商品名: *RapidS*PALM, Protein *S*-Palmitoylation Detection Kit

English version

商品コード：F017A / F017B

※F017A の旧ロット 023CC05A につきましてはホームページより
該当データシートをご利用ください。

商品名: *RapidS*PALM, Protein *S*-Palmitoylation Detection Kit

商品コード：F017A

＜キット構成・保存条件＞

コンポーネント	包装	保管温度
①2x Basal Buffer	1 bottle	室温（-20℃以下でも可）
②Reduction Reagent	1 vial	-20℃以下
③Blocking Reagent A	1 vial	-20℃以下
④Blocking Reagent B	1 vial	-20℃以下
⑤Cleavage Reagent	1 vial	-20℃以下
⑥Cleavage Control	1 vial	-20℃以下
⑦MfTag-labeling Reagent	1 vial	-20℃以下
⑧Supplement	1 vial	-20℃以下

品質保持期限: 1 year

商品名: *RapidS*PALM, Additional Components for Affinity Purification

商品コード：F017B

＜キット構成・保存条件＞

コンポーネント	包装	保管温度
①2x Binding Buffer	1 bottle	室温
②10x Wash Additive	2 vials	室温
③10x Elution Additive	1 vial	室温
④Empty Column	24 columns	室温
⑤Affinity Beads	4 vials	4℃（凍結禁止）
⑥10x Reduction Reagent	1 vial	4℃（再溶解前） -20℃以下（再溶解後）

品質保持期限: 1 year

株式会社バイオダイナミクス研究所
www.biodynamics.co.jp

イントロ編

1. キット概要

*RapidS*PALM, Protein *S*-Palmitoylation Detection Kit はタンパク質 *S*-パルミトイル化修飾（以後、*S*-アシル化修飾を含む）を多方面からトータル解析できるキットです。タンパク質中の *S*-パルミトイル基を独自の多機能タグ（Multifunctional-tag; 以下 MfTag と略）に変換することで、下記の解析が可能です。

1) 蛍光強度測定による複数試料間の修飾タンパク質総量の相対比較
2) SDS-PAGE における修飾タンパク質バンドの蛍光検出
3) ウェスタンブロットによる個々のタンパク質の修飾個数の判定
4) アフィニティーカラムによる修飾タンパク質の網羅的精製
5) アフィニティーカラム精製後のウェスタンブロットによる個々のタンパク質の修飾率の算定

本キットは試料として動物組織、培養細胞および植物組織など幅広く適用可能で、従来の *S*-パルミトイル化修飾解析手法に比べ簡便かつ迅速に調製できるため、実験労力および時間の大幅な削減にもつながります。

2. キットの構成とできること

当社はタンパク質の *S*-パルミトイル基（*S*-アシル基）を蛍光定量、精製、修飾個数判定が可能な独自の多機能タグ MfTag に、迅速かつ高選択的に変換する新規手法 **Rapid S**ubstitution of **P**rotein *S*-**A**cy**l**ation for **M**ultifunctional-tag （*RapidS*PALM, 読み ラピズパーム）を開発しました。*RapidS*PALM, Protein *S*-Palmitoylation Detection Kit は**反応キット**（品番#F017-A）と**精製キット**（品番#F017-B）の 2 つのキットからなります（図 1）。まず、**反応キット**を用いて任意の試料中の *S*-パルミトイル化修飾を独自の MfTag に変換します。*RapidS*PALM における MfTag は分子量約 5 kDa の単一分子量の高分子構造体をベースに黄色蛍光基（yFL）およびアフィニティー精製用の *Hook* 基が付加されています。MfTag はパルミトイル化システインにジスルフィド結合で付加されます。*Hook* 基は**精製キット**に含まれる *Loop* アフィニティーカラムにより迅速かつ簡便、そして高純度で精製することができ、精製終了後は還元剤により容易に MfTag を除去することができます。

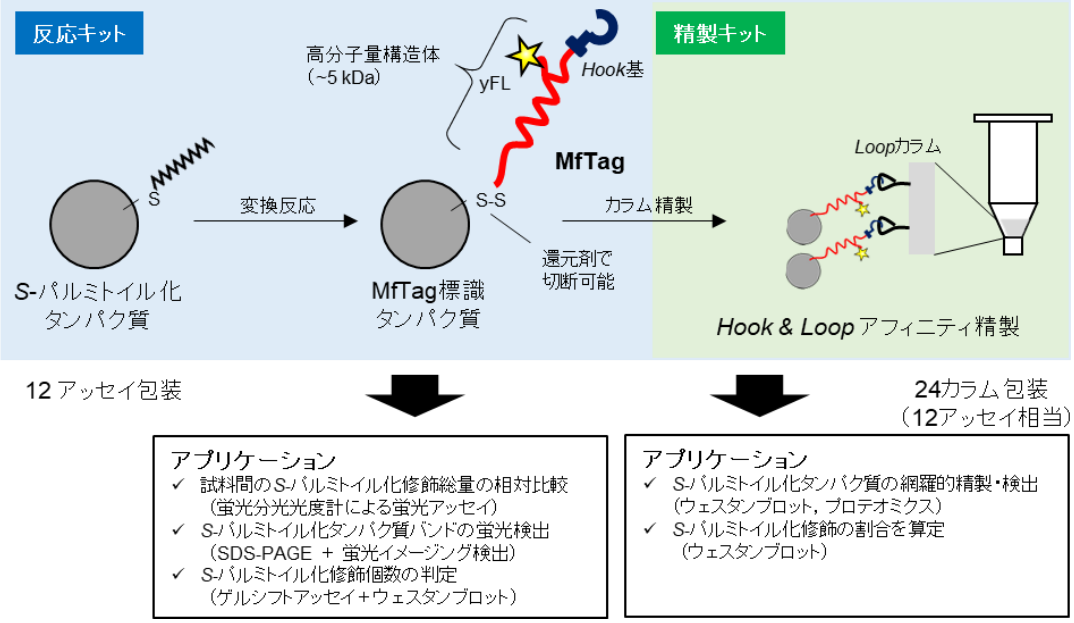


図 1 *RapidS*PALM キットの概要

RapidSPALM における MfTag には前述のように 3 つの機能（①黄色蛍光基 yFL、②高分子量構造体および③*Hook* 基）が付与されており、計 5 つのアウトプット解析が挙げられます（図 2）。①黄色蛍光基 yFL は熱安定性および光安定性に優れた色素で、一般的な UV 励起（300-370 nm）光源で可視化（450 nm-600 nm）することができます。各種蛍光分光光度計により変換反応後の試料溶液の蛍光強度を測定することで、試料毎の MfTag 標識量（＝*S*-パルミトイル化修飾量）を相対定量できます。また、変換反応後のタンパク質試料を SDS-PAGE で分離した後、ゲルを蛍光イメージャーで観察することで MfTag 標識タンパク質（＝*S*-パルミトイル化タンパク質）のバンドを可視化することができます。②高分子量構造体から成る MfTag がタンパク質に付加することで、MfTag 一つにつき約 5 kDa 分子量が大きくなるため SDS-PAGE においてゲルシフトが発生します。この現象を利用してウェスタンブロット検出におけるバンドの本数と分子量シフト幅で MfTag 標識個数（＝*S*-パルミトイル化修飾個数）を判定することができます。③*Hook* 基は精製キットの *Loop* カラムにより精製できるため、MfTag 標識タンパク質（＝*S*-パルミトイル化修飾タンパク質）を網羅的に精製することができます。精製後に還元処理することで MfTag を除去でき、前述のような分子量シフトを起こすことなく各種検出方法（質量分析、ウェスタンブロット）が可能になります。また、精製カラムによる精製前試料と精製カラム素通り画分および溶出画分を比較することで個々のタンパク質の *S*-パルミトイル化修飾割合を算定することができます。

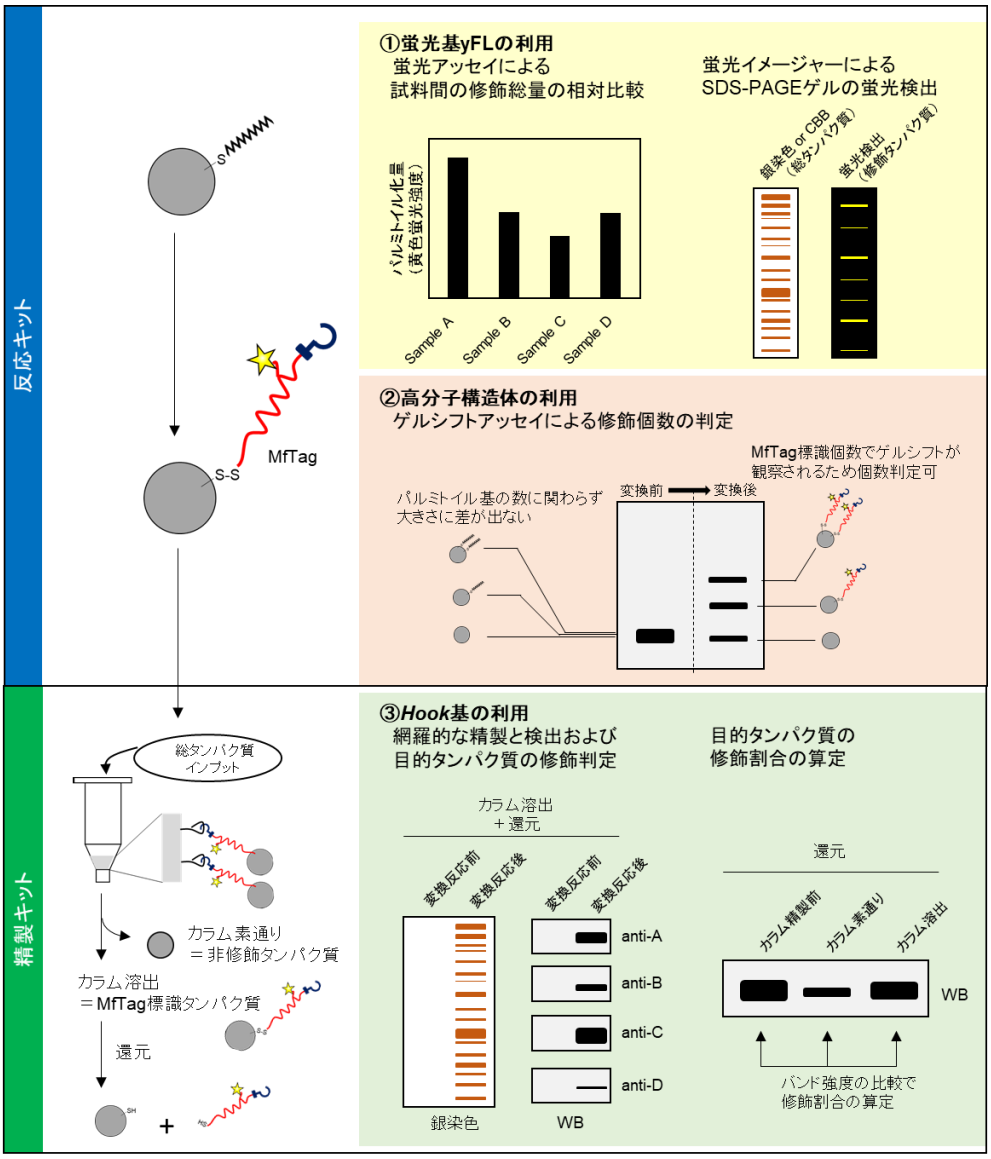


図 2 RapidSPALM で解析できること

3. 原理

＜変換反応の原理＞

^{RapidS}PALM は段階的な化学修飾反応により、*S*-パルミトイル基を MfTag に変換します（図 3）。^{RapidS}PALM は *S*-パルミトイル化修飾検出手法として知られる Acyl-Biotin Exchange（ABE）法や Acyl-PEGyl Exchange Gel Shift（APEGS）法をもとに独自に改良した試薬類及びプロトコールを採用することで、特異性の向上および反応工程の短縮化を実現しました。

①強力なタンパク質変性処理

各化学修飾反応の効率を上げるため、タンパク質を強力な変性剤と加熱により変性させます。

②還元処理

タンパク質中のジスルフィド結合を還元し、フリーのシステインにします。

③フリーシステインのブロッキング

S-パルミトイル化修飾に無関係なフリーシステインをシステイン特異的修飾試薬でブロッキングします。

④*S*-パルミトイル基の選択的切断

S-パルミトイル基のチオエステル結合を高活性ヒドロキシルアミン誘導体（high performance hydroxylamine; 以下 hpHA と略）により切断します。この際に、特異性コントロールとして hpHA 未処理（Tris 処理）を用意します。

⑤MfTag の標識反応

hpHA により遊離したシステインに MfTag を標識します。③のブロッキングが不十分の場合、hpHA 未処理の試料においても MfTag が標識されるため、hpHA 未処理の試料を並行して用意し、特異性判定に使用します。また、ネガティブコントロールとして MfTag 標識試薬未処理の試料も用意します。

⑥クロロホルム／メタノール沈殿法（CMppt）により未反応試薬の除去およびタンパク質成分の粗精製をおこないます。

上記のプロセスを経て、1 つの試料に対し 2 種類のネガティブコントロールを含む 3 種類の処理 hpHA(-)/MfTag(-)、hpHA(-)/MfTag(+)および hpHA(+)/MfTag(+)を調製します。

