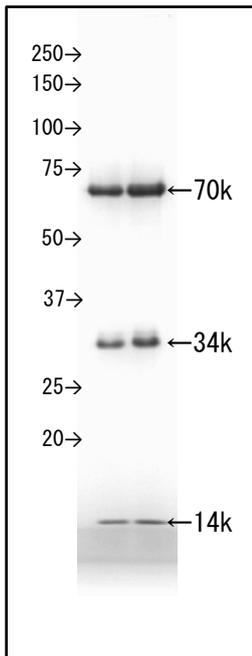


ヒト RPA タンパク質, 一本鎖 DNA 結合タンパク質 His₆ タグ付き (HishRPA)

商品コード	02-046
容量	50μg
保存	-20℃
濃度	1 mg/ml
バッファ	20mM Hepes NaOH (pH8.0), 1mM EDTA, 0.01% NP40, 0.3M NaCl, 50% glycerol, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 2μg/ml leupeptine (防腐剤、キャリアタンパク質を含まない)。
調製法と純度	ヒト RPA の3つのサブユニット(RPA1-3)の全長 DNA (RPA1 の N 末に His ₆ ペプチドタグが付けてある) を発現するプラスミド DNA を導入したヒト 293T 細胞抽出液から DEAE-sepharose (Cytiva 17070910), Ni-NTA agarose (Qiagen)、ssDNA cellulose (自社調製)を使って精製した。精製された HishRPA は 70kDal, 34kDal, 14kDal のペプチドバンドから構成され、95%以上の純度を持つ (Fig. 1)。
活性	本精製品を使うと電気泳動度シフト法で一本鎖 DNA (ssDNA)特異的な結合活性を検出することができる (Fig. 2)。
用途	<ol style="list-style-type: none"> EMSA による ssDNA 特異的結合の検出(Fig. 2)。 複製、修復、組換え、DNA 損傷応答の生化学的反応の構成因子として使用。 RPA 結合因子のプルダウン解析
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)
関係商品	70-085 抗 RPA 抗体, ウサギポリクローナル 02-040 T4 SSB (gene32)タンパク質 02-042 E. coli SSB タンパク質 02-044 Taq SSB タンパク質
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、軍事目的には使用しないようお願いします。	

画像: 02-046 ヒト RPA タンパク質, 一本鎖 DNA 結合タンパク質(His6 タグ付き HishRPA)

Fig. 1 精製した HishRPA

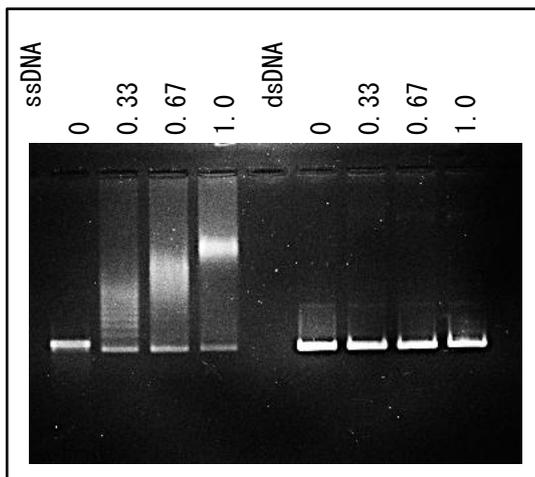


精製した HishRPA、それぞれ 3.2 μ g (左)、または 6.4 μ g (右) を 12.5% SDS-PAAG で分離し CBB 染色した。右側の分子量を記載した矢印は、それぞれ RPA の 3 つのサブユニットの位置と分子量を示す。

Fig. 2 EMSA による精製した HishRPA の ssDNA 特異的結合活性の検出

基質となる 0.9kb DNA 断片は、PCR 増幅によって調製した。

0.1 μ g の DNA 断片それぞれの、98 $^{\circ}$ C 熱処理したもの (ssDNA)、またはしなかったもの(dsDNA)を用意し、表示した量の HishRPA とともに 10 μ l の反応液(10mM TrisHCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl) 内で氷上 10min、インキュベーションした。反応産物は TAE バンファーを含む 1% アガロースゲルで 30min、100V 泳動し、その後 GelRed (BTI Biotium, 41003-T)によって染色した。加えた HishRPA の量に従って ssDNA が特異的にシフトアップしている。使用した条件下では、HishRPA 無添加の ssDNA 断片も dsDNA 断片も同様に位置に泳動されるが、ssDNA の方が染色効率が低く観察される。



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