vol. 36, p. 299

3．実験ワークフロー

タンパク質合成は、PURE*frex*® *2.0 mini* の Solution I、II、III を混合した反応液に、鋳型 DNA を添加し、転写・翻訳反応を同時に行います。

PURE*frex*®を用いて機能的なタンパク質を合成する一般的な手順は、はじめに、PURE*frex*®での合成に適した鋳型 DNA をお客様ご自身で作製し、目的のタンパク質が合成されるかどうかを確認することから始めます。合成されたタンパク質が、SDS-PAGE 上で確認できる量になるまで、鋳型 DNA の塩基配列の検討を行います。

つぎに、合成が確認できた後に、可溶性や活性の有無を確認していきます。

PURE*frex*® *2.0 mini* には、図 1 のフローの「2-1．合成したタンパク質の確認」までを行うために必要な試薬が含まれています。

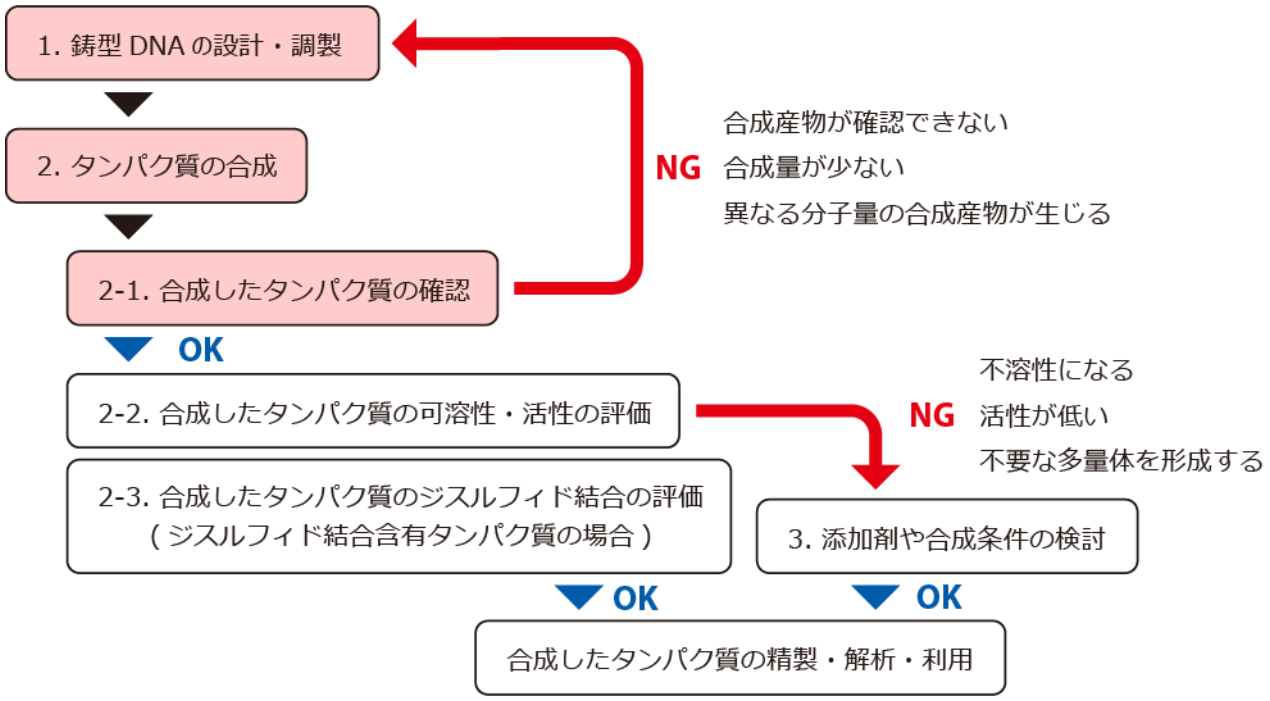


図 1. PURE*frex*®を用いたタンパク質合成のワークフロー

4．鋳型 DNA の設計・調製

4-1．鋳型 DNA の概要

PURE*frex*® *2.0 mini* 用の鋳型 DNA は、下記に記載する配列が最低限必要になります。この最低限必要な配列を含む DNA であれば、環状 DNA、直鎖 DNA および mRNA のいずれも使用できますが、本書では、PCR 産物を用いた直鎖状 DNA について解説します。

目的タンパク質をコードする遺伝子の上流について

鋳型 DNA には、目的タンパク質をコードする遺伝子の上流に、T7 プロモーター配列とリボソーム結合配列（SD 配列）が最低限必要です（図 2）。

図 2. 鋳型 DNA の基本構造

目的タンパク質をコードする遺伝子の終止コドンについて

PURE*frex*® *2.0 mini* に含まれる翻訳終結因子（解離因子）は、3 種類存在する終止コドン（UAA（オーカー）、UAG（アンバー）、UGA（オパール））の全てに対応しているため、いずれの終止コドンも使用できます。

目的タンパク質をコードする遺伝子の下流について

直鎖 DNA を使用する場合、終止コドンの下流に 10 塩基以上の塩基を付加してください。付加する塩基配列の例は、「2 段階 PCR で用いるプライマーの配列例（7 ページ）」をご参照ください。直鎖 DNA の場合は、終止コドンの下流に T7 ターミネーター配列は必ずしも必要ではありません。

4-2．鋳型 DNA の設計

鋳型 DNA の設計は、PURE*frex*®でのタンパク質合成にとって、とても重要な工程になります。
その設計を行う際には、いくつかのポイントがあります。「鋳型 DNA 設計のサポート（p.6）」もご利用ください。

設計のポイント

鋳型 DNA の配列を設計する場合に、重要なポイントが 3 つあります。

目的タンパク質をコードする領域の配列について

- 大腸菌のコドン使用頻度に基づいたコドンを使用する
- フレームシフトを生じる配列（X/XXY/YYZ）を除く

目的タンパク質をコードする遺伝子の N 末端について

- AT リッチコドンを使用する
- 開始メチオニン直後のプロリンやグリシンはできるだけ避ける

目的タンパク質をコードする遺伝子の上流（5' UTR）について

- SD 配列（リボソーム結合配列）を含む
- SD 配列上流の AT リッチ配列を 15 塩基以上含む

鋳型 DNA 設計のサポート

目的タンパク質のアミノ酸配列を下記のフォームでお送り頂ければ、PURE*frex*® *2.0 mini* に付属の T7PRO-SD primer の配列との相性や、コドンの最適化等、重要なポイントを考慮した遺伝子配列の候補をお返しします。

アミノ酸配列入力フォーム

4-3. 2 段階 PCR による鋳型 DNA の調製方法

PURE*frex*® *2.0 mini* に付属の T7PRO-SD primer を用いた 2 段階 PCR による鋳型 DNA 調製方法を解説します。

鋳型 DNA の調製に用いる PCR 酵素は、正確性の高い酵素（KOD（TOYOBO）、PrimeSTAR (TAKARA-BIO）、Pfu（Promega）など）を使用してください。2 段階 PCR を用いた鋳型 DNA の調製の概略を図 3 に示します。

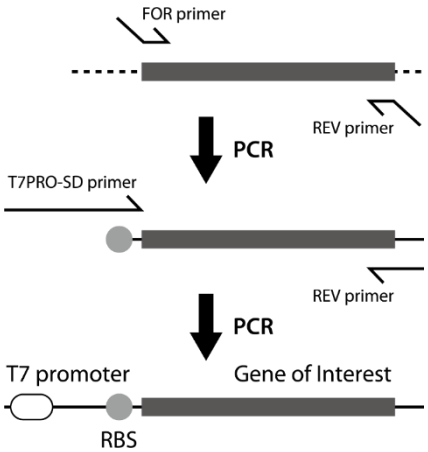


図 3. 2 段階 PCR の概略

2 段階 PCR で用いるプライマーの配列例

1 段階目の PCR で使用する FOR primer と REV primer は、お客様ご自身でご用意ください。

各種プライマーの配列

下記サイトのテキスト情報もご利用ください。 https://www.genefrontier.com/solutions/dhfr_dna/

Primer	Sequence
FOR primer	5′-AAGGAGATATACCA-ATG-N(10-20)-3′ RBS
REV primer	5′-GGATTAGTTATTCA-TTA-N(10-20)-3′ 10 塩基以上の任意の配列
T7PRO-SD primer	5′-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCT T7 promoter CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA-3′ RBS

