



# MagZ™ System : ヘモグロビン混入のないHisタグ-タンパク質の精製とプルダウンアッセイ

By Becky Godat, M.A., Laurie Engel, B.S., and Tonny Johnson, Ph.D., Promega Corporation

## アブストラクト

この新規なタンパク質精製システムは、ウサギ網状赤血球をベースにしたタンパク質発現システムで合成したHisタグ-タンパク質の発現、精製、機能解析に関する可能性を広げます。MagZ™ Protein Purification Systemは、ニッケルをベースにしたシステムとは異なり、ヘモグロビンの共精製のないウサギ網状赤血球ライセートからのポリヒスチジン-タグ (Hisタグ) タンパク質の特異的な精製を可能にするユニークな特性を持っています。そのため、MagZ™ Systemで精製したタンパク質は、他のIMAC法では溶出サンプルに混入するヘモグロビンにより制限される様々なアプリケーションにも使用することができます。

## Hisタグ-タンパク質の精製手順

MagZ™ Systemを用いたTNT® Reticulocyte LysateからのHisタグ-タンパク質精製に関する3つの基本ステップを図1に示します。これらのステップは、Hisタグ-タンパク質がヘモグロビンの共精製なしに効率的に回収されるよう最適化されています。MagZ™ Binding Particlesの磁気特性によりシングルチューブでの精製が可能となり、引いては精製プロセスの簡素化および時間短縮が実現しました。

MagZ™ Protein Purification Systemは、Hisタグ-タンパク質がヘモグロビンの共精製なしに効率的に回収されるよう最適化されています。

## はじめに

*in vitro*発現タンパク質の利用は急激な成長を遂げている領域であり、応用分野としては基礎研究、分子診断およびハイスループットスクリーニングがあります (1 - 6)。ウサギ網状赤血球ライセートは真核細胞タンパク質の発現系であり、微生物ベースの*in vivo*発現系または無細胞 (S30) 発現系に優る利点をいくつか有しています。細胞ベースの発現系との比較では、ウサギ網状赤血球ライセートシステムは、発現cDNAライブラリーの迅速な機能スクリーニング法を提供します。さらに、この発現方法はハイスループットにも応用できます。Hisタグベクターで構築されたライブラリーは現在、ヒト、細菌、酵母および植物タンパク質に関して入手可能です。ウサギ網状赤血球ライセート発現システムは、これらcDNAライブラリーから発現したタンパク質の一次スクリーニングにとって強力なツールとなりえます。

Hisタグは最も汎用されているタンパク質融合タグですが、現在利用可能なニッケル精製システムでは、ウサギ網状赤血球ライセートで発現したHisタグ-タンパク質を精製する場合に制限があります。これは同精製システムがウサギ網状赤血球ライセート中に含まれるヘモグロビンをも共精製してしまうことによるもので、このことにより、蛍光ベースの機能分析またはタンパク質間相互作用試験への精製タンパク質の利用が制限されるだけでなく、タンパク質の精製量も減少します。

我々は、ウサギ網状赤血球ライセートで発現したHisタグ-タンパク質をヘモグロビンの混入をとまわずに精製できる新たなタンパク質精製システムを開発しました。本稿では、MagZ™ Protein Purification Systemのユニークな特徴について説明します。MagZ™ Protein Purification Systemがウサギ網状赤血球ライセートで発現したHisタグ-タンパク質を簡便かつ柔軟に精製する方法であり、ヘモグロビン混入がごく微量であることを示します。

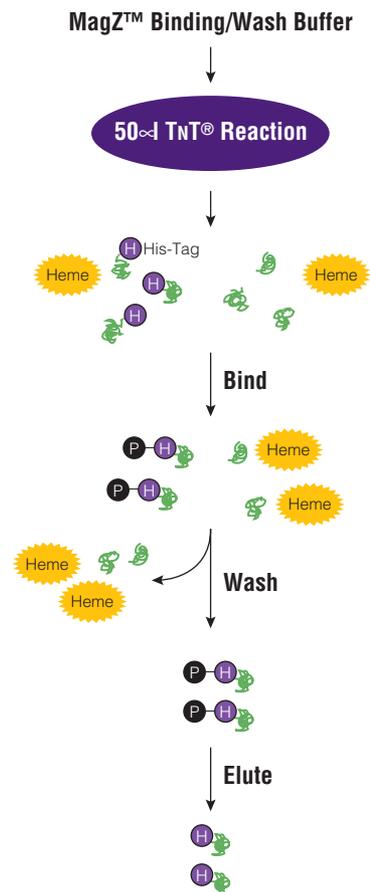


図1. MagZ™ Protein Purification Systemの操作概要

Hisタグ-タンパク質を発現するTNT®反応液をMagZ™ Binding/Wash Bufferで希釈し、MagZ™ Binding Particlesに添加。Hisタグ-タンパク質はインキュベーション中に同粒子に結合。その後、洗浄し、同粒子に結合していないタンパク質および非特異的に結合するタンパク質を除去。MagZ™ Elution Bufferを用いて、標的タンパク質を溶出。

