

#PF201-0.25

#PF201-0.25-5

250 µL 反応用

Lot : _____

Expiry Date : _____

in vitro research use only

開封前保存温度：-80°C

Jun 2015


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

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 10⁻¹ 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。

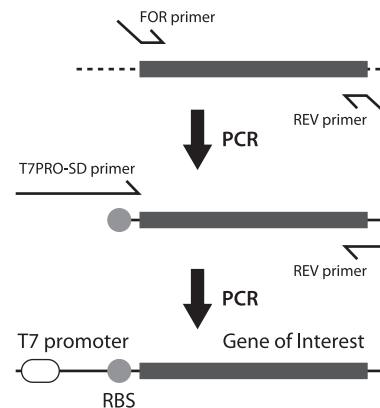
References) 1. Shimizu *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, p. 751
 2. Shimizu *et al.* (2005) *Methods*, vol. 36, p. 299

Template DNA

2. 鋳型 DNA の調製

PCR による PUREfreflex® 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。



Protocol

PUREfreflex® 2.0 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、20 µL で行う場合は、以下のよう反応液を調製してください。

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

Water	7-X µL
Solution I	10 µL
Solution II	1 µL
Solution III	2 µL
Template DNA	X µL
Total	20 µL

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。

Kit components

開封前の保存温度は、すべて -80°C です。

- Solution I (White) 125 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 (Black) 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 *1
- Solution III (Red) *2 12.5 µL x2**
 内容：リボソーム (20 µM)
 開封後保存温度：-80°C *1
- DHFR DNA (Clear) *2,3 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

*1)
 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。

*2)
 PUREfreflex® 1.0 (#PF001-0.25) に含まれる Solution III、DHFR DNA とそれぞれ同一組成の溶液です。

*3)
 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

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' -GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAGACC
T7 promoter
ACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTA
ACTTTAAGAAGGAGATATACCA-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。

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

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 (登録商標第 5443077 号) です。