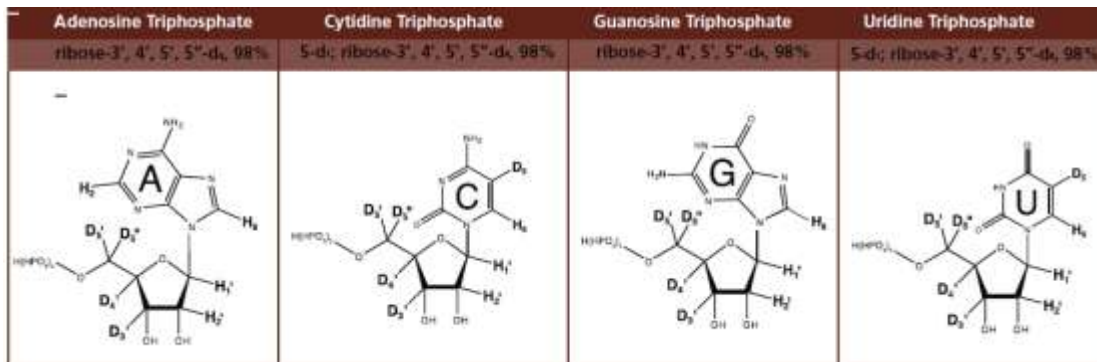


選択的に重水素で標識した Ribonucleotides

Catalog No. DLM-7862

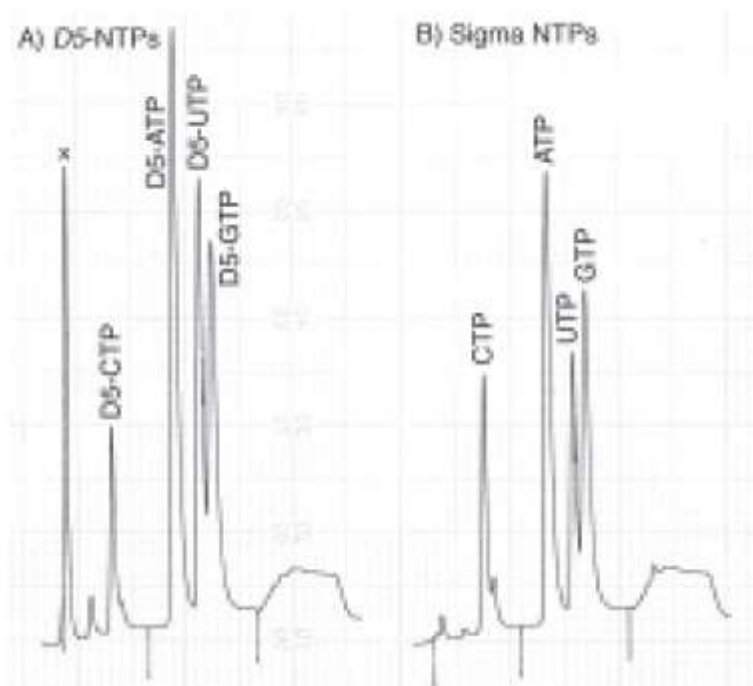
次のリボヌクレオチド-3 燐酸を含む 100mg 混合物



最近 Cassia 社の Jamie Williamson 博士が示しているように、選択的に重水素化したりボヌクレオチドは非常に簡略化した 1H NOESY スペクトラを製造するために RNA オリゴマーに酵素を用いて変換することができます。詰め込まれたリボース領域のスペクトルのオーバーラップは、RNA の構造決定と assignments を容易にする等核 NOESY スペクトラの迅速分析ができ、かなり減らすことができます。そして、CIL は独占的に Cassia 社によって製造されたこれらの製品を提供します。