## Hisタグ-タンパク質の精製

MagZ™ Systemは柔軟性が高いため、さまざまな標識および検出方法と併用できます。ウサギ網状赤血球ライセートで発現したHisタグ-タンパク質は、<sup>35</sup>SメチオニンまたはFluoroTect™ GreenLys *in vitro* Translation Labeling Systemで標識することができます。FluoroTect™ 標識したHisタグ-タンパク質はゲル分析により視覚化し、FluorImager® 上で読み取ることができます (図2)。

図3に示すように、フルオロメーターを用いたタンパク質の直接分析も可能であるため、タンパク質をゲル分析する必要がありません。本アプローチは無細胞系で発現したタンパク質の定量的な発現分析に使用することができました。<sup>35</sup>S-標識Hisタグ-タンパク質はゲル分析後、Storm® Phosphorimager® (Amersham) を用いて検出されます。我々の得た結果は、<sup>35</sup>SメチオニンまたはFluoroTect™ tRNAによる標識がMagZ™ Particles、引いてはウサギ網状赤血球ライセートで発現したHisタグ-タンパク質の精製と干渉しないことを示唆するものです。こうした結果は、タンパク質特異的抗体および抗ポリヒスチジン抗体を用いたウエスタンブロット分析によっても裏付けられました。

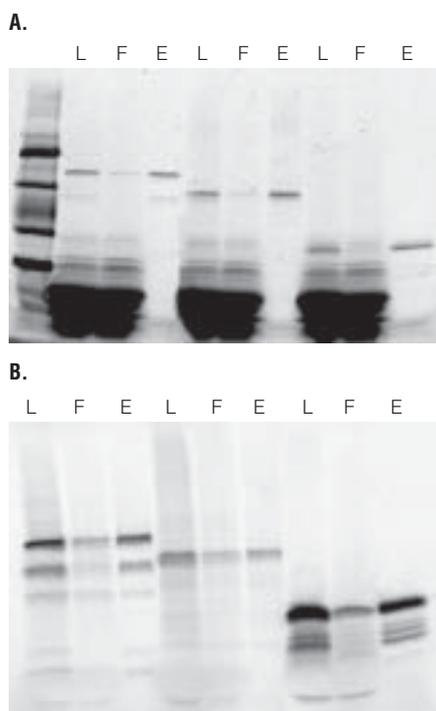


図2. FluoroTect™または<sup>35</sup>Sメチオニン標識Hisタグ-タンパク質のMagZ™ Protein Purification Systemによる精製

His-MAPK、His-HGFおよびHis-カルモジュリン (それぞれ53、42および25kDa) の発現には、TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号 L1170)、DNA 1µgおよびFluoroTect™ GreenLys tRNA (カタログ番号 L5001) または<sup>35</sup>Sメチオニン2µlを用いた。反応液は30分、60分間インキュベーションした。Hisタグ-タンパク質の精製には、MagZ™ Systemを用いた。手順としては、ライセート50µlとMagZ™ Binding/Wash Buffer 100µlを混和後、MagZ™ Binding Particles 60µlに添加し、オービタルシェーカー上で15分間インキュベーションした。MagZ™ Bind/Wash Buffer 200µlで4回洗浄し、Hisタグ-タンパク質をMagZ™ Elution Buffer (1Mイミダゾール) 100µlで溶出後、ゲル分析した。パネルA: FluoroTect™標識したタンパク質をFluorImager® (530nmフィルターを使用) を用いて視覚化した。レーンL, ライセート2µl; レーンF, 流出液6µl; レーンE, 溶出液8µl。パネルB: <sup>35</sup>S-標識したタンパク質をStorm® Phosphorimager® (Amersham) を用いて視覚化した。レーンL, ライセート2µl; レーンF, 流出液6µl; レーンE, 溶出液4µl。