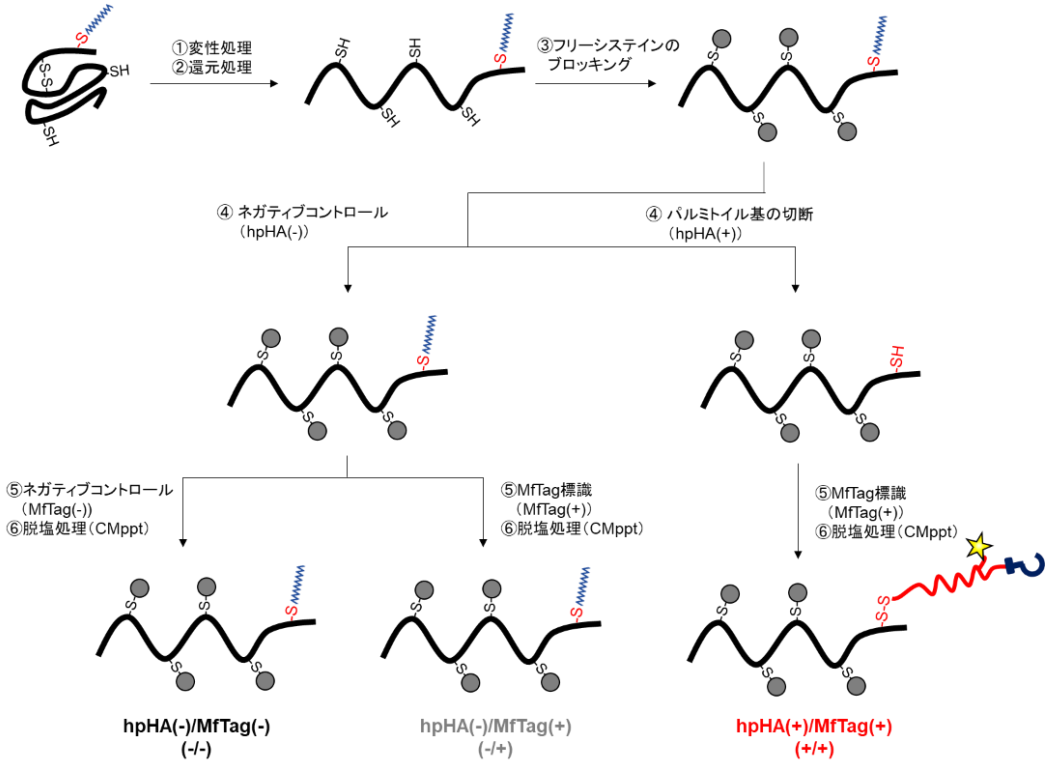


図 3 ^{RapidS}PALM の変換反応の概要

＜カラム精製の原理＞

本精製キットの *Hook & Loop* アフィニティー精製は非タンパク質性の低分子間相互作用を利用しています。非タンパク質性の相互作用のため、完全変性条件下での結合が可能で、アフィニティービーズ自体への非特異吸着が非常に低く抑えられます。また、全工程スピンカラムでの提供のため、カラムへの溶液添加とスピンダウンの繰り返しだけで簡便に精製がおこなえます。

4. 従来解析法に対する優位性

タンパク質 *S*-パルミトイル化修飾の解析方法として ABE 法が汎用されています。ABE 法は *S*-パルミトイル基とビオチンを交換することでアビジンなどの精製系で回収できます。しかし、一般的な ABE 法はサンプル調製とアフィニティー精製に丸一日以上の時間が必要でした。本キットは変換反応工程が約 2 時間、精製工程が約 1 時間と大幅に時間が短縮されており、半日で実験を終えることが可能です[注]（図 4）。

注：作業時間は 1 アッセイの場合の目安です。

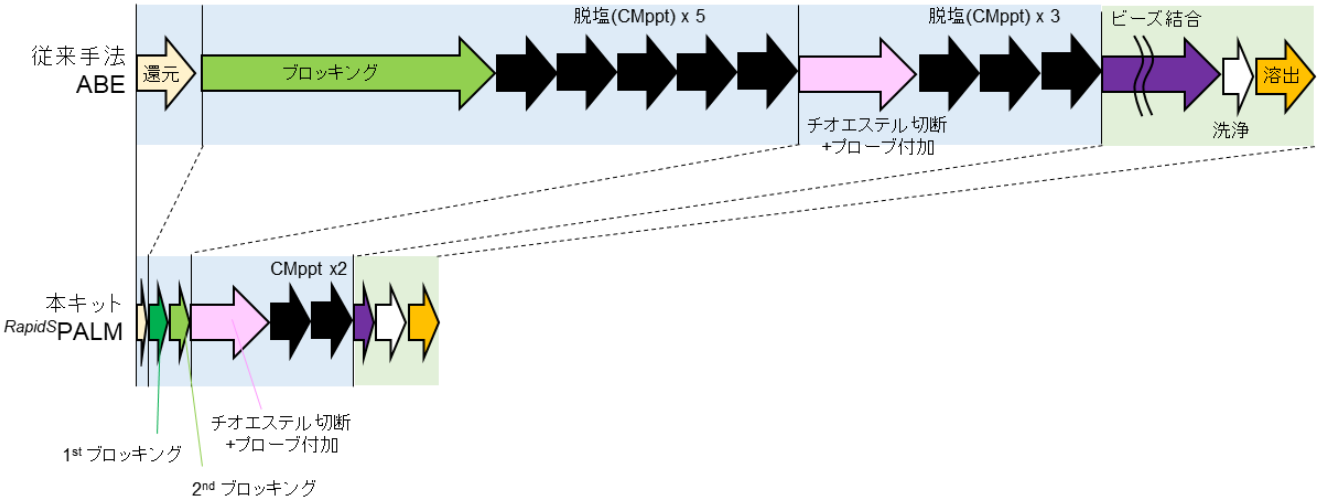


図 4 従来法（ABE）と本キット RapidSPALM の作業時間比較

プロトコール編：反応キットの部 (商品コード ：F017A)

別途用意が必要なもの

＜試薬類＞

・超純水
・ジメチルスルホキシド DMSO
・メタノール MeOH
・クロロホルム CH_3Cl
・ダルベッコ PBS(-)
・BCA アッセイキット
・2x-5x Laemmli SDS-PAGE sample buffer （還元剤無添加）

＜機器類＞

・ヒートブロック（95℃設定が可能なもの）
・恒温槽（37-42℃設定が可能なもの）
・遠心分離機
・ボルテックスミキサー
・シェーカーまたはローテーター
・プローブ型超音波破砕装置（オプション）
・ウォーターバス型超音波破砕装置（オプション）
・ハンディーUV ランプ（300-370 nm 範囲の設定可能なもの）（オプション）

キットコンポーネント一覧と保存方法

本製品には下記の 8 コンポーネントが含まれています。各コンポーネントは適切な温度にて保管してください。

表 0-1 キットコンポーネント一覧

コンポーネント	包装	保管温度
①2x Basal Buffer	60 mL ボトル	室温（-20℃以下でも可）
②Reduction Reagent	1.5 mL チューブ	-20℃以下
③Blocking Reagent A	1.5 mL チューブ	-20℃以下
④Blocking Reagent B	1.5 mL チューブ	-20℃以下
⑤Cleavage Reagent	1.5 mL チューブ	-20℃以下
⑥Cleavage Control	1.5 mL チューブ	-20℃以下
⑦MfTag-labeling Reagent	1.5 mL チューブ	-20℃以下
⑧Supplement	1.5 mL チューブ	-20℃以下

0. 試薬調製

・1x Basal Buffer の調製

①**2x Basal Buffer** は都度等量の超純水で希釈し 1x として使用します。2x Basal Buffer は成分が析出しやすいため、使用前に 37℃で加温し、完全に溶解したことを確認の上、希釈してご使用ください。界面活性剤が含まれ、激しく攪拌すると泡立つため、緩やかな混和により溶解するようにご注意ください。調製した 1x Basal Buffer は室温で長期間保存可能ですが、冬季など気温が低い場合に成分が析出する場合がありますので、必要に応じて使用前に加温して溶解のうえご使用ください。本キットでは計 100 mL 分の 1x Basal Buffer を調製できる分が含まれていますが、組織や植物ライセート調製に多量に必要な場合、下記の組成で適宜ご調製ください。ご自身で調製される場合、直接 1x Basal Buffer を調製いただいて問題ありません。

1x Basal Buffer (50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM NaCl, 2% SDS)

・キットコンポーネントの調製

下記の試薬は乾燥品で梱包されており、使用する前に再溶解が必要です。下記のコンポーネントは室温に戻したのち、記載の溶媒を添加して再溶解してください。再溶解後は-20℃以下で保存し、2 カ月以内に使用することを推奨します。複数回に分けて使用される場合は、繰り返しの凍結融解を避けるため、各コンポーネントを小分注して保管し、都度使い切ることを推奨しています。

表 0-2 キットコンポーネントの調製

コンポーネント	溶媒	添加量
②Reduction Reagent	超純水	200 μL
③Blocking Reagent A	DMSO	100 μL
④Blocking Reagent B	DMSO	50 μL
⑦MfTag-labeling Reagent	超純水	120 μL

1. コントロール設定方法について

イントロ編図 3 に示すように、本実験系では 1 つの試料に対し、実験目的に応じて 2 つまたは 3 つの処理を設定することを推奨しています。各処理方法を表 1-1、目的を表 1-2 に示します。なお、本キットは S-パルミトイル基（S-アシル基）の切断試薬として Hydroxylamine の高活性誘導体 **h**igh-**p**erformance **H**ydroxyl**a**mine (hpHA) を利用しています。本マニュアルのコントロールの表記では hpHA(-)/MfTag(-)、hpHA(-)/MfTag(+)、hpHA(+)/MfTag(+) をそれぞれ**-/-**、-/+、**+/+** と表記しています。

表 1-1 処理方法

処理の名称	略称	還元	Cys ブロッキング	パルミトイル切断	MfTag 標識	脱塩 (CMppt)
hpHA(-)/MfTag(-)	**-/-**	✓	✓			✓
hpHA(-)/MfTag(+)	-/+	✓	✓		✓	✓
hpHA(+)/MfTag(+)	**+/+**	✓	✓	✓	✓	✓

表 1-2 各処理の目的

処理の名称	略称	目的
hpHA(-)/MfTag(-)	**-/-**	・完全なネガティブコントロール ・試料自体の固有の自家蛍光の評価 ・各種還元・ブロッキング処理および脱塩処理が個々のタンパク質の電気泳動度に与える影響およびウェスタンブロットに与える影響の評価
hpHA(-)/MfTag(+)	-/+	・MfTag-labeling Reagent による非特異的 MfTag 導入を検出するためのネガティブコントロール ・非 *S*-パルミトイル化システインのブロッキング度合いの評価
hpHA(+)/MfTag(+)	**+/+**	・*S*-パルミトイル基特異的な MfTag 導入

本キットでは *S*-パルミトイル基のチオエステル結合を hpHA により切断するため、*S*-パルミトイル基特異的な MfTag 導入処理である**+/+**と非特異的 MfTag 導入評価処理である-/+の差分が真の *S*-パルミトイル化タンパク質であること示します。解析目的に応じた各処理の必要性を表 1-3 にまとめます。適切な評価のため、実験毎にネガティブコントロール処理を設定することを推奨します。

表 1-3 実験目的別ネガティブコントロールの設定方法

実験目的	**-/-**	-/+	**+/+**
蛍光測定による *S*-パルミトイル化総量の解析	✓	✓	✓
ゲルシフトアッセイによる目的タンパク質の *S*-パルミトイル基個数の解析	✓	✓	✓
精製キット（別売品）による *S*-パルミトイル化タンパク質の単離	不要 （*注）	✓	✓

(*注) 精製キットによる単離の場合**-/-**は原則不要ですが、目的試料中タンパク質そのもののカラム吸着バックグラウンドを判定したい際は適宜ご設定ください。

2. 試料調製

本キットは組織、培養細胞、植物などさまざまな試料に適用可能です。下記のガイドに従いタンパク質試料の調製を行ってください。本キットは強い変性条件下で変換反応をおこなうため、プロテアーゼ阻害剤の添加は不要です。また、プロテアーゼ阻害剤の種類によっては変換反応に影響を及ぼす可能性があるため不添加を推奨します。

＜培養細胞の場合＞

培養細胞（接着・浮遊含む）を PBS で 2 回以上洗浄後[*1]に、適量の **1x Basal Buffer** を添加し細胞ライセートを調製します。細胞ライセートの総タンパク質濃度が 1 mg/ml 以上になるように適宜液量を調整してください。この際、細胞由来の DNA により粘度が高い不均一なライセートになりますが、できるだけピペッティングやプローブ型超音波破砕などにより DNA を切断・分散させ粘度の低い均一なライセートにすることを推奨します[*2]。十分に均一なライセートが得られたら、遠心分離（10,000 xg, 5 分間、室温）後に上清を回収することで不溶物（細胞塊やゴミなど）を取り除きます。上清回収後、細胞ライセートの総タンパク質濃度を BCA アッセイにより測定します。**1x Basal Buffer** には界面活性剤が含まれますのでブラッドフォードタンパク質定量法は使用できません。総タンパク質濃度は 1 mg/ml 以上であることが望ましいです[*3]。調製したライセートは冷凍保管可能ですが、できるだけ早く変換反応に使用することを推奨します。

*1 血清を含む培地で培養している場合は、3 回以上 PBS で洗浄してください。血清アルブミンが細胞ライセートに残存すると、本キットのバックグラウンドになるおそれがあります。
*2 粘度が高いまま各処理に進むと再現性の低下の原因になります。
*3 低濃度、高液量の場合、後述するオプションをご参照ください。細胞ライセートを濃縮することができます。

＜組織の場合＞

組織を細かく切断後、適量の 1x Basal Buffer*4 を添加し、組織ごとに適切な方法で破砕処理（各種ホモジナイザー、超音波破砕など）を行います。*S*-パルミトイル化タンパク質が多く含まれる膜画分の回収率を上げるため、また、均一な組織ライセートを得るためできるだけ超音波破砕によるせん断処理を推奨します。十分に可溶化できたら、遠心分離（x10,000g, 5 分間、室温）後に上清を回収することで不溶物（組織塊やゴミなど）を取り除きます。上清回収後、組織ライセートの総タンパク質濃度を BCA アッセイにより測定します。総タンパク質濃度は 1 mg/ml 以上であることが望ましいです*5。

*4 1 試料あたり 5 mL 以上の **1x Basal Buffer** を必要とする場合、キット付属の **1x Basal Buffer** が不足する可能性があります。**1x Basal Buffer** の不足が見込まれる場合、「**0. 試薬調製**」に記載する 1x Basal Buffer をご調製ください。

*5 低濃度、高液量の場合、後述するオプションをご参照ください。組織ライセートを濃縮することができます。

＜植物試料の場合＞

植物種や部位に適切な方法で破砕後、適量の **1x Basal Buffer** を添加し、タンパク質抽出を行います。不溶性物質は遠心分離または適切なフィルターなどで除去してください。植物試料はクロロフィルなど自家蛍光の原因となる物質が含まれるため、後述する＜オプション＞に記載のクロロホルムメタノール沈殿を行うことを推奨します。ライセートの総タンパク質濃度を BCA アッセイにより測定します。総タンパク質濃度は 1 mg/ml 以上であることが望ましいです*6。

*6 低濃度、高液量の場合、後述するオプションをご参照ください。植物ライセートを濃縮することができます。

＜オプション：核酸や脂質等を除去したタンパク質ライセートの調製＞

クロロホルム／メタノール沈殿法（Chloroform/Methanol precipitation； 以下 CMppt と略）により、各試料ライセート中の核酸や脂質その他低分子成分を除去したタンパク質ライセートを調製できます。ライセートの粘度や濁度が高い場合やタンパク質濃度が低く濃縮が必要な場合、および植物組織など有色の試料を用いる場合、オプションとしてご検討いただけます。