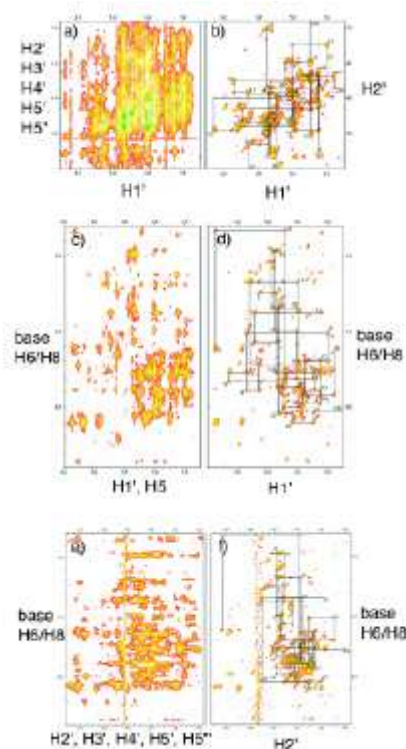
Cassia 社は生体分子 NMR コミュニティのために、これらの材料を生産する目的で Lincoln Scott 博士と Jamie Williamson 博士によって設立されました。

D5 - 標識ヌクレオチドは、以下に示すように、ATP、CTP、GTP と UTP のアンモニウム塩の等モル混合物として供給されます。NTPs は転写グレードで、T7 RNA ポリメラーゼを使う RNA 合成に適しています。



NTPs のイオン交換 HPLC クロマトグラム A) D5-NTPs B) シグマ NTPs. HPLC は、pH 2.8 でリン酸ナトリウムグラジエントを使って Vydac 陰イオン交換カラムで実行されました。

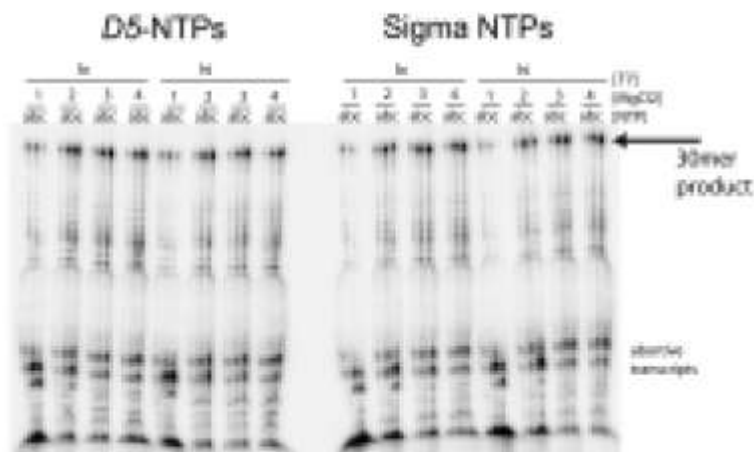
X という特徴あるピークは残留するクロラムフェニコールですが、これは転写効率に影響しません。



Tetraloop-Receptor RNA (45nt 二量体:30kDa) の 1H-1H-NOESY Spectra

左は非標識 RNA (a,c,e) からのスペクトラで、右は D5-標識 RNA (b,d,f) からのスペクトラです。トップの 2 つのパネル (a,b) は、H1' プロトンと他の全てのリボースプロトンの間の NOE's を含んでいます。中央の 2 つのパネル (c,d) は、ベースプロトンと H1'プロトンの間の NOEs を含んでいます。一番下の 2 つのパネル (e,f) は、ベースと他のリボースプロトンの間の NOEs を含んでいます。Davis ら (2005) とられたスペクトラは、ウィスコンシン大学の Sam Butcher 教授の好意により提供されました。

inter と intra スクレオチド NOEs の連続した割当てパターンは、D5-RNA のために示されます。D5-標識パターンの長所は、スペクトラのこれらの要所の領域にあることは明らかです。



D5-NTP 転写反応のポリアクリルアミドゲル電気泳動分析

転写反応は、30 スクレオチド HIV-2 TAR RNA 転写の最適転写条件を決定するために、いろいろな条件で実行されました。D5-NTPs は、T7 RNA ポリメラーゼと合成 DNA テンプレートを用いて非標識 Sigma NTPs と直接比較されました。反応は、試薬の濃度を変えた条件のマトリックスを使って、37° C で 3 時間活動させました：[T7 RNA ポリメラーゼ]hi=175 ユニット、lo= 25 ユニット。[MgCl₂] 1=8 mM、2=20 mM、3=34 mM、4=48 mM。

[NTP]a=4 mM、b=14 mM、c=24 mM。製品は微量の ^{32}P 標識 GTP で標識され、20% (29:1) の変性ポリアクリルアミドゲルで分析されました。D5-NTPs は、市販 Sigma NTPs と同じ活性があることがわかりました。