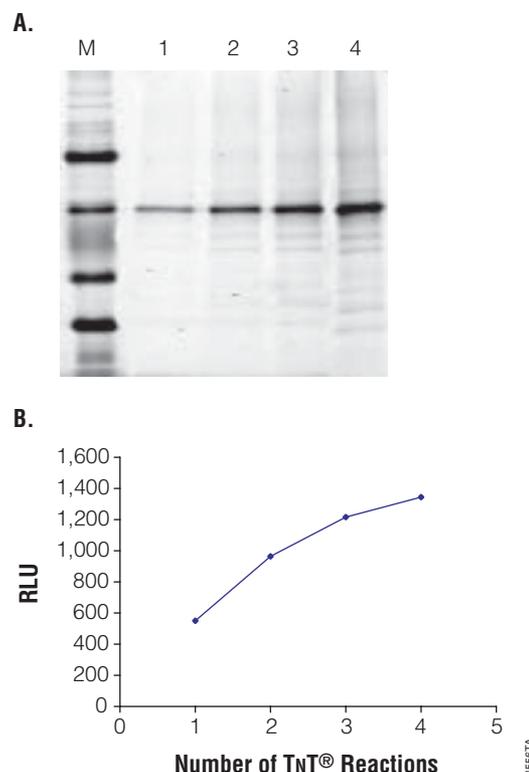


図3. Hisタグ-タンパク質精製のスケールアップ

MagZ™ Protein Purification Systemは、全サンプルでマスターミックス (TNT® ライセート中で発現させたHis-HGF 1mlとMagZ™ Bind/Wash Buffer 2mlの混合液) を用いたことを除き、図2に記載した手順通りに行った。マスターミックス150µlをMagZ™ Particles 60µlに添加後、図2の手順通りにインキュベーションした。Hisタグ-タンパク質を濃縮するため、同じMagZ™ Particlesにマスターミックスをさらに3回添加した。MagZ™ Particlesの洗浄およびサンプルの溶出は図2の記載通りに行った。パネルA: 蛍光分析後、溶出タンパク質をSDS-PAGEで分析し、FluorImager® (530nmフィルターを使用) を用いて視覚化した。レーンM, マーカー; レーン1, 1回分のTNT®反応液; レーン2, 2回分のTNT®反応液; レーン3, 3回分のTNT®反応液; レーン4, 4回分のTNT®反応液。パネルB: 溶出タンパク質はLabsystems社の96ウェル白色プレートに直接移し、Victor™ Multilabelリーダー (485/535nm) で読み取った。

ウサギ網状赤血球ライセートで発現したタンパク質をMagZ™ Protein Purification Systemを用いて精製した場合のヘモグロビン混入率は0.1%未満です。このことを実証するため、MagZ™ Systemと他の2種類のHisタグ-タンパク質精製システムを比較しました。TNT® Coupled Reticulocyte Lysateで発現したタンパク質の精製に各精製システムを用いて、溶出サンプルとTNT® Lysateのタイトレーション (0~5%) をウエスタンブロット分析により比較しました。MagZ™ Protein Purification Systemでは、ごく微量のヘモグロビン混入が認められるに過ぎません (図4)。ウエスタンブロット分析の結果、Hisタグ-タンパク質と共精製されるヘモグロビンの割合は0.15%未満であることが明らかになっています。事実、溶出タンパク質にヘモグロビンが混入した場合、タンパク質をゲル分析しなくても視覚化することができます (図4)。このことは、ニッケルベースのシステムが、蛍光ベースの分析に使用されるタンパク質の精製方法として限界があることを示唆するものでもあります。また、ヘモグロビン自体がバックグラウンド蛍光を生じることが、弊社のFluoroTect™実験で認められています (図2)。