1. 試料ライセートを 100 μL ずつ 1.5 mL チューブに分注する
2. 各チューブにメタノール 400 μL 添加し、ボルテックスで激しく攪拌する
3. 各チューブにクロロホルム 100 μL を添加し、ボルテックスで激しく攪拌する
4. 各チューブに超純水 300 μL を添加し、ボルテックスで激しく攪拌する（白濁溶液となる）
5. 遠心分離（10,000 xg, 2 分間、室温）後、2 層に分離し、層界面にタンパク質沈殿が見られる
6. タンパク質沈殿を吸わないように注意しながら上層をできるだけ除去する
7. メタノール 300 μL をチューブの壁面に伝わらせながら穏やかに添加し、ゆっくり転倒混和して 1 層化する

注 1 タンパク質沈殿が壊れないようゆっくり混和してください。タンパク質沈殿が壊れるとタンパク質のロスに繋がります。

8. 遠心分離（10,000 xg, 2 分間、室温）後、底面のタンパク質沈殿を吸わないように注意しながら上清を全量除去する。
9. 再度遠心分離（x10,000g, 2 分間、室温）後、生じた上清を完全に除去する。
10. **1x Basal Buffer** を適量添加し、ピペッティングまたはウォーターバス型超音波破砕機で溶解する。この際に複数本分の沈殿をまとめることで濃縮することが可能です。

注 2 CMppt は繰り返し行うことでタンパク質の凝集を引き起こす可能性があります。タンパク質の種類によっては凝集により SDS-PAGE における分離度が低下する場合があります。本キット使用前の CMppt は 1 回のみを推奨します。

3. 反応キットのアッセイプロトコール

3-0 プロトコール概要

【1】タンパク質ライセートの調製
（使用する試薬： **1x Basal Buffer**）
【2】還元処理 ー 5 分間@95℃
（使用する試薬： **Supplement**、**Reduction Reagent**）
【3】ブロッキング処理 1 回目 ー 5 分間@室温 ＋ 5 分間@95℃
（使用する試薬： **Blocking Reagent A**）
【4】ブロッキング処理 2 回目 ー 5 分間@室温 ＋ 5 分間@95℃
（使用する試薬： **Blocking Reagent B**）
【5】 *S*-パルミトイル基の切断と MfTag 標識 ー 40 分間@37℃（～42℃）
（使用する試薬： **Cleavage Reagent**、**Cleavage Control**、**MfTag-labeling Reagent**）
【6】 クロロホルムメタノール沈殿法（CMppt）による脱塩操作x2 回 ー 15 分間 x2 回

はじめに

キットの各試薬は解凍後室温におき、よく攪拌後に析出がないことを確認の上ご使用ください。氷上や冷蔵庫等の冷却環境におくと有効成分が析出する場合がございますので、使用までの間は室温にて保管してください。

3-1 変換反応プロトコール

1) 2.で調製した試料を総タンパク質濃度が 1-2 mg/ml になるように **1x Basal Buffer** を用いて調製します。
注 1 2 mg/ml 以上の場合、各反応が十分でない可能性があります。
注 2 1 mg/ml 以下でも反応は進められますが、変換反応終了後の各種検出においてタンパク質の種類によっては十分に検出できない場合があります。
2) 新しい 1.5 mL チューブにステップ 1) で調製した 1-2 mg/ml タンパク質試料を 100 μL x 処理数（3 処理分の場合 300 μL、2 処理のみの場合 200 μL）移します。
3) ⑧**Supplement** を 1 μL x 処理数（3 処理の場合 3 μL、2 処理のみの場合 2 μL）、②**Reduction Reagent** を 2.5 μL x 処理数（3 処理の場合 7.5 μL、2 処理のみの場合 5 μL） 添加し、ボルテックスまたは転倒混和で均一化します。
注 3 Supplement 添加後は、BCA アッセイが実施できません。BCA アッセイを実施したい場合は Supplement 添加前、またはステップ 17) 以降にしてください。
4) スピンダウンしたのち、95℃で 5 分間インキュベートします。
5) ③**Blocking Reagent A** を 2 μL x 処理数 （3 処理の場合 6 μL、2 処理の場合 4 μL）添加し、ボルテックスまたは転倒混和で均一化します。
注 4 ステップ 4) で加熱後、試料を冷ます必要はありません。すぐに **Blocking Reagent A** を添加して問題ありません。添加時の火傷にご注意ください。
6) ローテーターまたはシェーカーで攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートします。
7) スピンダウンしたのち、95℃で 5 分間インキュベートします。
8) ④**Blocking Reagent B** を 1 μL x 処理数 （3 処理の場合 3 μL、2 処理の場合 2 μL） 添加し、ボルテックスまたは転倒混和で均一化します。
注 5 ステップ 7) で加熱後、試料を冷ます必要はありません。すぐに **Blocking Reagent B** を添加して問題ありません。添加時の火傷にご注意ください。
9) ローテーターまたはシェーカーで攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートします。
10) スピンダウンしたのち、95℃で 5 分間インキュベートします。
11) 遠心分離（10,000 xg, 2 分間、室温）後、上清を 95 μL ずつ新しい 1.5 mL チューブに移します（3 処理の場合 3 本、2 処理の場合 2 本）。以降 **-/-**、**-/+**、**+/+** でそれぞれ試薬添加処理が異なります。
注 6 遠心分離によりゴミや不溶性タンパク質、試薬の溶け残りが沈殿する場合があります。できるだけ沈殿

が次のステップに入らないようにご注意ください。

12) 下記に従い各処理ごとに⑤**Cleavage Reagent**（hpHA）または ⑥**Cleavage Control**（Tris）を添加し、ボルテックスまたは転倒混和で均一化します。

-/- ⑥**Cleavage Control** 25 μL

-/+ ⑥**Cleavage Control** 25 μL

+/+ ⑤**Cleavage Reagent** 25 μL

注 7 試料によって **Cleavage Reagent** を添加時に白濁が見られる場合がありますが問題ありません。

13) 下記に従い各処理ごとに、超純水または⑦**MfTag-labeling Reagent** を添加し、ボルテックスまたは転倒混和で均一化します。

-/- 超純水 5 μL

-/+ ⑦**MfTag-labeling Reagent** 5 μL

+/+ ⑦**MfTag-labeling Reagent** 5 μL

14) スピンダウンしたのち、37-42℃にて 40 分間インキュベートします。10 分に 1 回ボルテックスによる攪拌を推奨します。

注 8 37-42℃でのインキュベートが難しい場合、室温で 1 時間インキュベートしてください。

15) 下記のクロロホルム／メタノール沈殿法（CMppt）により未反応試薬の除去および脱塩を行います。

15-1) メタノール 400 μL を添加し、激しく攪拌します。

15-2) クロロホルム 100 μL を添加し、激しく攪拌します。

15-3) 超純水 300 μL を添加し、激しく攪拌します。溶液が白濁します。

15-4) 遠心分離（>10,000 xg, 2 分間、室温）により 2 層に分離します。界面にタンパク質沈殿がディスク状に形成されます。タンパク質沈殿を吸わないように注意しながら上層を除去します。上層は完全に除去する必要はありません。

15-5) メタノール 300 μL をチューブの壁に伝わらせながら緩やかに添加し、ディスク状のタンパク質沈殿が壊れないよう穏やかに転倒混和しながら溶液を均一化します。

注 9 初期の総タンパク質濃度が著しく少ない場合、ディスクにならないことがあります。また、激しく混和するとディスク状の沈殿が壊れ、タンパク質の収率低下の原因になります。ディスク状の沈殿ができる限り壊れないよう注意して均一化することを推奨します。

15-6) 遠心分離（>10,000xg、2 分間、室温）によりディスク状のタンパク質沈殿をチューブ底面に沈殿させ、ピペットを用いてタンパク質沈殿を吸わないように注意しながら上清をすべて除去します。

15-7) 再度遠心分離（>10,000xg、30 秒、室温）をおこない、チューブの壁面に付着して取り切れなかった上清を底面に落とし、全量を除去します。

15-8）沈殿が乾燥しないうちに速やかに **1x Basal Buffer** 100 μL を添加します。

15-9）ピペッティングまたはウォーターバス型超音波破砕装置により沈殿を溶解します。十分に溶解させてください。

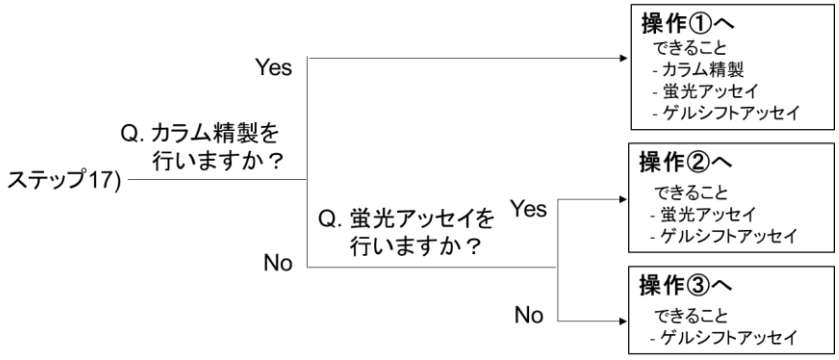
注 10 ウォーターバス型超音波破砕装置を用いると多くの試料で溶解効率の促進が確認されています。

16) ステップ 15-1) からステップ 15-7) と同様に CMppt をもう一度行います。

注 11 蛍光アッセイ、カラム精製（別売品）を行わず、ゲルシフトアッセイのみを行う場合、2 回目の CMppt はスキップできます。

17) 以下ステップはカラム精製（別売品）を行う場合と行わない場合で使用する試薬が異なります。下図のフローチャートをもとに操作①-③をお選びください。

注 12 いずれの操作の場合でも、暗室下ハンディーUV ランプを照射することで MfTag 中の黄色蛍光基を指標に簡易的に標識を確認できます。



【操作①:カラム精製を行う場合】
タンパク質沈殿を**精製キット**(別売品)に含まれる **1x Binding Buffer** 110 μL で溶解します。1x Binding Buffer で溶解した場合でも、蛍光アッセイおよびゲルシフトアッセイに使用することができます。

【操作②:カラム精製を行わず、蛍光アッセイを行う場合】
タンパク質沈殿を **1x Basal Buffer** 50-100 μL に溶解します。蛍光アッセイ実施後、2x-5x Laemmli SDS-PAGE sample buffer(還元剤無添加)を添加することでゲルシフトアッセイに使用できます。

【操作③:ゲルシフトアッセイのみを行う場合】
タンパク質沈殿を直接 1x Laemmli SDS-PAGE sample buffer(還元剤無添加)に溶解できます。

3-2. 蛍光アッセイ

蛍光アッセイを行う場合、1 試料につき表 1-2 で示したように **-/-**、**-/+**、**+/+** の 3 種類の処理試料を測定してください。

1) 上記 3-1.で調製した各処理試料を 95℃で 2 分間加熱します。
   注 12 加熱処理を行わない場合、蛍光基の波長域がシフトし正しく測定できない場合があります。MfTag 中の蛍光基は加熱に対する高い安定性を示すため(図 3-1B 参照)、加熱による蛍光基の分解の心配はありません。
2) 室温に戻したのち、遠心分離(>10,000 xg、2 分、室温)をおこない、沈殿物を除去するため上清を回収します。
3) 各種蛍光分光光度計により 325 nm における蛍光スペクトルまたは 525 nm の蛍光を測定します。3 処理試料(**-/-**、**-/+**、**+/+**)のそれぞれを測定してください。MfTag 中の蛍光基の光学特性は図 3-1A に示しています。
   ※オプション
   325 nm 励起における 400-600 nm 領域の蛍光スペクトルを取得することで試料ごとの正確な蛍光極大値および自家蛍光の有無を評価することができます。
4) 蛍光アッセイに使用した各試料は回収し、ゲルシフトアッセイまたは精製キットに使用することができます。試料を回収する場合、試料間のコンタミネーションにご注意ください。

＜蛍光アッセイの注意点＞
本蛍光アッセイでは内部標準になるパラメータがありません。そのため、蛍光量は試料のタンパク質総量に大きく依存します。複数の試料を測定し、定量的に比較する場合、必ず事前にBCAアッセイによりタンパク質総量を揃えてから蛍光値を測定してください。別のタイミングに調製した試料同士の蛍光値比較は推奨していません。比較したい試料群は一括で反応キット処理及び蛍光アッセイすることを強く推奨します。

＜解析方法＞

解析目的に応じて下記の 2 つの解析方法があります。

1) 試料毎の S-パルミトイル化修飾特異性の判定

試料毎の *S*-パルミトイル化特異性評価を行う場合、**-/-** を試料自体の自家蛍光バックグラウンドシグナルとして -/+ および **+/+** を補正します（式 1、図 3-2 左下）。補正後 **+/+** と -/+ の比（**hpHA(+)/(-)**、式 2）をとることで特異性の評価ができます。hpHA(+)/(-) は数値が 1 よりも大きいほど *S*-パルミトイル化特異的に検出できていることを示しています。

Normalized FL intensity = [**+/+** or -/+] - [**-/-**]　　（式 1）

Specificity hpHA(+)/(-) = ([**+/+**] - [**-/-**])/([-/+] - [**-/-**])　　（式 2）

2) 複数試料間の *S*-パルミトイル化総量の比較解析

複数の試料間の *S*-パルミトイル化特異的シグナルの比較を行う場合、-/+ を非特異的な MfTag 標識バックグラウンドシグナルとして **+/+** を補正します（式 3、図 3-2 右下）。