表 1. 各種プライマーの配列

FOR primer

目的タンパク質をコードする遺伝子の開始メチオニンの上流に、T7PRO-SD primer（キットに付属）配列が含まれるように設計します。例えば、リボソーム結合部位（RBS（SD 配列））以降を含んだ配列の例を表 1 に示しています。

REV primer

目的タンパク質をコードする遺伝子の終止コドンに、10 塩基以上の配列が追加されるように設計します。この配列は任意ですが、一例を表 1 に示しています。

1 段階目の PCR

お客様ご自身でご用意頂いた FOR primer と REV primer を用いて、目的タンパク質をコードする遺伝子の上流に位置するリボソーム結合部位（RBS（SD 配列））から終止コドン+10 塩基以上の配列を含む断片を増幅します。1 段階目の PCR でも副産物がほとんど検出されないように PCR 条件を調整します。

2 段階目の PCR

1 段階目の PCR で得られた PCR 産物から、PURE*frex*® *2.0 mini* に付属の T7PRO-SD primer とお客様ご自身でご用意頂いた REV primer を用いて、目的タンパク質をコードする遺伝子の上流に T7 プロモーター配列と RBS を含む PCR 断片を増幅します。

4-4. PCR で鋳型 DNA を作製する際の注意点等

PCR 産物の純度について

PCR 後の電気泳動で目的産物以外にバンドが見られる場合は、PCR 条件を検討して副産物の生成を抑えてください。副産物からもタンパク質が合成されることがあり、PCR で得られるバンドの純度がタンパク質の合成効率に影響します。

PCR 条件を変更しても副産物が生じる場合は、目的のバンドをゲルから切り出して精製してください。ゲルから切り出す際には、DNA の損傷（転写反応が阻害されます）を防ぐために紫外線は照射しないでください。ブルーライトは使用可能ですが、できるだけ照射時間を短くしてください。

PCR 産物の添加量について

PURE*frex*®の反応液に添加する鋳型 DNA 量は、分子数（モル濃度）が基準となっており、最終濃度が 2 nM 前後となるように添加してください。1 kbp あたり 0.5～3 ng/μL 反応液が目安となります。

未精製の PCR 反応液を PURE*frex*®に添加して反応することも可能ですが、PCR 反応液からの塩などの持ち込みを抑えるため、添加量は PURE*frex*®の反応液量の 1/10 以下にしてください。転写・翻訳反応とも、PCR 反応液からの持ち込みによる塩濃度の変化などによって活性が低下します。

PCR 産物量が不足している場合は、未精製の PCR 反応液の添加量を増やすことは避け、DNA 精製キットなどを用いて十分な濃度になるように DNA 溶液を調製してください。

DNA を溶解する際等の注意点

TE バッファーに含まれる EDTA は、転写・翻訳反応に必須なマグネシウムイオンをキレートするため、タンパク質合成反応を阻害してタンパク質合成量を下げることがあります。DNA を溶解する際には、EDTA を含まないバッファーやミリ Q 水などを使用することをおすすめします。また、RNase が混入すると、合成反応液中の転写産物などの RNA が分解されるため、PURE*frex*®を使用する際には、ヌクレアーゼフリーの水、試薬、器具類を使用し、手袋やマスクの着用をおすすめします。

5．タンパク質の合成反応と確認

PURE*frex*® *2.0 mini* の Solution I、II、III を混合した反応液に、作製した鋳型 DNA を添加し、37℃で 2～6 時間反応させます。

RNase の混入は、転写産物や tRNA などの RNA の分解が起こり、タンパク質が合成されない、あるいは合成量が著しく低下する原因となります。そのため、使用するチューブやチップ等は RNase フリーのものを使用し、作業は手袋を着用して行ってください。

初めて合成する際は、鋳型 DNA を添加しない反応（陰性コントロール）や、本キットに添付されている DHFR DNA を添加した反応（陽性コントロール）を同時に行うことをおすすめします。

5-1．タンパク質の合成反応

用意するもの

PURE*frex*® *2.0 mini*

鋳型 DNA（目的タンパク質の遺伝子と必須配列を含んだもの）

37℃のヒートブロック又はウォーターバス

プロトコル（反応液の調製から合成反応まで）

1. **Solution I を、室温～37℃で 1 分間ほど温めて完全に（白濁がみられる場合には白濁がなくなるまで）融解した後、氷上に置きます。**
   - ■ 氷上に置いて再び白濁した場合には、室温に置いて速やかに使用し、残りの試薬は、-20℃以下で保存してください。
2. **Solution II と Solution III を氷上で融解します。**
3. **融解した Solution I、II および III をボルテックスやタッピングなどで均一にした後、遠心して内容物をチューブ下部に集めます。**
4. **20 µL の反応液量で合成する場合、以下のように反応液を調製します。**

RNase-Free Water	7-X µL	（キットの付属品）
Solution I	10 µL	（キットの付属品）
Solution II	1 µL	（キットの付属品）
Solution III	2 µL	（キットの付属品）
鋳型 DNA（PCR 産物）	X µL	（1 kbp 当たり 0.5～3 ng/µL）
Total	20 µL	

■ 鋳型 DNA の添加量は、使用する DNA の種類や濃度に応じて調整してください。詳しくは、「4-4. PCR で鋳型 DNA を作製する際の注意点等」（8 ページ）を参照してください。

■ 合成反応液の液量は自由に調整でき、数 μL からの反応が可能です。

5. 37℃のヒートブロック又はウォーターバスで 2～6 時間反応させて、タンパク質を合成します。

■ 気相の恒温槽（培養用恒温器など）で反応させると、反応液の温度の上昇に時間がかかり、合成量が低くなります。

■ 合成温度や合成時間は、合成するタンパク質に合わせて適宜変更してください。

6. 合成されたタンパク質を SDS-PAGE で確認します。

弊社 Web サイトで
動画がご覧いただけます。

5-2. 合成産物の確認

合成後の反応液をそのまま SDS-PAGE で解析することで、目的タンパク質が合成されたかどうかを確認します。鋳型 DNA を含まない反応液のレーンと、鋳型 DNA を添加した反応液のレーンを比較し、合成したタンパク質の予想分子量付近にバンドがあるかどうかを確認します。

以下に、CBB 染色で確認する方法の一例を示します。SDS-PAGE に供する反応液量やゲル濃度は、目的タンパク質の分子量や合成量、ゲルの染色方法などに応じて調整してください。

用意するもの（クマシーブリリアントブルー（CBB）で染色する場合）

合成反応終了後の PURE*frex*® *2.0 mini* の反応液

3x Sample Buffer（組成は7．Appendix（p.18）を参照してください。）

水

95℃のヒートブロック又はウォーターバス

SDS-PAGE ゲル

分子量マーカー

CBB 染色液

プロトコル（SDS-PAGE 用サンプル調製から CBB による染色まで）

1. **合成後の反応液に等量の水を加えます。**

   ■ 合成反応液の塩濃度が比較的高いため、反応液を希釈せずに Sample Buffer を添加して加熱すると、白色の析出が生じる場合があります。適宜、水などで希釈してから添加してください。

2. **水で希釈した反応液に、反応液と等量の 3x Sample buffer を加えます。**
3. **95℃で 5 分間加熱します。**
4. **SDS-PAGE ゲルに 3 µL/ウェルずつアプライして、分子量マーカーとともに泳動します。**

   ■ 合成反応液に換算すると、1 µL/ウェルになります。

   ■ 広い分子量範囲を確認する場合は、10-20%グラジエントゲルのご使用をおすすめします。

5. **泳動が終了したゲルを CBB 染色し、目的タンパク質のバンドを確認します。**

   ■ 陽性コントロールの DHFR のバンドは 18 kDa 付近に確認されます。

5-3. トラブルシューティング

ポジティブコントロールの DHFR が合成されない

PURE*frex*®の反応液は、反応チューブを直接加温できるヒートブロック又はウォーターバスで反応させてください。気相の恒温槽（培養用恒温器など）で反応すると、反応液の温度の上昇に時間がかかり、合成量が低くなります。

キットの構成成分が失活している可能性があります。失活を防ぐために、キットは適切な温度で保存してください。また、キットの溶液を小分けにして保存するなどして、凍結融解の繰り返しをできるだけ避けてください。

