

Dynabeads を用いたアプリケーション

Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMC1-mediated homologous pairing

Yuichi Morozumi¹, Ryohei Ino¹, Motoki Takaku¹, Mihoko Hosokawa², Shinichiro Chuma^{2,3} and Hitoshi Kurumizaka¹

¹Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, ²Institute for Integrated Cell-Material Sciences and ³Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Nucleic Acids Research, 2012, 40 (7), 3031-3041

要約

Polypyrimidine tract binding protein associated splicing factor (PSF) は、多機能を有するタンパク質であり、RNA プロセッシング、トランスクリプションおよび相同組換え修復などに関与すると考えられています。著者らのグループは PSF が、精原細胞、精母細胞、精子細胞で産生されることを発見し、減数分裂組み換えでも機能する可能性が示されました。今回ご紹介している文献中で著者らは減数分裂特異的リコンビナーゼ DMC1 による相同的対合反応に PSF が及ぼす影響を解析した結果、ヒト PSF はこれを強く促進することを明らかにしました。また、PSF は相同的対合反応の間に形成される DMC1-ssDNA-dsDNA の 3 者複合体形成を促進することを見出しました。PSF による DMC1 の促進は、PSF が ssDNA と dsDNA の集合体を形成し、DNA の局所的な濃度が上昇させることによって、DMC1 が相同的対合反応を触媒しやすくなるためだと考えられ、これらの結果は、PSF が減数分裂特異的リコンビナーゼ DMC1 の活性化因子として機能している可能性を示唆しています。

文献中での Dynabeads の活用例

免疫沈降アッセイ

Anti-PSF 抗体を結合した磁気ビーズ (Dynabeads Protein G) を用いたプルダウンアッセイで、マウス精巣から調製した抽出物内での PSF-DMC1 相互作用を検出

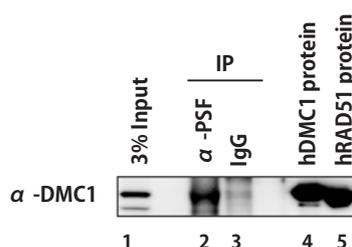
実験に使用した試薬

- Dynabeads Protein G
- Lysis buffer: 20mM sodium phosphate (pH 8.0), 60mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.05% Triton X-100, protease inhibitor cocktail, 10% glycerol
- Anti-PSF mouse monoclonal antibody

試験方法

1. マウス精巣細胞を Lysis buffer に懸濁する
2. 氷上で 15 分間インキュベートした後、細胞溶解液をソニケーションする
3. 11,000 g (4°C) で 5 分間遠心分離する
4. 上清を回収して全細胞抽出物とする
5. Anti-PSF mouse monoclonal antibody (12 μg) と精巣細胞抽出物 (5x10⁶ cells 相当) を混合し、4°C で 3 時間インキュベートする
6. 50 μL の Dynabeads Protein G を加え、4°C で 1 時間インキュベートする
7. 1mL の Lysis buffer で 3 回洗浄する
8. SDS-PAGE sample buffer で溶出し、SDS-PAGE および Western Blotting で解析

結果



Lane 1. Input 3%
Lane 2. Dynabeads Protein G + anti-PSF 抗体
Lane 3. Dynabeads Protein G + mouse IgG
Lane 4. Control hDMC1
Lane 5. Control hRAD51

DMC1 に対する PSF の結合

図は、Anti-PSF 抗体による免疫沈降物を anti-human DMC1 抗体を用いて解析した結果です。DMC1 が、PSF に結合したフラクションから検出されました。これは PSF がマウス精巣細胞抽出物内で DMC1 と相互作用していることを示唆しています。

dsDNA キャプチャーアッセイ

Dynabeads Streptavidin と biotinylated poly dT ssDNA を用いた dsDNA キャプチャーアッセイで DMC1-ssDNA 複合体による dsDNA のキャプチャーを PSF が活性化することを検出

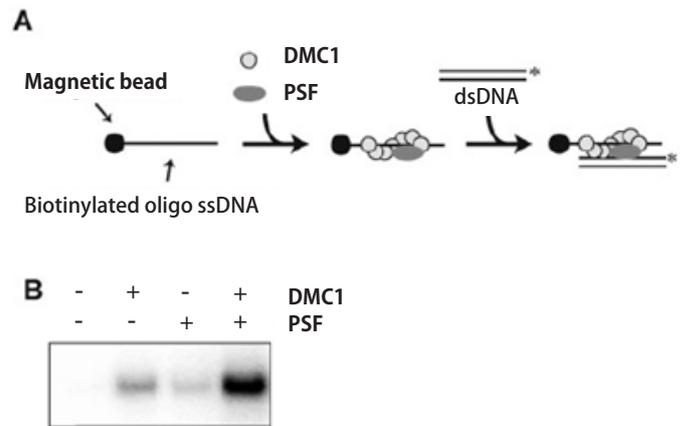
実験に使用した試薬

- Dynabeads Streptavidin
- Reaction buffer : 22mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 4mM Tris-HCl (pH 8.0), 40mM NaCl, 20mM KCl, 0.045mM EDTA, 0.2mM 2-mercaptoethanol, 3% glycerol, 5mM MgCl₂, 1.2mM DTT, 1mM ATP, 0.1mg/ml BSA, 0.01% Nonidet P-40
- 5'-biotinylated poly dT ssDNA (83-mer, 6 μ M)
- ³²P-labeled dsDNA (49-mer, 6 μ M)

試験方法

1. DMC1 (4 μ M) と PSF (0.6 μ M) を 5'-biotinylated poly dT ssDNA でコートした Dynabeads Streptavidin (9 μ L の Reaction buffer に懸濁) と共に 37°C で 5 分間インキュベートする
2. ³²P ラベルした dsDNA (49-mer, 6 μ M) を添加し反応を開始させ、10 分間 37°C でインキュベートする
3. 上清を取り除き、ビーズを 10 μ L の Reaction Buffer で 2 回洗浄する
4. ssDNA ビーズでキャプチャーした dsDNA を 0.4% の SDS および 1.8mg/mL の Proteinase K、37°C で 15 分間処理することで抽出する
5. フェノールクロロホルム抽出を行った後、0.5x TBE buffer 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析する

結果



DMC1-ssDNA 複合体による dsDNA キャプチャーを PSF が活性化

A. dsDNA キャプチャーアッセイの略図

B. DMC1 と ssDNA 複合体による dsDNA のキャプチャーを検出しています。PSF と DMC1 両存在下において最も多くの dsDNA が結合しており、DMC1 による相同的対合の間に dsDNA をキャプチャーするステップでは、PSF が主に機能している可能性が考えられます。

使用者のコメント

免疫沈降アッセイや dsDNA キャプチャーアッセイを行うに当たって、Dynabeads を使用することにより、ビーズに非特異的に結合するタンパク質や DNA を抑えられ、きれいな実験結果を得ることができました。

Dynabeads は使用方法も簡単なので、今でもよく使わせてもらっています。

早稲田大学 先進理工学部
電気・情報生命工学科
胡桃坂研究室 助教
両角 佑一 先生

| 商品コード | 商品名 | 梱包単位 |
|---------|------------------------------|-------|
| DB10003 | Dynabeads Protein G | 1mL |
| DB10004 | Dynabeads Protein G | 5 mL |
| DB11205 | Dynabeads M-280 Streptavidin | 2 mL |
| DB11206 | Dynabeads M-280 Streptavidin | 10 mL |

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>