

ER-Protein Capture Kit

商品コード FDV-0039

※本製品は研究用です。研究用以外には使用できません。

製品背景

小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) は、細胞内で最も大きなオルガネラであり、特徴的かつダイナミックなチューブ状またはシート状構造を有します。ER は、タンパク質の生合成、正確なフォールディング、品質チェックに重要な役割を果たし、ゴルジ体、エキソサイトーシス、細胞膜、細胞外タンパク質など分泌タンパク質の輸送源となっています。また、ER の機能はタンパク質の合成だけでなく、糖質代謝、カルシウム貯蔵、脂質代謝、脂肪滴の合成にも関与します。小胞体の膜画分を大まかに分離するために、超遠心法を用いた生化学的アプローチが行われていますが、従来の方法では特殊な装置を用いて時間をかけて行う必要があり、エンドソームなどの他のオルガネラの混入が頻繁に見られるなどの問題点があります。小胞体タンパク質の機能を解析するために、小胞体関連タンパク質を特異的に、簡便な手順で単離する方法が期待されています。

本製品「ER-protein Capture kit」は、京都大学の浜地格教授、田村朋則講師らにより開発された小胞体局在性タンパク質分子 (ER-localizable Reactive Molecule : ERM) の技術(参考文献 1)を元に製品化されました。本キットには、小胞体局在性タンパク質標識試薬 ERM (Component A)と抗 Rhodol 抗体 (component B) と2つの構成成分が含まれています。キットの原理概要を図1に示します。ERM は Rhodol 誘導体の緑色蛍光色素とチオエステル構造のタンパク質標識基の2種類のユニットを有する低分子化合物です(図1)。Rhodol 型の蛍光色素は小胞体膜に強い親和性を有し、特異的かつ迅速に小胞体に集積します (Step1 左図)。Rhodol 型色素の小胞体特異性は、従来の小胞体染色試薬である蛍光標識 Glibenclamide と同等です。ERM を添加し小胞体に特異的に集積した直後に、ERM の標識基が ER タンパク質中の求核性アミノ酸と反応し、タンパク質と共有結合して小胞体タンパク質が Rhodol-tag で標識されます (Step1 右図)。その後、細胞溶解バッファーにより細胞を溶解し (Step-2)、抗 Rhodol 抗体を用いたイムノアフィニティ精製により、Rhodol タグ付きタンパク質を選択的に精製します (Step-3)。精製された Rhodol-tag 付きタンパク質は、SDS-PAGE で分離し (Step-4)、LS/MS を用いたプロテオミクスやウェスタンブロット法で解析します (Step-5)。本キットは、超遠心機などの特別な装置を必要とせず、簡単な操作で小胞体関連タンパク質を精製することができます。参考文献 1 では、ERM を用いた小胞体関連タンパク質のプロテオミクス解析を実施しています。また、tunicamycin により誘導される酸化ストレス時の小胞体関連タンパク質の定量的なプロテオミクス解析を行い、いくつかのタンパク質が小胞体ストレス条件下で明らかに増加あるいは減少をしていることも明らかにしています。ER-Protein Capture Kit は、小胞体関連タンパク質を選択的に精製し、様々な小胞体の役割を評価するための強力なツールとなります。

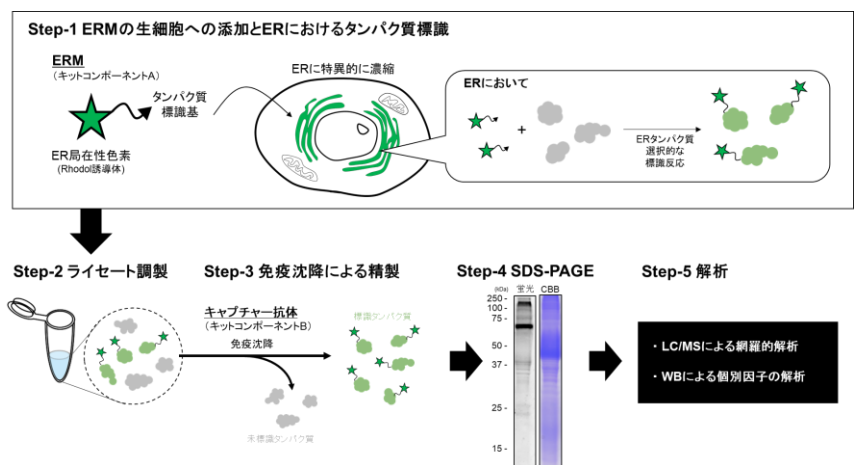


図1 ER-Protein Capture Kit の概要

製品情報

商品コード: FDV-0039

キット構成:

A: ERM

容量: 10 nmol

分子式: $C_{37}H_{28}F_2N_2O_4S$

分子量: 634.6g/mol

溶解性: DMSO に可溶

Ex/Em: 509/524 nm

* 市販の FITC フィルターセットが使用可能

保存: -20°C

溶解: 0.1 mM-1 mM/100% DMSO を推奨

備考: DMSO 溶液として調製後は小分注し遮光

条件下 -20°C で保管。凍結融解の繰り返しは避け、小分注品の使い切りを推奨

B: anti-Rhodol antibody

容量: 200 µg

濃度: 1 mg/ml

溶液: 50%グリセロールを含む PBS バッファー (1X)

宿主/クローナリティ: ウサギ ポリクローナル

精製方法: Protein G

ロット番号: バイアルラベルに記載

保存: -20°C

※単品購入について

それぞれ単品でご購入いただけます。

A: ERM (商品コード #FDV-0029、商品名 ERseeing として販売)

B: Anti-Rhodol antibody (商品コード #FDV-0039B、商品名 ER-ProteinCapture Kit Component B)

アプリケーション

- 小胞体関連タンパク質の特異的蛍光ラベル
- 小胞体関連タンパク質の選択的精製
- LM/MS プロテオーム解析による小胞体関連タンパク質の包括的同定
- 定量的質量分析法による小胞体関連タンパク質の定量解析
- ウェスタンブロッティングによる小胞体関連タンパク質の個別検出

使用方法

キット構成

- ERM (component A)
- 抗 Rhodol 抗体 (component B)

別途必要なもの

- 細胞培養用のディッシュおよび培地
- PBS
- 細胞溶解バッファー (RIPA buffer など)
- 免疫沈降用の Protein A あるいは Protein G ビーズ
- 洗浄バッファー: 細胞溶解バッファー (RIPA バッファーなど) や tween20 などの界面活性剤を含んだバッファー

メモ: 高濃度の SDS や界面活性剤は、抗体-抗原相互作用を阻害する可能性があります。

- 一般的な SDS-PAGE 用の装置および試薬
- オプション: 蛍光顕微鏡
- オプション: 蛍光ゲルイメージャー

- オプション: BCA アッセイキット
- オプション: ゲル内プロテアーゼ消化試薬および一般的な LC/MS プロテオミクスに使用する試薬および装置
- オプション: 一般的なウェスタンブロットに使用する装置および試薬

Step-1 小胞体関連タンパク質の標識

1. 対象の細胞を 10 cm ディッシュ (10^6 - 10^7 cells/ディッシュ) で 24 時間以上培養する。
2. 0.1 μ M ERM を無血清培地またはバッファーで調製する (5 mL 培地/ディッシュ)。

注意: 0.1 μ M の濃度から条件検討することを推奨します。高濃度になるとミトコンドリアや核のタンパク質などへの非特異的な標識が見られる場合があります。
3. 培地を除去し, PBS あるいは無血清培地で数回細胞を洗浄する。
4. 操作 2. で調製した ERM 含有培地を細胞に添加する。
5. 1 時間以上 37°C で細胞をインキュベートする。

注意: ERM によるタンパク質への Rhodol-tag 標識の反応率は, インキュベーション時間に依存します。効率良く標識するために, 少なくとも 1 時間の反応を推奨します。標識効率を上げるために, インキュベーション時間を長くすることができます。
6. 未反応の ERM を除去するため PBS で数回細胞を洗浄する。