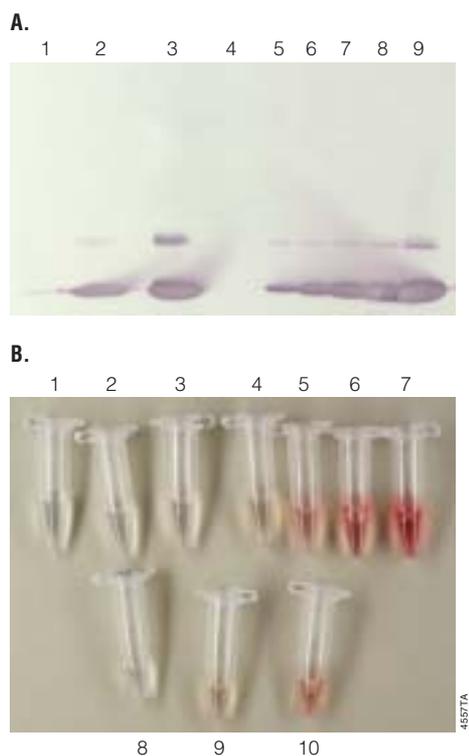


図4. 別のタンパク質精製システムを用いて精製したサンプルに含まれる混入ヘモグロビンの比較

MagZ™ Protein Purification System、MagneHis™ Protein Purification SystemまたはQiagen Ni-NTA磁性レジンを用いてライセート50μlを精製した。MagZ™およびMagneHis™ Systemは適切なマニュアル（それぞれ#TB336および#TM060）を用いて実施した。Qiagen Ni-NTA磁性レジンに製造元のプロトコールに従って使用した。パネルA：ウエスタンブロット分析による溶出液中のヘモグロビン検出。ヒツジ抗ヒトヘモグロビン-APを希釈倍率1:1,000で用い、Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase（カタログ番号 S3841）を用いてヘモグロビンを検出した。レーン1, MagZ™ Protein Purification System; レーン2, MagneHis™ Protein Purification System; レーン3, Qiagen Ni-NTA磁性レジン; レーン4~9, 0~5% (0, 0.15, 0.6, 1.25, 2.5, 5) のライセート希釈液。パネルB：チューブ1~7は、それぞれTNT®ライセート0, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5% を含有する。チューブ8：MagZ™ Systemからの溶出液、チューブ9：MagneHis™ Protein Purification Systemからの溶出液、チューブ10：Qiagenレジンからの溶出液。

## バックグラウンドの改善を目的としたイミダゾール濃度の最適化

MagZ™ Binding ParticlesからのHisタグ-タンパク質の溶出に用いるイミダゾール濃度は、最適化する必要があります。MagZ™ Binding ParticlesからのHisタグ-タンパク質の溶出条件はタンパク質の種類により異なります。すなわち、MagZ™ Binding ParticlesからHisタグ-タンパク質を溶出させるイミダゾール濃度は、タンパク質の種類によって異なります。例えば、His-カルモジュリンは100mMイミダゾールで溶出できる一方、His-アクチンの溶出には1Mを超えるイミダゾールが必要です（図5）。Hisタグ-タンパク質の市販品の多くは0.5Mイミダゾールで溶出されたものです。

1Mイミダゾールを用いた溶出条件では、MagZ™ ParticlesからのHisタグ-タンパク質の収率が最も高くなりますが、その一方、非特異的に

溶出されるタンパク質濃度も1Mより低濃度のイミダゾールを溶出に用いた場合と比較して高くなってしまいます。さまざまなタンパク質を用いた実験の結果、タンパク質の溶出に必ずしも1Mイミダゾールが必要でないことが明らかになりました。His-カルモジュリンなどの一部のタンパク質は100mMイミダゾールで溶出可能です（図5）。500mM以下のイミダゾールを用いた2種類の実験においては、バックグラウンドのタンパク質がほとんど検出されませんでした（図5、パネルA）。このため、弊社は標的タンパク質ごとにイミダゾール濃度を最適化することを強くお勧めします。

溶出条件を最適化する目的では、Nuclease-Free Waterで希釈することにより、MagZ™ Elution Buffer（1Mイミダゾール[pH 7.5]）の濃度をタイトレーションすることができます。例えば、MagZ™ Elution Bufferはイミダゾール濃度が50、100、250および500mMとなるよう希釈することができます。イミダゾールを最低濃度から最高濃度まで連続した条件で、Hisタグ-タンパク質をMagZ™ Binding Particlesから溶出させます。流出液を回収し分析に供します。イミダゾール濃度が50mM~1Mの条件で溶出させたFluoroTect™標識Hisタグ-タンパク質を、図5に示します。MagZ™ Elution Bufferをタイトレーションすれば、最低濃度のイミダゾールを用いることでバックグラウンドを最低限に抑えつつ、Hisタグ-タンパク質の収率を最大限に引き出すことができます。