DHFR は合成されるが，目的のタンパク質が合成されない

鋳型 DNA に最低限必要な配列が含まれていない

PURE*frex*®で使用する鋳型 DNA には、T7 プロモーター、リボソーム結合部位（SD 配列）、開始コドン、終止コドンが必要です。

反応液への DNA 添加量が多い、あるいは少ない

プラスミドや PCR 産物に関わらず、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。添加量が多い場合もタンパク質の合成量が下がる場合があります。

PURE*frex*®反応液に添加する DNA は、分子数(モル濃度)が基準となっているため、例えば、反応液に添加する DNA がプラスミド(環状 DNA)で、その長さが 6 kbp の場合、実際の ORF の長さに関係なく、(0.5～3)×6=3～18 ng/μL となります。

鋳型 DNA の調製方法が適切ではない

T7 プロモーターと SD 配列が含まれている大腸菌の発現用ベクターでも、開始メチオニン直後に Gly-Ser-Ser の配列があるものがあります。このような場合、タンパク質の合成量が低下することがありますので、PURE*frex*® *2.0 mini* に付属の T 7 PRO-SD primer とお客様ご自身でご用意頂いた FOR primer および REV primer を用いて、PCR で鋳型 DNA を作成することをお試しください。

鋳型 DNA の配列に合成されにくい配列が含まれている

鋳型 DNA の配列に関する注意点をまとめたサイトがありますので、こちらもご確認ください。
https://www.genefrontier.com/solutions/purefrex/technology/template-dna/

SDS-PAGE の際、反応液にサンプルバッファーを添加すると白濁する

PURE*frex*®反応液は、比較的塩濃度が高いため、反応液に直接 SDS を含むサンプルバッファーを添加して加熱すると白濁する場合があります。白濁を避けるためには、合成後の反応液を等量以上の水で希釈した後に、サンプルバッファーを添加してください。白濁が解消されない場合は、低めの温度（37℃など）で長め（1 時間程度）の加熱処理を行ってください。

6．合成したタンパク質の評価とその後のフロー

PURE*frex*® *2.0 mini* で合成されたタンパク質が、SDS-PAGE 上で推定される分子量付近にあることと、その合成量を確認します。

PURE*frex*®で合成可能な最大量は、キットに含まれている因子（図 4 の青矢印）と同じくらいになります。合成するタンパク質と染色剤の種類により、染まり方は異なりますが、合成量の目安にしてください。

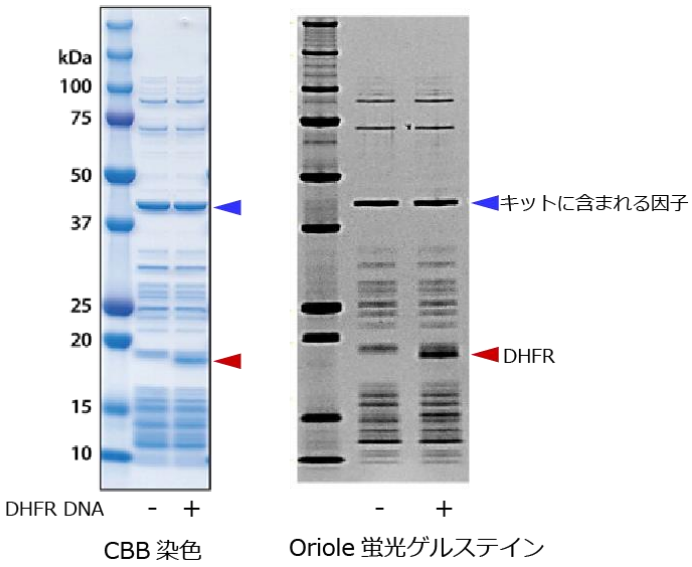
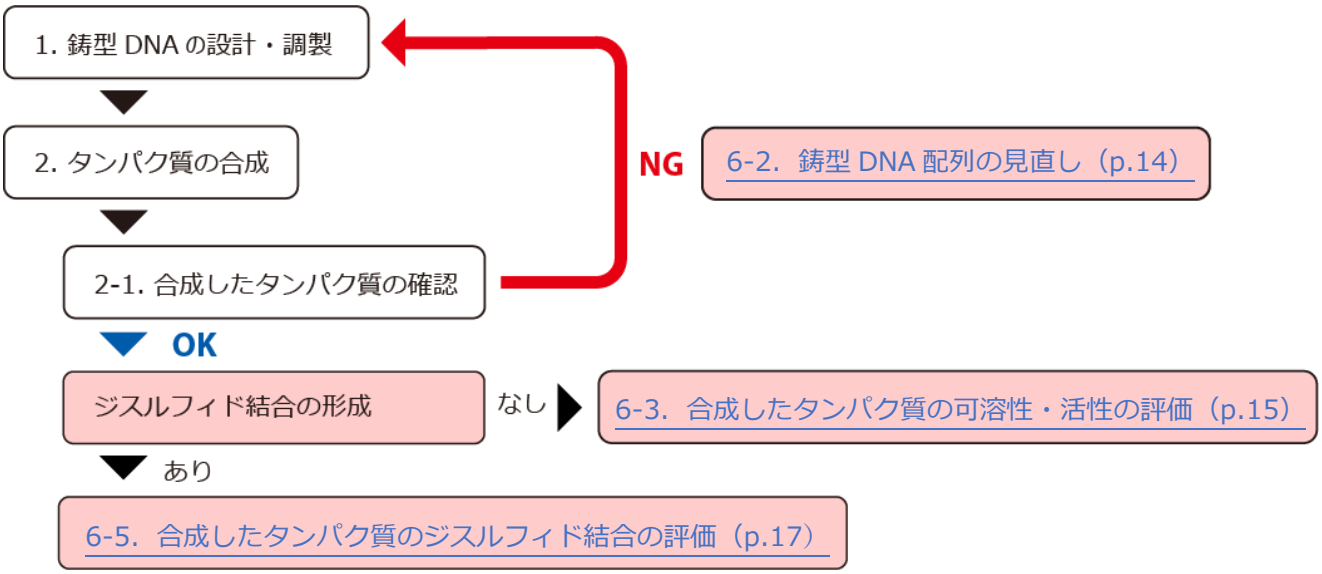


図 4. PURE*frex*®を用いた DHFR の合成結果

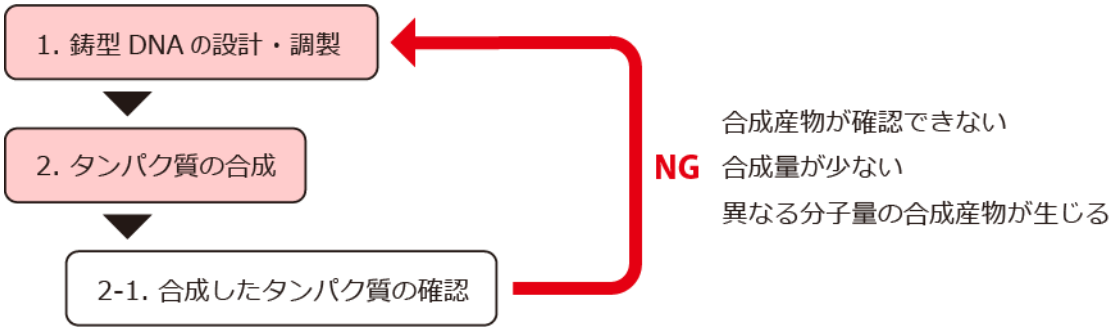
6-1. 合成したタンパク質の確認後のフロー

合成したタンパク質の量が少ない場合には、鋳型 DNA 配列の見直しを行います。
SDS-PAGE 上で合成したタンパク質が確認できた場合には、「ジスルフィド結合形成の有無」に応じて次のステップに進みます。



6-2. 鋳型 DNA 配列の見直し

十分な量のタンパク質の合成が確認できなった場合、再度、遺伝子配列の見直しを行います。



鋳型 DNA 設計のサポート

目的タンパク質のアミノ酸配列を下記のフォームでお送り頂ければ、PURE*frex*® *2.0 mini* に付属の T7PRO-SD primer の配列との相性や、コドンの最適化等、重要なポイントを考慮した遺伝子配列の候補をお返しします。

アミノ酸配列入力フォーム

プロリンが連続する配列を含む

連続したプロリンを含むタンパク質の場合、合成量が低いことがあります。このような連続したプロリンを含むタンパク質の合成に、EF-P と呼ばれる翻訳因子が効果を示すことがあります。PURE*frex*® *2.0 mini* には、EF-P が含まれていないため、添加剤として販売している EF-P（#PFS052-0.5）もお試しください。

