

# DnaK Mix

## #PF003-0.5

### 500 µL 反応用

Lot : \_\_\_\_\_

Expiry Date : \_\_\_\_\_

- DnaK Mix は、精製した大腸菌由来の DnaK、DnaJ、GrpE の混合溶液です。
- Dilution Buffer が添付されています。
- タンパク質合成試薬は含まれていません。

*in vitro* research use only

開封前保存温度：-80℃

Jun 2015



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

DnaK Mix 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。

DnaK Mix 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 PUREfrefx® テクニカルサポートまでお願い致します。

PUREfrefx® テクニカルサポート

E-mail: purefrefx@genefrontier.com

PUREfrefx は、ジーンフロンティア株式会社の登録商標（登録商標 第 5443077 号）です。

## Introduction

### 1. PUREfrefx® について

PUREfrefx® 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。

PUREfrefx® 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>-4</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、PUREfrefx® 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. DnaK Mix 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。合成されたタンパク質の高次構造の形成・維持に関与するタンパク質として Hsp70 や Hsp60 などの分子シャペロンが知られています。PUREfrefx® は、転写、翻訳反応に必要な因子のみから再構成されており、分子シャペロンは含まれておりません。そのため、合成するタンパク質によっては正しい高次構造形成ができず、不溶性となる場合もあります。このような場合、分子シャペロンを添加して合成することで可溶性となり、機能を発現するタンパク質もあります。

DnaK は大腸菌の Hsp70 で、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います。DnaK は ATPase であり、DnaJ、GrpE と協調して働きます。DnaJ は、DnaK の ATP 加水分解反応を促進し、タンパク質の疎水領域への結合活性も有しています。GrpE は、DnaK 上の ADP/ATP 交換反応を促進します。

DnaK Mix は、高度に精製した大腸菌由来の DnaK、DnaJ、GrpE を適切な濃度比であらかじめ混合した溶液です。PUREfrefx® (#PF001-0.25、#PF201-0.25) や DS supplement (#PF005-0.5) を添加した反応液でのタンパク質合成時に、さらに DnaK Mix を添加することにより、単独では高次構造を形成しにくいタンパク質を活性を有した状態で合成しやすくします。

## Kit components

開封前の保存温度は、すべて -80℃ です。

- **DnaK Mix (Orange) 25 µL**  
内容：100µM DnaK, 20µM DnaJ, 20µM GrpE  
(30% グリセロール溶液)  
開封後保存温度：-80℃<sup>\*1</sup>

- **Dilution Buffer (Clear) 500 µL**  
内容：30% グリセロール溶液  
開封後保存温度：-20℃

\*1)

使用後の残りの反応液を -80℃ 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。

## Memo

## Protocol

DnaK Mix は、PUREfrefx® (#PF001-0.25、#PF201-0.25)、または DS supplement (#PF005) を添加したタンパク質合成反応で使用できます。例えば、PUREfrefx® を用いたタンパク質合成反応を 20 µL で行う場合、以下のように添加して使用できます。

1. Solution I を 30℃ で 1 分間温めて融解し、氷上に置きます。
2. Solution II、III 及び DnaK Mix を氷上で融解します。
3. 融解した Solution I、II、III、DnaK Mix 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製します。  
(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。)

	#PF001	#PF201
Water	7-X µL	6-X µL
Solution I	10 µL	10 µL
Solution II	1 µL	1 µL
Solution III	1 µL	2 µL
DnaK Mix <sup>*2</sup>	1 µL	1 µL
Template DNA	X µL	X µL
Total	20 µL	20 µL

## Protocol

5. 37℃ 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。

\*2)

DnaK Mix の必要量は、合成するタンパク質によって異なる場合があります。希釈が必要な場合は、添付の Dilution Buffer で DnaK Mix を希釈して使用してください。

## Experimental data

### 使用例 1. ルシフェラーゼの合成

DnaK Mix を添加した PUREfrefx® (#PF001-0.5) を使用して、ルシフェラーゼを合成し、合成産物の活性を測定しました。

裏面に記載の Protocol に従って、合成反応液を調製しました。Dilution Buffer で 2 倍に希釈した DnaK Mix (0.5x)、及び希釈していない DnaK Mix (1x) を添加したそれぞれの反応液に、ルシフェラーゼの鑄型 DNA を加えて 30℃ で 4 時間合成しました。その際、DnaK Mix を添加しない反応液 (-)、及び DnaK Mix 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、ルシフェラーゼの酵素活性を測定しました。測定結果を、DnaK Mix を添加せずに合成した場合の活性を 1 とした相対値で示します (図 1)。DnaK Mix を添加しなかった場合に比べ、1x で DnaK Mix を添加した場合、合成したルシフェラーゼの酵素活性は約 6 倍上昇しました。

この結果は、酵素活性が高いルシフェラーゼを合成するためには、適切な濃度の DnaK Mix の添加が必要であることを示しています。

## Experimental data

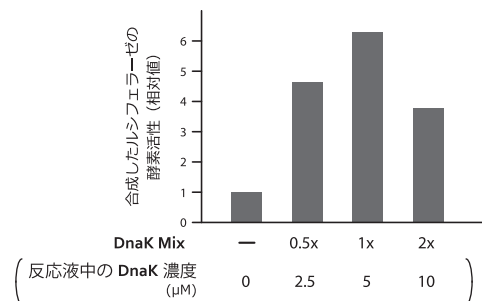


図 1. (使用例 1)

DnaK Mix を添加した PUREfrefx® (#PF001-0.5) を用いて合成したルシフェラーゼの酵素活性

## Memo

## Memo

## Experimental data

### 使用例 2. scFv の合成

DnaK Mix を添加した、PUREfrefx® (#PF001) 及び PUREfrefx®SS (#PF002)\*3 を使用して、scFv (single-chain Fv) を合成し、合成産物の活性を測定しました。

裏面に記載の Protocol に従って、合成反応液を調製しました。希釈していない DnaK Mix を添加した反応液 (+) に、リゾチームに結合する scFv の鑄型 DNA を加えて 37℃ で 4 時間合成しました。その際、DnaK Mix を添加しない反応液 (-) での合成も行いました。合成後、scFv の抗原結合活性を ELISA により測定しました。測定結果を、DnaK Mix を添加していない PUREfrefx®SS\*3 で合成した場合の結合活性を 100% とした相対値で示します (図 2)。PUREfrefx®SS\*3 では、DnaK Mix を添加した場合、合成した scFv の結合活性は約 20% 上昇しました。また、PUREfrefx® においても、DnaK Mix を添加することにより、scFv の結合活性が検出されました。

この結果は、DnaK Mix の添加が、結合活性の高い scFv の合成に有効であることを示しています。

## Experimental data

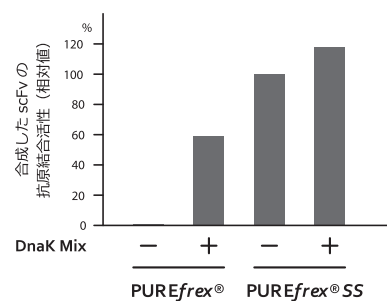


図 2. (使用例 2)

DnaK Mix を添加した、PUREfrefx® (#PF001) 及び PUREfrefx®SS (#PF002)\*3 を用いて合成した scFv の抗原結合活性

## Memo

## Memo

\*3)

PUREfrefx®SS (#PF002) は、PUREfrefx®1.0 (#PF001-0.25) に、DS supplement (#PF005-0.5) を添加した反応液と同品です。