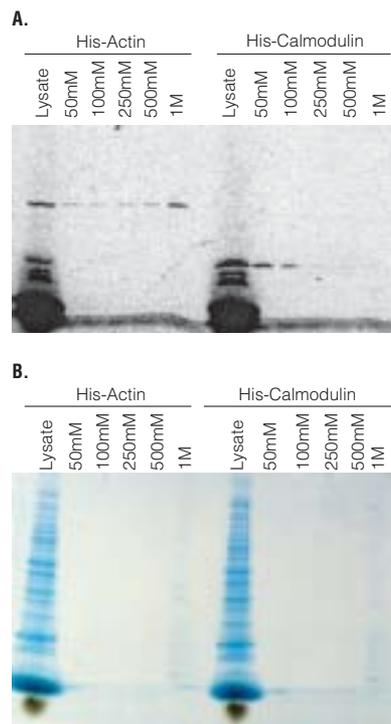


図5. 異なるHisタグ-タンパク質に用いる溶出条件の最適化

2種類のHisタグ-タンパク質（His-カルモジュリンおよびHis-アクチン）の発現にはTNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System、標識にはFluoroTect™ tRNAを用いた。Hisタグ-タンパク質の精製にはMagZ™ Protein Purification Systemを用いた。MagZ™ Elution Buffer（1Mイミダゾール[pH7.5]）をイミダゾール濃度が50、100、250、500mMとなるよう希釈し、最適な溶出条件を求めた。MagZ™ Binding Particlesは、最低濃度から最高濃度のMagZ™ Elution Buffer 希釈液 各100μlで洗浄した。パネルA：溶出サンプルを回収しSDS-PAGEで分析後、FluorImager®（530nmフィルターを使用）で視覚化した。パネルB：SimplyBlue™染色。

## 精製のスケールアップ

MagZ™ Purification Systemは、複数回の*in vitro*翻訳反応で発現したHisタグ-タンパク質の精製に使用することができます。精製のスケールアップ方法は2種類あります：1) *in vitro*翻訳反応液50μlを複数回分プール、2) 同じMagZ™ Particlesに*in vitro*翻訳反応液50μlを連続的に添加。前者の方法では、プールした*in vitro*翻訳反応の回数に比例した量までMagZ™ ParticlesおよびBinding Bufferを増やさなければなりません。例えば、*in vitro*翻訳反応液200μlの精製には、MagZ™ Particles 240μlおよびMagZ™ Binding Buffer 400μlを使用する必要があります。後者の方法では、*in vitro*翻訳反応液50μlの複数回分を初期設定量のMagZ™ Particlesに添加することができます。図3に示すこれらの試験結果は、*in vitro*翻訳反応液50μl 4回分がMagZ™ Particles 60μlに問題なく結合したことを示すものです。この方法は、複数回の*in vitro*翻訳反応で得た同一のHisタグ-タンパク質の効率的な精製方法であるものと考えられます。

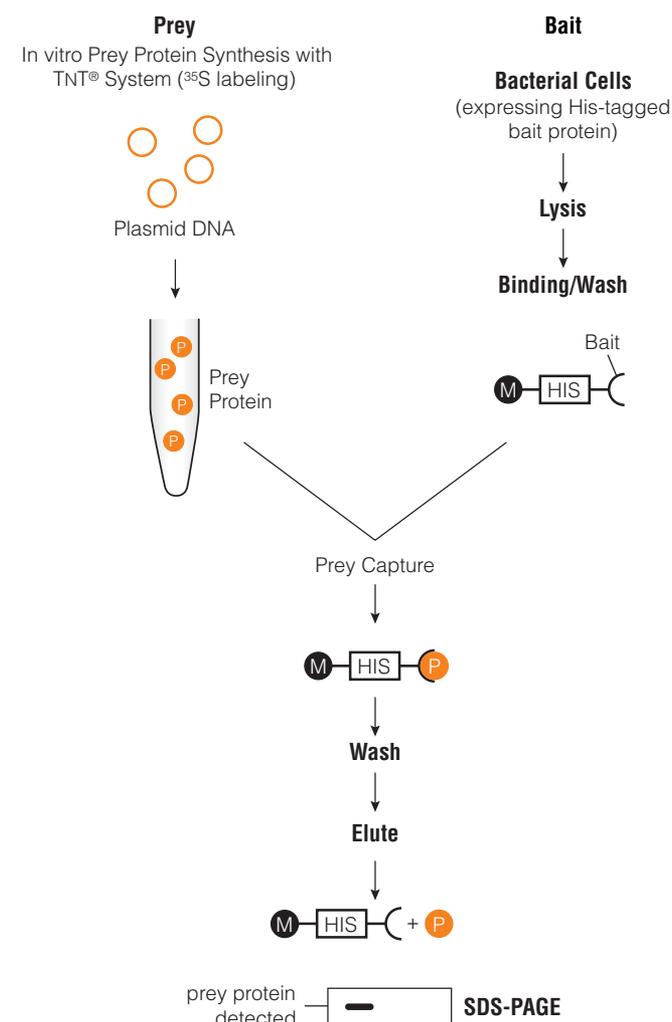


図6. MagZ™ Particlesを用いたHisタグプルダウンの概要 (P=餌食タンパク質)

