

ヒト DNA リガーゼ 1 DYKDDDDK ペプチド タグ付き (tag-hLig1), functional

商品コード	10-141
容量	50 µg
保存	-20°C
濃度	1 mg/ml
バッファ	0.25M NaCl と 40% glycerol を含む BufferH* (防腐剤、キャリアタンパク質を含まない)。*; BufferH (25 mM HEPES pH8, 1 mM EDTA, 0.01 % NP40, 0.1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, 1mM DTT)
調製法と純度	N 末に DYKDDDDK ペプチドタグを付加したヒト全長 DNA リガーゼ(tag-hLig1)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 anti-flag M2 agarose beads (Sigma A2220) と DEAE-sepharose (Cytiva 17070910) を使って精製した。精製された tag-hLig1 は 90%以上の純度を持つ(Fig. 1)。
分子構造	tag-hLig1 は、919 アミノ酸残基からなる全長ヒト DNA リガーゼに DYKDDDDK ペプチドタグ配列を含む 12 アミノ酸残基を N 末に付加したものである。予想分子量が 103kDa のタンパク質であるが、この精製されたタンパク質はヒト細胞内でいくつかの翻訳後修飾をうけるため、SDS-PAGE では 140kDa 付近の複数のバンドとして観察される(Fig. 1)
活性	DNA リガーゼ活性は市販されている T4DNA リガーゼ(02-050)と同様の条件で観察できる。しかしこの tag-hLig1 のタンパク質量あたりのリガーゼ活性 (比活性) は T4DNA リガーゼの 1/10 以下である。例えば濃度既知の T4DNA リガーゼの反応産物の電気泳動パターンと比較すると、HindIII 切断 DNA 断片 (コヘシブ末端 DNA) に対しては 2U (T4ligase units)/µg、HaeIII 切断 DNA 断片(平滑末端 DNA)に対しては 0.5U (T4ligase units)/ µg と概算できる(Fig. 2)。
用途	<ol style="list-style-type: none"> 1. DNA 連結反応; この酵素は、T4DNA リガーゼと同等の反応液組成、基質 DNA などの条件で DNA 連結活性を観察できる(Fig. 2)。 2. 複製タンパク質 PCNA と物理的相互作用を検出することができる(Fig. 3)。 3. 機能未知の抗がん剤候補分子に対して hLig1 の機能阻害の有無を評価することができる。
背景	<i>LIG1</i> (HGNC: 6598) 遺伝子はヒト細胞の ATP 依存 DNA リガーゼの一つをコードしている。この酵素は DNA 複製、組換え、塩基切り出し修復過程に関与し、この遺伝子の変異は、細胞の DNA ligase I 欠損となり、その結果、免疫欠損、DNA 損傷試薬への感受性上昇を引き起こすなど発ガン過程への関与が示唆されている。ヒト細胞には LIG3 と LIG4 と呼ばれるさらに 2 つの DNA リガーゼファミリーがあり、いずれも DNA 複製や DNA 傷害応答に対して LIG1 と重複した機能を持ち、これらの遺伝子変異は発癌性を引き起こす(文献 1)。いくつかの LIG1 相互作用タンパク質が報告されているが、その一つに DNA 複製、修復に関与するクランプタンパク質 PCNA がある。PCNA との相互作用は LIG1 の N 末にある PCNA 結合モチーフ (PIP box) と DNA 結合モチーフが関与し、複製時の Okazaki 断片連結 に関与している (文献 2)。
データリンク	UniProtKB - P18858 (DNL1_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: 10-141 ヒト DNA リガーゼ 1 DYKDDDDK ペプチド タグ付き (tag-hLig1)

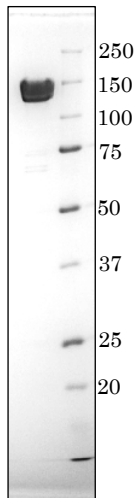


図 1. 精製した 2.4 μ g のヒト DNA リガーゼ 1 の CBB 染色像

純度 90%以上の精製 tag-hLig1 を 12.5% PAAG で電気泳動し CBB 染色した像。140kDa 付近に、予想分子量(103kDa) より高分子量の複数のバンドとして観察される。これはヒト細胞内で複数の翻訳後修飾が起きることを反映している。