下記のサイトよりダウンロード頂けるポスターに、PURE*frex*® *2.0* に EF-P を添加した効果を示しています。

https://www.genefrontier.com/files/p21_MBSJ2018.pdf

製品 EF-P

実験サポート

目的のタンパク質が合成できない、あるいは合成量が上がらないなど、どんなことでもご相談ください。

お気軽にお問い合わせください

6-3. 合成したタンパク質の可溶性・活性の評価

目的のタンパク質の合成が確認できたら、その可溶性を評価します。

可溶性の評価方法

用意するもの

合成反応終了後の PURE*frex*®の反応液

微量高速冷却遠心機

3x Sample Buffer（組成は7． Appendix (p.18)を参照してください。）

水

95℃のヒートブロック又はウォーターバス

SDS-PAGE ゲル

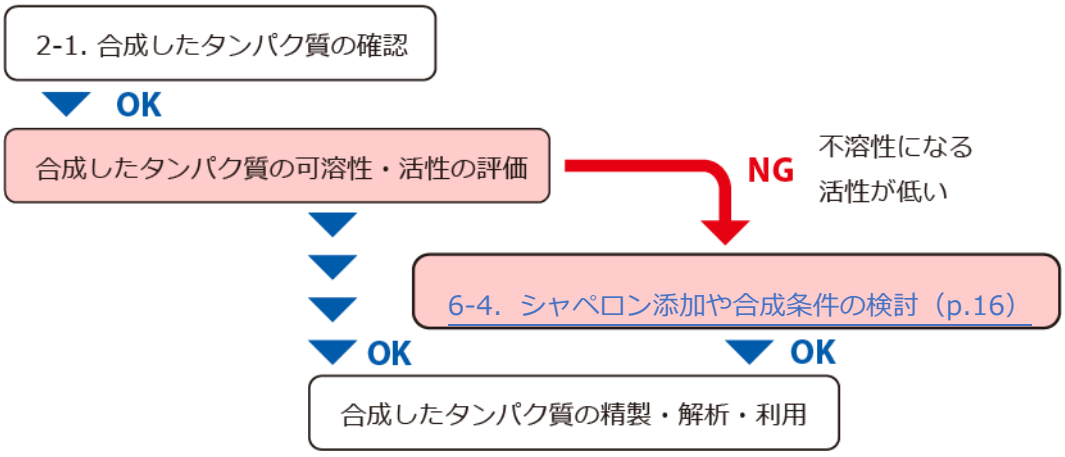
分子量マーカー

プロトコル（可溶性の確認）

1. **合成後の反応液に等量の水を加えます。**
2. **水を加えた反応液から適量をサンプリングします。→「Total」**
3. **20,000xg（1.5 mL チューブ 24 本架けローターの場合、約 15,000 rpm）、4℃で 30 分間遠心します。**
4. **遠心後の上清から適量をサンプリングします。→「Sup」**
5. **Total、Sup のサンプルを SDS-PAGE で解析します。**

可溶性評価後のフロー

合成したタンパク質の可溶性や活性を確認し、不溶性になっていたり、活性が低いなどの結果がみられた場合には、シャペロンの添加で可溶化したり、合成条件を検討し、活性があがる条件を検討します。



6-4. シャペロン添加や合成条件の検討

合成したタンパク質が不溶化している場合には、合成する温度やシャペロンを添加して、可溶性になる条件を検討します。合成したタンパク質の活性を得るために必要な因子（補酵素や金属イオンなど）が足りないことがあります。PURE*frex*®には、転写・翻訳反応以外に必要な低分子は含まれていないため、活性に必要な因子があれば、追加で添加してください。

条件検討の目安

ある条件下で、合成したタンパク質がすべて可溶性になることはほとんどありません。そのため、条件検討は、可溶化したタンパク質が多く存在する条件を探していきます。

翻訳のスピードを下げて合成する

一般に、翻訳速度に比べてフォールディングの速度は遅い場合が多いため、合成温度を37℃から30℃や25℃に下げて翻訳速度を遅くすると、目的産物の可溶性の割合が増大する場合があります。

一方で、転写・翻訳反応の最適な温度は37℃であるため、転写・翻訳の活性が下がり、結果として合成されるタンパク質の量自体が少なくなります。そのため、可溶性タンパク質が効率よく得られる条件を検討してください。

また、PURE*frex*® *2.0* よりも、合成量が少ない PURE*frex*® *1.0* を用いて合成した方が良い結果が得られることがあります。

製品 PURE*frex*® 1.0

シャペロンを添加して合成する

PURE*frex*® *2.0 mini* には、分子シャペロンが含まれていません。分子シャペロンは、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おり、DnaK（大腸菌の Hsp70）や、GroEL（大腸菌の Hsp60）をタンパク質合成の際に添加すると可溶化が促進されることが多いです。タンパク質により効果のあるシャペロンは異なりますが、はじめは DnaK をお試し頂くことをおすすめします。

シャペロンは、タンパク質合成用の反応液に直接添加して合成することができます。

製品 DnaK Mix　製品 GroE Mix

実験サポート

実験の方法についてなど、どんなことでもご相談ください。

お気軽にお問い合わせください

6-5. 合成したタンパク質のジスルフィド結合の評価

細胞外に分泌されるタンパク質など、タンパク質の種類によっては、正しい高次構造の形成や維持に、ジスルフィド結合（SS 結合またはジスルフィド架橋とも呼ばれる）が必要な場合があります。

ジスルフィド結合が形成できる反応液の環境をつくる

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 SH 基が酸化されやすい環境が必要です。

PURE*frex*® *2.0 mini* には、予め還元剤として還元型グルタチオン（GSH）が入っているために、ジスルフィド結合を形成する酸化されやすい環境にはなりません。しかし、目的のタンパク質が合成できるかどうかや、合成量の確認はこの環境下で行うことができます。

PURE*frex*® *2.0 mini* で合成を確認した後、ジスルフィド結合の形成を評価するためには、酸化還元の環境をコントロールできる別のタンパク質合成用キットが必要になります。キットを構成する因子類は、PURE*frex*® *2.0 mini* と同じですが、還元剤がバッファーから除かれた状態になっています。

製品 PURE*frex*® 2.1

ジスルフィド結合形成を促進させる添加剤

酸化還元の環境をコントロールするには、還元型と酸化型のグルタチオンの量比を調整します。

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（ジスルフィド結合イソメラーゼ）が必要な場合もあります。

このような酸化型グルタチオンと、由来の異なるジスルフィド結合イソメラーゼを含む添加剤をそれぞれご用意していますが、はじめは DsbC Set をお試し頂くことをおすすめします。

製品 DsbC Set　製品 PDI Set

実験サポート

実験の方法に関することなど、どんなことでもご相談ください。

お気軽にお問い合わせください

7． Appendix

7-1. DHFR DNA の配列情報

下記のサイトから、テキスト配列がご利用になれます。

https://www.genefrontier.com/solutions/dhfr_dna/

7-2. SDS-PAGE サンプルバッファーの組成

3x サンプルバッファー（10 mL 分）

1M Tris-HCl (pH6.8)	1.5 mL
Glycerol	3 mL
SDS	0.6 g
2-Mercaptoethanol	0.6 mL
Bromophenol Blue	適量

(H_2O で 10 mL にメスアップ)

7-3. その他の情報

PURE*frex*® と PURE system を用いた論文がご覧になれます。

https://www.genefrontier.com/publications/purefrex/

様々なタンパク質を合成した事例を紹介しています。

https://www.genefrontier.com/cases/purefrex/

弊社が国内外の学会などで発表したポスターをダウンロードできます。

https://www.genefrontier.com/downloads/purefrex-poster/

8．その他の関連製品とご注文の方法

お見積およびご注文に関するお問い合わせは、コスモ・バイオ(株)様までお願いいたします。

8-1．タンパク質合成反応液

タンパク質の使用用途に合わせてお選びください

翻訳スピードを下げたい、基礎研究用			
PURE*frex*® *1.0*	PF001-0.25	1 kit (250 µL 反応用)	15,000 円
	PF001-2ML	1 kit (2 mL 反応用)	105,000 円
	PF001-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	440,000 円
合成量重視			
PURE*frex*® *2.0*	PF201-0.25	1 kit (250 µL 反応用)	24,000 円
	PF201-2ML	1 kit (2 mL 反応用)	160,000 円
	PF201-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	700,000 円
合成量重視にしつつ、ジスルフィド結合が大事			
PURE*frex*® *2.1*	PF213-0.25	1 kit (250 µL 反応用)	24,000 円
	PF213-2ML	1 kit (2 mL 反応用)	160,000 円
	PF213-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	700,000 円