Palmitoylation specific FL intensity = [**+/+**]-[-/+]　　（式 3）

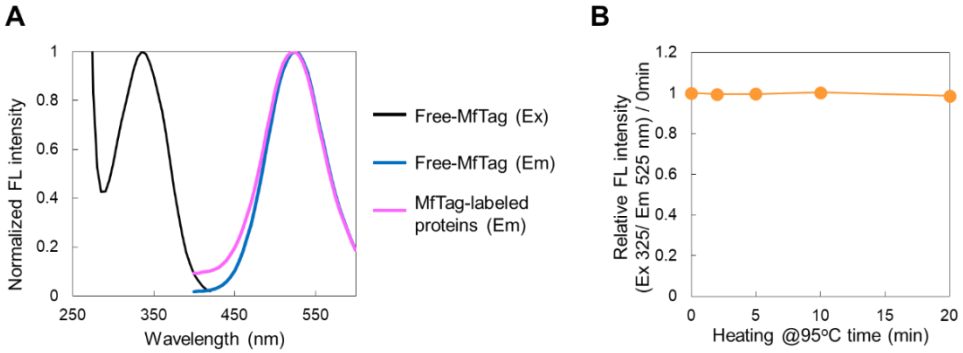


図 3-1 MfTag 中蛍光基の光学特性

(A) Free-MfTag および MfTag 標識タンパク質の励起・蛍光スペクトル

(B) MfTag 蛍光強度の熱安定性（励起 325 nm／蛍光 525 nm）

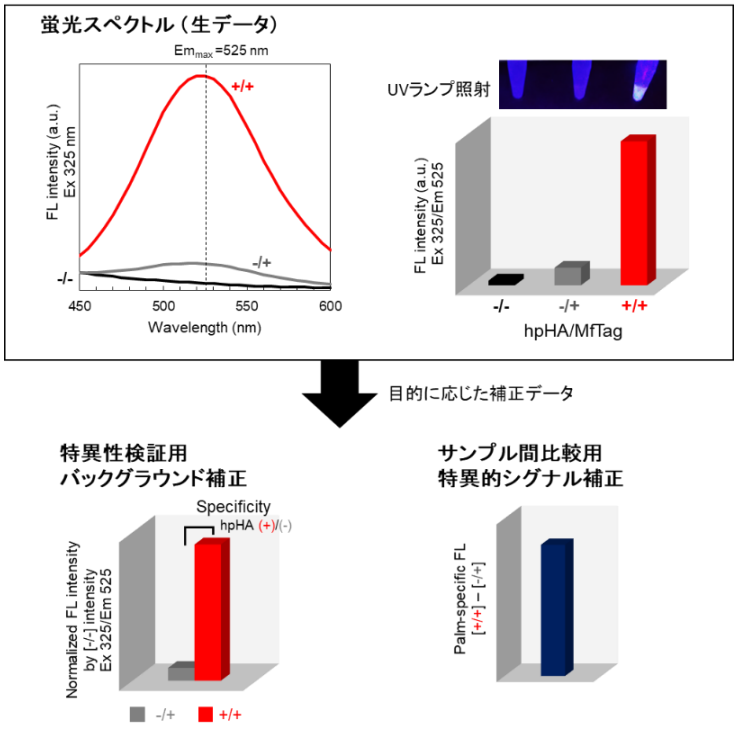


図 3-2 蛍光アッセイの解析方法概略

3-3. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイを行う場合、1 試料につき表 1-2 で示したように -/-、-/+ および +/+ の 3 種類の処理試料をご用意ください。

1) 上記 3-1.で調製した試料に濃縮型（2x-5x） Laemmli SDS-PAGE sample buffer（還元剤無添加）を添加し、95℃で 2 分加熱します。

注 13 還元条件下では MfTag が切断されてしまいますので、**必ず非還元条件下で SDS-PAGE を実施**する必要があります。

2) ゲル濃度の目安

目的タンパク質の分子量によりゲル濃度を変えることを推奨します。本キットの各種処理（還元、システインのブロッキングなど）により、本来の分子量と異なる位置にバンドが得られる可能性がありますので、SDS-PAGE／ウェスタンブロットの予備検討を推奨します。グラディエントゲルも使用できますが、MfTag による分子量シフト幅が小さくなるため、十分なシフトが得られない可能性があります。

表 3-1 ゲルシフトアッセイにおけるゲル濃度目安

分子量範囲	ゲル濃度目安
20-30 kDa	13-15%
30-40 kDa	11-13%
40-50 kDa	10-12%
50-70 kDa	8-10%
70-100 kDa	6-8%
>100 kDa*	<6%

*100 kDa 以上のタンパク質では、MfTag（約 5kDa）によるシフト幅が小さいため、個数の判断が難しくなります。

*上記の表は目安です。タンパク質の種類・性質や *S*-パルミトイル基の数によって適切なゲル濃度が異なる場合があります。目的タンパク質毎にゲル濃度は検討いただくことを推奨します。

3) SDS-PAGE の実施

4) メンブレンへの転写

ウェット、セミドライいずれも利用可能です。転写はタンパク質毎に最適な条件（メンブレン、転写バッファー、電流量、通電時間など）が変わる可能性がありますので、目的タンパク質にあった検討を推奨します。

5) ウェスタンブロット

【抗体の選択方法】

ゲルシフトアッセイにあたり抗体の選択は重要です。下記のガイドラインに沿って抗体を選定することを推奨します。

・特異性の高い抗体

目的タンパク質がシングルバンドで確認できる特異性の高い抗体を推奨します。MfTag によるバンドシフトで複数の新たなバンドが生じるため、特異性の低い抗体では判断しにくくなります。

・ポリクロ―ナル抗体を推奨

分子量（約 5kDa）の大きな MfTag が標識されるため、抗体のエピトープと MfTag 標識箇所（本来の *S*-パルミトイル化部位）が重なる場合、抗原抗体反応が低下する可能性があります。特に抗体のエピトープ、またはエピトープ近傍に 2 つ以上の MfTag が標識された場合、抗体が結合できず検出できない可能性があります。抗体のエピトープと *S*-パルミトイル化部位が既知の場合は事前にこの問題を回避できますが、いずれかが未知の場合はポリクロ―ナル抗体の使用が望ましいです。

・複数抗体による検証を推奨

初めてゲルシフトアッセイを実施する場合、可能であれば複数の目的タンパク質に対する抗体で評価することを推奨します。

【判定方法】

1) 特異性の判断

図 3-3 のように -/- が目的タンパク質の基準バンドになります。図 3-3 左のように -/+ に追加のバンドが見られず、+/+ にのみ追加のバンドが見られた場合、*S*-パルミトイル基特異的に検出できたと判断できます。もし図 3-3 右のように -/+ にも追加のバンドが観察された場合、フリーシステインのブロッキング不十分であることを指し、個数の判定は注意が必要です。

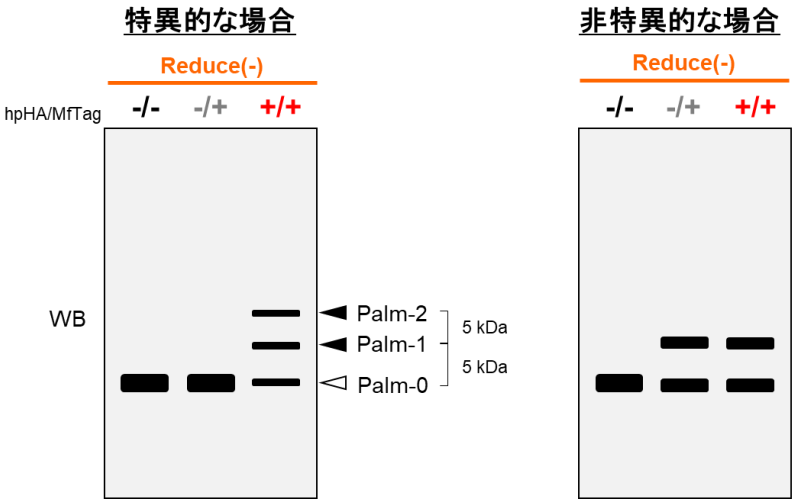


図 3-3 ゲルシフトアッセイの特異性の判断方法

2) 各シフトバンドの評価方法

MfTag の分子量は約 5 kDa で、MfTag の導入個数 *n* 個の場合、バンドはオリジナルバンド＋標識バンドで 最大（*n*+1）本になります。しかし、特定の個数の MfTag 修飾体が存在しないなど、個数が不鮮明の場合があります。その場合、分子量マーカーの SDS-PAGE における移動度と分子量の指数関数プロットを作製し、バンドシフトの移動度を比較することで、MfTag によりシフトしたバンドが MfTag 何個分に相当するか検討することができます。

実施例 Ras GTPase ファミリー Hras と Rap2b の解析

Ras 低分子量 G タンパク質ファミリーである Hras と Rap2b は、多くの研究報告より C 末端の 2 カ所で *S*-パルミトイル化修飾をうけることが知られています。マウス脳組織における Hras と Rap2b の解析を行いました。Hras（図 3-4 緑色）は +/+ 特異的にオリジナルバンドに加えて 2 本のバンドが新たに現れ、計 3 本のバンドが確認できます。この結果は、Hras が 2 カ所 *S*-パルミトイル化修飾をうけることを示しています。一方、Rap2b（図 3-4 ピンク色）は +/+ 特異的に高分子量側でバンドが 1 本のみ観察されました。それぞれバンドの移動度から Rap2b の MfTag 標識個数を解析します。

まず、各分子量マーカーのゲル移動度 Rf を測定し、分子量とゲル移動度のプロットを作製後、指数関数近似式でフィッティングして近似式を算出します。次いで、+/+ の各バンドの移動度を測定し、近似式を用いて見かけの分子量を算出します。もし +/+ のオリジナルバンドが消失している場合、-/- または -/+ のバンドを代用してください。これにより、各バンド間の分子量差が推定できます。MfTag は約 5 kDa ですが、タンパク質の種類や標識個数、2 つ以上の MfTag の近接度合いなどによって 4-7kDa 程度のばらつきが生じるケースがあります。Hras はそれぞれ約 5 kDa のシフトが確認できたことからそれぞれ MfTag が 1 個、2 個標識されたものと判定できます。Rap2b はオリジナルバンドに対し約 11 kDa のシフトが見られたことから、観察されたバンドは MfTag が 2 個標識されたものであることが分かります。この結果より Rap2b はマウス脳において、ほぼ全量が 2 カ所 *S*-パルミトイル化修飾をうけることを示唆しています。

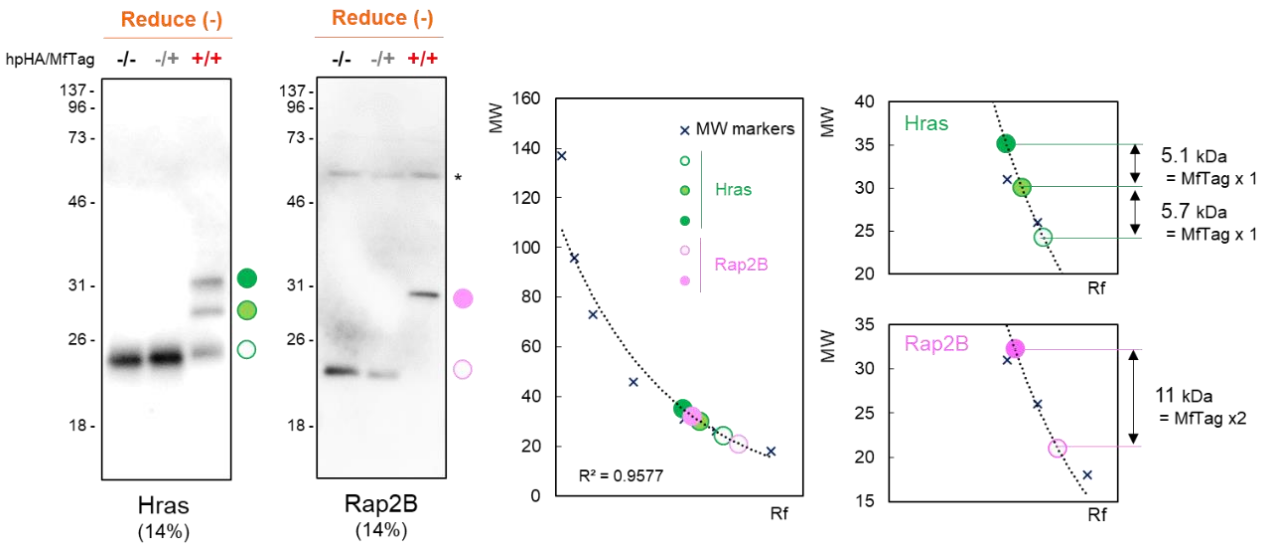


図 3-4　マウス脳組織における Hras と Rap2b の MfTag 標識個数の判定

*抗体自体の非特異的検出バンド

3) MfTag 標識による使用する抗体反応への影響評価

MfTag 標識による抗体抗原反応が無標識に比べて変化する可能性がありますので、ゲルシフトアッセイでは MfTag 標識数（*S*-パルミトイル基の個数）は評価できますが各バンド間の定量はできません。例えば、図 3-5 では抗原が MfTag 標識部位と重なるケース（上段）と重ならないケース（下段）を示しています。抗原が MfTag 標識部位と重なる場合、著しく認識能力が低下する可能性があり、**+/+** の各バンドの強度をすべて加算しても **-/-** のバンド強度に達しないことがあります。このケースでは、各バンドの強度で比を取ると誤った存在比を与える危険性がありますので、ゲルシフトアッセイは MfTag 標識個数の判定にとどめ、バンド間の定量は行わないことを推奨しています。

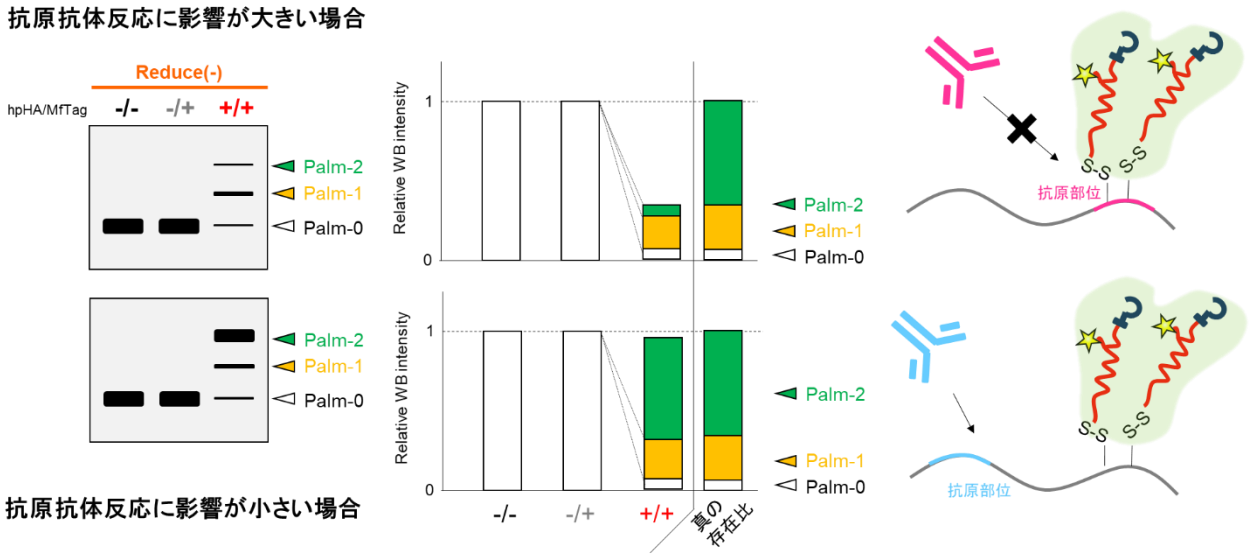


図 3-5　MfTag による抗原抗体反応に与える影響

プロトコール編：精製キットの部 (商品コード ：F017B)

