

*Reconstituted cell-free protein synthesis kit*

# **PURE***frex*<sup>®</sup> **2.1**

**PF213-0.25**

**PF213-2ML**

**PF213-10ML**

**PF213-50ML**

**取扱説明書**

**Mar 2025**

## 目次

キット情報 .....	1
PUREflex® 2.1 .....	1
製品情報 .....	1
製品内容物 .....	1
分注方法 .....	2
本製品について .....	2
PUREflex® について .....	3
PUREflex® とは .....	3
PURE system について .....	3
実験ワークフロー .....	4
1. 鋳型 DNA の作製 .....	5
使用する鋳型 DNA について .....	5
PCR 産物を鋳型 DNA として使用する場合 .....	6
プラスミドを鋳型 DNA として使用する場合 .....	8
RNA を鋳型として使用する場合 .....	8
鋳型 DNA の配列に関する注意点 .....	9
鋳型 DNA 設計のサポート .....	11
2. タンパク質の合成反応 .....	12
2-1. 合成産物の確認 .....	13
2-2. 可溶性の評価 .....	14
2-3. ジスルフィド結合形成の評価 .....	15
3. 添加剤の検討 .....	16
PUREflex® を用いた合成例 .....	17
1. DHFR の合成 .....	17
用意したもの .....	17
DNA およびプライマーの配列 .....	18
PCR による鋳型 DNA の作製方法 .....	18
PCR による鋳型 DNA の作製結果 .....	20
PUREflex® 2.1 を用いたタンパク質合成と合成産物の確認 .....	20
DHFR の合成結果 .....	21
2. His タグ融合タンパク質の精製 (DHFR-6xHis) .....	22
用意したもの .....	22
PUREflex® を用いたタンパク質合成と合成産物の確認 .....	22

合成した DHFR-6xHis の精製結果 .....	23
3. FluoroTect™ Green <sub>Lys</sub> を用いた合成産物の確認 (DHFR) .....	24
用意したもの .....	24
FluoroTect™ Green <sub>Lys</sub> を添加した合成 .....	24
FluoroTect™ Green <sub>Lys</sub> を添加した合成結果 .....	25
4. ジスルフィド結合含有タンパク質の合成 (アルカリフォスファターゼ) .....	26
用意したもの .....	26
AP の合成 .....	27
合成した AP の活性測定 .....	27
AP の合成結果 .....	28
5. イムノグロブリン (IgG, Trastuzumab) の合成 .....	29
用意したもの .....	29
IgG の合成 .....	30
IgG の合成結果 .....	31
<u>トラブルシューティング .....</u>	<u>32</u>
ポジティブコントロールの DHFR が合成されない .....	32
DHFR は合成されるが、目的のタンパク質が合成されない .....	32
鋳型 DNA に最低限必要な配列が含まれていない .....	32
反応液への DNA 添加量が多い、あるいは少ない .....	32
鋳型 DNA の調製方法が適切ではない .....	32
鋳型 DNA の配列に合成されにくい配列が含まれている .....	32
合成したタンパク質が不溶化している .....	33
分子シャペロンを添加して合成する .....	33
翻訳のスピードを下げて合成する .....	33
合成したタンパク質の活性がない .....	33
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 .....	33
<u>Appendix .....</u>	<u>34</u>
DHFR DNA の配列情報 .....	34
SDS-PAGE サンプルバッファーの組成 .....	34
論文情報 .....	34
<u>その他の関連製品とご注文の方法 .....</u>	<u>35</u>
タンパク質合成反応液 .....	35
タンパク質合成用添加剤 .....	36
<u>お問い合わせ .....</u>	<u>36</u>

## キット情報

### PUREfrefx® 2.1

#### 製品情報

キット開封前は、-80°Cで保存してください。

製品番号	製品名称	容量	使用期限
PF213-0.25	PUREfrefx® 2.1	250 µL 反応分	添付説明書に表示
PF213-2ML	PUREfrefx® 2.1	2 mL 反応分	添付説明書に表示
PF213-10ML	PUREfrefx® 2.1	5x 2 mL 反応分	添付説明書に表示
PF213-50ML	PUREfrefx® 2.1	25x 2 mL 反応分	添付説明書に表示

#### 製品内容物

試薬名	250 µL 反応容量	2 mL 反応容量	内容	保存温度
Solution I	100 µL	800 µL	アミノ酸、NTP、tRNA、酵素の基質など	-20°C以下
Solution II	12.5 µL	100 µL	タンパク質 (30%グリセロール溶液)	-20°C以下*
Solution III	25 µL	200 µL	リボソーム (20 µM)	-80°C*
Cysteine	20 µL	160 µL	システイン (10 mM)	-20°C以下
DTT	20 µL	160 µL	ジチオスレイトール (40 mM)	-20°C以下
GSH	20 µL	160 µL	還元型グルタチオン (80 mM)	-20°C以下
DHFR DNA	10 µL	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°C以下

\*-80°Cでの保存方法：使用後の残りの Solution II、III 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。

---

## 分注方法

PUREfrefex<sup>®</sup>キットは、-80℃で保管している間に劣化していくことはほとんどありませんが、凍結融解を繰り返すと活性が低下していくことがあります。そのため、1回あたりの使用量が少ない場合は、お客様の方で試薬を分注して保存いただくことをお薦めしております。少量で分注される場合は、低吸着チューブをご使用頂くとより安心です。

**Solution I:** 室温～37℃で5分ほどインキュベートし、完全に透明になるまでしっかりと混合します。その後、氷上には置かずに分注作業を行い、-20℃以下で凍結してください。

**Solution II:** 氷上で融解させ、しっかりと混合（少量の場合は泡立たない程度のボルテックスも可）した後に分注し、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）を用いて急速凍結させた後に、-20℃以下で保存してください。

**Solution III:** 氷上で融解させ（溶けた状態で長時間放置しないでください）、しっかりと混合した後に分注し、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）を用いて急速凍結させた後に、-80℃で保存ください。分注した Solution III を急速凍結せずに、そのまま-80℃の冷凍庫で凍らせてしまうと活性の低下につながります。

