

DsbC Set

(旧 DS supplement)

#PF005-10

5 x 2 mL 反応用

(タンパク質合成試薬は添付されていません)

Lot: _____

Expiry Date: _____

in vitro research use only

開封前保存温度: -80°C

Sep 2021

 ジーンフロンティア株式会社
www.genefrontier.com

〒277-0005
千葉県柏市柏 273-1
シャープ柏ビル4階

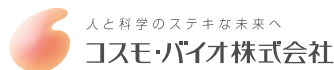
Note

DsbC Set、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。

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。

Distributor



〒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

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ボ多糖は、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

Introduction

DsbC Set / PDI Set 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。細胞外に分泌されるタンパク質などの中には、正しい高次構造の形成や維持に、ジスルフィド結合が必要なタンパク質があります。

ジスルフィド結合は、近接する 2 つのシステインのスルフヒドリル (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 基が酸化されうる環境が必要です。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が必要な場合もあります。

DsbC Set (#PF005) には、ジスルフィド結合形成が可能な環境にするための酸化剤として酸化型グルタチオン (GSSG)、及びジスルフィド結合イソメラーゼとして大腸菌の DsbC が含まれています。一方、PDI Set (#PF006) には、ヒト由来のジスルフィド結合イソメラーゼ (PDI)、PDI の酸化酵素である Ero1α、及び GSSG が含まれています。DsbC Set、または PDI Set を PUREfreflex® に添加して合成反応を行うことで、正しいジスルフィド結合を形成して活性を有するタンパク質を合成することができます。

反応液に含まれる還元剤によってジスルフィド結合の形成効率が異なるため、ジスルフィド結合含有タンパク質を合成する場合は、還元剤を選択できる PUREfreflex® 2.1 (#PF213) を使用してください。

Kit components

- GSSG *1 **100 µL x 5**
内容: 酸化型グルタチオン (60 mM)
開封後保存温度: -20°C
- DsbC *2 **100 µL x 5**
内容: 320 µM DsbC (30% グリセロール溶液)
開封後保存温度: -20°C または -80°C *3
- Dilution Buffer **500 µL x 1**
内容: 30% グリセロール溶液
開封後保存温度: -20°C

Kit components

開封前の保存温度は、すべて -80°C です。

*1) 使用する還元剤の種類や濃度、合成するタンパク質により、最適濃度が異なります。PUREfreflex® 2.1 (#PF213) を使用し、還元剤として 4 mM GSH を添加する場合、GSSG の標準的な使用濃度は 1 mM です。GSSG の添加濃度を検討する場合、1-3 mM で検討してください。

*2) DsbC の濃度表記をモル濃度に変更しました。DsbC Set の 320 µM は、旧 DS Supplement での 7.5 mg/mL と同濃度です。DsbC の必要濃度は、合成するタンパク質によって異なります。必要濃度が不明な場合は、1~16 µM で検討してください。希釈が必要な場合は、添付の Dilution Buffer を使用してください。

*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。

Protocol

DsbC Set を添加し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、PUREfreflex® 2.1 (#PF213) を使用し、0.5 mM Cysteine、4 mM GSH、1 mM GSSG、4 µM DsbC を添加して、液量 20 µL で合成する場合、以下のように反応液を調製してください。

1. Solution I、Cysteine、GSH、GSSG 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。
2. Solution II、Solution III、DsbC を氷上で融解します。
3. 融解した Solution I、II、III、Cysteine、GSH、GSSG、DsbC 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. DsbC を Dilution Buffer で 4 倍に希釈します。また、GSSG を水で 3 倍に希釈します。

Protocol

5. 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	5-X µL
Solution I	8 µL *4)
Cysteine	1 µL
GSH	1 µL
GSSG (3 倍希釈)	1 µL
Solution II	1 µL
Solution III	2 µL
DsbC (4 倍希釈)	1 µL
Template DNA	X µL
Total	20 µL

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

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