オプション: ERM での標識を確認するため, 細胞を蛍光顕微鏡で観察する ((Ex / Em = 509/524 nm , 一般的な FITC 条件に対応)。

Step-2 ERM 標識済み細胞ライセートの調製

注意: 本項に記載の細胞溶解方法は, 参考例です。個々の実験に応じて最適化してください。

1. RIPA バッファーなどの細胞溶解バッファーで標識した細胞を溶解する。

オプション: タンパク質を濃縮し, 非タンパク質成分を除去するために, 冷やしたアセトンでタンパク質を沈殿させ, 数回洗浄した後, 細胞溶解バッファーで再溶解する。

オプション: BCA アッセイ法でタンパク質の定量を行い, 総タンパク質量を確認する。

Step-3 免疫アフィニティ精製 (免疫沈降)

注意: 本項に記載の免疫アフィニティ精製方法は, 参考例です。個々の実験に応じて最適化してください。

0. ライセートを少量「インプット画分」として保存する。
 1. 10 cm ディッシュ 1 枚で調製したサンプルにつき 10 μ g の抗 Rhodol 抗体をタンパク質ライセートに添加する。

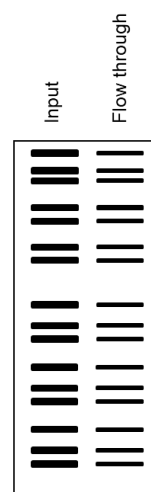
NOTE: 抗 Rhodol 抗体の量は参考値であり, 全タンパク質量に大きく依存するため, 実験による最適化が必要な場合があります。
 2. 回転あるいは振とうさせながら, 4°C で 1 時間以上 (あるいは終夜) 反応させる。
 3. ライセートに適切な量の Protein A あるいは Protein G ビーズを添加する。

NOTE: 抗 Rhodol 抗体はウサギ由来の精製ポリクローナル IgG 抗体のため, Protein A, Protein G ともに免疫沈降に使用が可能です。本キットには Protein A, G ビーズ等は含まれていませんので, お客様でご用意ください。精製ビーズの量は, 製品仕様に大きく依存します。Protein A, G-beads の量は, お客様側で必要な量を最適化してください。
 4. 回転あるいは振とうさせながら, 4°C で 1 時間以上反応させる。
 5. Protein A あるいは G ビーズをスピンドウンした後, 上清を「フロースルー画分」として新しいチューブに移す。
 6. tween 20 などの界面活性剤を含む洗浄バッファーでビーズを数回洗う。
 7. 適切な量の (例 ビーズの 2-3 倍量) SDS サンプルバッファーをビーズに添加し, 95°C で 5 分間ビーズを加熱する。

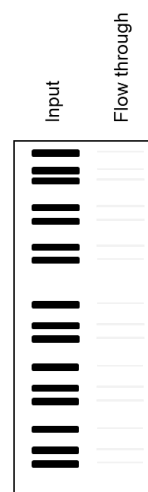
8. 加熱が終了した SDS サンプルバッファー添加のサンプルを「精製画分」として新しいチューブに回収する。

オプション: 免疫アフィニティ精製の効率は、「インプット画分」、「フロースルー画分」を用いて、蛍光ゲルイメージャーによる SDS-PAGE や抗 Rhodol 抗体によるウェスタンブロットティングにより評価することができます。「フロースルー画分」に多量の Rhodol-tag 付きタンパク質が残っている場合 (左), 抗 Rhodol 抗体を増やすか、インプットサンプル量を減らすことを強く推奨します。「フロースルー画分」に少量の標識シグナルがある場合 (右), 免疫アフィニティ精製がうまくいっていることを示しています。

Bad case



Good case



WB with anti-rhodol antibody

Step-4 SDS-PAGE

精製したタンパク質は、通常の SDS-PAGE で分離し、総タンパク質染色 (CBB, 銀染色など) または蛍光ゲルイメージャー (FITC フィルターセット対応) で検出することが可能です。