8-2．添加剤

合成確認後、つぎのステップに合わせてお選びください

高次構造形成、可溶性向上			
DnaK Mix	PF003-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	18,000 円
	PF003-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	290,000 円
GroE Mix	PF004-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	18,000 円
	PF004-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	290,000 円
ジスルフィド結合形成を促進			
DsbC Set	PF005-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	10,000 円
	PF005-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	160,000 円
PDI Set	PF006-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	10,000 円
	PF006-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	160,000 円
プロリンが連続する配列をもつタンパク質合成に			
EF-P	PFS052-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	5,000 円
	PFS052-10ML	1 kit (5x 2 mL 反応用)	80,000 円

９．お問い合わせ

PURE*frex*®に関するご質問は、こちらのフォームよりお問い合わせください。

https://www.genefrontier.com/contact/purefrex/

GeneFrontier

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 4階
TEL: 04-7137-6301　　FAX：04-7132-7530
URL: www.genefrontier.com

Reconstituted cell-free protein synthesis kit

PURE*frex*®

実 施 例

May 2023_ver.2

DHFR 鋳型 DNA の PCR による作製例

DHFR（PURE*frex*®に陽性コントロールとして鋳型 DNA が付属）について、PCR を用いた鋳型 DNA の調製の方法と結果を示します。PCR で使用する酵素や DNA 精製キットは、他メーカーの製品でも問題ありません。ただし、PCR 酵素は、増幅時の正確性が高い酵素を使用してください。

用意したもの

DHFR 遺伝子 DNA（DHFR の ORF を含む DNA）

プライマー（DHFR-F、DHFR-R3、T7PRO-SD Primer）

水

PCR 試薬（KOD-Plus-Neo（TOYOBO）など）

サーマルサイクラー

PCR 産物精製キット（NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up（MACHEREY-NAGEL）など）

6x アガロースゲル用サンプルバッファー

アガロースゲル（1%）

UV ゲルイメージャー

DNA およびプライマーの配列

DHFR 遺伝子

ATGATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATCGCGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTGGAACCTGCCTGCC
GATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCGT
CCGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGGGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCGGTG
GATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGATTGGCGGCGGTCGCGTTTATGAACAGTTCTTG
CCAAAAGCGCAAAAACTGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCG
GATGACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTGCTTTGAGATTCTG
GAGCGGCGGTAA

FOR Primer（DHFR-F）

AAGGAGATATACCAATGATCAGTCTGATTG

REV Primer（DHFR-R3）

GGATTAGTTATTCATTACCGCCGCTCCAGAAT

T7PRO-SD Primer

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACCA

2 段階 PCR の方法と結果

PCR の方法

1. **DHFR 遺伝子 DNA およびプライマーを、それぞれ 1 ng/μL、2 μM に水で希釈した。**
2. **酵素を除く PCR 試薬を室温で融解した。**
3. **以下のように PCR 反応液を調製した。**

水	3.5 μL
10x buffer	1 μL
2 mM dNTPs	1 μL
25 mM $MgSO_4$	0.6 μL
2 μM Primer (DHFR-F)	1.5 μL
2 μM Primer (DHFR-R3)	1.5 μL
DMSO	0.2 μL
Enzyme (KOD Plus Neo)	0.2 μL
1 ng/μL DHFR 遺伝子	0.5 μL
Total	10 μL

4. **以下の条件で PCR 反応を行った。（1 段階目）**

94℃	2 min.	
94℃	15 sec.	x 30 cycles
58℃	30 sec.	x 30 cycles
68℃	1 min.	x 30 cycles
68℃	2 min.	
10℃		

5. **PCR 反応液（1 μL）を 1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅産物を確認した。**
6. **PCR 産物精製キット（NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up（MACHEREY-NAGEL））を用いて PCR 産物を精製した。カラムからの溶出は 20 μL の水で行った。**
7. **6.で精製した PCR 産物（PCR-1 Product）を水で 50 倍希釈した。**
8. **以下のように PCR 反応液を調製した。**

水	3.5 µL
10x buffer	1 µL
2 mM dNTPs	1 µL
25 mM $MgSO_4$	0.6 µL
2 µM Primer (T7PRO-SD)	1.5 µL
2 µM Primer (DHFR-R3)	1.5 µL
DMSO	0.2 µL
Enzyme (KOD Plus Neo)	0.2 µL
50 倍希釈した PCR-1 Product	0.5 µL
Total	10 µL

9.　1 段階目と同様の条件で PCR 反応を行った。（2 段階目）

10.　PCR 反応液（1 µL）を 1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅産物を確認した。

11.　PCR 産物精製キット（NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up（MACHEREY-NAGEL））を用いて PCR 産物を精製した。カラムからの溶出は 20 µL の水で行った。

12.　260 nm の吸光度を測定して DNA 濃度を計算し、20 ng/µL に調整した。

PCR による鋳型 DNA の作製結果

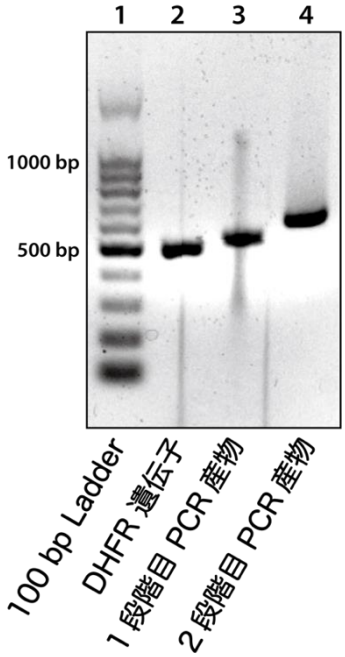


図 5. PURE*frex*®で使用する DHFR 合成用の鋳型 DNA の作製

DHFR の合成例

DHFR DNA（PURE*frex*®に付属の鋳型 DNA 陽性コントロール）を用いて、PURE*frex*®を用いたタンパク質合成の方法と結果を示します。DHFR DNA は PCR で作製しています。

用意したもの

DHFR DNA（PURE*frex*® *2.0* に付属）

PURE*frex*® *2.0*

ヌクレアーゼフリーの水

ヒートブロック又はウォーターバス（37℃および 95℃）

3x Sample Buffer（SDS-PAGE 用）

SDS-PAGE ゲル（10-20%）

分子量マーカー

CBB 染色液

DHFR の合成と合成産物の確認

合成の方法

1. **Solution I を室温で 1 分間ほど温めて完全に融解した。**
2. **Solution II と Solution III を氷上で融解した。**
3. **融解した Solution I、II および III をボルテックスで均一にした後、遠心して内容物をチューブ下部に集めた。**
4. **以下のように反応液を調製した。**

	(+) DNA	(-) DNA
ヌクレアーゼフリーの水	3 µL	3.5 µL
Solution I	5 µL	5 µL
Solution II	0.5 µL	0.5 µL
Solution III	1 µL	1 µL
DHFR DNA (20 ng/µL)	0.5 µL	0 µL
Total	10 µL	10 µL

5. **37℃のヒートブロックで 2 時間反応させて、タンパク質を合成した。**
6. **合成反応液に 10 µL の水と 10 µL の 3x Sample Buffer を加えた。**
7. **95℃で 5 分間加熱した。**
8. **10-20%のグラジエントゲルに、3 µL（合成反応液 1 µL 分）をアプライして泳動した。**

