

無細胞タンパク質合成キット



PUREfres[®]

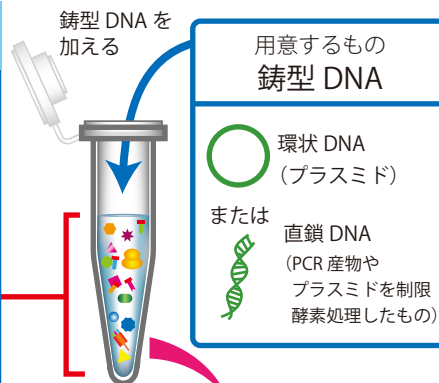
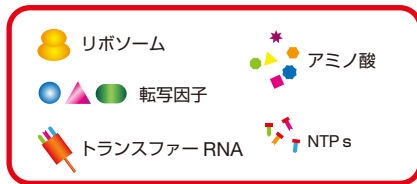
クローニング不要、
タンパク質調製に細胞は必要ありません!!

- 生細胞では難しい、毒性の強いタンパク質も合成できます。
- 複数鋳型を混在して反応させ、Fab 等、多量体の合成もできます。
- 鋳型 DNA は、PCR 反応液を直接添加してお使いいただけます。
- 操作は簡単。1 チューブで、37℃、数時間で合成されます。

PURE system^{*1} を基に開発された再構成型無細胞
タンパク質合成^{*2} キットです

*1: 東京大学大学院 新領域創成科学研究科上田卓也教授が開発。

*2: 大腸菌からタンパク質合成に必要な成分を単離し、
再びタンパク質合成できる形に構成したシステム。
試験管内で合成できる!



目的タンパク質ができる!

タンパク質合成反応液

PUREfres[®] 1.0

タンパク質科学・合成生物学で
使用したいときに

PUREfres[®] 2.0

1.0 より多量のタンパク質を
合成したいときに

タンパク質合成用添加剤

DS supplement

ジスルフィド結合含有タンパク
質を合成するための添加剤とし
て

DnaK Mix / GroE Mix

活性型タンパク質を
合成するための添加剤として

用途に合わせて反応液・添加剤をお選びください

人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

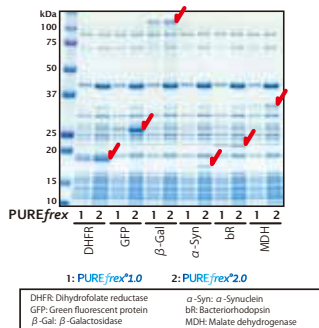
<http://www.cosmobio.co.jp/>

PUREfrex® は、皆様の研究目的に応じて、2種類のタンパク質合成反応液をご用意しております

PUREfrex® 1.0 PUREfrex® 1.0 は、反応液の構成因子が公開されているため、お客様のアッセイ系と組み合わせで使用していただく場合に向いております。また、PUREfrex® 2.0 でタンパク質を合成した際に合成量が多すぎて、SS 結合やフォールディングが追い付かず不溶化してしまう場合には、PUREfrex® 1.0 でお試しくださいと解決することがございます。

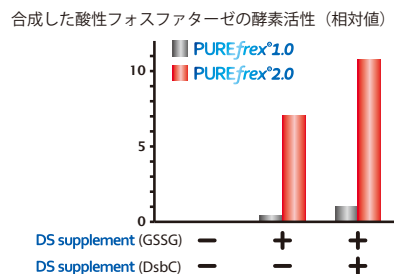
PUREfrex® 2.0 PUREfrex® 2.0 は、生細胞では発現・精製が難しいものや、スクリーニングなど多種類のタンパク質が必要な研究向けに開発し、反応液当たりの合成量を高めております。PUREfrex® 1.0 と 2.0 で、各種タンパク質の合成量を比較したところ（図 1）、例えば DHFR が 150 µg/mL から 600 µg/mL、GFP が 100 µg/mL から 800 µg/mL と増加しました。また、タンパク質合成用添加剤の効果についても、以下のような違いがあります（図 2、3）。

図 1：タンパク質の合成例



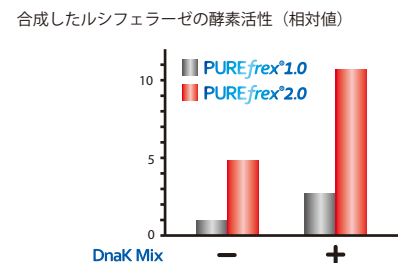
原核生物および真核生物由来のタンパク質を合成した結果、PUREfrex® 2.0 で合成した場合、様々なタンパク質で PUREfrex® 1.0 に比べて合成量が増大していることが確認できました。

図 2：DS supplement を添加したタンパク質の合成例



ジスルフィド結合 (SS 結合) が必要な大腸菌酸性フォスファターゼ (AppA) を PUREfrex® 2.0 反応液に DS supplement を添加して合成した結果、酸化剤やジスルフィド結合イソメラーゼの存在下で活性タンパク質合成量の向上が確認できました。