別途用意が必要なもの

＜試薬類＞
・超純水
・2x-5x Laemmli SDS-PAGE sample buffer

＜機器類＞
・ヒートブロック（95℃設定が可能なもの）
・恒温槽（37℃設定が可能なもの）
・遠心分離機
・ハンディーUV ランプ（300-370 nm 範囲の設定可能なもの）（オプション）

キットコンポーネント一覧と保存方法

本製品には下記の 6 コンポーネントが含まれています。各コンポーネントは適切な温度にて保管してください。

表 0. キットコンポーネント一覧

コンポーネント	包装	保管温度
①2x Binding Buffer	60 mL ボトル	室温
②10x Wash Additive	1.5 mL チューブ x 2 本	室温
③10x Elution Additive	1.5 mL チューブ	室温
④Empty Column	カラム x 24 本	室温
⑤Affinity Beads	1.5 mL チューブ x 4 本	4℃（凍結禁止）
⑥10x Reduction Reagent	1.5 mL チューブ	4℃（再溶解前） -20℃以下（再溶解後）

0. 試薬調製

0-1. Binding/Wash/Elution buffer の調製

本精製キットでは **Binding Buffer**、**Wash Buffer**、**Elution Buffer** を使用します。それぞれ①**2x Binding Buffer** と 10x の添加剤を用いて下記の要領で調製します。**2x Binding buffer** は析出しやすいため、使用前に 37℃で加温して完全に溶けたことを確認してから使用してください。また、各 1x Buffer は用事調製を推奨しています。

1x Binding Buffer の調製

	x 1 カラム	x 2 カラム	x 24 カラム
①2x Binding buffer	200 μL	400 μL	4.8 mL
H_2O	200 μL	400 μL	4.8 mL
Total	400 μL	800 μL	9.6 mL

1x Wash Buffer の調製

	x 1 カラム	x 2 カラム	x 24 カラム
①2x Binding buffer	250 μL	500 μL	6.0 mL
②10x Wash Additive	50 μL	100 μL	1.2 mL
H_2O	200 μL	400 μL	4.8 mL
Total	500 μL	1000 μL	12 mL

1x Elution Buffer の調製

	x 1 カラム	x 2 カラム	x 24 カラム
①2x Binding buffer	75 μL	150 μL	1,800 μL
③10x Elution Additive	15 μL	30 μL	360 μL
H_2O	60 μL	120 μL	1,440 μL
Total	150 μL	300 μL	3,600 μL

1. カラム精製プロトコール

1-0. カラム精製プロトコールの概要

【1】 変換反応後の試料の加熱 ー 2 分間@95℃ ＋ ＞5 分間@室温
【2】 スピンカラムの調製 ー 5 分間程度
（使用する試薬： **Empty Column**、**Affinity Beads**、**1x Binding Buffer**）
【3】 加熱済み試料の遠心分離 ー 2 分間@RT
【4】 試料のカラムアプライ ー 10 分間@RT
【5】カラムの洗浄操作 ー 15 分間程度
（使用する試薬： **1x Binding Buffer**、**1x Wash Buffer**）
【6】 精製タンパク質の溶出 ー 15 分間程度
（使用する試薬： **1x Elution Buffer**）

1-1. カラム精製プロトコールの詳細

反応キットの部 3-1. で調製した試料のうち -/+ および +/+ をペアで使用します。

1) 反応キットの部 3-1. ステップ 4-17)で調製した -/+ および +/+ のタンパク質沈殿に **1x Binding Buffer** 110 μL を添加し、ピペッティングまたはウォーターバス型超音波破砕装置で溶解します。
2) タンパク質沈殿の十分な溶解が確認出来たら、95℃で 2 分間加熱します。
3) タンパク質溶液を室温に戻します。
   注 1 この溶液を用いてカラム精製前に蛍光アッセイを実施することも可能です。蛍光アッセイの方法については反応キットの 3-2.をご参照ください。
4) 下記手順に従いスピンカラムの平衡化をおこないます。
   4-1) 使用する本数の④**Empty Column** を用意し、1.5 mL チューブにそれぞれセットします。
   4-2) ⑤**Affinity Beads** をよく懸濁したのち、ワイドボアチップ（または先端を切ったチップ）で 150 μL をカラムに移します。
   4-3) 蓋を開けたまま遠心分離（3,000 xg, 1 min, 室温）し、**Affinity Beads** と保存溶液を分離します。
   4-4) **1x Binding Buffer** 150 μL を添加し 1 分以上インキュベートすることで平衡化します。
   注 2 この状態で最大半日間保管できます。保管する場合、ビーズが長時間乾燥しないようにご注意ください。
   4-5) 蓋を開けたまま遠心分離（3,000 xg, 1 min, RT）し、**Affinity Beads** と **1x Binding Buffer** を分離します。
   4-6) 平衡化済み Affinity Beads 充填カラムを新しい 1.5 mL チューブに移します。これによりカラムの準備ができました。
5) 室温に戻したステップ 3) のタンパク質溶液を遠心分離（10,000 xg, 2 min, 室温）し、溶け残りやゴミを沈殿させます。
   注 3 溶け残りがカラムに入ると溶出時のバックグラウンドシグナル増加につながる可能性があります。
6) ステップ 5) で遠心分離した上清 50 μL を、ステップ 4) で調製した Affinity Beads 充填カラムに添加し、タッピングにより攪拌します。
7) 蓋を開けたまま 10 分間室温でインキュベートします。
   このステップの間に、ステップ 5)の上清の残りより新しいチューブに 50 μL 回収し、**1x Binding Buffer** 50 μL を添加しカラム精製前試料 ”Input” 100 μL を調製します。
8) 蓋を開けたまま遠心分離（3,000 xg, 1 min, 室温）して通液します。回収用チューブの交換は不要です。
   注 4 通液後の MfTag 標識タンパク質の素通り量は暗室下ハンディーUV ランプで黄色蛍光基を指標に簡易的に観察することが可能です。もし、通液試料より強い黄色蛍光が観察される場合、もう一度カラムに添加することで吸着量を改善することが可能です。
9) さらに **1x Wash Buffer** 50 μL をカラムに添加し、蓋を開けたまま 2 分間インキュベートします。
10) 蓋を開けたまま遠心分離（3,000 xg, 1 min, RT）し、8) の濾液とあわせて ”Flow through (FT)” 画分 100 μL として回収します。
11) カラムを新しい 1.5 mL チューブ（洗浄画分回収用 1）に移します。

12) **1x Wash Buffer** 100 μL をカラムに添加し、蓋を開けたままよくタッピングして攪拌したのち、遠心分離（3,000 xg, 1 min, 室温）して通液します。
13) ステップ 12）を繰り返しおこない ”Wash-1” 画分として計 200 μL 回収します。
14) カラムを新しい 1.5 mL チューブ（洗浄画分回収用 2）に移し、ステップ 12, 13)を 2 回繰り返し、”Wash-2” 画分として計 200 μL 回収します。

注 4 各 Wash 画分を回収・解析したい場合、毎回回収用チューブを交換してください。

15) カラムを新しい 1.5 mL チューブ（カラム溶出画分回収用）に移します。
16) **1x Elution Buffer** 25 μL をカラムに添加し、蓋を開けたまま 2 分間インキュベートしたのち、蓋を開けたまま遠心分離（2,000 xg, 1 min, 室温）して通液することで回収します。
17) ステップ 16) を計 4 回繰り返しおこない、”Elution” 画分として計 100 μL 回収します。

注 6 Elution buffer 通液後の Affinity Beads は著しく変性するため再利用できません。

注 7 Elution 画分は蛍光アッセイに適用できません。蛍光が著しく低下するため、Input 中の蛍光強度と比較することができません

注 8 **1x Elution Buffe**r には BCA アッセイに干渉する物質が含まれるため、“Elution” 画分は BCA アッセイができません。タンパク質定量を行いたい場合、”Elution” 画分中のタンパク質を CMppt、アセトン沈殿、TCA 沈殿などにかけ、脱塩する必要があります。

18) “**Input**”、”**FT**”、**”Elution**” 画分それぞれに 2x-5x Laemmli SDS-PAGE sample Buffer を適量添加します。還元条件下で SDS-PAGE を行う場合キット付属の**⑥10x Reduction Reagent** をさらに適量添加します。95℃で 5 分間加熱処理後、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行います。

注 9 本カラムからの **1x Elution Buffer** による溶出は MfTag 標識を維持したまま溶出されます。還元剤の添加有無によって SDS-PAGE における泳動パターンが異なりますので、次項の選択方法をもとにご選択ください。

注 10 ”Input”、”FT”および”Elution”は 100 μL ずつの等液量のため、試料間比較することが可能です。

1-2. 解析方法

SDS-PAGE における非還元・還元処理の選択

本カラムからの **1x Elution Buffer** による溶出は MfTag 標識を維持したまま溶出されます。そのため、非還元条件下で SDS-PAGE をおこなうと MfTag の標識個数に応じたバンドシフトが誘導されますが、一方で、キットに付属の **10x Reduction Reagent** を添加し、還元条件下で SDS-PAGE をおこなうと MfTag は除去でき、バンドは収束します（図 1-1）。精製キット終了後は下記実験目的に応じて、非還元条件下と還元条件下のいずれの条件下で実施するか選択する必要があります（表 1-1）。

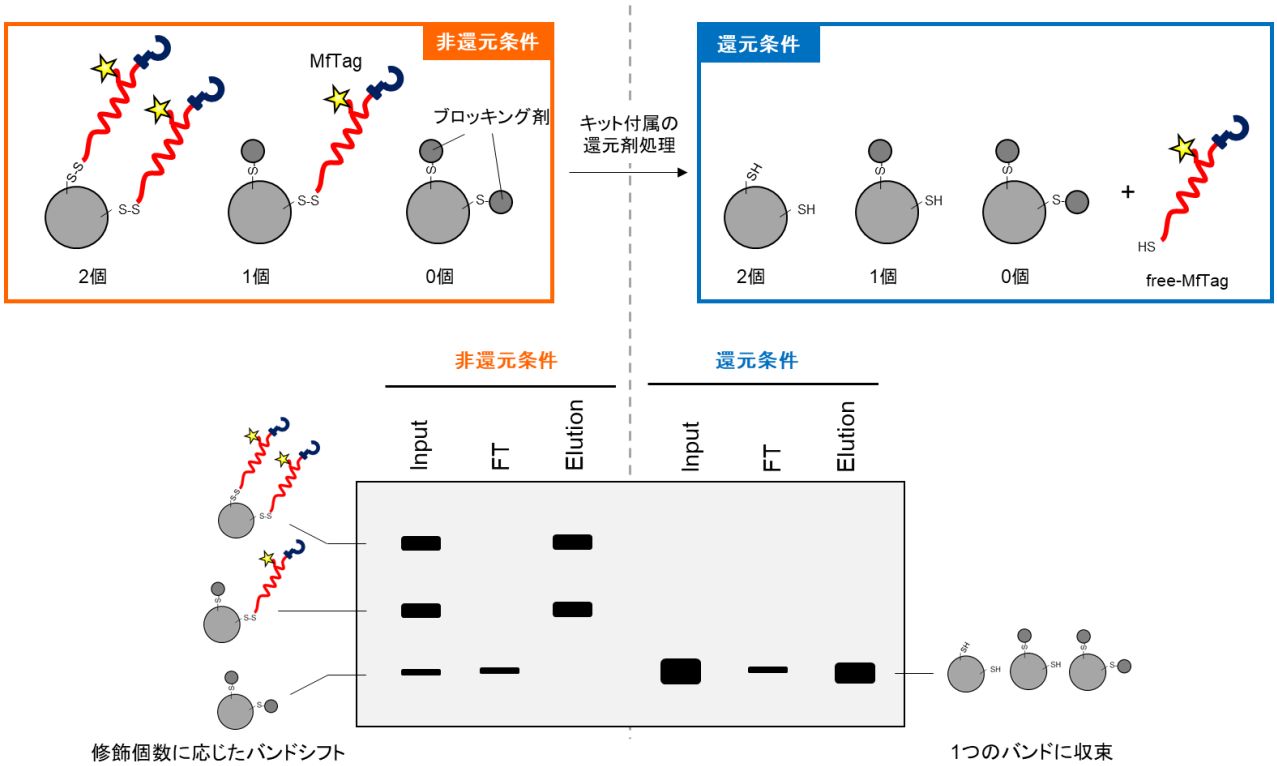


図 1-1　2 か所 MfTag 標識されうるタンパク質の非還元・還元時の模式図

表 1-1 アプリケーションに応じた非還元・還元条件の選択方法

条件	アプリケーション
非還元条件	ゲルシフトアッセイ SDS-PAGE ゲルの蛍光検出
還元条件	精製キット実施後の総タンパク質の銀染色による検出 および目的タンパク質のウェスタンブロットによる検出
非還元・還元両方必要	精製キット実施後の目的タンパク質の *S*-パルミトイル化修飾の割合算定

特異性の判定

-/+ および +/+ 処理試料の Elution 画分を**還元条件下**（MfTag を切断した状態）で SDS-PAGE 後、銀染色（CBB 染色）または WB を実施することで *S*-パルミトイル化修飾の特異性を評価することができます（図 1-2A）。**+/+** のみにシグナルが得られる場合、そのタンパク質は *S*-パルミトイル化修飾タンパク質である可能性が高いことを示します。一方、-/+ でもシグナルが得られる場合（図 1-2A の白矢印で示すバンド）、ブロッキング不足による MfTag の非特異的な標識を示し、*S*-パルミトイル化修飾タンパク質ではないと考えられるため注意が必要です。