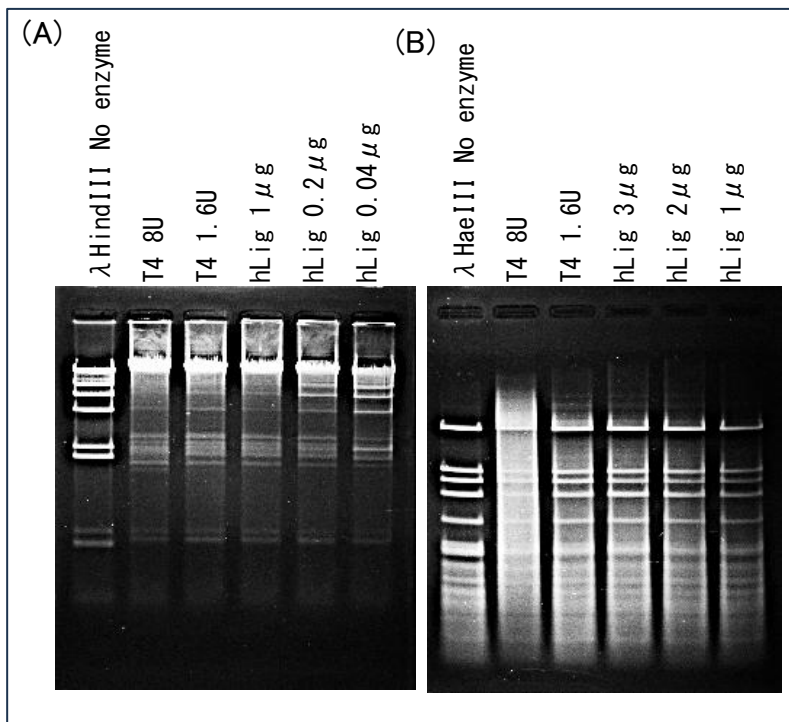


図 2. tag-hLig1 の DNA リガーゼ活性

(A) コヘシブ DNA 末端の連結。表示した量の DNA リガーゼを 2 μ g の HindIII 切断した λ DNA と 10 μ l の反応液 (50mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10mM dithiothreitol; 02-T4b) 内で 25°C、30 分間インキュベートした。反応後 30 μ l の反応停止液 (1% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue and 100 μ g/ml proteinaseK)を加えさらに 60°C、10 分間インキュベートし、その半分を 1% アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動での DNA 連結による DNA バンドのシフトの程度を濃度既知の T4DNA リガーゼのものと比較して tag-hLig1 の比活性を 2U (T4ligase units)/ μ g と概算した。これは T4DNA リガーゼの比活性の 1/10 以下に相当する。

(B) 平滑 DNA 末端の連結。表示した量の DNA リガーゼを 1 μ g の HaeIII 切断した λ DNA と 10 μ l の反応液内で 25°C、180 分間インキュベートした。反応後、(A)と同様の方法で解析し、tag-hLig1 の比活性を 0.5U (T4ligase units)/ μ g と概算した。

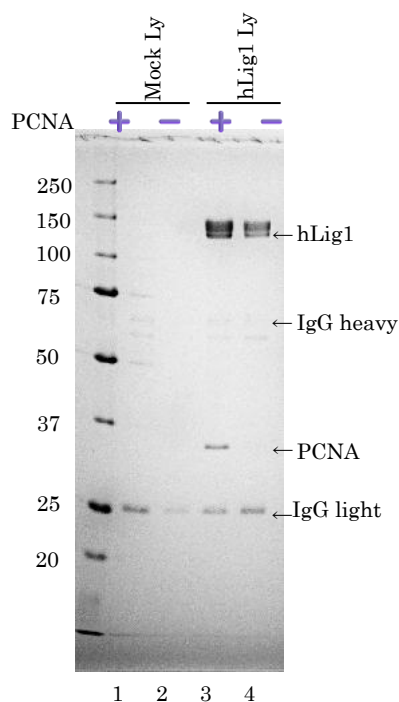


図 3. PCNA との相互作用

10 μ l の anti-flag antibody ビーズ(M2; Sigma A2220) を 25 μ l の 293T 細胞 mock 抽出液 (反応 1、2) または tag-hLig を発現する 293T 細胞抽出液 (反応 3、4) とそれぞれプレインキュベートした。ビーズ洗浄後、反応 1、3 に 1.6 μ g PCNA、反応 2、4 に同体積のバッファーを加え 4 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした。非結合分を洗浄し、結合タンパク質を 20 μ l の SDS loading buffer で溶出した。その試料、それぞれの 2.5 μ l を 12.5% PAAG で泳動しタンパク質を CBB 染色した。PCNA hLig1 が結合したビーズ特異的に結合した PCNA のバンドが検出される (レーン 3)。ゲルの右側に hLig1、IgG H 鎖、L 鎖、PCNA の泳動位置を矢印で示した。

関係商品:

10-151 human PCNA

70-090 Anti-DNA ligase1 (human) antibody, rabbit polyclonal

02-050 T4 DNA Ligase with reaction buffer (02-T4b)

参考文献:

1. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. Ellenberger T, Tomkinson AE. Annu Rev Biochem. 2008; 77: 313–338, PMID: [18518823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18518823/), PMCID: [PMC2933818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2933818/), doi: [10.1146/annurev.biochem.77.061306.123941](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.123941)
2. [Mechanism of human Lig1 regulation by PCNA in Okazaki fragment sealing.](#) Blair K, Tehseen M, Raducanu VS, Shahid T, Lancey C, Rashid F, Crehuet R, Hamdan SM, De Biasio A. Nat Commun. 2022, 13, 7833. doi: 10.1038/s41467-022-35475-z. PMID: 36539424