## 本製品について

PUREfrefex<sup>®</sup>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。PUREfrefex 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: [purefrefex@genefrontier.com](mailto:purefrefex@genefrontier.com)

## PUREflex®について

### PUREflex®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、PUREflex®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。

PUREflex®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。さらに、PUREflex®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。

### 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。

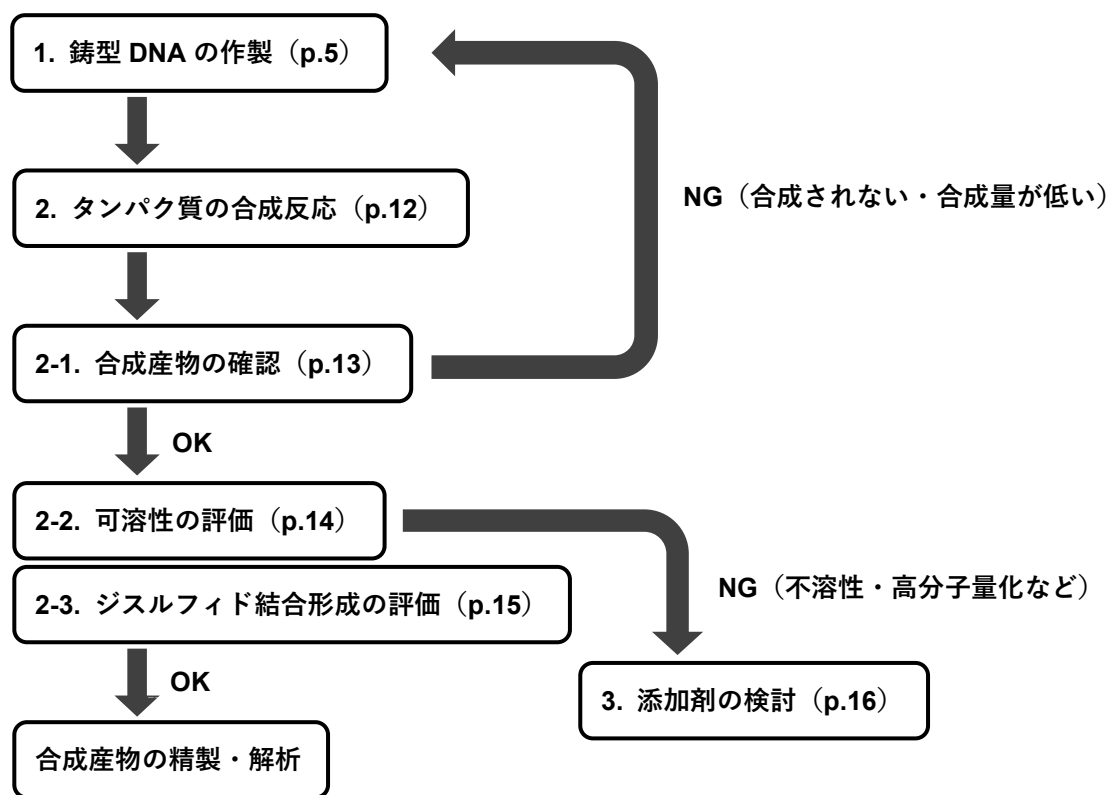
- <参考文献>
1. Shimizu Y. et al. (2001) Nat. Biotechnol., vol. 19, p. 751
  2. Shimizu Y. et al. (2005) Methods, vol. 36, p. 299

## 実験ワークフロー

PUREfres<sup>®</sup>を用いて機能的なタンパク質を合成する一般的な手順を図1に示します。

はじめに、PUREfres<sup>®</sup>を用いた合成に適した鋳型DNAを作成し、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。合成量が低い場合、鋳型DNAの塩基配列の再検討を行います。また、合成されていても可溶性や活性が低い（無い）場合は添加剤や合成条件を検討します。

本キットには、目的のタンパク質が合成されるかどうかを調べるために必要な試薬が含まれています。



※ページが記載されている項目をクリックすると、本取扱説明書内のページへジャンプします。

図1. PUREfres<sup>®</sup>を用いたタンパク質合成のワークフロー

## 1. 鋳型 DNA の作製

タンパク質合成は、本キットの 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。そのため、最初に PUREflex®での合成に適した鋳型 DNA の作製が必要です。PUREflex®でタンパク質を合成する際に必要な目的タンパク質の鋳型 DNA は、下記を参考にしてお客様ご自身でご用意ください。また、「鋳型 DNA 設計のサポート (p.11)」もご利用ください。

### 使用する鋳型 DNA について

PUREflex®用の鋳型 DNA は、下記に記載する最低限必要な配列を含む DNA であれば、環状 DNA および直鎖 DNA (PCR 産物や環状 DNA を制限酵素処理した DNA などが含まれます) のどちらも使用できます。また、mRNA を PUREflex®に添加してタンパク質合成を行うこともできます。

#### 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部位 (SD 配列)が最低限必要です (図 2)。

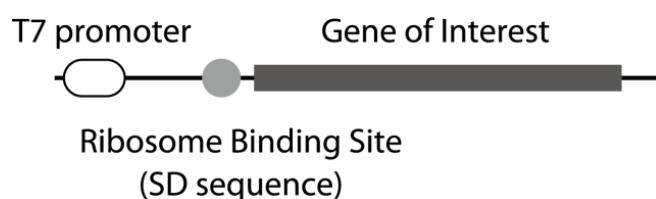


図 2. 鋳型 DNA の構造

#### 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

PUREflex®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

環状 DNA を使用する場合は、目的タンパク質をコードする遺伝子の下流に、転写を終結させる T7 ターミネーター配列が必要です。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。

---

### 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・翻訳反応に必要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、PUREflex®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。

---

## PCR 産物を鋳型 DNA として使用する場合

---

### 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

PUREflex®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 PUREflex®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 PUREflex®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。

---

## 2 段階 PCR による鋳型 DNA の調製方法の概略

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。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。

1 段階目の PCR では、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 条件を調整してください。2 段階目の PCR では、T7PRO-SD primer と REV primer を用いて、目的タンパク質をコードする遺伝子上流に T7 プロモーター配列と RBS を含む PCR 断片を増幅します。