精製状況の確認と *S*-パルミトイル化修飾割合の推定

上記の特異性判定で目的タンパク質が **+/+** 特異的に検出できることが確認できた場合、**+/+**処理の **Input、FT および Elution 画分を同液量ずつ非還元条件下**（MfTag を維持したままの状態）で SDS-PAGE 後、目的タンパク質に対する抗体を用いて WB を実施することで精製度の確認が可能です。図 1-2B 上段右側の**非還元条件下**では MfTag によるバンドシフトが誘導された状態で観察できますが、FT 画分でバンドシフトしたシグナルが消失し、そのシグナルが Elution 画分に観察されていれば、カラム精製が成功していると判断できます。この精製条件下であれば、左側の**還元条件下**で *S*-パルミトイル化修飾体と非修飾体のおおよその割合を算定できます。一方、図 1-2 下段のケースでは、**非還元条件下**においてバンドシフトしたシグナルが FT に残存していて、精製が不十分であることを意味しています。この精製条件下では、左側の**還元条件下**で *S*-パルミトイル化修飾体と非修飾体の比率の算定はできませんのでご留意ください。

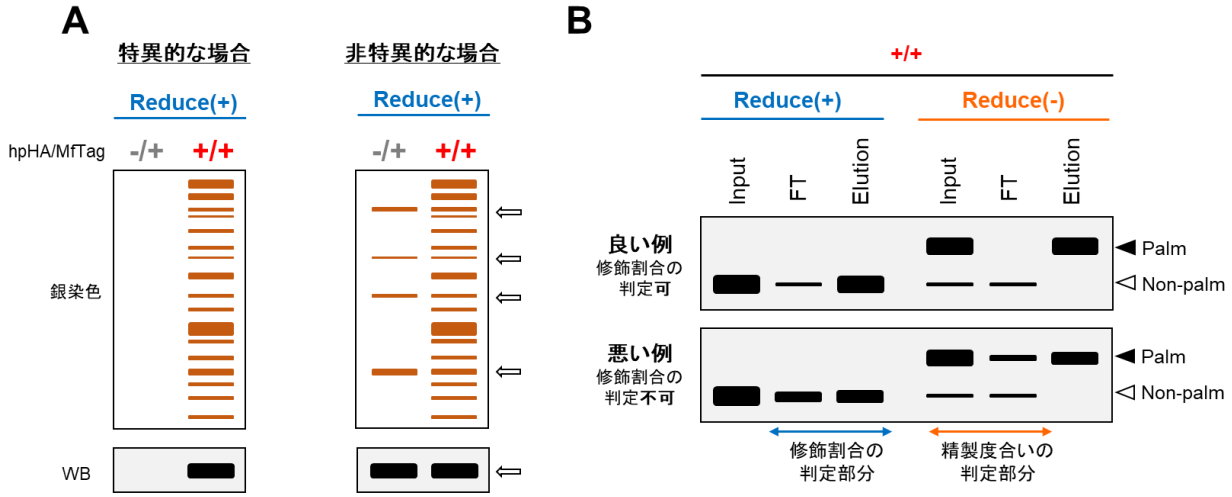


図 1-2 カラム精製における *S*-パルミトイル化修飾の特異性判定と修飾割合の算定方法

アプリケーションデータ編

注意

本アプリケーションデータにおいて、hpHA(-)/MfTag(-)、hpHA(-)/MfTag(+)、hpHA(+)/MfTag(+)をそれぞれ**-/-**、-/+、**+/+** と表記しています。

＜蛍光アッセイの例＞

各試料について**-/-**、-/+、**+/+**の 3 つの処理をおこない、蛍光分光光度計にて 325 nm 励起における 525 nm の蛍光強度を測定した。下記 2 通りの補正グラフを作成した。

A 試料毎の S-パルミトイル化修飾特異性の判定

B 複数試料間の *S*-パルミトイル化総量の比較解析

※各解析方法の詳細はプロトコール編（反応キットの部）3-2. 蛍光アッセイ をご参照ください。

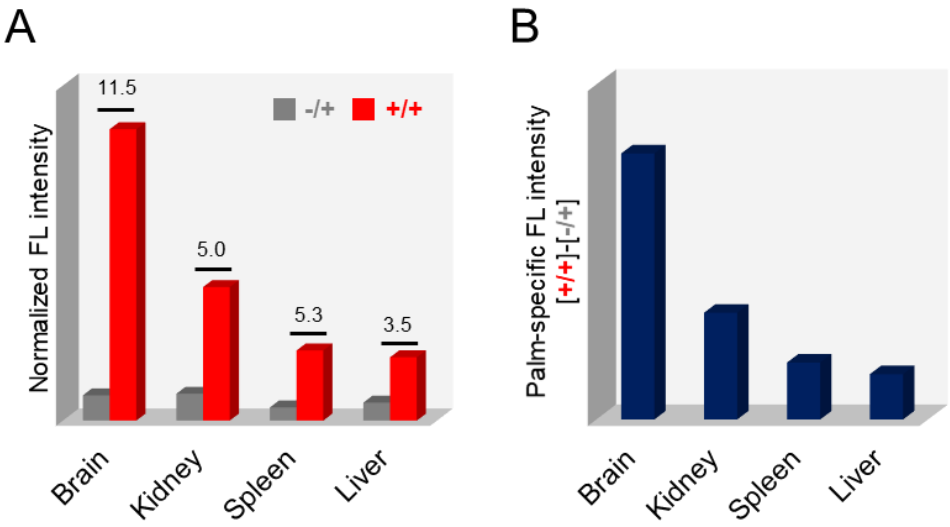
実施例 1 マウス由来組織の *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料：成体マウスより摘出した脳、腎臓、脾臓、肝臓

ライセート調製方法：トータル組織ライセート

スタート試料量：200 μg／1 処理 総タンパク質量

使用したキット：反応キット



(A) 各試料における *S*-パルミトイル化修飾特異性の評価

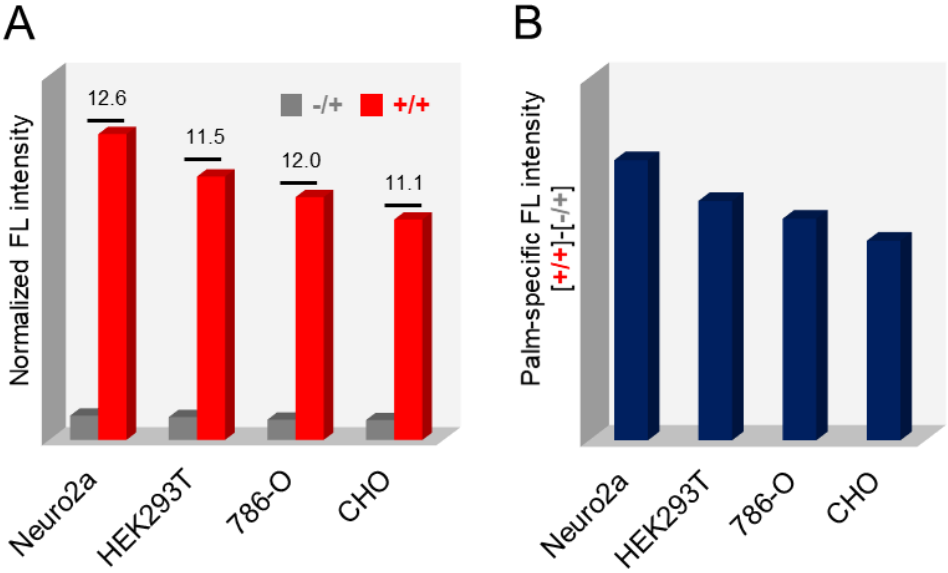
いずれの組織試料についても、-/+と**+/+**で高い SN 比が確認され、*S*-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。

(B) 4 つの組織試料間における *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較

今回比較した 4 つの組織においては脳組織の *S*-パルミトイル化修飾量が最も多いことが分かった。

実施例 2 培養細胞株の *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料：培養細胞株　Neuro2a、HEK293T、786-O、Chinese hamster ovary(CHO)
ライセート調製方法：トータル細胞ライセート
スタート試料量：200 μg／1 処理　総タンパク質量
使用したキット：反応キット

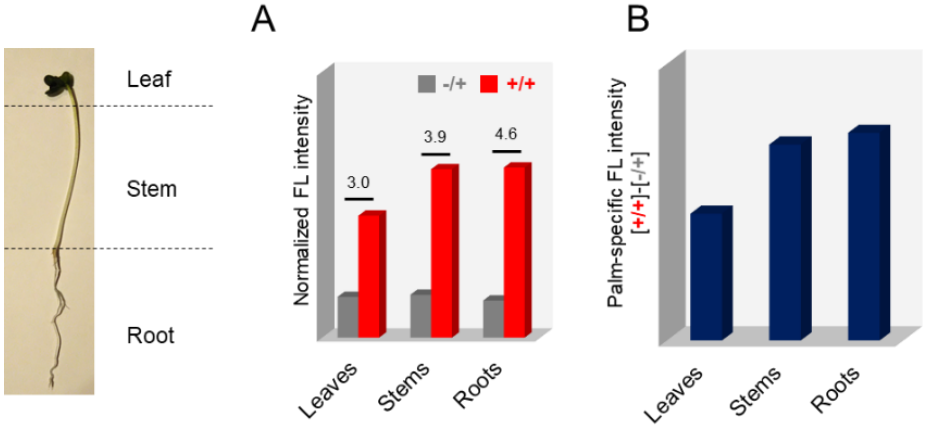


(A) 各試料における *S*-パルミトイル化修飾特異性の評価
いずれの組織試料についても、-/+と+/+で高い SN 比（hpHA(+)/(-) >10）が確認され、*S*-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。

(B) 4 種類の培養細胞試料間における *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較
今回比較した 4 種類の細胞株においては Neuro2a の *S*-パルミトイル化修飾量が最も多いことが分かった。

実施例 3 ブロッコリースプラウトの各部における *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

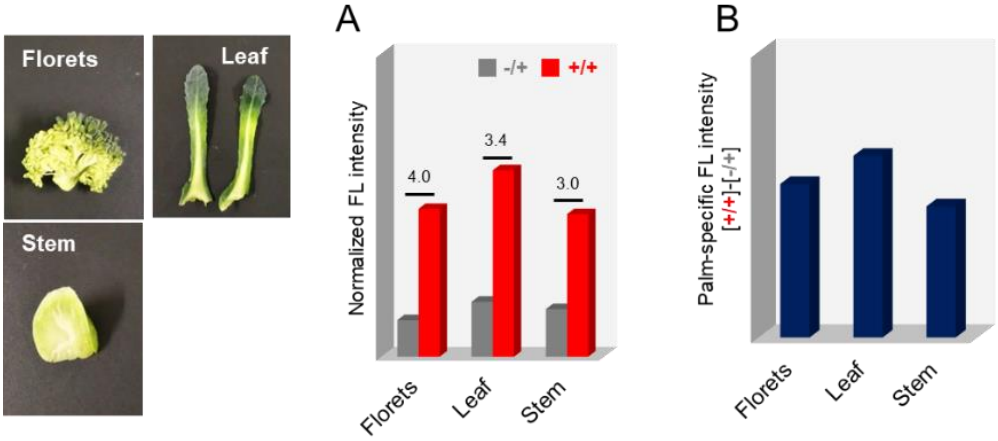
試料：ブロッコリースプラウトの葉、茎、根
ライセート調製方法：トータル組織ライセートより不溶性残渣を取り除いたもの
スタート試料量：200 μg／1 処理　総タンパク質量
使用したキット：反応キット



(A) 各試料における *S*-パルミトイル化修飾特異性の評価
いずれの組織試料についても、hpHA(+)/(-) >3 が確認され、S-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。
(B) 3 部位試料間における *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較
今回比較した 3 つの部位では幹と根が同程度であることが分かった。

実施例 4 ブロッコリー組織の各部における *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料：ブロッコリーのつぼみ、葉、茎
ライセート調製方法：トータル組織ライセートより不溶性残渣を取り除いたもの
スタート試料量：200 μg／1 処理　総タンパク質量
使用したキット：反応キット

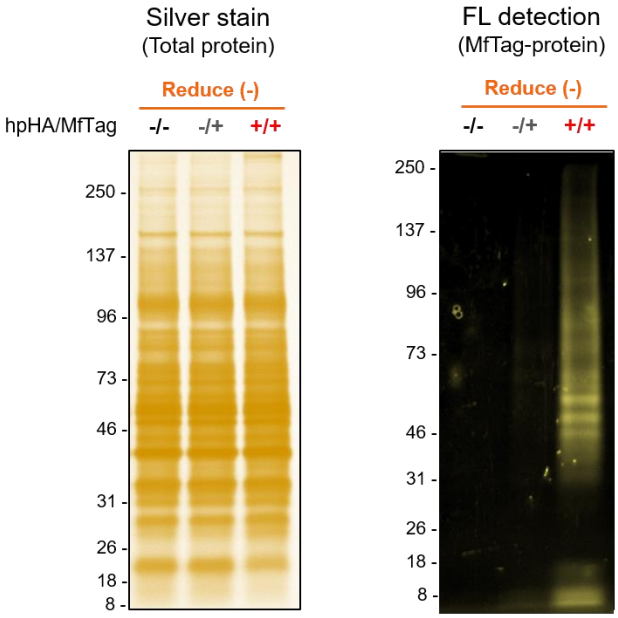


(A) 各試料における *S*-パルミトイル化修飾特異性の評価
いずれの組織試料についても、hpHA(+)/(-) >3 が確認され、S-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。
(B) 3 部位試料間における *S*-パルミトイル化修飾総量の相対比較
今回比較した 3 つの部位では葉、つぼみ、幹の順で S-パルミトイル化修飾総量が多いと見積もられた。

＜蛍光イメージャーによる SDS-PAGE ゲル内の *S*-パルミトイル化タンパク質バンドの検出＞

実施例　マウス脳試料における *S*-パルミトイル化タンパク質の SDS-PAGE ゲル内検出

試料：成体マウスから摘出した脳組織
ライセート調製方法：トータル組織ライセート
使用したキット：反応キット
スタート試料量：200 μg／処理　総タンパク質量
電気泳動条件：**非還元条件**（MfTag 標識を維持）
検出方法：銀染色および蛍光イメージャー検出（Ex 312 nm／Em >560 nm）