図 3：DnaK Mix を添加したタンパク質の合成例



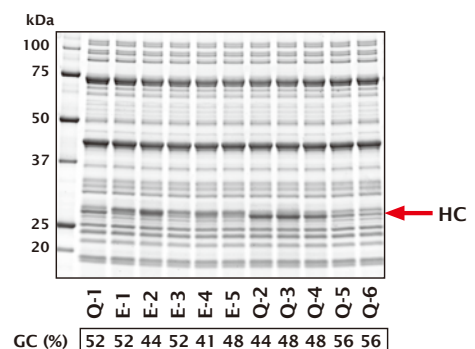
正しい高次構造の形成に分子シャペロンが必要なタンパク質を合成した結果、PUREfrex® 2.0 で合成した場合、分子シャペロン存在下で活性タンパク質合成量の向上が確認できました。

鋳型の配列を調整することで、目的のタンパク質合成量を高めることができます

a) nucleotide sequence of HC DNA

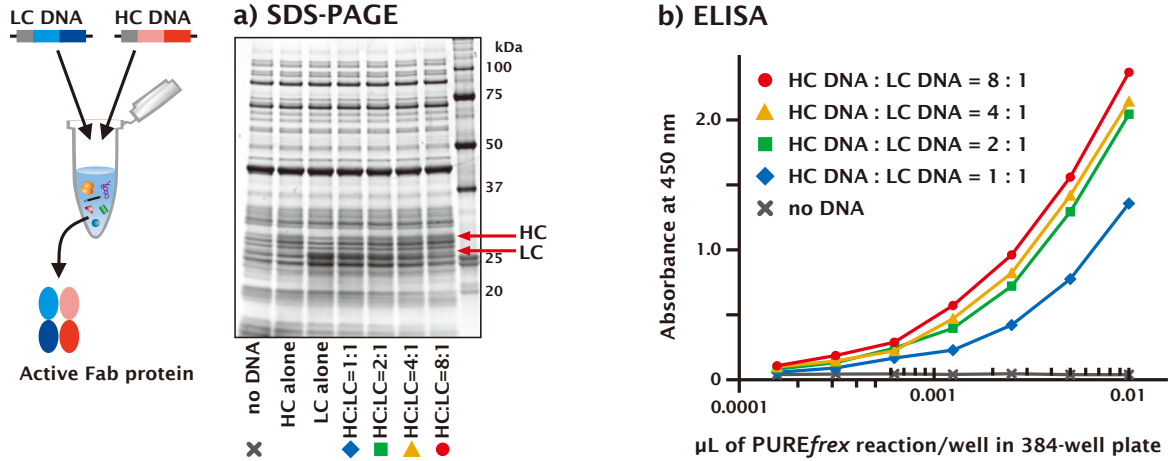
	M	Q	V	Q	L	V	E	S	G	GC (%)
<i>E. coli</i> freq. codon	atg	cag	gtg	cag	ctg	gtg	gaa	agc	ggc	59%
Q-1	atg	cag	gtg	caa	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	52%
Q-2	atg	caa	gtt	caa	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	44%
Q-3	atg	caa	gtg	caa	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	48%
Q-4	atg	cag	gtt	caa	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	48%
Q-5	atg	cag	gtg	caa	ctg	gtc	gaa	tcg	ggg	56%
Q-6	atg	cag	gtg	cag	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	56%
E-1	atg	gag	gtg	caa	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	52%
E-2	atg	gaa	gtt	caa	ttg	gtc	gaa	tcg	ggg	44%
E-3	atg	gaa	gtt	cag	ctg	gtc	gaa	tcg	ggg	52%
E-4	atg	gaa	gtt	caa	ttg	gtt	gaa	agc	ggg	41%
E-5	atg	gaa	gtt	cag	ctg	gtt	gaa	agc	ggg	48%

b) SDS-PAGE



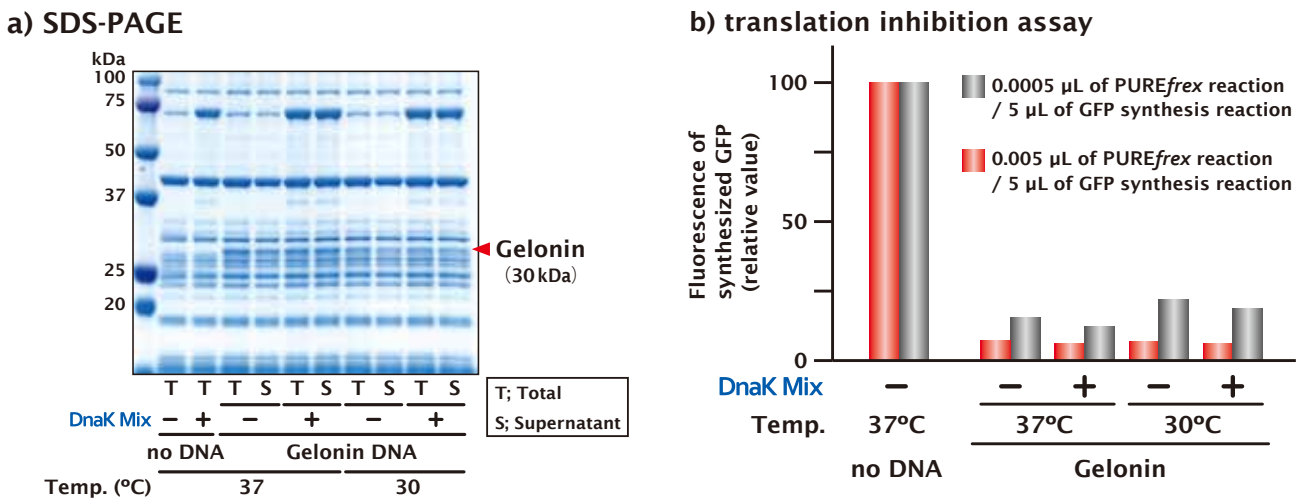
軽鎖 (LC) と重鎖 (HC) からなる Fab にて、重鎖 (HC) の合成量を高めるために、塩基配列にサイレント変異を導入し、5' 末端側の 9 アミノ酸の GC 含量を変化させることで合成量に及ぼす影響を調べた結果、AT 含量が高い方が合成量が高くなる傾向にあることを確認できました。

複数鋳型混在下で DS supplement を添加した Fab の合成例



Fab は、軽鎖 (LC) と重鎖 (HC) が各分子内でジスルフィド結合を形成し、会合して活性型となります。その Fab を PUREfrefx®2.0 反応液に DS supplement を添加して合成した結果、実際に抗原と結合できる活性型の Fab が合成できました。さらに、軽鎖 (LC) と重鎖 (HC) の鋳型 DNA の添加する比率を最適化することで、活性型の Fab の収量が上がることも確認できます (最大収量 0.5 mg/mL)。

タンパク質性毒素 (Gelolin) の合成例



タンパク質性毒素 Gelolin* を PUREfrefx®2.0 を用いて合成しました。目的の分子量のタンパク質が合成されていることが確認できます (図 a)。また翻訳阻害活性の確認は、Gelolin を合成させた PUREfrefx® 反応液 (未精製) を HeLa 細胞由来の無細胞発現系で GFP を合成させる際に添加し、合成される GFP の蛍光量を比較して行い、タンパク質の翻訳阻害活性があることも確認できました (図 b) (最大収量 0.5 mg/mL)。

* *Gelonium multiflorum* という植物の種子由来。真核細胞のリボソームを不活化させることで翻訳を阻害するため、真核細胞での発現は困難。

技術情報

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と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。反応液に、目的のタンパク質をコードする DNA もしくは 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。

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

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、従来品に比べて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、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・検出を行うことが可能です。**

商品情報

タンパク質合成反応液

ジーンフロンティア株式会社 メーカー略号：GFK

品名	品番	包装	希望販売価格
PUREfrefx® 1.0	PF001-0.25	1 kit (250 µL 反応用)	¥15,000
	PF001-0.25-5	1 kit (5 × 250 µL 反応用)	¥67,500
PUREfrefx® 2.0	PF201-0.25	1 kit (250 µL 反応用)	¥24,000
	PF201-0.25-5	1 kit (5 × 250 µL 反応用)	¥108,000

保 存：全て -80℃

タンパク質合成用添加剤

PUREfrefx® 1.0 と 2.0 は、分子シャペロンを含んでおりません。そのため、合成するタンパク質によっては、正しい高次構造が形成できず、不溶性となる場合があります。このような場合には、分子シャペロンをタンパク質合成時に添加することにより解決できることがあります。そのためのキット添加剤として **DnaK mix (品番：PF003-0.5)** と **GroE mix (品番：PF004-0.5)** を用意しております。

また、PUREfrefx® 1.0 と 2.0 は、DTT を含む還元的条件下でタンパク質の合成反応を行います。ジスルフィド結合の形成が必要なタンパク質を合成される場合は、**DS supplement (品番：PF005-0.5)** を添加してお使い頂くことをお奨めいたします。

ジーンフロンティア株式会社 メーカー略号：GFK

品名	品番	包装	希望販売価格
DnaK Mix	PF003-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	¥18,000
GroE Mix	PF004-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	¥18,000
DS supplement	PF005-0.5	1 kit (500 µL 反応用)	¥10,000

保 存：全て -80℃

記事 ID 検索 **16268** 詳しい情報はコスモ・バイオ Web サイトへ

コスモ・バイオホームページのサイト内検索エンジン「記事 ID 検索」に、この商品のページ ID (上記のアイコンの数字) を入力してください。ダイレクトにページへ行くことができます。

お願い および 注意事項

- 希望販売価格 …「希望販売価格」は参考であり、販売店様からの販売価格ではございません。
記載の希望販売価格は 2016 年 4 月 1 日現在の希望販売価格です。
予告なしに改定される場合がありますので、ご注文の際にご確認下さい。消費税は含まれておりません。
- 使用範囲 …記載の商品は全て、「研究用試薬」です。
人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

記載の社名・商品名等の名称は、弊社もしくは各社の商標または登録商標です。

取扱店



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