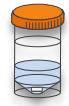
無細胞くんSI SS : 微量透析法による最適酸化還元条件の検討

SI SS



外液 7.25 mL

内液 685 µL

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

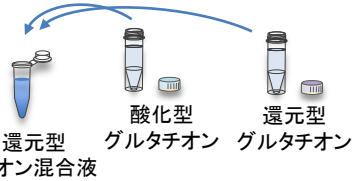
還元型グルタチオン (GSH) 1.2 mL

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

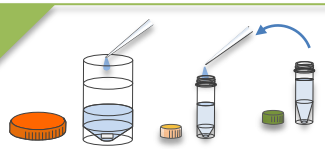
1



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	(µL)

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，泡立たないよう静かにピペッティングで混合します。

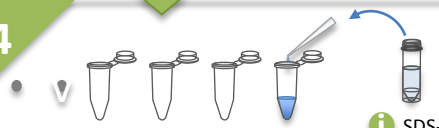
	アミノ酸混合液	MilliQ 水	鋳型DNA(100µg/mL)
外液	750 µL	1 mL	-
内液	75 µL	100 µL	40 µL

3

外液を2mLチューブにそれぞれ0.9mLずつ分注します。

ⓘ 内液100µL，外液1mLの場合，1キットあたり，最大9反応（本プロトコール）。内液50µL，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



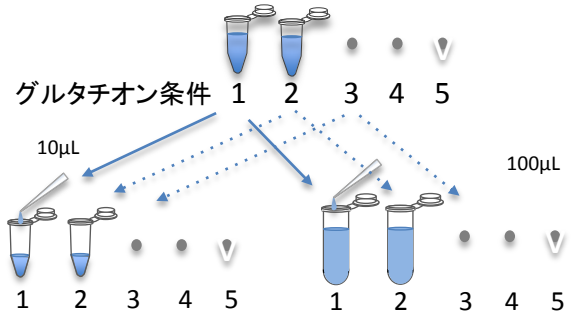
内液を0.6 mLチューブにそれぞれ90µLずつ分注します。

ⓘ 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10µL程度小分けし，冷蔵保存しておく。

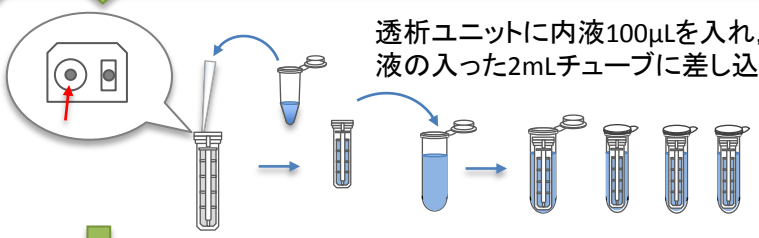
5

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100µLおよび10µL加え，よく混合します。

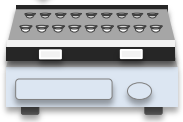
＊内液は，泡立たないよう静かにピペッティングで混合します。
＊内液50µL，外液0.5mLで反応させる場合は，それぞれ50µLおよび5µL加えます。

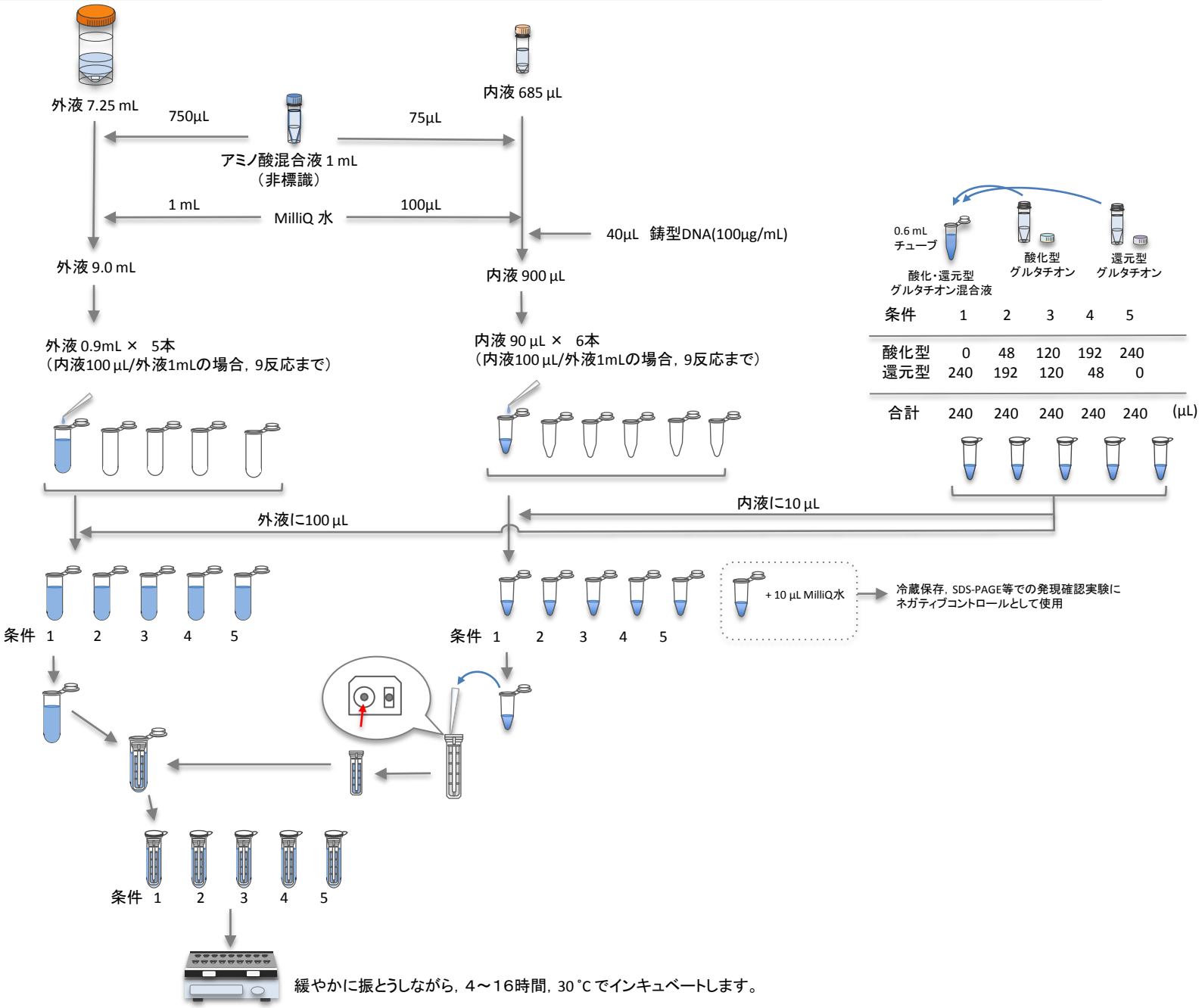


6



透析ユニットに内液100µLを入れ，外液の入った2mLチューブに差し込む。



緩やかに振とうしながら，4～16時間，30 ˚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)