使用する FOR primer、REV primer と T7PRO-SD primer は、お客様ご自身でご用意ください。

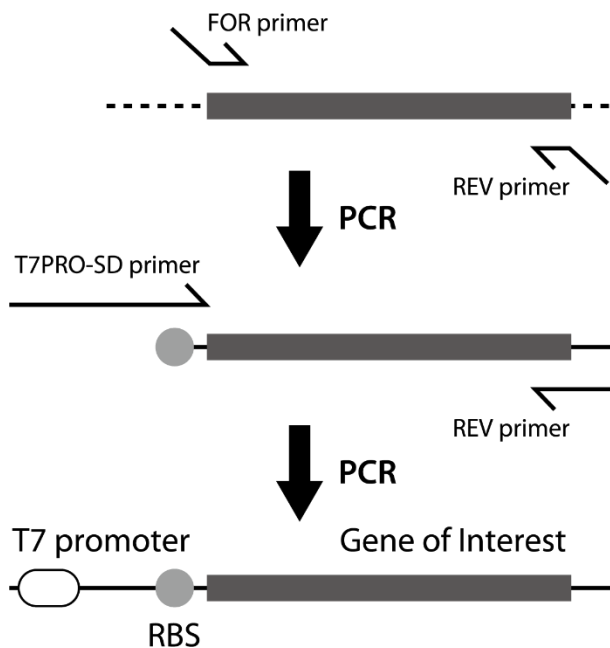


図 3.2 段階 PCR の概略

## 2 段階 PCR で用いるプライマーの配列例

各種プライマーの配列を表 1 に示します。また、下記のサイトもご参照ください。

[https://www.genefrontier.com/solutions/dhfr\\_dna/](https://www.genefrontier.com/solutions/dhfr_dna/)

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

表 1. 各種プライマーの配列

---

## プラスミドを鋳型 DNA として使用する場合

---

### 使用できるプラスミドベクター

T7 promoter、SD 配列、T7 terminator を含むベクターが使用できます。例えば、pET 系 (Merck 社)、pQE 系 (Qiagen 社) 等があります。但し、lac operator 配列が存在すると、タンパク質合成量が減少する場合がありますので、lac operator 配列を含まないベクター (pET17 など) をおすすめします。

---

### プラスミドの調製方法

プラスミド DNA を調製する際は、精製時に使用したバッファーに添加した RNase の活性が最終精製物に残っていないことが重要です。

例えば、Qiagen 社の QIAprep Spin Miniprep Kit や、Promega 社の Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System のようなメンブレンタイプの精製キットを使用した場合、Lysis buffer に含まれる RNase A が最終精製 DNA 溶液にも混入しています。このまま鋳型 DNA として PUREflex® の反応液に添加すると、転写産物などの RNA が分解されタンパク質の合成が阻害されます。

このタイプの精製キットで精製した DNA 溶液の場合、Phenol/Chloroform 処理により RNase を失活させた後、エタノール沈殿などにより再度精製することで、RNase 活性を含まない DNA 溶液を調製できます。あるいは、RNase inhibitor を PUREflex® の反応液に添加することで、タンパク質を合成できるようになります。

一方、Qiagen 社の Plasmid Mini Kit では、樹脂に結合した DNA を溶出後、溶出液に isopropanol を加えて DNA を沈殿させるため、RNase 活性の混入が抑制されます。このキットで精製したプラスミドを、そのまま使用できることを確認しています。

---

### プラスミドの添加量

PUREflex® の反応液に添加する鋳型 DNA 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。例えば、反応液に添加するプラスミドの長さが 6 kbp の場合、実際の ORF の長さに関係なく、 $(0.5\sim 3)\times 6=3\sim 18$  ng/μL となります。

---

## RNA を鋳型として使用する場合

mRNA からタンパク質を合成する場合、開始コドンの上流に SD 配列を含む mRNA を使用してください。また、mRNA の添加濃度の目安は 0.1~1 μM です。ご使用の mRNA の配列や純度等により最適濃度は異なりますので、はじめに、上記の濃度を参考に最適な添加濃度を定める条件検討をおすすめします。

## 鋳型 DNA の配列に関する注意点

鋳型 DNA の塩基配列やアミノ酸配列が原因で、合成されるタンパク質の量が低下することがあり、原因となる配列を最適化することで、タンパク質の合成量が改善されることがあります。

PUREfrex<sup>®</sup>は、リボソームや tRNA などの翻訳に関連する因子が大腸菌由来であるため、目的タンパク質の遺伝子全体を、大腸菌での翻訳に適したコドンで最適化することをおすすめします。最適化する場合は、様々なメーカーから提供されている最適化ツールをご利用ください。大腸菌用にコドンを最適化した後に、さらに、PUREfrex<sup>®</sup>用に修正すべき点がありますので、下記の項目についてご確認ください。

### 開始コドン直後の GC 含量

開始コドン（ATG）直後の 2 番目から 6 番目のアミノ酸のコドンでは、できるだけ AT が多くなるようなコドンを選択してください（図 4）。この領域に限っては、大腸菌のコドンの使用頻度よりも優先してください。

