

# 無細胞くんSI SS : 微量透析法による最適酸化還元条件の検討

SI SS



外液 7.25 mL



内液 685  $\mu$ L



アミノ酸混合液 1 mL  
(非標識)



酸化型グルタチオン  
(GSSG) 1.2 mL



還元型グルタチオン  
(GSH) 1.2 mL



微量透析ユニット  
Xpress Micro Dialyzer  
MWCO; 12-14 kDa

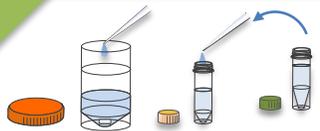


2mL丸底  
チューブ



0.6mL チューブ

2



外液と内液それぞれに、アミノ酸混合液、MilliQ水、および内液に鋳型DNAを下記表に示す量添加します。

\* 内液は、泡立たないように静かにピペティングで混合します。

	アミノ酸混合液	MilliQ 水	鋳型DNA(100 $\mu$ g/mL)
外液	750 $\mu$ L	1 mL	-
内液	75 $\mu$ L	100 $\mu$ L	40 $\mu$ L

3



外液を2mLチューブにそれぞれ0.9mLずつ分注します。

i 内液100 $\mu$ L、外液1mLの場合、1キットあたり、最大9反応(本プロトコル)。内液50 $\mu$ L、外液0.5mLの場合、1キットあたり、最大19反応分になります。

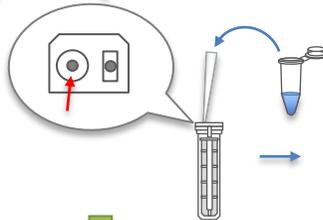
4



内液を0.6 mLチューブにそれぞれ90 $\mu$ Lずつ分注します。

i SDS-PAGE等での発現確認の際の比較サンプルとして残った内液を10 $\mu$ L程度小分けし、冷蔵保存しておく。

6



透析ユニットに内液100 $\mu$ Lを入れ、外液の入った2mLチューブに差し込む。

1



0.6mLチューブに酸化および還元型グルタチオンをそれぞれ下記表の割合で混合します

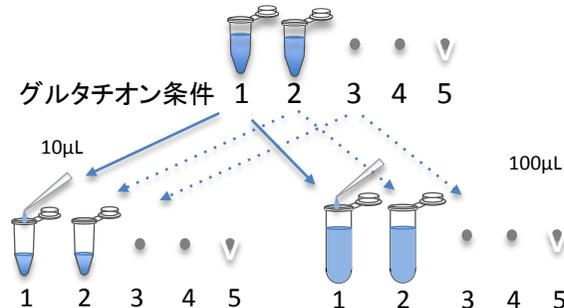
条件	1	2	3	4	5	
酸化型	0	48	120	192	240	
還元型	240	192	120	48	0	
合計	240	240	240	240	240	( $\mu$ L)

5

3で外液を入れた2mLチューブおよび4で内液を入れた0.6mLチューブに、条件1-5のグルタチオン混合液をそれぞれ100 $\mu$ Lおよび10 $\mu$ L加え、よく混合します。

\* 内液は、泡立たないように静かにピペティングで混合します。

\* 内液50 $\mu$ L、外液0.5mLで反応させる場合は、それぞれ50 $\mu$ Lおよび5 $\mu$ L加えます。



緩やかに振とうしながら、4~16時間、30 $^{\circ}$ Cでインキュベートします。

# 無細胞くんSI SS : 微量透析法による最適酸化還元条件の検討 (操作フロー図)