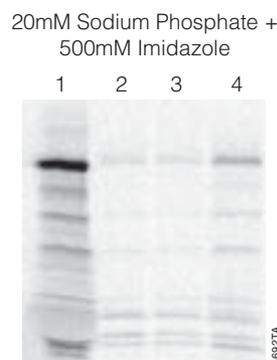


図7. MagZ™ Protein Purification Systemを用いたプルダウンアッセイ

HisタグIdは“餌”として使用した。標準的なプロトコルに従い、His-Idは大腸菌の中で発現/誘導された。菌体ベレットは10X濃度になるように再懸濁し、ソニケーションに供した。タグの無い“餌食”タンパク質であるMyoDは、1μg MyoD DNAおよび2μl [<sup>35</sup>S]メチオニンを用いてTNT® T7 Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号L1170)で発現させた。TNT® 反応はTechnical Manual (#TM045)に従い実施した。His-Id“餌”タンパク質を含む菌体ライセート100μlを30μl MagZ™ Binding Particlesに添加し、振とうしながら15分間インキュベーションした。MagZ™ Particlesは200μlの20mM リン酸ナトリウム (pH7.4) で3回洗浄し、30μl MagZ™ Binding/Wash Bufferに再懸濁した。5μlの粒子を新しいチューブに移し、175μl MagZ™ Binding/Wash Bufferに再懸濁した。TNT® 反応液20μlを、調製した“餌”側のHis-Id/MagZ™ Particlesに加え、振とうしながら60分間インキュベーションした。その粒子を同じ洗浄バッファーで3回洗浄し、固定した後、500mMイミダゾールによる洗浄を加えた。粒子に20μl SDSバッファーを添加し、振とうしながら5分間インキュベーションした後、サンプルを回収した。溶出したサンプルはSDSバッファーで10倍希釈し、95℃に加熱した後、4~20%トリス-グリシンゲルに添加した。ゲルはPVDF膜に転写し、PhosphorImager® plateに一晚露光し、Storm® fluorescent imagerで読込んだ。レーン1, TNT® Lysate ([<sup>35</sup>S]メチオニン標識)で発現させたMyoD; レーン2, MagZ™ Particles + MyoD; レーン3, MagZ™ Particlesに結合したHis-RNase H + MyoD; レーン4, MagZ™ Particlesに結合したHis-Id + MyoD。

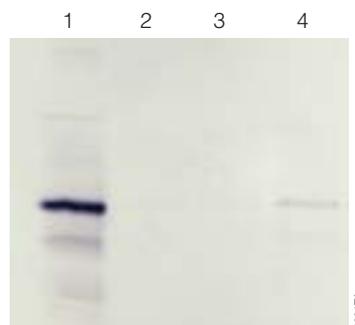


図8. ウェスタンブロット分析

図7のメンブレンをTBST/1% BSAで1時間、室温でブロッキングし、精製マウス抗MyoDモノクローナル抗体 (BD Biosciences Cat.# 554130) 1μg/ml (TBST)で1時間インキュベーションした。メンブレンをTBSTで3回洗浄し、TBSTで7500倍に希釈した抗体マウスIgG (H+L), AP Conjugate (カタログ番号S3721)を加え、1時間インキュベーションした。TBSTで3回洗浄した後、さらにTBSで2回洗浄した。バンドは、Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (カタログ番号S3841)を用いて可視化した。レーン1, TNT® Lysate ([<sup>35</sup>S]メチオニン標識)で発現させたMyoD; レーン2, MagZ™ Particles + MyoD; レーン3, MagZ™ Particlesに結合したHis-RNase H + MyoD; レーン4, MagZ™ Particlesに結合したHis-Id + MyoD。

## プルダウンアッセイ

近年のヒトのゲノムおよびプロテオームマッピングの進展にともない、機能プロテオミクスの主要な焦点の1つである全プロテオームのタンパク質間相互作用マップ (“ インタラクトーム ”) が明らかになってきました (12,13)。これまでに、酵母、細菌あるいは哺乳動物のツーハイブリットシステム、イムノアフィニティー精製、アフィニティータグをベースにした方法や質量分析などタンパク質間相互作用の研究では様々な手法が用いられてきました (総説12-14参照)。

酵母ツーハイブリットシステムはタンパク質間相互作用の分析法として最もよく知られている技術ですが、高い確率で生じる擬陽性および擬陰性など、いくつかの制限があります。そのため、酵母ツーハイブリットアッセイにより得られた実験結果は、*in vitro* タグベースプルダウンアッセイによる確認作業が必要な場合があります。さらにタグベースのアフィニティープルダウンによるアプローチは、ゲル分析や既知または未知の相互作用対象タンパク質の同定に有用な質量分析などの利用を可能にします。また *in vitro* プルダウンアッセイは、ツーハイブリットシステム同様に、タンパク質間相互作用のゲノムまたはプロテオームワイドな同定に使用することができます (13-17)。 *In vitro* プロテインプルダウンアッセイは、細胞のライセートや *in vitro* 発現ライセート、組織サンプルなどを用いて行うことができます。これらのオプションは、ツーハイブリットによるアプローチでは不可能です。さらに、Tandem Affinity Purification (TAP) など、*in vitro* プルダウンベースの技術はタンパク質複合体の単離に広く用いられています (18)。

