

#PF213-0.25

250 µL 反応用

in vitro research use only

開封前保存温度：-80

May 2023

 ジーンフロンティア株式会社 〒277-0005
 千葉県柏市柏 273-1
 www.genefrontier.com シャープビル4F

Kit components

- Solution I*1** **100 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*2** **12.5 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*3
- Solution III*4** **25 µL**
 内容：リボソーム (20 µM)
 開封後保存温度：-80°C*3
- Cysteine*1** **20 µL**
 内容：システイン (10 mM)
 開封後保存温度：-20°C
- DTT*1** **20 µL**
 内容：ジチオスレイトール (40 mM)
 開封後保存温度：-20°C
- GSH*1** **20 µL**
 内容：還元型グルタチオン (80 mM)
 開封後保存温度：-20°C
- DHFR DNA*4,5** **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

Introduction

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。PUREfreflex® 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。

PUREfreflex® 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 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。

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、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

Kit components

開封前の保存温度は、すべて -80°C です。

*1) PUREfreflex® 2.1 の Solution I には、システイン、還元剤が含まれていません。タンパク質合成時に、必要に応じて添付のシステイン、還元剤を添加してください。

Cysteine の標準的な使用濃度は、0.5 mM です。還元剤として、添付の DTT もしくは GSH を使用する場合の標準的な使用濃度は、それぞれ 2、4 mM ですが、合成するタンパク質により、最適濃度が異なる可能性があります。また、2-メルカプトエタノールなどの他の還元剤も使用できます。

*2) PUREfreflex® 2.0 (#PF201) に添付されている Solution II と同一組成の溶液です。

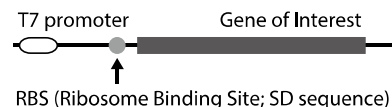
*3) 使用後の残りの反応液を -80°C で凍結保存する場合、液体窒素やドライアイス/エタノールなどで急速凍結してから保存してください。また、必要に応じて分注し、凍結融解の繰り返しをできるだけ避けてください。

*4) PUREfreflex® 1.0 (#PF001)、PUREfreflex® 2.0 (#PF201) に添付されている Solution III、DHFR DNA とそれぞれ同一組成の溶液です。

*5) 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、20 µL の合成反応液に 1 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。

Template DNA

1. 鋳型 DNA の構造



PUREfreflex® によるタンパク質合成に使用する鋳型 DNA には、目的タンパク質をコードする遺伝子の開始コドンの上流に、T7 プロモーター配列およびリボソーム結合部位 (SD 配列) が含まれている必要があります。また、終止コドンの下流には、10 塩基以上の任意の塩基配列を付加してください。

PUREfreflex® では、3 種類の終止コドンすべてを使用できます。

環状 DNA (プラスミド DNA など)、および直鎖状 DNA (PCR 産物や環状 DNA を制限酵素で切断した DNA など) 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、目的遺伝子の終止コドンの下流に T7 ターミネーターが必要です。一方、直鎖状 DNA では、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。

Protocol

PUREfreflex® 2.1 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、液量 20 µL で、0.5 mM システイン、4 mM GSH を添加して合成する場合は以下のよう反応液を調整してください。

- Solution I, Cysteine, GSH を、室温~37°C で 1 分間ほど温めて完全に融解し、氷上に置きます。
- Solution II, Solution III を氷上で融解します。
- 融解した Solution I, II, III, Cysteine, GSH を軽くボルテックスした後、速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 | 7-X µL |
| Solution I | 8 µL *6) |
| Cysteine | 1 µL |
| GSH | 1 µL |
| Solution II | 1 µL |
| Solution III | 2 µL |
| Template DNA | X µL |
| Total | 20 µL |

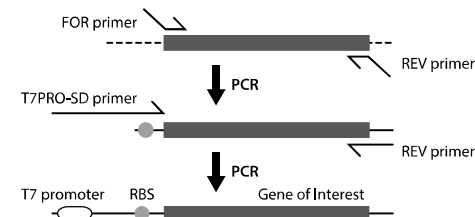
- 37°C で 2~6 時間反応させて、タンパク質を合成します。
- 合成されたタンパク質を、それぞれの目的に使用します。

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

Template DNA

2. 鋳型 DNA の調製法の例

PCR を用いた PUREfreflex® の鋳型 DNA の調製方法の例を示します。



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' -GAAATTAATACGACTCACATATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC
T7 promoter
TCTAGAAAATAATTTTGTTAACCTTAACAAGGAGATATACCA-3'
RBS

Note

PUREfreflex® 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® 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。

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。PUREfreflex® 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: purefreflex@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