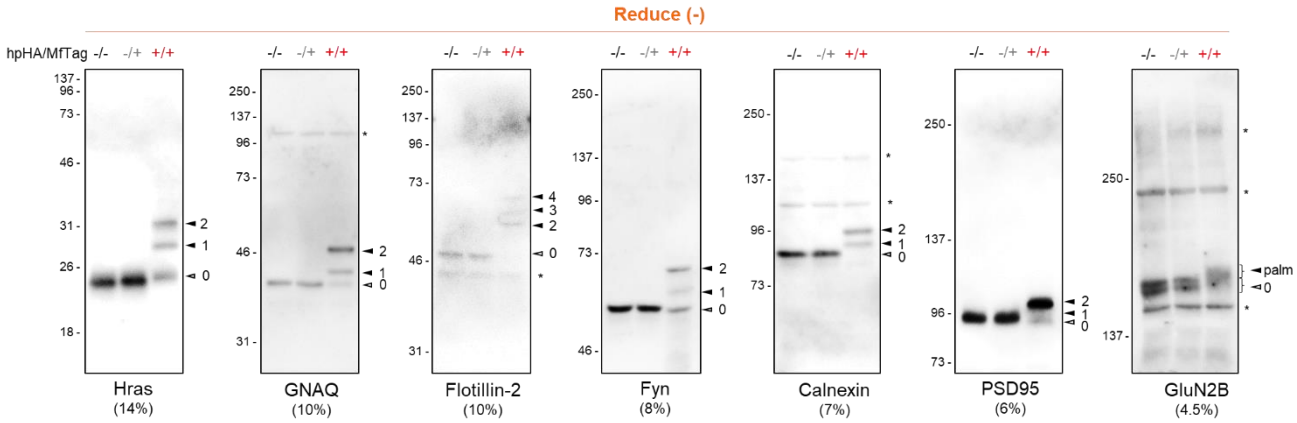


マウス脳組織ライセートに対し反応キットを用いて**-/-**、**-/+**、**+/+** の 3 種類の処理をおこなった。反応後、各処理試料を MfTag が維持されるよう**非還元条件下**にて 2 枚のゲルで SDS-PAGE を実施し、1 枚は銀染色で総タンパク質を検出、もう 1 枚を 312 nm UV 光源を用いた蛍光イメージャーで検出した。**-/-**、**-/+**、**+/+** のいずれも総タンパク質量に差はみられないが、**+/+**特異的に蛍光が検出された。

＜ゲルシフトアッセイによる目的タンパク質の *S*-パルミトイル化修飾個数の判定＞

実施例　マウス脳試料における代表的な *S*-パルミトイル化タンパク質の修飾個数判定

試料：成体マウスから摘出した脳組織
ライセート調製方法：トータル組織ライセート
使用したキット：反応キット
スタート試料量：200 μg／処理　総タンパク質量
電気泳動条件：**非還元条件**（MfTag 標識を維持）
（ゲル濃度は因子名の下のカッコ内参照）
検出方法：PVDF メンブレンに転写後、各種特異的抗体を用いて WB を実施



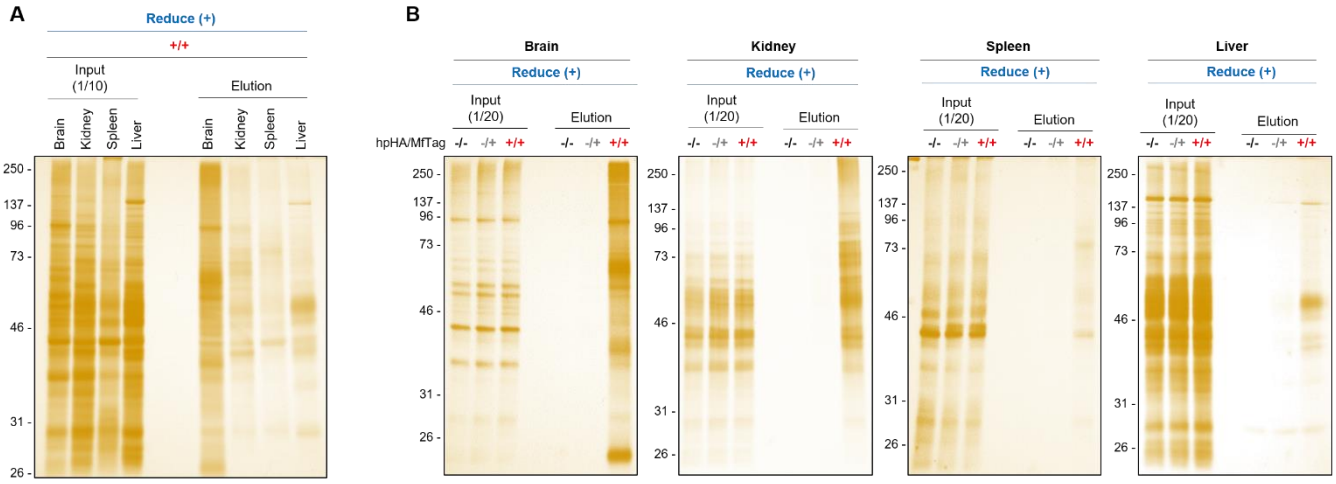
注：図中の* は抗体の非特異的な検出を示す。

マウス脳組織ライセートに対して反応キットを用いて**-/-**、**-/+**、**+/+** の 3 種類の処理をおこなった。反応後、各処理試料を MfTag が維持されるよう**非還元条件下**にて各因子の分子量にあったゲル濃度で電気泳動を実施し、PVDF メンブレンに転写したのち代表的な *S*-パルミトイル化タンパク質に対する特異的抗体を用いた WB で検出した。いずれの因子においても**+/+**のみでバンドシフトが観察され、**-/+**ではバンドシフトが見られていないため、*S*-パルミトイル化特異的な変換反応が確認できた。マウス脳組織において Hras は 2 つ、GNAQ は 2 つ、Flotillin-2 は 4 つ、Fyn は 2 つ、Calnexin は 2 つ、PSD95 は 2 つの MfTag、すなわち *S*-パルミトイル基を有すると推定された。なお、GluN2B は分子量約 150 kDa で、**+/+**特異的にスメア状のバンドシフトが観察されたが、MfTag の標識個数の判定はできなかった。

＜精製キットによる S-パルミトイル化タンパク質の網羅的精製と検出＞

実施例 1 マウス由来組織における *S*-パルミトイル化タンパク質の精製と特異性判定

試料：成体マウスより摘出した脳、腎臓、脾臓、肝臓
ライセート調製方法：トータル組織ライセート
使用したキット：反応キット＋精製キット
スタート試料量：200 μg／1 処理 総タンパク質量
精製カラムアプライタンパク質量：100 μg／1 処理 総タンパク質量
電気泳動条件：**還元条件下**（MfTag 標識を除去）



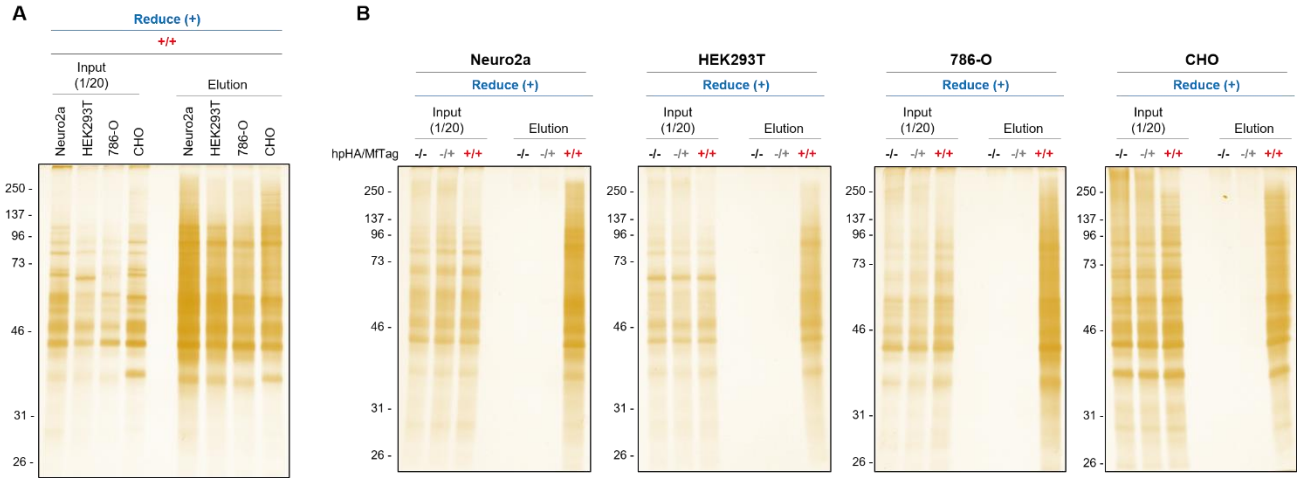
A： 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の組織の**+/+**処理のカラム精製前試料（Input、10 倍希釈）およびカラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ**還元条件下**で電気泳動し精製量を比較した。4 種類の組織では脳組織で最も多く精製されていることがわかる。

B： 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の組織それぞれの 3 処理（**-/-**、**-/+**、**+/+**）のカラム精製前試料（Input、20 倍希釈）およびカラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ**還元条件下**で電気泳動し、銀染色で検出。いずれの組織においても**+/+**特異的な精製タンパク質が多数観察された。

注 肝臓では、30kDa 付近の一部のタンパク質が**-/-**でもカラム精製されているのが確認できる。このようなタンパク質はカラム吸着性のある非特異成分である。

実施例 2 培養細胞株における *S*-パルミトイル化タンパク質の精製と特異性判定

試料：培養細胞株　Neuro2a、HEK293T、786-O、Chinese hamster ovary(CHO)
ライセート調製方法：トータル細胞ライセート
使用したキット：反応キット＋精製キット
スタート試料量：200 μg／1 処理　総タンパク質量
精製カラムアプライ量：100 μg／1 処理　総タンパク質量
電気泳動条件：還元条件下（MfTag 標識を除去）



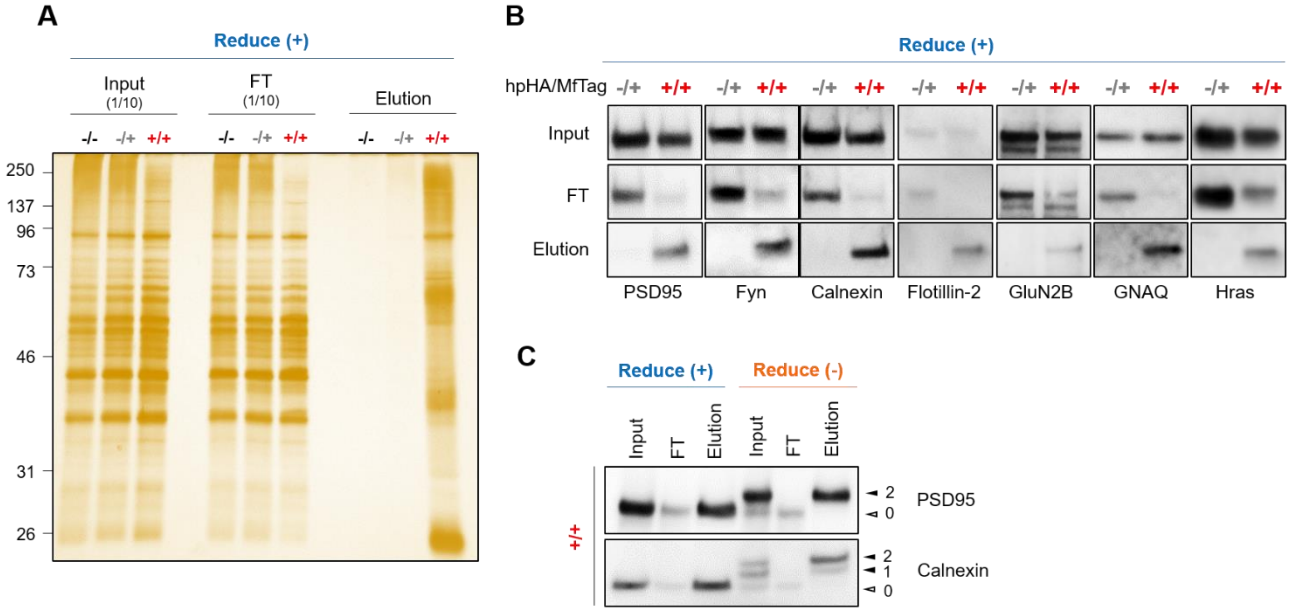
A：　精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の細胞株の+/+処理のカラム精製前試料（Input、20 倍希釈）およびカラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ還元条件下で電気泳動し精製量を比較した。4 種類の細胞株では Neuro2a で比較的多く精製されていることがわかる。

B：　精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の細胞株それぞれの 3 処理（-/-、-/+、+/+）のカラム精製前試料（Input、20 倍希釈）およびカラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ還元条件下で電気泳動し、銀染色で検出した。いずれの細胞株においても+/+特異的な精製タンパク質が多数観察された。また、いずれ細胞株においても-/-、-/+の Elution 画分からはほとんどバックグラウンドシグナルが観察されなかった。

＜精製キットによる目的タンパク質の *S*-パルミトイル化修飾判定と修飾割合推定＞

実施例　マウス脳試料の代表的な *S*-パルミトイル化タンパク質の検出と修飾割合推定

試料：成体マウスより摘出した脳
ライセート調製方法：トータル組織ライセート
使用したキット：反応キット＋精製キット
スタート試料量：200 μg／1 処理
精製カラムアプライ量：100 μg／1 処理
電気泳動条件：**還元条件**（図 A、B、C-左）および**非還元条件**（図 C-右）



A：　精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製操作後、カラム精製前試料（Input、10 倍希釈）、カラム素通画分（Flow through（FT）、10 倍希釈）、カラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ**還元条件下**で電気泳動し、銀染色で検出した。総タンパク質量に差がみられない中、**+/+** に特異的な精製タンパク質が多数検出された。

B：　精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製操作後、Input、FT、Elution（いずれも原液）を同液量ずつ**還元条件下**で電気泳動し、PVDF メンブレンへ転写したのち 7 種類の代表的な *S*-パルミトイル化タンパク質の各特異的抗体を用いてウェスタンブロットで検出をおこなった。各タンパク質の Input、FT、Elution は同一メンブレン上で、データを取得した。いずれのタンパク質についても**+/+**特異的に Elution で検出された。

C：　精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製操作後、Input、FT、Elution（いずれも原液）を同液量ずつ**還元条件下**（左）、および**非還元条件下**（右）で電気泳動し、PVDF メンブレンへ転写したのち代表的な *S*-パルミトイル化タンパク質である PSD95 と Calnexin の特異的な抗体を用いてウェスタンブロットで検出をおこなった。まず、**非還元条件**（右）を見ると、PSD95、Calnexin ともに MfTag 標識済みのバンドは FT には見られず、Elution のみ観察されたため、カラム精製が良好に完了していることがわかる。このようなケースにおいて、**還元条件**（左）で FT と Elution の存在量を比較することで、*S*-パルミトイル化修飾存在量を推察することができ、PSD95、Calnexin ともに大部分が *S*-パルミトイル化体であることが推定された。