## MagZ™ Systemを用いたプルダウンアッセイ

ウサギ網状赤血球ライセートはその簡便さから *in vitro* プルダウンアッセイに広く使用されており、TNT® Reticulocyte Lysateを用いたハイスループットなタンパク質間相互作用の同定なども報告されています (19-21)。しかし、ウサギ網状赤血球ライセートはHisタグをベースとするプルダウンアッセイの場合、Hisタグ-タンパク質とともにヘモグロビンが共精製されてしまうため制限がありました。MagZ™ Protein Purification Systemを用いることにより、ウサギ網状赤血球ライセートで発現したHisタグ-タンパク質は、ヘモグロビンの混入をとまわずに精製することができます (図6; 22)。我々はこれを検証するためにID-MyoDタンパク質相互作用システムを利用しました。

MyoDは骨格筋に発現する筋分化調節タンパク質であり、Idタンパク質は筋分化に対する負の調節を担っています。MyoDおよびIdは核タンパク質のヘリックス-ループ-ヘリックスファミリーのメンバーでもあります。これまでに様々な方法によるMyoD-Idの相互作用が報告されています (23,24)。図7ではMagZ™ Particles を用いたHisタグプルダウンアッセイによるHis-Id-MyoD相互作用の検出結果を示しています。様々な条件をテストした結果、洗浄の条件に 40mMのイミダゾールを加えることにより、Id-MyoD相互作用のアッセイが最適化されました。これらの結果により<sup>[35S]</sup>メチオニン標識したMyoDのプルダウンがIdタンパク質依存性であることが分かりました。

MyoDのMagZ™ Particlesへの非特異的結合が認められましたが、His-Id-MyoD相互作用はコントロールに比べ2~3倍強く、洗浄条件に依存していました。我々はさらにこれらの結果をウエスタンブロッティング分析により確認しました (図8)。興味深いことに、Id-MyoD相互作用は、500mMという高いイミダゾール濃度でも安定でした。表1に文献で記述されているいくつかの結合/洗浄バッファーの例を示します。標準的な相互作用と洗浄用バッファーのイミダゾール濃度は5~50mMで、塩濃度は100~300mMであり、異なる相互作用の実験にはそれぞれ異なる条件が必要であることを示していました。

表1. Hisタグ プルダウンアッセイに使用された結合/洗浄バッファー

Binding/Wash Buffer	Pull-Down Expression System	Reference
50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.3% Nonidet® P-40, 10mM ZnCl <sub>2</sub> , 1mM DTT, 0.35% BSA	TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate	19
20mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Nonidet® P-40, 1mM DTT	TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate	20
50mM Tris-HCl (pH 7.5), 300mM KCl, 20-30mM imidazole	TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate	21
20mM Tris-HCl (pH 7.6), 100-125mM NaCl, 15mM imidazole, 1% Nonidet® P-40	Gold TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate	24
20mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM NaCl, 15mM imidazole, 10% glycerol	Crude insect cell extracts	25
20mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 10-15mM imidazole, 1% Triton® X-100	Crude cell extracts	26
20mM MOPS (pH 7.0), 4.5mM MgCl <sub>2</sub> , 150mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton® X-100, 50mM imidazole	Cell lysate	27
10mM Tris-HCl, 100mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25mM imidazole, 1% Nonidet® P-40	Cell extract	28
20mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 100mM NaCl, 15mM imidazole	Cell extract	29
50mM phosphate buffer (pH 8.0), 300mM NaCl, 2mM BME, 10-20mM imidazole	Cell extract	30
20mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 90mM KCl, 10mM BME, 50µg/ml ethidium bromide, 0.1% Triton® X-100, 20mM imidazole, 20µg/ml BSA	Cell extract	31
PBS, Tween®-20	Purified protein	32
10mM HEPES (pH 7.4), 200mM KCl, 10% glycerol, 0.25% Triton® X-100, 30mM imidazole, 0.2mM EDTA, 10mM BME	Cell lysate	33
50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8), 300mM NaCl, 20mM imidazole	Purified protein	34
10mM Tris buffer (pH 7.9), 50mM NaCl, 50mM imidazole	Purified protein	35

