

Promega Notes 95 アブストラクト

TSAP: 新しい熱失活性アルカリホスファターゼ

新しい熱失活性アルカリホスファターゼは、MULTI-CORE™ Bufferを含むプロメガの全ての制限酵素バッファーおよびGoTaq® バッファー中で活性を持ちます。頑健なホスファターゼ活性は37℃、15分以内に全てのDNA末端(5'、3' 突出および平滑)から効率的にリン酸を除去します。TSAPは制限酵素バッファー中で活性を持つため、制限酵素消化と脱リン酸化処理を同時に行うこともできます。

Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_03/14867_03.pdf

STAT5活性におけるPIASyによる調節：異なるレポーターベクターが有する異なる応答性

ルシフェラーゼレポーターベクターは、遺伝子発現調節の研究で広く使用されていますが、ベクターによっては不可解なシス作用性調節配列が含まれるために、予期しない転写因子により活性化され、変則的な応答を引き起こす場合があります。本稿ではデュアルレポーターアッセイを用いて、インスリンノーマ (INS-1)細胞におけるSTAT5の転写活性をPIASyが調節するか否かを調べました。予想に反してpRL-null VectorにコードされるウミシイタルシフェラーゼはPIASy (STAT阻害剤 E3-SUMOリガーゼ) に強く制御されました。pRL-null Vectorの骨格に3つの未知STAT5調節エレメントの存在が明らかになりました。これらのエレメントやその他多くの転写因子結合サイトが除去されたpGL4.70 [hRluc] Vector は、PIASyの機能を調べる上でより信頼性が高いことが確認されました。

Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_05/14867_05.pdf

哺乳動物細胞における新規なタンパク質発現制御システム

今回、哺乳動物細胞においてタンパク質発現を厳密にコントロールできるRegulated Mammalian Expression Systemについてご紹介いたします。このシステムは遺伝子の発現制御を行うためにクメリンベースの化合物を使用し、低レベルの基底発現活性から高レベルの発現活性へと誘導することができます。さらに、ノボビオシンの添加により目的遺伝子の発現を停止させることができます。転写活性化因子発現のためのユニークな自己増幅回路によりシステムを頑強にし、潜在的な宿主側の遺伝子発現に及ぼす影響を最低限に抑えることができます。

[本誌3ページ参照] Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_08/14867_08.pdf

Maxwell® 16 Polyhistidine Protein Purification Kit: 最大のパフォーマンスと利便性を備えた自動タンパク質精製

Maxwell® 16 Polyhistidine Protein Purification Kitは、細菌、哺乳動物細胞、昆虫細胞、培地など複数のサンプルタイプよりポリ-ヒスチジンタグタンパク質をシンプルかつ効率的に精製することができます。また、本システムは細菌サンプルよりHQタグタンパク質も精製することができます。最適化された自動化法、コンパクトな機器、プレパックされた試薬カートリッジはタンパク質精製にかかる時間を最小限にし、最大のパフォーマンスを発揮します。精製したタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および検出、機能実験、ウェスタンブロット分析、質量分析など様々な用途に使用することができます。本稿では、低-中スループットの自動タンパク質精製のためのMaxwell® 16 Polyhistidine Protein Purification Kitのパフォーマンスについて説明いたします。Maxwell® 16 Systemによる精製は、マニュアルによる精製法と同等以上の結果を示しました。

Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_12/14867_12.pdf

細胞表面におけるHaloTag® テクノロジー：空間的な分離と双方向的なタンパク質の輸送

生細胞内でタンパク質を特異的に標識する技術は、タンパク質のダイナミクスや機能に関する重要な情報を提供してくれる可能性があります。本稿では、異なる波長の蛍光物質を特別に設計したHaloTag® レポータータンパク質に共有結合でつなぎ止める技術を使用しました。我々は欠失型インテグリンに融合させたHaloTag® レポータータンパク質を細胞表面で発現させました。さらに、新規な細胞膜非透過性の蛍光物質を開発しました。異なる蛍光色を持つ細胞透過性または非透過性の蛍光物質を用いることにより、細胞膜タンパク質プールと細胞内タンパク質プールの空間的な分離状態を可視化することができました。識別可能な蛍光物質で標識した欠失型インテグリンタンパク質をリアルタイムで追跡することができ、細胞表面タンパク質プールと細胞内タンパク質プールの転移を研究する上で有用です。HaloTag® -インテグリン融合タンパク質を用いることで、HaloTag® テクノロジーが生細胞内におけるタンパク質プールの空間的な分離とリアルタイムな転移を研究する上で強力なツールであることを示しました。

[本誌7ページ参照] Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_16/14867_16.pdf

HaloTag® タンパク質：ヒト神経幹細胞のための新規なレポータータンパク質

幹細胞やそれに関連するタンパク質は、多くの科学研究でフォーカスされています。幹細胞内で特定のタンパク質を標識できる技術は、タンパク質のダイナミクスと機能に関する重要な情報を提示します。本稿で我々は、特別に設計されたレポーターHaloTag® タンパク質に異なる波長の蛍光物質を共有結合させる技術を用いました。HaloTag® タンパク質単独あるいは目的タンパク質と融合したものをヒト神経幹細胞 (hNSC) で発現させ、いくつかのHaloTag® リガンドによる標識に成功しました。異なる色の細胞非透過性および細胞透過性の蛍光物質は、生きたhNSCにおいて細胞膜タンパク質プールと細胞内タンパク質プールの空間的分離およびリアルタイムでの移行を示しました。さらに、HaloTag® タンパク質はhNSCから神経細胞やアストロサイトへの分化後も引き続き発現します。そのため、HaloTag® テクノロジーは、幹細胞におけるタンパク質生物学をより深く調べるための新しい研究ツールとしての使用をはじめ、その他様々な目的タンパク質の研究に使用することができます。

[本誌11ページ参照] Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_20/14867_20.pdf

ウェスタンブロットングおよび免疫細胞染色のためのポリクローナルHaloTag® 抗体

本稿では精製したHaloTag® タンパク質に対して作製されたポリクローナル抗体についてご紹介いたします。抗体のエピトープへの結合に対してリガンドの結合は顕著な影響を与えないため、HaloTag® リガンドとの共標識を行うことができます。Anti-HaloTag® pAbは、発色または化学発光検出のための標識抗ウサギ2次抗体によるウェスタンブロットングや免疫細胞染色に使用することができます。

[本誌14ページ参照] Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_23/14867_23.pdf

EnduRen™ Live Cell Substrateを用いた生きたマスのウィルス検出のための生物発光イメージング

我々は生きた魚を用いた新しい生物発光イメージング法について概説します。若いマス (Trout) におけるウィルスファミリー *Rhabdoviridae* の1メンバーの進入経路と発病の研究を行うためにHarmacheらはユニークな生魚イメージングシステムおよび生物発光を用いました。彼らは様々な病原性および非病原性の *Novirhabdoviridae* 分離株を用いて、様々な感染後時間に魚体を調べ、ウィルスの進入場所と複製場所を明らかにしました。

Full Text www.promega.com/pnotes/95/14867_25/14867_25.pdf