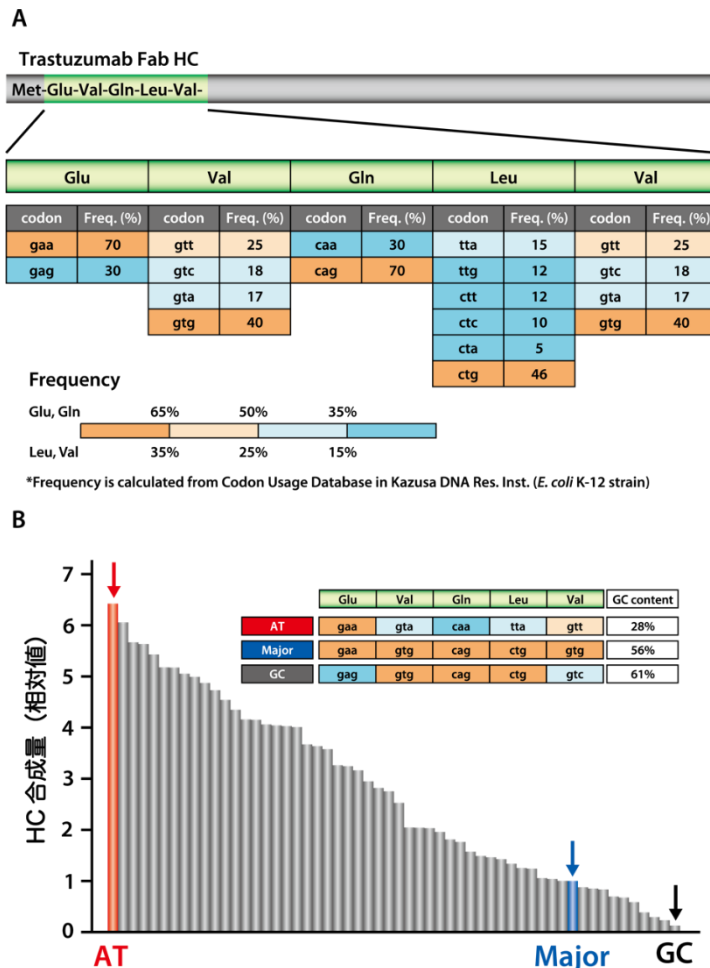


図 4. N 末端領域のコドンがタンパク質合成量に与える影響

A. Trastuzumab (Herceptin) 重鎖 (HC) の N 末端領域のコドン

B. 異なるコドンを使用した鋳型 DNA から合成した場合の合成量の比較

## コドンの使用頻度

塩基配列を大腸菌用に最適化した場合、大腸菌で使用頻度の高い1つのコドンのみが使用される場合があります。例えば、ロイシンでCTGコドンのみが使用されている場合があります。このようなDNAを用いてPUREfrex®で合成した場合、合成量が低くなる可能性があります。使用されるコドンが極度に偏っている場合には、大腸菌のコドンの使用頻度に応じて適度に割り振ります。

*E. coli* K12株のコドン使用頻度はこちらも参照ください。

<https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=83333&aa=1&style=N>

## 5'UTR～N末端近傍の二次構造

SD配列付近～N末端近傍（開始から10アミノ酸程度）をコードする領域で、mRNAが強固な二次構造を形成してSD配列がマスクされると、リボソームが結合しにくくなり、合成量が低下する可能性があります。この領域で強い二次構造形成が予測される場合には、コドンを置換して塩基配列を調整してください。

二次構造予測の例として、本キットの陽性コントロールとして添付されているDHFR DNAについて、RNAfold server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)で解析した結果を図5に示します。SD配列が二次構造を取らないため、合成量は低下しません。

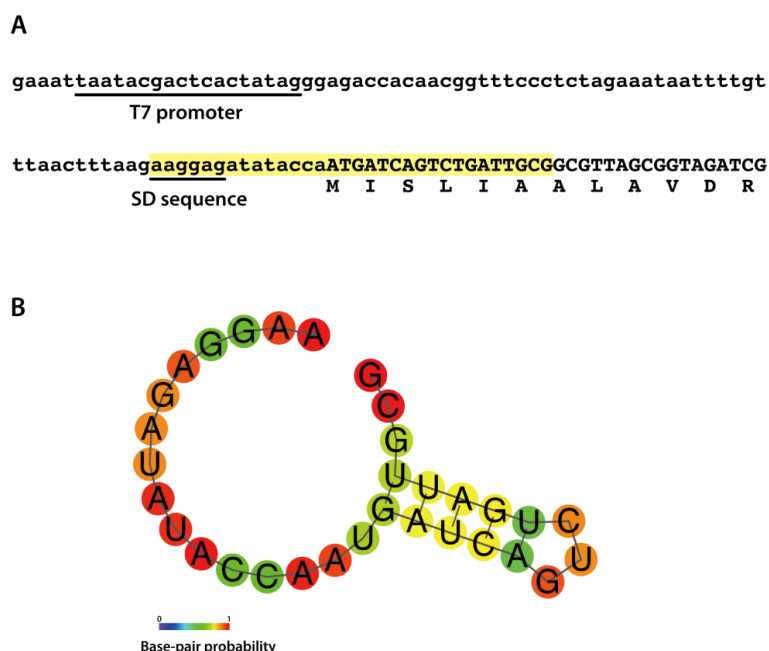


図5. 翻訳開始領域の塩基配列の二次構造予測

A. DHFR DNAの5'末端領域の塩基配列。解析した領域を黄色のハイライトで示しています。

B. RNAfoldでの二次構造予測結果

---

## N 末端付近のアミノ酸配列

開始メチオニン直後の 2 番目や 3 番目のアミノ酸がプロリンやグリシンの場合、合成量が低下する場合があります。除去可能であれば、この領域のプロリンやグリシンは避けてください。

---

## フレームシフトを生じさせる配列

X/XXY/YYZ のようなフレームシフトを起こしやすい配列が存在する場合は、他のコドンに置き換えてください。例えば、リジンが 2 個連続し、塩基配列が「A/AAA/AAA」のような場合、「A/AAG/AAA」に置換するとフレームシフトが抑制されます。

<参考文献> Sharma V. et al. (2014) *Nucleic Acids Res.*, vol.42, p.7210

---

## プロリンが連続する配列

連続したプロリンを含むタンパク質を合成すると、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翻訳において、大腸菌では EF-P と呼ばれる翻訳因子が関与していることが知られていますが、本キット (PUREflex® 2.1) には EF-P が含まれていないため、合成量が低くなる可能性があります。

PUREflex® に EF-P を添加して合成した場合に、タンパク質の合成量が増大した結果について、下記のポスターをご参照ください。

[https://www.genefrontier.com/files/p21\\_MBSJ2018.pdf](https://www.genefrontier.com/files/p21_MBSJ2018.pdf)

---

## 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、PUREflex® 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

## 2. タンパク質の合成反応

本キットの 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°C 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。

### 用意するもの

PUREfrefx® 2.1

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）

ヌクレアーゼフリーの水

37°C 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）

以下は、液量 20  $\mu$ L で、0.5 mM システイン、4 mM GSH を添加して合成する場合の方法です。

1. Solution I、Cysteine、GSH を、室温~37°C で 5 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、室温に置きます。
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、Cysteine、GSH 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  $\mu$ L 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。