＜総合的なアプリケーション例＞

実施例 1　マウス脳組織の組織分画による *S*-パルミトイル化タンパク質の濃縮

事前の試料調製:

図 A に沿ってマウス脳組織から P2 膜画分および P2-TritonX100 不溶性画分（P2-TXinsol）を取得した。

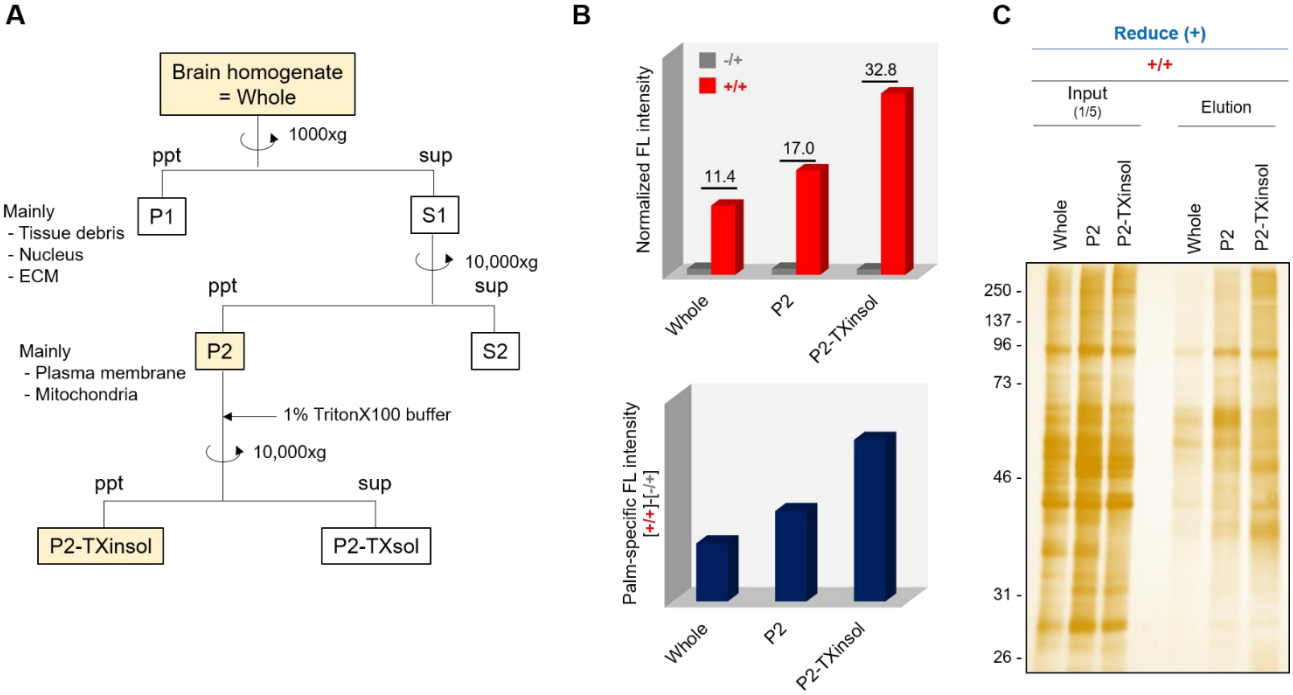
使用したキット:反応キット＋精製キット

分析方法:蛍光アッセイ、カラム精製溶出物の銀染色

スタート試料量:100 μg／1 処理

精製カラムアプライ量:50 μg／1 処理

電気泳動条件:**還元条件下**



A:　P2 および P2-TXinsol 画分の取得方法。マウス全脳を界面活性剤不含破砕バッファー（50 mM phosphate (pH 7.4), 150mM NaCl, 320 mM sucrose）中にてダウンス型ホモジナイザーで破砕後、低速遠心分離にて P1 画分を沈殿として除去したのち、上清 S1 を中速遠心分離にかけた。沈殿を P2 画分として回収し、さらに P2 画分の半分に 1% TritonX100 バッファーを添加して可溶化後、中速遠心分離で TritonX100 可溶性画分（P2-TXsol）と不溶性画分（P2-TXinsol）に分画した。回収した P2 および P2-TXinsol 画分に 1x Basal Buffer を添加し可溶化して反応キットに使用した。

B:　蛍光アッセイによる各試料の hpHA 特異性の評価（上）および各試料間の *S*-パルミトイル化量の相対比較（下）。全脳組織に比べ P2 画分、P2-TXinsol 画分で *S*-パルミトイル化タンパク質が濃縮しているのが確認できる。

C:　精製キットによる精製作業後、各**+/+**のカラム精製前試料（Input、5 倍希釈）およびカラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ**還元条件下**で電気泳動し、銀染色で検出した。精製されたタンパク質が全脳組織に比べ P2 画分、P2-TXinsol 画分で *S*-パルミトイル化タンパク質が濃縮しているのが確認できる。

実施例 2　培養細胞における細胞内 *S*-パルミトイル化タンパク質分布の解析

事前の試料調製：

図 A に沿って Neuro2a 細胞から全細胞ライセート、P_{10k} 画分（主に細胞膜）、S_{10k} 画分（主に小胞体膜および細胞質）を取得した。

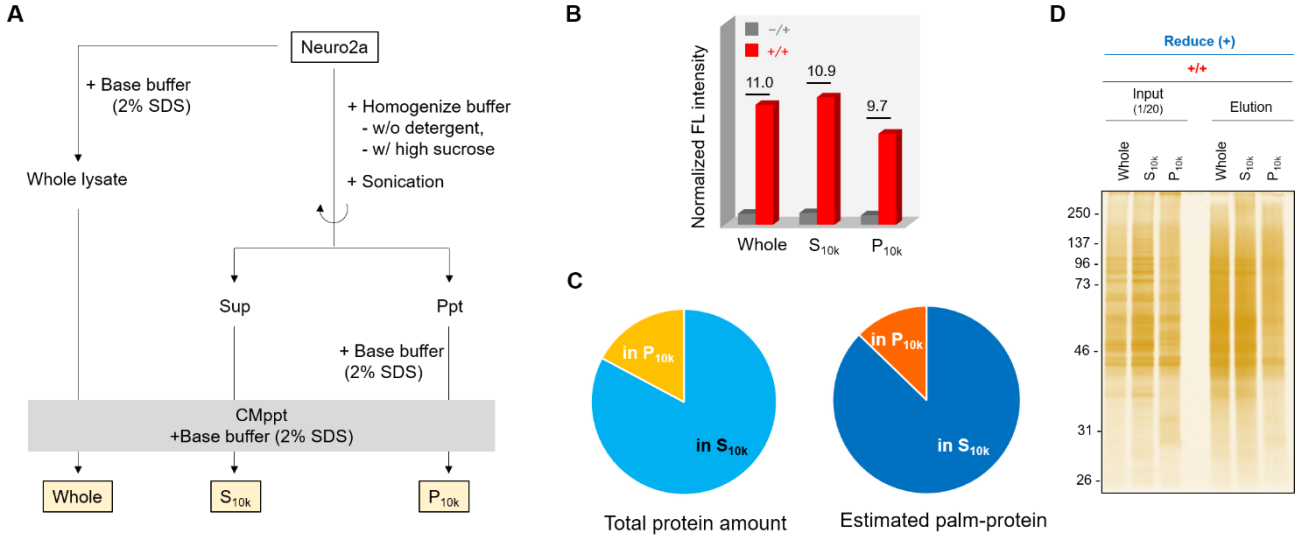
使用したキット：反応キット＋精製キット

分析方法：蛍光アッセイ、カラム精製溶出物の銀染色

スタート試料量：100 μg／1 処理

精製カラムアプライ量：50 μg／1 処理

電気泳動条件：**還元条件下**



A：　Neuro2a 由来各ライセートの調製方法。”Whole”は Neuro2a に直接 1x Basal Buffer を添加してライセートを調製した。一方、分画用として界面活性剤不含の破砕バッファー（50 mM phosphate (pH7.4), 150 mM NaCl, 320 mM sucrose）により細胞を懸濁後、超音波破砕をおこない、中速遠心分離（10,000xg、20 分間、4℃）により沈殿画分（P_{10k}）および上清画分（S_{10k}）を取得した。各試料のバッファーを統一するため、それぞれ CMppt を一度実施し、いずれも 1x Basal Buffer に置換したのち、反応キットに使用した。

B：　蛍光アッセイによる各試料の hpHA 処理特異性の評価。

C：　総タンパク質量の割合（左）と蛍光アッセイをもとにした各試料の *S*-パルミトイル化量の割合（右）。本分画実験では S_{10k} に *S*-パルミトイル化タンパク質が相対的に多く含まれていた。

D：　精製キットによる精製作業後、各**+/+**のカラム精製前試料（Input、20 倍希釈）およびカラム溶出画分（Elution、原液）を同液量ずつ**還元条件下**で電気泳動し、銀染色で検出した。精製されたタンパク質が全細胞ライセートに比べ S_{10k} に *S*-パルミトイル化タンパク質が濃縮しているのが確認できる。

実施例 3　培養細胞における刺激応答性の評価

事前の試料調製:

図 A に沿って Neuro2a 細胞に 4 種類の薬剤（パルミトイル転移酵素（PAT）阻害剤（10 μM 2-Bromopalmitate + 10 μM Cerulenin）、一酸化窒素（NO）ストレス（1 mM SNAP）、小胞体（ER）ストレス（1 μg/ml Tunicamycine）および細胞膜脱分極（50 mM KCl））を 24 時間処理し、細胞を回収後、細胞膜粗精製画分（P_{10k}）を粗精製した（P_{10k} 調製方法は実施例 2 をご参照ください。）

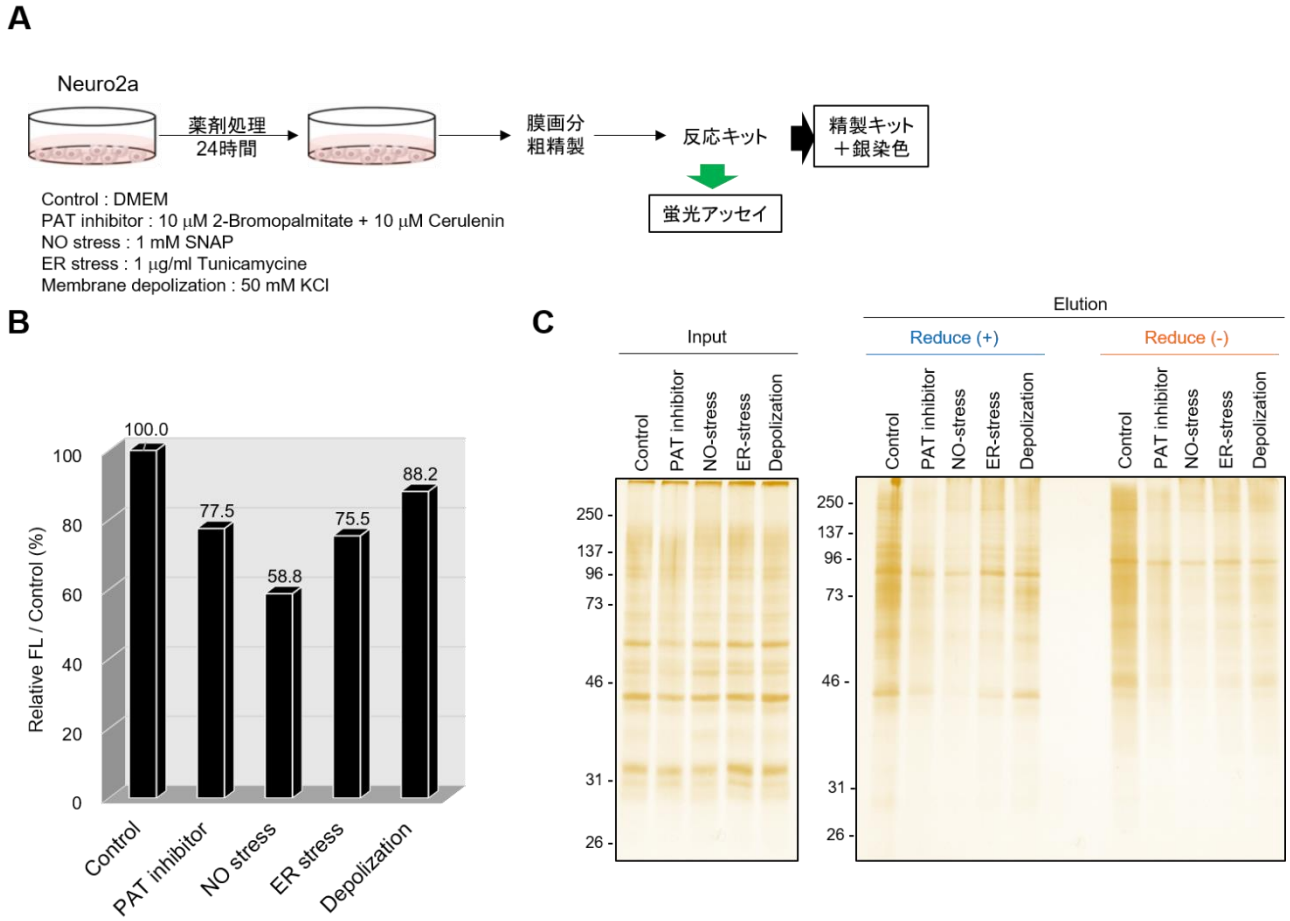
使用したキット: 反応キット＋精製キット

分析方法: 蛍光アッセイ、カラム精製溶出物の銀染色

スタート試料量: 100 μg／1 処理　総タンパク質量

精製カラムアプライ量: 50 μg／1 処理　総タンパク質量

電気泳動条件: 還元条件下および非還元条件下



A:　実験プロトコールの概要

B:　蛍光アッセイによる各+/+試料の蛍光値を測定後、コントロール処理の蛍光値に対する各刺激処理の蛍光値を比較した。いずれも蛍光量（＝S-パルミトイル化総量）の変動が確認でき、特に NO ストレスにおいて顕著な減少が確認された。

C:　精製キットによる精製作業後、各+/+試料のカラム精製前試料（Input）とカラム溶出画分（Elution）を還元条件下および非還元条件下で電気泳動し、銀染色で検出した。いずれの条件下においても NO ストレス処理により精製タンパク質の大きな変動が観察された。