## 結論

本稿に提示したデータから、MagZ™ Protein Purification Systemがウサギ網状赤血球ライセートからHisタグ-タンパク質を簡便かつ迅速に精製する方法であることが明らかになっています。MagZ™ Systemのユニークな特徴は、混入ヘモグロビンを99.9%除去しつつ、ウサギ網状赤血球ライセートからHisタグ-タンパク質を精製できる点です。ヘモグロビンの除去は、*in vitro*発現クローニング(7)、Hisタグのプルダウン実験(8)、リボゾームディスプレイ(9)、*in vitro*変異誘発(10)、人工分子進化(directed-evolution)試験(11)といった精製後の用途にとってきわめて有益です。本システムは柔軟性が高いため、FluoroTect™ System、<sup>35</sup>S]メチオニンのいずれで標識したHisタグ-タンパク質をも検出可能で、精製されたタンパク質はゲル分析、FluorImager®またはウエスタンブロット分析により視覚化することができます。

## 参考文献

1. Yokoyama, S. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 39–43.
2. Sawasaki, T. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14652–7.
3. Tabuchi, M. *et al.* (2002) *Proteomics* **2**, 430–5.
4. *In Vitro Expression Guide* (2000) Promega Corporation.
5. Smutzer (2001) *The Scientist* **15**(1), 22, .
6. Martin, K. (1999) *Promega Notes* **70**, 2–6
7. Stemmann, O. *et al.* (2002) *Promega Notes* **80**, 2–4.
8. Brix, J., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20730–5.
9. He, M. and Taussig, M.J. (1997) *Nucl. Acids Res.* **25**, 5132–4.
10. Hohsaka, T., Fukushima, M. and Sisido, M. (2002) *Nucl. Acids Res. Suppl.* **2**, 201–2.
11. Nord, O., Uhlen, M. and Nygren, P.A. (2003) *J. Biotechnol.* **106**, 1–13.
12. Li, S. *et al.* (2004) *Science* **303**, 540–3.
13. Huzbun, T. *et al.* (2003) *Mol. Cell.* **12**, 1353–65.
14. Zhu, H., Bilgin, M. and Snyder, M. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 783–812
15. Graves, P. and Haystead, T. (2003) *Recent Prog. Horm. Res.* **58**, 1–24.
16. Takahashi, N. *et al.* (2003) *J. Nutr.* **133**, 2090S–6S.
17. Hasse, J. *et al.* (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 722–8.
18. Forler, D. *et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* **21**, 89–92.
19. Charron, F. *et al.* (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 4355–65.
20. Wang, S. *et al.* (2001) *J. Virol.* **75**, 11961–73.
21. Pflieger, C., Lee, E. and Kirschner, M. (2001) *Genes and Development* **15**, 2396–407.
22. Godat, B., Engel, L. and Johnson, T. (2004) *Promega Notes* **88**, 9–12.
23. Ray, P. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3105–10.
24. Paulmurugan, R. and Gambhir, S. (2003) *Anal. Chem.* **75**, 1584–9.
25. Pridgeon, J., Geetha, T. and Wooten, M. (2003) *Biol. Proceed. Online* **5**, 228–37.
26. Tetel, M. *et al.* (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 910–24.
27. Ito, M. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9029–37.
28. Evans, G. and Morgan, A. (2002) *Biochem. J.* **364**, 343–7.
29. Zanata, S. *et al.* (2002) *EMBO J.* **21**, 3307–16.
30. Boonyaratanakornkit, V. *et al.* (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 4471–87.
31. Bell, S. *et al.* (2001) *EMBO* **2**, 133–8.
32. Chen, H. *et al.* (2002) *J. Virology* **76**, 5233–50.
33. Fanger, C. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5746–54.
34. Demetree, E. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35746–51.
35. Qian, X. *et al.* (2002) *Biochem. J.* **361**, 27–34.

## プロトコル

- ◆ *MagZ™ Protein Purification System Technical Bulletin*#TB336, Promega Corporation.  
([www.promega.com/tbs/tb336/tb336.html](http://www.promega.com/tbs/tb336/tb336.html))
- ◆ *MagneHis™ Protein Purification System Technical Manual*#TM060, Promega Corporation.  
([www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html](http://www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html))
- ◆ *TNT® T7 Coupled Transcription/Translation System Technical Manual* #TM045, Promega Corporation.  
([www.promega.com/tbs/tm045/tm045.html](http://www.promega.com/tbs/tm045/tm045.html))

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格( ¥ )
MagZ™ Protein Purification System	30 回分	V8830	36,000