

抗 RPA (ヒト)抗体、ウサギポリクローナル

商品コード	70-085
容量	100 µg
保存	-20°C
濃度	1.0 mg/ml
バッファ	PBS- with 50% グリセロール
調製法と純度	ヒト RPA で免疫したウサギ血清より protein A によって精製した IgG 分画 (Fig. 1)
抗原	293T ヒト細胞抽出液から ssDNA agarose を使って精製した天然型 RPA 複合体
反応性	この抗体はヒト細胞抽出液を使ったイムノブロットで RPA2 サブユニットを強く検出し、RPA1 サブユニットにはそれよりも弱く反応する。RPA3 はほとんど検出されない(Fig. 2)。他の生物種の RPA に対する反応性は調べていない。
特異性	反応の特異性は免疫沈降した試料に対するイムノブロットで確認した (Fig. 3)。
用途	1. イムノブロット (1 µg/ml; Fig.2) 2. 蛍光染色 (1 µg/ml; Fig.4) 3. 免疫沈降 (µg/l with ProteinG Plus Agarose). 本抗体はヒト 293T 細胞抽出液より RPA 複合体を沈降する (Fig. 3).
背景	RPA (replication protein A) は p70 (RPA1; HGNC:10289)、p34 (RPA2; HGNC:10290)、p14 (RPA3; HGNC:10291)の3つのサブユニットからなる3量体複合体で真核生物で高度に保存された一本鎖 DNA 結合タンパク質である。RPA は SV40 ウイルス DNA の試験管内複製反応で必須のタンパク質として同定され RFA (replication factor A) や HSSP (human single-stranded DNA binding protein)とも呼ばれた(PNAS 1987, 84, 1834-8, EMBO J 1988, 7, 1211-8, PNAS 1988, 85, 2523-7)。このタンパク質は、一本鎖 DNA 結合活性により DNA-タンパク質複合体を形成し、細胞内の一本鎖 DNA を DNA 分解酵素や高次構造形成から守り、ゲノム安定性維持に関与する因子の集合や解離を調節する。したがって、複製、修復、組換えの多様な DNA 代謝過程に要求され(ref. 1, 2)、ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related タンパク質キナーゼを介した細胞の DNA 損傷応答を制御する。細胞内では RPA が一本鎖 DNA に結合した時 (S 期中または DNA 損傷後)、RPA2 が DNA 依存タンパク質キナーゼによってリン酸化されることが知られている (ref. 3)。
データリンク	UniProt P27694 (RFA1_HUMAN), P15927 (RFA2_HUMAN), P35244 (RFA3_HUMAN)
注意：本製品は研究用として販売しており、動物への医療、臨床診断用、軍事的には使用しないようお願いします。	

画像: 70-085 抗 RPA (ヒト)抗体、ウサギポリクローナル

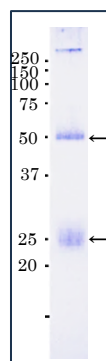


Fig. 1 精製した抗-RPA (ヒト)抗体

10 μ g の精製した抗-RPA (ヒト)抗体 (IgG 分画)を 12.5% SDS-PAAG で泳動し CBB 染色した。IgG の heavy と light 鎖を矢印で示した。

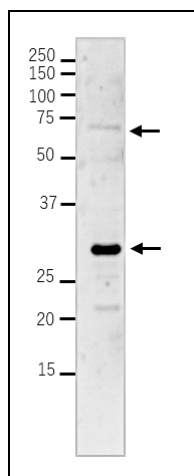


Fig. 2 抗-RPA (ヒト)抗体を使ったヒト 293 細胞抽出液中の内在性 RPA のイムノプロットによる検出

20 μ g の 293T 細胞抽出液を 12.5% SDS-PAAG で泳動しウエット転写装置を使って PVDF 膜に 15V で一晩転写した。これに 1 μ g/ml の抗-RPA (ヒト)抗体による 145 分間処理と 1/10,000 希釈した Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)による 90 分間処理を行なった。反応した抗体は Immunostar zeta reagent (291-72401, wako)によって検出した。下側矢印は強い RPA (34kDa)のバンドで 上側矢印は弱い RPA1 (70kDa)のバンドを示す。RPA3 (14kDa) のバンドはこの抗体ではほとんど検出されない。