ヌクレアーゼフリーの水	7-X $\mu$ L	
Solution I	8 $\mu$ L	
Cysteine (10 mM)	1 $\mu$ L	(終濃度: 0.5 mM)
GSH (80 mM)	1 $\mu$ L	(終濃度: 4 mM)
Solution II	1 $\mu$ L	
Solution III	2 $\mu$ L	
鋳型 DNA	X $\mu$ L	(1 kbp 当たり 0.5~3 ng/ $\mu$ L)
Total	20 $\mu$ L	

- PUREfrefx® 2.1 (#PF213) の Solution I は、PUREfrefx® 2.0 (#PF201) とは使用量が異なりますので、ご注意ください。



■ PUREflex® 2.1 は還元剤（システイン、DTT、GSH など）の添加量を自由に調整することができますが、システインはタンパク質の材料でもあるので、必ず添加してください。

■ 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、「1. 鋳型 DNA の作製」(5 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  $\mu\text{L}$  からの反応が可能です。

5. 37°Cのヒートブロック又はウォーターバスで4~6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。

---

## 2-1. 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。本キットに添付されている DHFR DNA を添加して合成された DHFR の合成量が、本キットで合成可能な最大量に近い量になります。DHFR に対し目的タンパク質の合成量が著しく低い場合や合成産物が見られない場合は、鋳型 DNA の配列の検討などを行います。鋳型 DNA の配列を検討する際は、「鋳型 DNA の配列に関する注意点」(9 ページ)も参照してください。

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 PUREflex® 反応液

3x Sample Buffer（組成は Appendix を参照してください）

水

95°C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°C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。

---

## 2-2. 可溶性の評価

合成されたタンパク質を含む PUREflex®反応液を、遠心により上清画分と沈殿画分に分離します。遠心前の反応液と上清画分（及び沈殿画分）を SDS-PAGE で解析することで簡易的な可溶性の評価を行います。

---

### 用意するもの

合成反応終了後の PUREflex®反応液

微量高速冷却遠心機

3x Sample Buffer

水

95°C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°C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。

---

### 2-3. ジスルフィド結合形成の評価

合成したタンパク質を、非還元条件下の SDS-PAGE で解析することでジスルフィド結合形成の評価を行います。ジスルフィド結合を形成しているタンパク質の場合、非還元条件では、還元条件とは異なる位置にバンドが確認されます。また、ゲルのウェル下部にとどまったり、バンドがスメアになったりする場合もあります。ジスルフィド結合が正しいシステイン残基間で形成されていることの確認は、合成産物の活性測定などで行います。

---

#### 用意するもの

合成反応終了後の PUREflex® 反応液

3x Sample Buffer (非還元：還元剤を加えていないもの)

水

95°C 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 (ジスルフィド結合形成の確認)

1. 合成後の反応液に等量の水を加えます。
2. 水で希釈した反応液に、反応液と等量の 3x Sample Buffer (還元剤を加えていないもの) を加え、95°C で 5 分間加熱します。
3. SDS-PAGE を行い、合成産物のバンドを解析します。

### 3. 添加剤の検討

合成したタンパク質が不溶化する場合や、ジスルフィド結合の形成が必要な場合は、分子シャペロンやジスルフィド結合形成を促進する添加剤を PUREfrex<sup>®</sup>に添加して合成することをおすすめします。「その他の関連製品とご注文の方法」(35 ページ) の関連する製品情報をご参照ください。

## PUREfrefx®を用いた合成例

下記のサイトでも、様々なタンパク質を合成した事例紹介を行っていますので、参考にしてください。

<https://www.genefrontier.com/cases/purefrefx/>

また、下記のサイトから、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/purefrefx-poster/>

### 1. DHFR の合成

DHFR（本キットの陽性コントロール）について、PCR を用いた鋳型 DNA の調製、および PUREfrefx®を用いたタンパク質合成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

PUREfrefx® 2.1

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°Cおよび 95°C）

3x Sample Buffer（SDS-PAGE 用）

SDS-PAGE ゲル（10-20%）

分子量マーカー

CBB 染色液

---

## DNA およびプライマーの配列

### DHFR 遺伝子

ATGATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATCGCGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTGGAACCTGCCTGC  
CGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTC  
GTCCGTTGCCAGGACGCAAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGGGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCG  
GTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGATTGGCGGCGGTCGCGTTTATGAACAGTT  
CTTGCCAAAAAGCGCAAAAACTGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAGTGGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACG  
AGCCGGATGACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCACAGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTGCTTTGAG  
ATTCTGGAGCGGCGGTAA

### プライマー

#### FOR Primer (DHFR-F)

AAGGAGATATACCAATGATCAGTCTGATTG

#### REV Primer (DHFR-R3)

GGATTAGTTATTCATTACCGCCGCTCCAGAAT

#### T7PRO-SD Primer

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG  
ATATACCA

---

## PCR による鋳型 DNA の作製方法

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 <sub>4</sub>	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°C	2 min.	x 30 cycles
94°C	15 sec.	
58°C	30 sec.	
68°C	1 min.	
68°C	2 min.	
10°C		

5. PCR 反応液 (1  $\mu\text{L}$ ) 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  $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$
10x buffer	1 $\mu\text{L}$
2 mM dNTPs	1 $\mu\text{L}$
25 mM $\text{MgSO}_4$	0.6 $\mu\text{L}$
2 $\mu\text{M}$ Primer (T7PRO-SD)	1.5 $\mu\text{L}$
2 $\mu\text{M}$ Primer (DHFR-R3)	1.5 $\mu\text{L}$
DMSO	0.2 $\mu\text{L}$
Enzyme (KOD Plus Neo)	0.2 $\mu\text{L}$
50 倍希釈した PCR-1 Product	0.5 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	10 $\mu\text{L}$

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  $\mu\text{L}$ ) 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  $\mu\text{L}$  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  $\text{ng}/\mu\text{L}$  に調整した。

## PCR による鋳型 DNA の作製結果

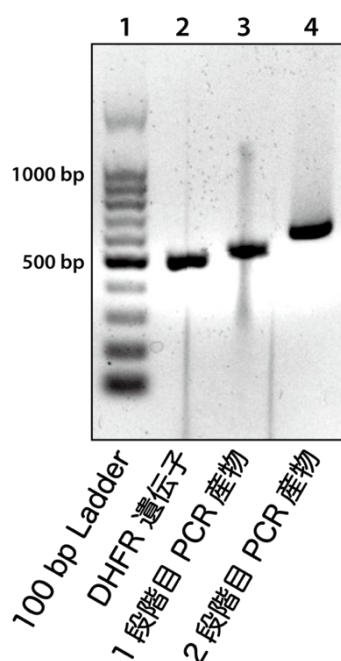


図 6. PUREflex<sup>®</sup>で使用する DHFR 合成用の鋳型 DNA の作製

### PUREflex<sup>®</sup> 2.1 を用いたタンパク質合成と合成産物の確認

1. Solution I、Cysteine、GSH 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、Cysteine、GSH 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 $\mu$ L	3.5 $\mu$ L
Solution I	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Cysteine (10 mM)	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
GSH (80 mM)	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
Solution II	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
Solution III	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
DHFR DNA (20 ng/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

5. 37°Cのヒートブロックで4~6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  $\mu$ L の水と 10  $\mu$ L の 3x Sample Buffer を加えた。
7. 95°C で 5 分間加熱した。
8. 10-20% のグラジエントゲルに、3  $\mu$ L (合成反応液 1  $\mu$ L 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

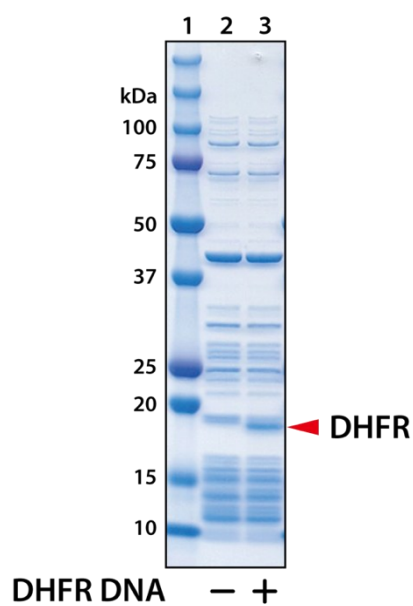


図 7. PUREflex<sup>®</sup>を用いた DHFR の合成結果



## 2. His タグ融合タンパク質の精製 (DHFR-6xHis)

PUREflex®反応液内のタンパク質合成に關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

PUREflex® 2.1

鑄型 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°Cおよび 95°C)

Ni-Sepharose 6 FF (Cytiva)

Binding Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 20 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>

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

---

### PUREflex®を用いたタンパク質合成と合成産物の確認

1. 「1. DHFR の合成」 (20 ページ) と同様に合成反応液の調製 (反応液量: 25  $\mu$ L) を行った。
2. 37°Cで 4 時間反応させた。
3. 合成反応液から 5  $\mu$ L を抜き取った。 (→ Syn)
4. 残りの合成反応液 (20  $\mu$ L) に 80  $\mu$ L 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  $\mu$ L の Ni-Sepharose 6 FF を添加し、4°Cで 1 時間インキュベートした。

■ PUREflex®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。

- 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）
- 樹脂を、50  $\mu$ L の Binding Buffer で 2 回洗浄した。（→ W1、W2）
- 樹脂を、50  $\mu$ L の Wash Buffer で 3 回洗浄した。（→ W3、W4、W5）
- 樹脂に、50  $\mu$ L の Elution Buffer を加えて DHFR-6xHis を溶出した。（→ E1、E2、E3）
- 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  $\mu$ L 分、W3-5/E1-3：合成反応液 4  $\mu$ L 分を泳動した。）
- 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

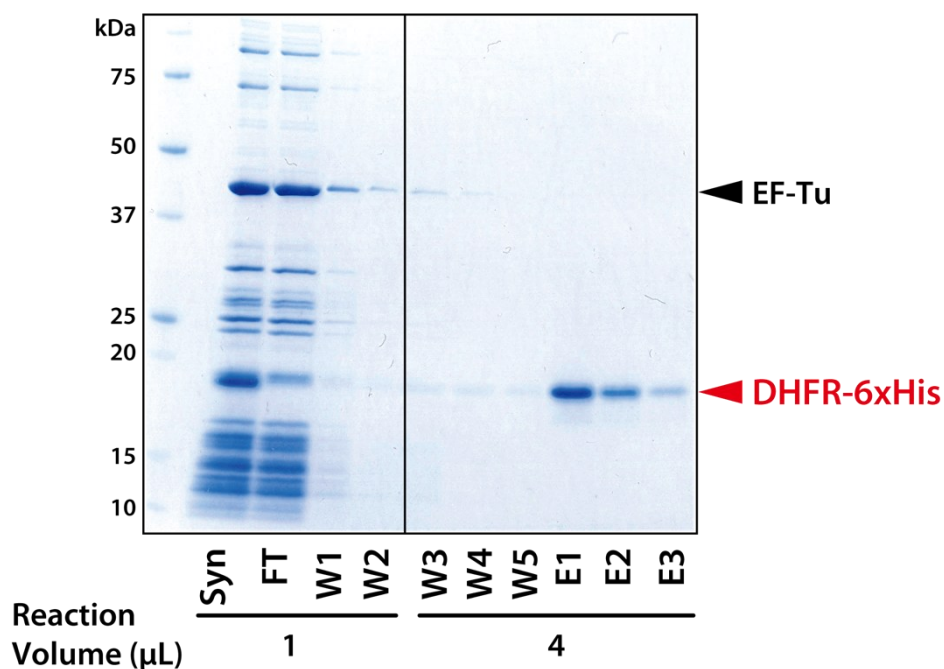


図 8. PUREflex®で合成した DHFR-6xHis の簡易精製

### 3. FluoroTect™ Green<sub>Lys</sub> を用いた合成産物の確認 (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)
- ・ <sup>35</sup>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<sub>Lys</sub> 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<sub>Lys</sub> を使用した合成例を示します。

