

## ヒト一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA (hRPA), タグなし, functional

商品コード	02-047
容量	50μg
保存	-20°C
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 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), HiTrap Heparin HP (Cytiva 17040701), ssDNA cellulose (自社調製)を使って精製した。精製された hRPA は 70kDa, 34kDa, 14kDa 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	1. EMSA による ssDNA 特異的結合の検出(Fig. 2)。 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。 3. RPA 結合因子のプルダウン解析
背景	RPA(replication protein A)は p70 (RPA1; <a href="#">HGNC:10289</a> )、p34 (RPA2; <a href="#">HGNC:10290</a> )、p14 (RPA3; <a href="#">HGNC:10291</a> )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 ウィルス 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( <a href="#">PNAS 1987, 84, 1834-8</a> , <a href="#">EMBO J 1988, 7, 1211-8</a> , <a href="#">PNAS 1988, 85, 2523-7</a> )。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、細胞内的一本鎖 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/KB: <a href="#">P27694</a> (RFA1_HUMAN), <a href="#">P15927</a> (RFA2_HUMAN), <a href="#">P35244</a> (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、軍事目的には使用しないようお願いします。	

データ画像: 02-047 ヒト一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA (hRPA) タグなし、活性型

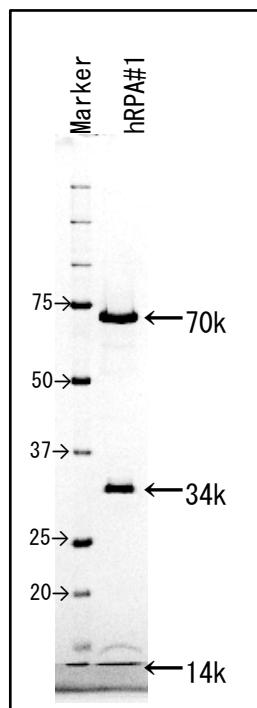


Fig. 1 精製した hRPA

精製した hRPA  $3\mu\text{g}$  (右) を 12.5% SDS-PAGE 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。

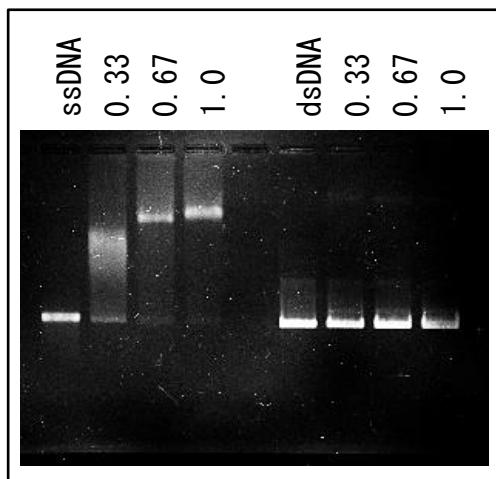


Fig. 2 EMSA による精製した hRPA の ssDNA 特異的結合活性の検出

基質となる 0.9kb DNA 断片は、PCR 増幅によって調製した。 $0.1\mu\text{g}$  の DNA 断片それぞれの、98°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 hRPA とともに  $10\mu\text{l}$  の反応液( $10\text{mM}$  TrisHCl pH7.5,  $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $50\text{mM}$  NaCl) 内で氷上  $10\text{min}$ 、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  $30\text{min}$ 、 $100\text{V}$  泳動し、その後 GelRed (BTI Biotium, 41003-T) によって染色した。加えた hRPA 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、hRPA 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。

#### 関係商品:

- 10-085 Anti-RPA antibody
- 02-040 T4 SSB (gene32)
- 02-042 E. coli SSB
- 02-044 Taq SSB
- 02-046 HishRPA

**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