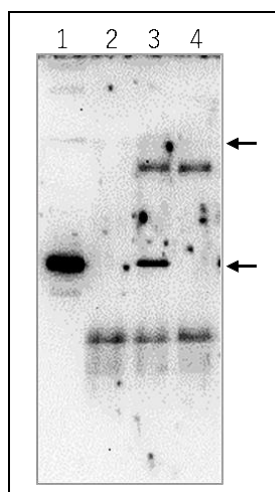


Fig. 3 ヒト 293 細胞抽出液中の内在性 RPA の免疫沈降

500 μ g の 293T 細胞抽出液を 1 μ g の抗-RPA (ヒト)抗体と混ぜ 4 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。さらに 20 μ l の ProteinG Plus Agarose を加え 4 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。この Agarose ビーズで沈降した試料の 25%を 12.5% SDS-PAAG で泳動し反応したバンドを Fig. 2 と同様にして検出した。

Lane 1: 34 μ g の 293T 細胞抽出液

Lane 2: 抗体非添加の場合の細胞抽出液からの免疫沈降試料

Lane 3: 1 μ g の抗-RPA (ヒト)抗体を添加した際の細胞抽出液からの免疫沈降試料

Lane 4: 1 μ g の抗-RPA (ヒト)抗体を添加した場合の細胞抽出液非添加の場合の免疫沈降試料

RPA1 と 2 のバンドが抗-RPA (ヒト)抗体を加えた場合に検出される (Lane 3)

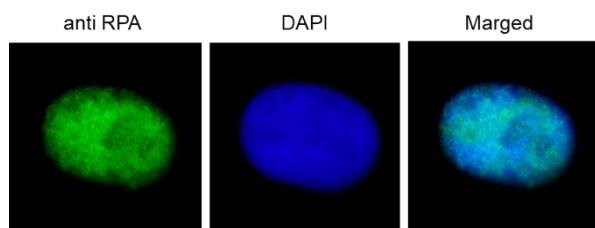


Fig. 3 蛍光染色による HeLa cell 核の染色

培養した HeLa 細胞を 4% PFA で 4°C 固定し、0.25 % Triton X-100 を加えた PBS- で 10 min 透過処理を行った。さらに BSA を含む PBS- で室温、75 分間ブロッキングをした後、1μg/ml of anti-RPA antibody を加え 4°C で一晩培養した。反応した抗体は 1/1000 希釈した

Goat anti rabbit IgG-H&L (Alexa Fluor 488) (ab150077) で 70min 処理して検出した。DAPI 染色は 1.0 μg/ml DAPI を含む TBS で 5 min 処理で行った。蛍光シグナルは Nikon LED (Ts2) system (Filter cube; C-LED470) を使って検出した。この抗体によって核が特異的に染色されることが観察された。

参考文献：

1. [Replication Protein A, the Main Eukaryotic Single-Stranded DNA Binding Protein, a Focal Point in Cellular DNA Metabolism](#) Nasheuer HP, Meaney AM, Hulshoff T, Thiele I, Onwubiko NO. Int J Mol Sci. 2024 25 588. doi: 10.3390/ijms25010588 PMID: PMC10779431
2. [Replication protein A: a multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond](#) Dueva R, Iliakis G. NAR Cancer. 2020 2 doi: 10.1093/narcan/zcaa022 PMID: PMC8210275
3. [Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes](#) ShaoRG, Cao CX, Zhang H, Kohn KW, Wold MS, Pommier Y. EMBO J. 1999 18 1397–1406. doi:10.1093/emboj/18.5.1397 PMID: PMC1171229

関係商品: