

# Promega Notes 87 アブストラクト

## psiCHECK™ Vector: RNAiを最適化するための生物発光レポーター遺伝子の使用

psiCHECK™ Vectorは、RNA干渉 (RNAi) を最適化するための定量的、迅速なアプローチを提供します。このベクターを用いれば、融合されたレポーター遺伝子の活性をモニタリングすることにより標的遺伝子の発現変化を観察することができます。psiCHECK™ Vectorにクローニングされた標的遺伝子に対するRNA干渉が開始されて切断されると、引き続き融合されているウミシイタケルシフェラーゼRNA配列も分解されます。このRNA分解はルシフェラーゼ活性の低下を引き起こします。活性の低下はモニタリングことができ、標的遺伝子に対するRNAi効果の簡便な指標として使用することができます。そのため、psiCHECK™ VectorはRNAi活性を定量的に測定することができ、ハイスループットアプリケーションでの使用に簡単に応用することができます。

[本誌11ページ参照] Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_02/11527\\_02.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_02/11527_02.pdf)

## siSTRIKE™: ヘアピンのクローニングおよび発現を簡便化するDNA Directed RNA Interference

我々が開発したsiSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) は、ヒト細胞内での遺伝子発現を抑制するshort hairpin RNA (shRNA) をクローニングし発現させるためのシステムです。shRNA標的配列は、互いに相補する2つの1本鎖オリゴヌクレオチド (研究者ご自身が準備) の中に含まれています。この2つのオリゴヌクレオチドをアニーリングし、psiSTRIKE™ VectorのU6プロモーター下流にライゲーションします。この記事では、トランジェントおよびステイブルの両トランスフェクションでpsiSTRIKE™ Vectorによるウミシイタケルシフェラーゼおよびp53発現の効果的な抑制が認められたことを示します。

Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_07/11527\\_07.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_07/11527_07.pdf)

## siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning Systemのご紹介

siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning System (Human) は、ヒト細胞内でのshort hairpin siRNA配列を簡便、迅速に発現させるためにデザインされています。このシステムは、複数のsiRNA標的配列を迅速にスクリーニングするために、PCR産物を細胞に直接トランスフェクションします。最適な標的配列が選択されれば、目的の遺伝子をトランジェントに抑制するために消化済みのpsiLentGene™ Basic Vectorにサブクローニングするか、または、長期的なステイブル遺伝子抑制を行うために任意の抗生物質耐性マーカー (ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン) を含むベクターにサブクローニングすることもできます。

Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_11/11527\\_11.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_11/11527_11.pdf)

## 上皮性卵巣癌細胞株におけるカスパーゼ活性と化学物質に対する反応との相関性

治療効果の迅速な判定は、卵巣癌患者にとっては特に有益です。本研究では、薬剤誘発性のカスパーゼ活性化をウェスタンブロット法とCaspase-Glo™ Assayで求め、両測定結果の相関性を明らかにしました。我々は初期の研究において、細胞毒性物質に対する*in vitro*反応の評価法に、Caspase-Glo™ Assayが簡便、迅速かつ高感度な選択肢を提供することを既に実証しています。

[本誌18ページ参照] Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_15/11527\\_15.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_15/11527_15.pdf)

## Rapid Response™ Reporter Vectorのご紹介

転写活性の急速な変化に対するホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーターの応答性を高めるために、我々はタンパク質またはタンパク質/mRNAの分解配列を持つ不安定型ルシフェラーゼレポーターを構築しました。これらのRapid Response™ レポーターの半減期は60%以上短縮されています。そのため、転写率の急速な変化に対して迅速でより高い度合いで応答します。その結果、レポーター発現の最大誘導率到達時間が最大75%短くなるため、2次的影響に起因するアーティファクトのリスクを低減すると考えられました。

[本誌7ページ参照] Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_18/11527\\_18.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_18/11527_18.pdf)

## MagneGST™ Pull-Down Systemを用いたタンパク質間相互作用の検出

MagneGST™ Pull-Down System は、大腸菌で発現させたGST融合タンパク質とTNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systemを用いて*in vitro*で発現させた餌食タンパク質とのタンパク質間相互作用を検出するためにデザインされたシステムです。TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation反応で合成された餌食タンパク質はMagneGST™ (GST) Particleに固定化された餌タンパク質 (GST融合タンパク質) で補足されます。非特異的に結合したタンパク質は洗浄除去され、餌食タンパク質が分析されます。我々は本法について2つの異なるタンパク質間相互作用の系でテストし、RI標識法またはウエスタンブロットで検出結果を得ました。

Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_23/11527\\_23.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_23/11527_23.pdf)

## Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いた酵母内プラスミドの精製

酵母からのプラスミドDNA精製は、酵母の細胞壁やプラスミドのコピー数が少ないことからバクテリアに比べて困難です。本稿では、シリカメンブレン技術であるWizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemのプロトコルの1ステップを改変した酵母からのプラスミド精製について実証しました。

Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_27/11527\\_27.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_27/11527_27.pdf)

## 昆虫および哺乳動物細胞からの効率的なHisタグ-タンパク質の精製

この報告では、FastBreak™ Cell Lysis ReagentおよびMagneHis™ Protein Purification Systemを用いた昆虫、哺乳動物細胞のライセートおよび血清添加または無添加の培地からのHisタグタンパク質精製について実証しました。FastBreak™ Reagent, 10Xを細胞に直接添加すると、遠心や機械的な破碎をともわずに15分以内で穏やかに効率的に細胞を溶解しました。MagneHis™ Protein Purification Systemは、ライセートまたは培地中に存在するHisタグ-タンパク質の精製に使用することができます。そのためFastBreak™ ReagentとMagneHis™ Protein Purification Systemの組み合わせは、種々のサンプルタイプからの効率的なHisタグ-タンパク質精製に使用することができます。

Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_29/11527\\_29.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_29/11527_29.pdf)

## Q & A : セルベースのカスパーゼアッセイ・・・データの解析について

カスパーゼアッセイの進歩に伴い、データ解析時により細心の注意が必要であるとの考えが新たに生じてきました。アポトーシスのパラダイムを構築する際や、ホモジニアスカスパーゼアッセイの結果を解析する際には、細胞システムについてのいくつかの特徴を考慮に入れる必要があります。発光Caspase-Glo™ Assayに関するいくつかの一般的な質問から、こうした特徴が浮き彫りになります。

[本誌21ページ参照] Full Text [http://www.promega.com/pnotes/87/11527\\_33/11527\\_33.pdf](http://www.promega.com/pnotes/87/11527_33/11527_33.pdf)