FluoroTect™ Green<sub>Lys</sub> (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 (本キットに添付された陽性コントロール)

PURE<sub>frex</sub>® 2.1

ヌクレアーゼフリーの水

37°C のヒートブロック又はウォーターバス

FluoroTect™ Green<sub>Lys</sub> 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<sub>Lys</sub> を添加した合成

1. 「1. DHFR の合成」 (17 ページ) 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<sub>Lys</sub> を最後に添加した。
2. 37°C 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°C でさらに 15 分間反応させた。

■ 未反応の FluoroTect™ Green<sub>Lys</sub> を分解します。

4. 反応液に等量の水と 3x Sample buffer を加えて 95°Cで 5 分間加熱した。
5. SDS-PAGE ゲルに 3  $\mu$ L (合成反応液 1  $\mu$ L 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<sub>Lys</sub> を添加した合成結果

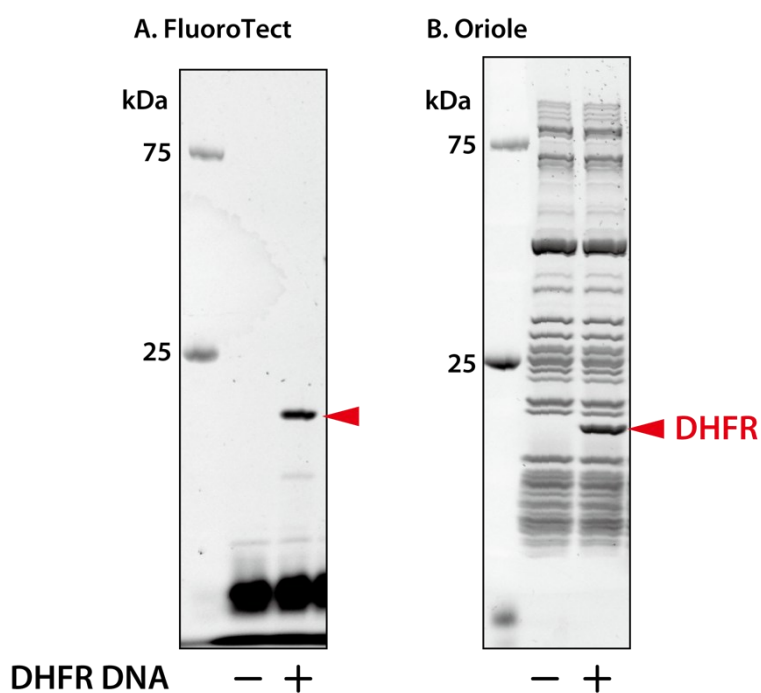


図 9. FluoroTect™ Green<sub>Lys</sub> を添加して合成した DHFR

A. FluoroTect™ Green<sub>Lys</sub> 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

#### 4. ジスルフィド結合含有タンパク質の合成（アルカリフォスファターゼ）

反応液に添加する還元剤を変更したい場合は、PUREfrex® 2.1 (#PF213-0.25) を使用してください。PUREfrex® 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。酸化還元環境をコントロールするには、還元型グルタチオンと酸化型グルタチオン (GSSG) の量比を調整します。

以下に、PUREfrex® 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、還元条件下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。非還元条件下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

PUREfrex® 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°C および 95°C)

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

1. PUREfrex® 2.1 を使い、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°C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°C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 PUREfrex®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°C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°C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

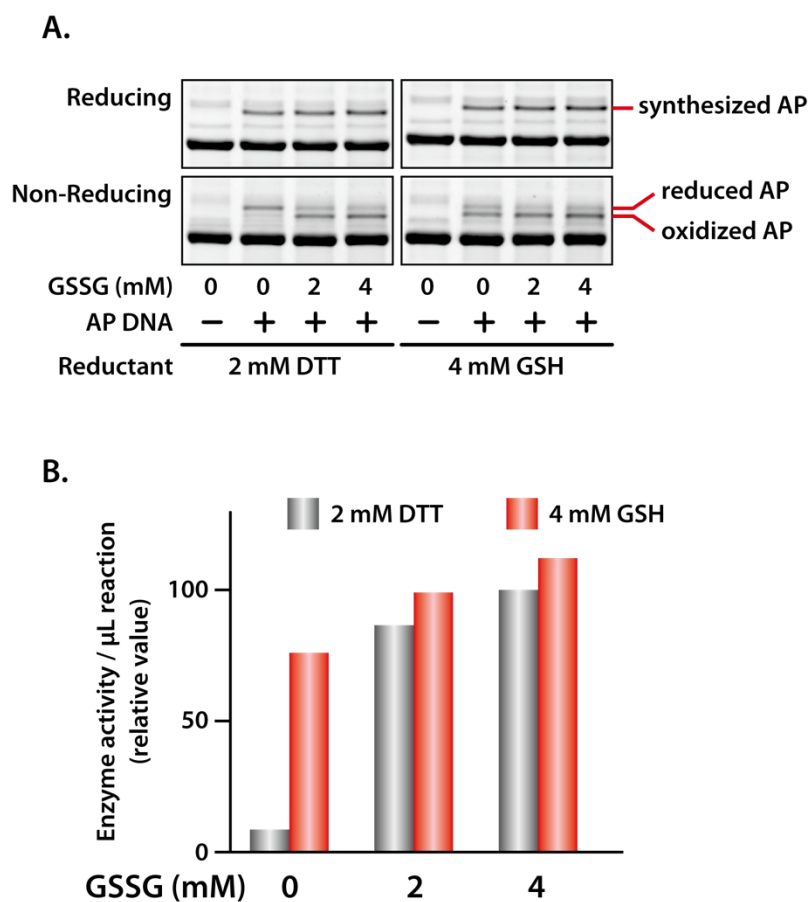


図 10. AP の合成

- 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。

## 5. イムノグロブリン (IgG, Trastuzumab) の合成

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。DsbC Set には、酸化型グルタチオン (GSSG) 溶液、および大腸菌のジスルフィドイソメラーゼである DsbC タンパク質溶液が含まれています。PDI Set には、GSSG 溶液、およびヒトのジスルフィドイソメラーゼである PDI タンパク質溶液、PDI の酸化酵素である Ero1  $\alpha$  タンパク質溶液が含まれています。

以下に、PUREfrefx<sup>®</sup> 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<sub>1</sub> 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。PUREfrefx<sup>®</sup> 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

PUREfrefx<sup>®</sup> 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°C および 95°C)

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<sup>™</sup> 染色液 (Bio-Rad)

蛍光ゲルイメージャー



## IgG の合成

1. PUREfrex® 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	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
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	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
200 μM PDI	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>
2.5 μM Ero1α	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>0</b>
5 μM Ero1α	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>
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

- 37°C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。
- 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°Cで5分間加熱した。
- 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。
- 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.