9.　泳動後、ゲルを CBB で染色し、合成産物を確認した。

DHFR の合成結果

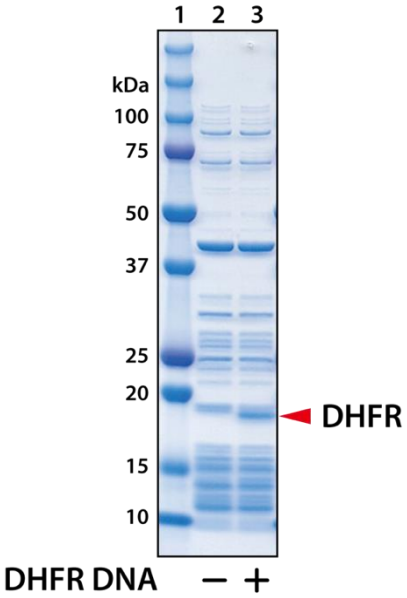


図 6. PURE*frex*®を用いた DHFR の合成結果

His タグ融合タンパク質の精製例（DHFR-6xHis）

PURE*frex*®反応液内のタンパク質合成に関与するタンパク質は、His タグを付加されていないため、目的タンパク質を His タグ融合タンパク質として合成し、Ni アフィニティ樹脂で精製することができます。以下に、C 末端に His タグを融合した DHFR を合成し、Ni アフィニティ樹脂で精製した結果を示します。

用意したもの

PURE*frex*® *2.0*

鋳型 DNA（DHFR-6xHis DNA）

ヌクレアーゼフリーの水

ヒートブロック又はウォーターバス（37℃および 95℃）

Ni-Sepharose 6 FF (Cytiva)

Binding Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 20 mM $Mg(OAc)_2$

Wash Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole

Elution Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole

微量高速冷却遠心機

3x Sample Buffer（SDS-PAGE 用）

SDS-PAGE ゲル（10-20%）

分子量マーカー

CBB 染色液

PURE*frex*®を用いたタンパク質合成と精製

DHFR-6xHis の合成と精製の方法

1. **「DHFR の合成例（p.23）」と同様に合成反応液の調製（反応液量：25 µL）を行った。**
2. **37℃で 4 時間反応させた。**
3. **合成反応液から 5 µL を抜き取った。（→ Syn）**
4. **残りの合成反応液（20 µL）に 80 µL の Binding Buffer を加えて希釈した。**
   - Mg イオンを含まないバッファーで希釈した場合、リボソームが不安定化して、溶出画分にリボソームタンパク質が混入してきます。合成産物を精製する際は、Mg イオンを含むバッファーで合成反応液を希釈してください。

5. 希釈した反応液に、Binding Buffer で平衡化した 10 µL の Ni-Sepharose 6 FF を添加し、4℃で 1 時間インキュベートした。

■ PURE*frex*®で合成した His タグ融合タンパク質は、Ni アフィニティ樹脂に結合しにくい傾向があるため、多めの樹脂を使用してください。

6. 短時間（5 秒程度）遠心し、樹脂を沈殿させて上清を回収した。（→ FT）
7. 樹脂を、50 µL の Binding Buffer で 2 回洗浄した。（→ W1、W2）
8. 樹脂を、50 µL の Wash Buffer で 3 回洗浄した。（→ W3、W4、W5）
9. 樹脂に、50 µL の Elution Buffer を加えて DHFR-6xHis を溶出した。（→ E1、E2、E3）
10. 10-20%のグラジエントゲルを用いて、SDS-PAGE を行った。
（Syn/FT/W1/W2：合成反応液 1 µL 分、W3-5/E1-3：合成反応液 4 µL 分を泳動した。）
11. 泳動後、ゲルを CBB で染色し、合成産物を確認した。

合成した DHFR-6xHis の精製結果

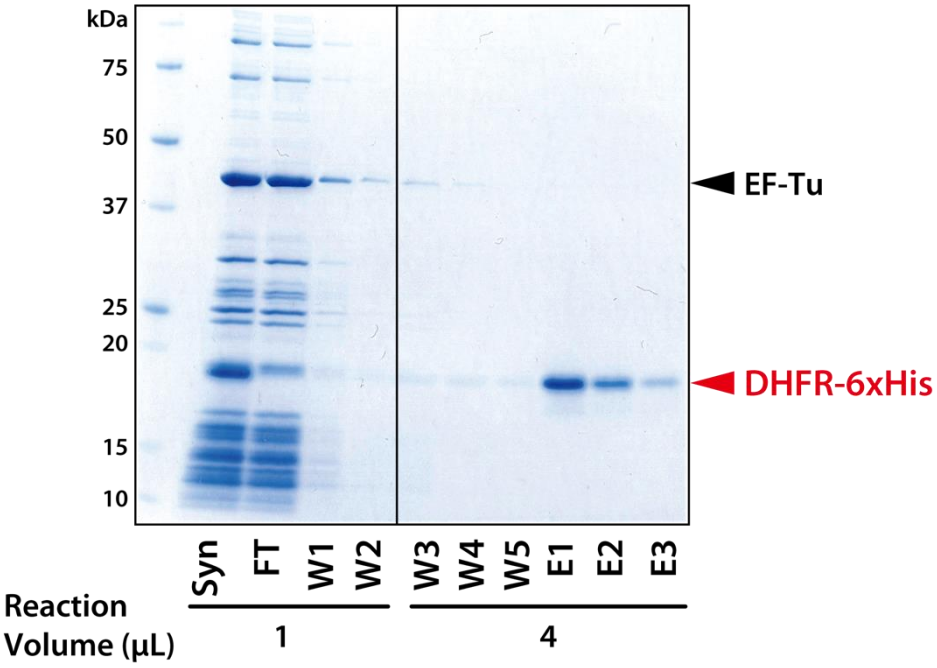


図 7. PURE*frex*®で合成した DHFR-6xHis の簡易精製

FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を用いた合成産物の確認例（DHFR）

合成産物を SDS-PAGE で確認する方法としては、上述した CBB による染色のほかに下記のような方法があります。

・CBB の代わりに蛍光染色剤でゲルを染色し、タンパク質のバンドを蛍光イメージャーで検出する。

・目的タンパク質に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングで検出する。

（FLAG タグや His タグを付加して合成し、タグに対する抗体を使用することも可能）

・^{35}S で標識されたメチオニンを添加して合成し、放射線標識されたバンドを検出する。

・FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を添加して合成し、蛍光標識されたバンドを検出する。

以下に、FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を使用した合成例を示します。

FluoroTect™ Green$_{Lys}$（Promega）は、合成するタンパク質のリジン残基の部位に、蛍光標識（BODIPY®）されたリジンを導入することが可能な試薬です。SDS-PAGE 後、蛍光イメージャーで蛍光標識されたバンドを検出することで、簡便に目的タンパク質の合成を確認することができます。

用意したもの

DHFR DNA（PURE*frex*® *2.0* に付属）

PURE*frex*® *2.0*

ヌクレアーゼフリーの水

37℃のヒートブロック又はウォーターバス

FluoroTect™ Green$_{Lys}$ in vitro Translation Labeling System（Promega）

1 mg/mL RNase A

SDS-PAGE ゲル（10-20%）

3x Sample Buffer

分子量マーカー

蛍光ゲルイメージャー

Oriole™染色液（Bio-Rad）

FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を添加した合成方法と検出

合成の方法

1. 「DHFR の合成例（p.23）」と同様に合成反応液の調製を行った。その際、10 µL の反応液あたり 0.5 µL の FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を最後に添加した。
2. 37℃で 1 時間反応させた。
3. 反応液に、1 µL の 1 mg/mL RNase A を加え、37℃でさらに 15 分間反応させた。

■ 未反応の FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を分解します。

4. 反応液に等量の水と 3x Sample buffer を加えて 95℃で 5 分間加熱した。
5. SDS-PAGE ゲルに 3 µL（合成反応液 1 µL 分）ずつアプライして泳動した。
6. 泳動後、ゲルをゲル板に入れたまま、蛍光ゲルイメージャーで、蛍光標識された DHFR タンパク質のバンドを確認した。
7. 蛍光標識バンドの確認後、ゲルを Oriole™染色し、反応液内の全タンパク質を確認した。

FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を添加した合成結果

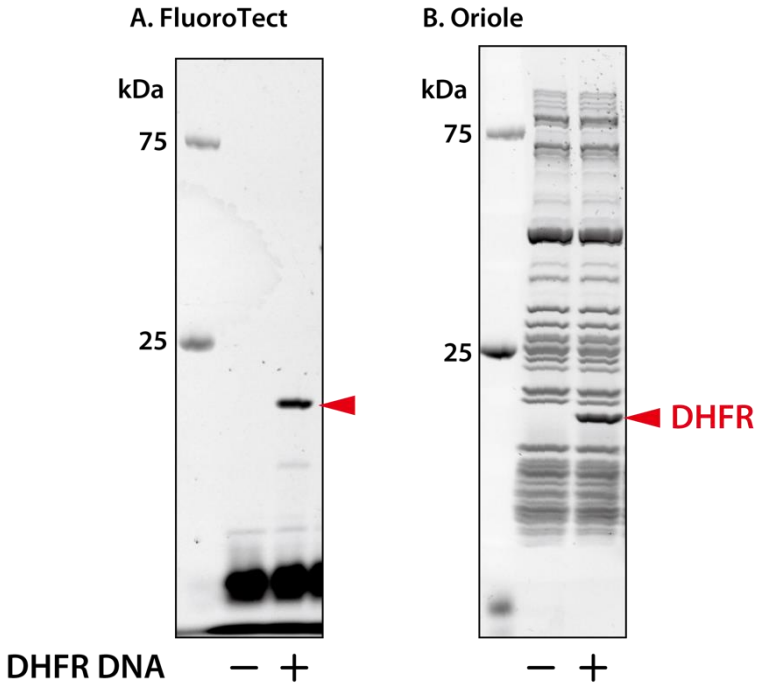


図 8. FluoroTect™ Green$_{Lys}$ を添加して合成した DHFR

A. FluoroTect™ Green$_{Lys}$ の蛍光（BODIPY®由来）を検出した結果

B. Oriole™で反応液内の全タンパク質を染色した結果

分子シャペロンを添加した合成例（ルシフェラーゼ）

合成するタンパク質によっては、合成後の正しい立体構造形成に分子シャペロンを必要とする場合があります。PURE*frex*® *2.0 mini* には、分子シャペロンが含まれていません。必要な場合には、DnaK Mix（#PF003-0.5）や GroE Mix（#PF004-0.5）を添加して合成してください。その他の分子シャペロンを添加して合成することも可能です。タンパク質によって適切な分子シャペロンは異なりますので、条件検討を行ってください。

以下に、DnaK Mix を添加した合成例を示します。
ルシフェラーゼは、凝集しやすく失活しやすいタンパク質です。実際に、PURE*frex*®で合成する際に DnaK Mix を添加して合成した場合の方が活性が高くなり、DnaK Mix の添加効果が確認されました。

用意したもの

鋳型 DNA（Luciferase DNA）

PURE*frex*® *2.0*

DnaK Mix（#PF003-0.5）

ヌクレアーゼフリーの水

30℃のヒートブロック又はウォーターバス

Luciferase Assay System（Promega）

ルミノメーター

DnaK Mix を添加した Luciferase の合成方法と活性確認

合成の方法

1.　以下のように合成反応液を調製した。液量は全て（μL）。

Sample no.	1	2
ヌクレアーゼフリーの水	3	2.5
Solution I	5	5
Solution II	0.5	0.5
Solution III	1	1
DnaK Mix	0	0.5
Luciferase DNA (40 ng/μL)	0.5	0.5
Total	10	10

2.　30℃のヒートブロックで 4 時間反応させて、タンパク質を合成した。

3. 1 μL の合成反応液を、水で 30 倍希釈した。
4. 1 μL の希釈した反応液を 20 μL のルミノアッセイ溶液に添加してボルテックスで混合した。
5. ルミノメーターで発光を測定した。

DnaK Mix を添加した合成結果

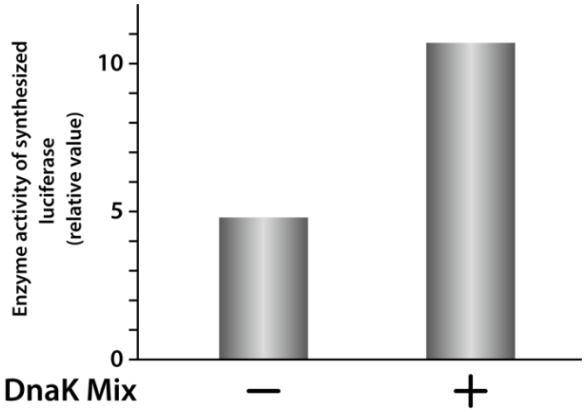


図 9. DnaK Mix の添加効果

ジスルフィド結合含有タンパク質の合成例（アルカリフォスファターゼ）

PURE*frex*® *2.0mini* は、還元剤として還元型グルタチオン（GSH）を予め含んでおり、ジスルフィド結合が形成されにくい環境になっています。そのため、ジスルフィド結合の形成が必要なタンパク質を合成する場合、別売のジスルフィド結合形成を促進する添加剤と一緒に合成する必要があります。添加剤には、酸化型グルタチオン（GSSG）溶液、およびジスルフィド結合イソメラーゼが含まれています。

また、反応液に添加する還元剤を変更したい場合は、PURE*frex*® *2.1*（#PF213-0.25）を使用してください。PURE*frex*® *2.1* では、還元剤として、DTT もしくは還元型グルタチオン（GSH）を選択可能です。

以下に、PURE*frex*® *2.1* を使用した大腸菌アルカリフォスファターゼ（AP）の合成例を示します。AP は、酵素活性に必要な 2 本のジスルフィド結合が分子内で形成されます。GSSG を添加して合成した場合、非還元条件下での SDS-PAGE で、還元条件での泳動と比較して合成産物の移動度が変化しており、分子内ジスルフィド結合が形成されたことが推測されます。また、還元剤として GSH を使用した場合は、GSSG を添加していない場合も移動度が変化しました。非還元条件での泳動で合成産物の移動度が変化した場合では、AP 活性も確認でき、活性を有した AP が合成できていることが示されました。

用意したもの

PURE*frex*® *2.1*（#PF213-0.25）

DsbC Set（#PF005-0.5）

鋳型 DNA（AP DNA）

ヌクレアーゼフリーの水

ヒートブロック又はウォーターバス（37℃および 95℃）

3x Sample Buffer（還元剤を含むもの、還元剤を含まないもの）

SDS-PAGE ゲル（10-20%）

分子量マーカー

Oriole™染色液（Bio-Rad）

蛍光ゲルイメージャー

Phosphatase Substrate Kit（Thermo Scientific）

96-well プレート

プレートリーダー

AP の合成と活性確認

AP の合成方法

1. **PURE*frex*® *2.1* を用い、以下のように反応液を調製した。液量は全て（μL）。**

Sample no.	1	2	3	4	5	6
ヌクレアーゼフリーの水	2.5	1.5	1.5	2.5	1.5	1.5
Solution I	4	4	4	4	4	4
3 mM Cysteine	1	1	1	1	1	1
40 mM DTT	0.5	0.5	0.5	0	0	0
80 mM GSH	0	0	0	0.5	0.5	0.5
20 mM GSSG	0	1	0	0	1	0
40 mM GSSG	0	0	1	0	0	1
Solution II	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solution III	1	1	1	1	1	1
AP DNA (20 ng/μL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Total	10	10	10	10	10	10

2. **37℃のヒートブロックで 4 時間反応させて、タンパク質を合成した。**
3. **2 μL の合成反応液に 10 μL の水と 6 μL の 3x Sample Buffer（還元剤あり）、もしくは（還元剤なし）を加え、95℃で 5 分間加熱した。**
4. **10-20%のグラジエントゲルに 4.5 μL（合成反応液 0.5 μL 分）をアプライして泳動した。**
5. **泳動後、ゲルを Oriole™で染色し、合成産物を確認した。**

合成した AP の活性測定

1. **合成産物を含む PURE*frex*®反応液を、水で 20 倍希釈した。**
2. **PNPP タブレットを溶かしたアッセイ溶液を、100 μL ずつ 96-well プレートに分注し、37℃で加温した。**
3. **2 μL の希釈した合成反応液をアッセイ溶液に添加した。**
4. **37℃で 405 nm の吸光度変化を測定した。**
5. **吸光度変化の傾きから、AP の活性を計算した。**

