

Promega Notes 91 アブストラクト

MagneHis™ 粒子を用いた自動化ハイスループットタンパク質精製

タンパク質のハイスループット合成は、様々な代謝経路に関連する複数のタンパク質ファミリーの研究を促進させています。精製タンパク質は、治療法の発見や診断のための生化学的または免疫学的なアッセイ法で数多くのアプリケーションの開発に寄与してきました。これらのアプリケーション用の精製タンパク質を合成するために自動化タンパク質精製ラインを開発しました。この96ウェルフォーマットラインの基本構成には、クローンの作製、タンパク質の発現と精製が含まれます。菌体の培養と発現は、必要に応じて液体分注ロボットを用いた96ウェルプレート、ディープレックで行いました。我々は、磁性体粒子をベースとしたアフィニティ精製法により、Biomek® FXを用いたタンパク質精製工程の完全自動化を実施しました。本稿では自動化アフィニティタンパク質精製の工程について概説し、精製例として48種類のポリヒスチジンタグタンパク質の精製について紹介しました。この精製ラインにより、1ml培養液から純度 約90%のタンパク質10µg以上を安定して回収することができました。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/91/12972_02/12972_02.pdf

カルパイン活性の生物発光アッセイ

我々は、プロテアーゼであるカルパインIおよびIIを定量する非常に感度の高いアッセイ法を開発しました。Calpain-Glo™ Protease Assayは、サンプル中に存在するカルパイン量に比例した発光シグナルを生じる迅速で、ホモジニアスなアッセイシステムです。Calpain-Glo™ Protease Assayでは、組換え耐熱性ルシフェラーゼであるUltra-Glo™ Luciferaseを利用しており、感度が飛躍的に改善され、広い活性測定レンジを有しています。

[本誌3ページ参照] Full Text → http://www.promega.com/pnotes/91/12972_06/12972_06.pdf

Pronto!™ Plus Indirect Systems: マイクロアレイベースの転写プロファイリングのための蛍光標的cDNA合成：プライマーおよび鋳型RNAに関する考察

DNAマイクロアレイは、2つ以上の検討条件下で転写物の相対量を決定するために最も汎用されている手法です。この手法では通常、異なる蛍光スペクトルを持つ蛍光タグを付帯するヌクレオチドまたは後で蛍光タグを結合させるための修飾ヌクレオチドの存在下でcDNAを合成します。現在用いられる様々な方法は標識効率やcDNA収量がそれぞれ異なります。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/91/12972_10/12972_10.pdf

GoTaq® Green Master Mix：増幅から分析まで

プロメガのPCR関連製品ラインの中で最も新しいGoTaq® Green Master Mixは、簡便で、ゲルへのローディングまでを迅速に行うことができ、操作ステップが少なく、コンタミネーションの可能性を最低限に抑えることができます。マスターミックスには全ての必要な成分が含まれるため、あとはご自身のプライマー、鋳型、水を加えるだけです。GoTaq® Green Master Mixは、GoTaq® Green Reaction Bufferが有する便利なゲルへの直接添加方式とマスターミックスの利便性を統合した試薬です。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/91/12972_13/row/12972_13.pdf

Flexi® Vectorを用いたタンパク質発現／精製用金属親和性タグ

我々は組換えタンパク質を精製するための新しい金属親和性タグ、HQタグを開発しました。HQタグはクローニングおよび発現を簡便にするFlexi® Vectorに組み込まれています。タンパク質コード領域は他種Flexi® Vectorから簡便、効率的にこの親和性タグベクターに移し換えることができます。HQ Flexi® Vectorはタグの位置、および抗生物質耐性をお選びいただくために4つのフォーマットを準備しています。HQタグは、細菌からの精製に使用されるポリ-ヒスチジンタグ（Hisタグ）と類似した機能を有しています。しかし、多くのHQタグタンパク質は低濃度のイミダゾールでアフィニティカラムから溶出することができます。HQタグのこのような特性は、酵素反応など下流のアプリケーションに有用です。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/91/12972_17/12972_17.pdf

無細胞抽出物液による可溶性ネイティブ-ヒトタンパク質の発現

本稿では、55種類の異なるヒトタンパク質をコードするFlexi® Vectorプラスミドを用いて、Wheat Germ Extract Plusと2つの大腸菌発現系における可溶性ネイティブ-タンパク質の発現を比較しています。大腸菌で発現したタンパク質はたったの3つ（全て可溶性）だけでしたが、E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNAを使うことで、この数は42に増加しました。しかし、これらのタンパク質のうち可溶性画分に発現したものは10種類のみでした。これとは対照的に、Wheat Germ Extract Plus では55種類全てのタンパク質が可溶性画分に発現し、さらにバッチモードと比較すると、透析モードでは4倍近い収量が得られました。

[本誌12ページ参照] Full Text → http://www.promega.com/pnotes/91/12972_21/12972_21.pdf