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

B.

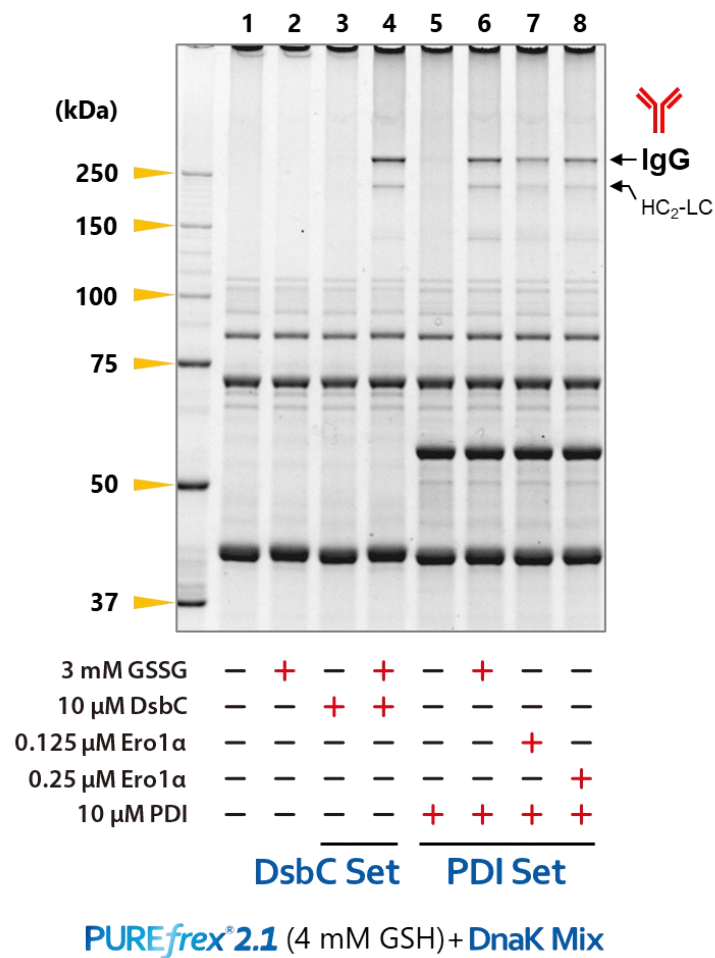


図 11. IgG synthesis

A. 合成した IgG の情報

B. 非還元条件での SDS-PAGE (10% gel)

## 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

- ・ PUREflex®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。
- ・システインを添加していない可能性があります。PUREflex® 2.1 は還元剤（システイン、DTT、GSH など）の添加量を自由に調整することができますが、システインはタンパク質の材料でもあるので、必ず添加してください。

### 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

- ・ PUREflex®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。
- ・ PUREflex®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、 $(0.5\sim 3)\times 6=3\sim 18$  ng/μL となります。

#### 鋳型 DNA の調製方法が適切ではない

- ・「1. 鋳型 DNA の作製」(5 ページ)に記載されている、DNA の様態別の注意点を確認してください。

#### 鋳型 DNA の配列に合成されにくい配列が含まれている

- ・「鑄型 DNA の配列に関する注意点」(9 ページ) に記載されているような配列が含まれていないか確認してください。

## 合成したタンパク質が不溶化している

### 分子シャペロンを添加して合成する

- ・PUREflex<sup>®</sup>には、分子シャペロンが含まれていません。そのため、分子シャペロンを添加して合成すると可溶化することがあります。この時、PUREflex<sup>®</sup> 2.1 よりも、合成量が少ない PUREflex<sup>®</sup> 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。「その他の関連製品とご注文の方法」(35 ページ) もご覧ください。

### 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°C から 30°C や 25°C 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。その際、合成量も少なくなりますので、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。

## 合成したタンパク質の活性がない

- ・合成したタンパク質が不溶化している可能性がありますので、可溶性を確認してください。
- ・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。PUREflex<sup>®</sup> は再構成系であるため、転写・翻訳反応に関係のない低分子などは含まれていません。活性に必要な因子を添加してください。
- ・ジスルフィド結合が正しく形成される必要がある場合には、その形成を促進する添加剤（DsbC Set または PDI Set）をお試しく下さい。「その他の関連製品とご注文の方法」(35 ページ) もご覧ください。

## 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

- ・PUREflex<sup>®</sup> 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°C など）で長め（1 時間程度）の加熱処理を行ってください。

## Appendix

### 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/](https://www.genefrontier.com/solutions/dhfr_dna/)

### SDS-PAGE サンプルバッファの組成

3x サンプルバッファ (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<sub>2</sub>O で 10 mL にメスアップ)

### 論文情報

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

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

## 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。

### 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

PUREfrefx <sup>®</sup> 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
	PF001-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	1,950,000 円

#### 合成量重視

PUREfrefx <sup>®</sup> 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
	PF201-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	3,000,000 円

#### 合成量重視にしつつ、ジスルフィド結合が大事

PUREfrefx <sup>®</sup> 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
	PF213-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	3,000,000 円

## タンパク質合成用添加剤

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
	PF003-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	1,250,000 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
	PF004-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	1,250,000 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
	PF005-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	700,000 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
	PF006-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	700,000 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
	PFS052-50ML	1 kit (25x 2 mL 反応用)	350,000 円

## お問い合わせ

PUREflex<sup>®</sup>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/pureflex/>



## 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](http://www.genefrontier.com)