AP の合成と活性測定の結果

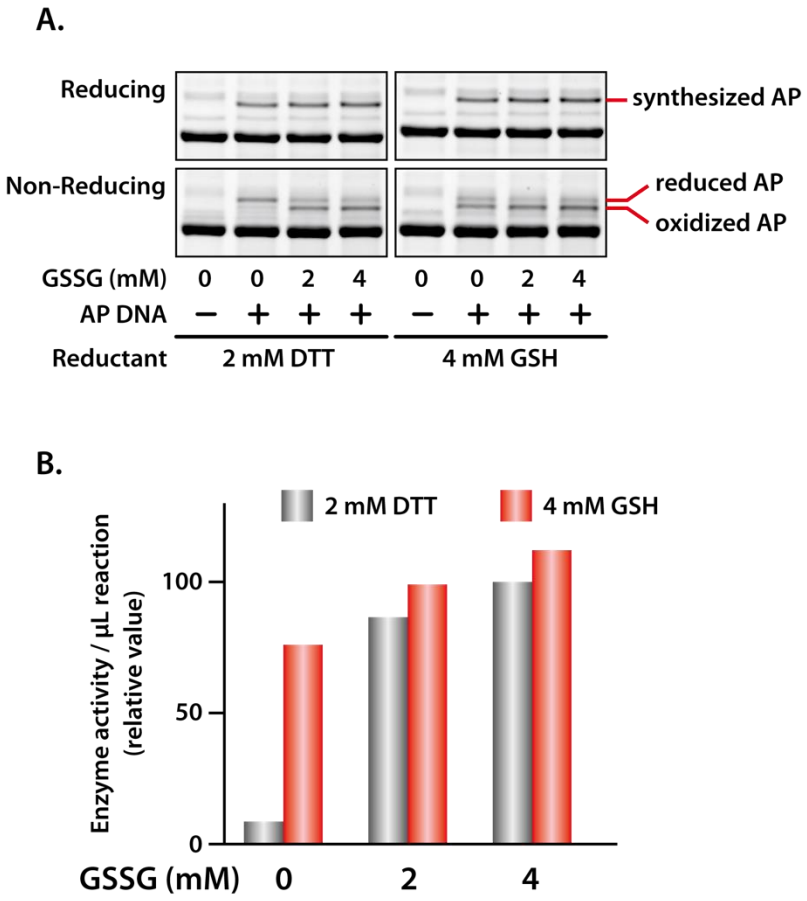


図 10. AP の合成

A. 還元条件および非還元条件での SDS-PAGE

B. 合成した AP の活性。2 mM DTT/4 mM GSSG 存在下で合成したサンプルの活性を 100 とした値で示す。

イムノグロブリン（IgG, Trastuzumab）の合成例

反応液に添加する還元剤を変更したい場合は、PURE*frex*® *2.1*（#PF213-0.25）を使用してください。正しいシステイン間でのジスルフィド結合形成には、還元剤と酸化剤の量比の調整に加えて、ジスルフィド結合異性化活性を有する酵素（ジスルフィド結合イソメラーゼ）が必要な場合もあります。ジスルフィド結合の形成が必要なタンパク質を合成する場合には、別売の DsbC Set（#PF005-0.5）または PDI Set（#PF006-0.5）を添加してください。

以下に、PURE*frex*® *2.1* を使用した糖鎖なしの IgG の合成例を示します。IgG は、2 つの重鎖（HC）と 2 つの軽鎖（LC）から構成される、巨大で複雑な Y 字型ヘテロ四量体タンパク質です。ジスルフィド結合の数はサブクラスによって異なり、IgG_1 の場合、その立体構造の形成と活性に 16 本のジスルフィド結合（分子間: 4 本）が必要です。PURE*frex*®による IgG の合成には、以下の追加因子と反応条件が必要です: 1）ジスルフィド結合イソメラーゼ DsbC または PDI の添加、2）GSH/GSSG 比の調整、3）分子シャペロン DnaK およびその補因子の添加、4）インキュベーション時間の延長（28 時間）。合成温度と鋳型 DNA のモル比 (HC:LC) は、目的の IgG に合わせて最適化する必要があります。初めて IgG を合成する場合の一般的な条件として、30°C および HC DNA:LC DNA=1:1 をお勧めします。

<参考文献> Murakami S. et al. (2019) Sci Rep., vol 9, p. 671 (https://www.nature.com/articles/s41598-018-36691-8)

用意したもの

PURE*frex*® *2.1*（#PF213-0.25）

DnaK Mix（#PF003-0.5）

DsbC Set（#PF005-0.5）

PDI Set（#PF006-0.5）

混合した鋳型 DNA（Trastuzumab DNA, 100 nM, HC DNA:LC DNA のモル比= 4:1）

ヌクレアーゼフリーの水

ヒートブロック又はウォーターバス（37℃および 95℃）

3x Sample Buffer（還元剤を含まないもの）

SDS-PAGE ゲル（10%）

分子量マーカー

Oriole™染色液（Bio-Rad）

蛍光ゲルイメージャー

IgG の合成と結果

IgG の合成方法

1. **PURE*frex*® *2.1* を用い、以下のように反応液を調製した。液量は全て（μL）。**

Sample no.	1	2	3	4	5	6	7	8
ヌクレアーゼフリーの水	4.0	3.0	3.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0
Solution I	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
10 mM Cysteine	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
80 mM GSH	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
60 mM GSSG	**0**	**1.0**	**0**	**1.0**	**0**	**1.0**	**0**	**0**
Solution II	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Solution III	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
DnaK Mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
200 μM DsbC	**0**	**0**	**1.0**	**1.0**	**0**	**0**	**0**	**0**
200 μM PDI	**0**	**0**	**0**	**0**	**1.0**	**1.0**	**1.0**	**1.0**
2.5 μM Ero1α	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1.0**	**0**
5 μM Ero1α	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1.0**
Template DNA (100 nM)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Total	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0

2. **37℃のヒートブロックで 28 時間反応させて、タンパク質を合成した。**
3. **2 μL の合成反応液に 10 μL の水と 6 μL の 3x Sample Buffer（還元剤なし）を加え、95℃で 5 分間加熱した。**
4. **10-20%のグラジエントゲルに 4.5 μL（合成反応液 0.5 μL 分）をアプライして泳動した。**
5. **泳動後、ゲルを Oriole™で染色し、合成産物を確認した。**

IgG の合成結果

A.

Organism	humanized monoclonal antibody (IgG1 kappa)
Synthesized region	Heavy chain (HC): 1Gln – 451Lys (+FLAG) Light chain (LC): 1Asp – 214Cys
Length	HC: 462 a.a. / LC: 215 a.a.
Molecular weight	HC: 50,618 Da / LC: 23,573 Da
No. of disulfide bonds	16 (intermolecular: 4)

B.

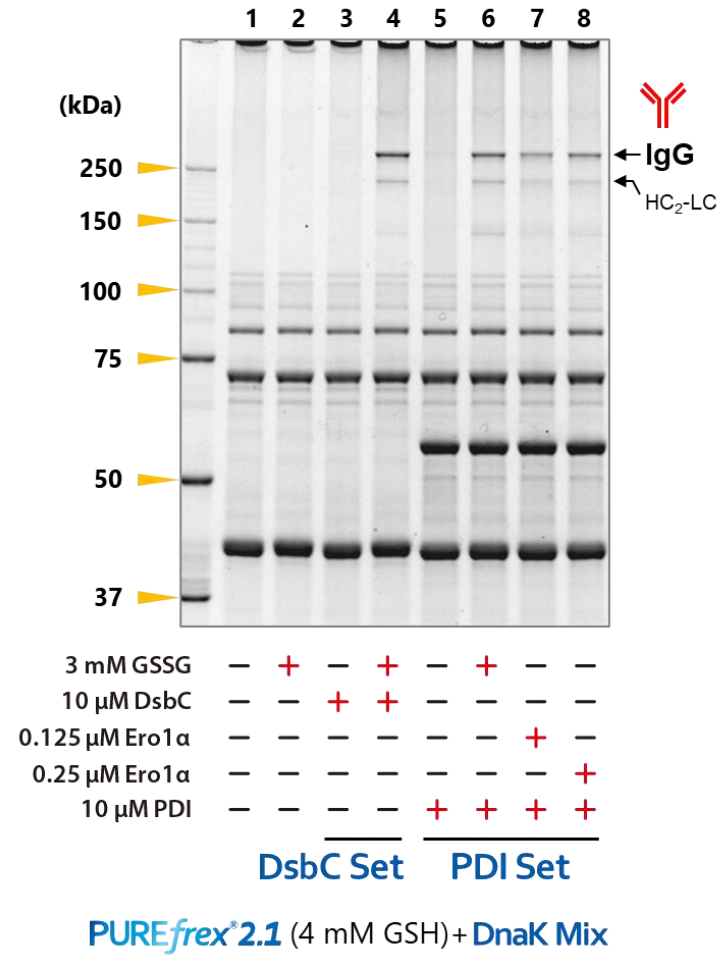


図 11. IgG synthesis

A. 合成した IgG の情報

B. 非還元条件での SDS-PAGE (10% gel)