Step-5 精製タンパク質の解析

LC/MS を用いたプロテオミクス: SDS-PAGE ゲル上のタンパク質をプロテアーゼで消化し、一般的なプロテオミクス手順でペプチドを精製する。

ウェスタンブロットティング: 精製したタンパク質は目的の抗体を用いて解析ができる。

Note: 本製品の捕捉抗体 (抗 Rhodol 抗体) はウサギ由来のポリクローナル IgG 抗体のため、捕捉抗体による重・軽鎖断片の非特異的検出を避ける必要があります。検出抗体の第一選択は、マウス/ラットモノクローナル抗体となります。目的のマウス/ラット抗体がない場合は、一次抗体としてウサギ抗体、二次抗体として非変性 IgG 特異的 (コンフォメーション特異的) 抗ウサギ抗体を使用することも選択肢の一つとなります。

トラブルシューティング

Q. ラベル化効率が悪い

A. ラベル化効率は ERM によるラベル化反応時間に依存するため、ラベル化の反応時間を長くしてください。ERM の濃度を上げると、ER 以外のタンパク質に対する非特異的な標識が増加する場合がありますので、ERM の濃度を変えることは推奨していません。また、血清タンパク質は、ERM の特異的なラベル化を阻害する可能性があるため、ラベル化に使用するバッファーに注意して下さい。ERM のラベル化には、血清タンパクを含まないバッファーの使用をお勧めします。

Q. 精製タンパク質量が少ない

A. 精製タンパク質の量を増やすために、いくつかの方法があります。1) タンパク質の総量を増やすために、開始細胞数を増やす。2) 免疫アフィニティ精製ステップの抗体量を増やし、精製効率を上げる。

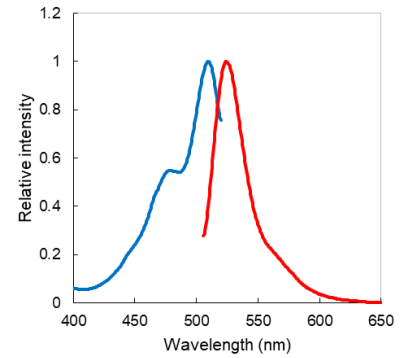
参考データ

ERM の励起・蛍光スペクトル

励起スペクトル (青) と蛍光スペクトル (赤)。

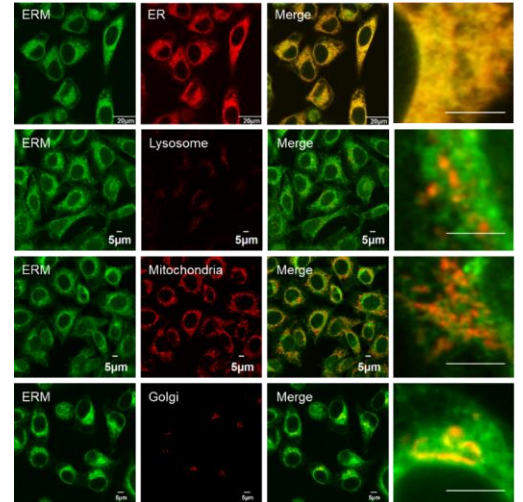
$Ex_{max}/Em_{max} = 509/524 \text{ nm}$

一般的な緑色蛍光色素 FITC 観察条件が適用可能です。



ER 特異性の検証

HeLa 細胞を ERM (100 nM) と各オルガネラマーカース色素 (Glibenclamide 型 ER 染色試薬、リソソーム染色試薬、ミトコンドリア染色試薬、ゴルジ体染色試薬) で染色した。ERM のシグナルは ER 染色試薬 (Glibenclamide 型) のシグナルと高い共局在が観察された (ピアソン相関係数 >0.9)。一方、リソソームマーカース、ミトコンドリアマーカースとの共局在は観察されなかった。ゴルジ体マーカースとは一部で共局在が観察され、本試薬により標識されたタンパク質が小胞体から Golgi 輸送で移動し分泌経路に移行していると考えられる。なお、ER-Golgi 輸送阻害剤を添加するとゴルジ体との共局在が減少することが分かっている (詳細は参考文献 1 をご参照下さい)。



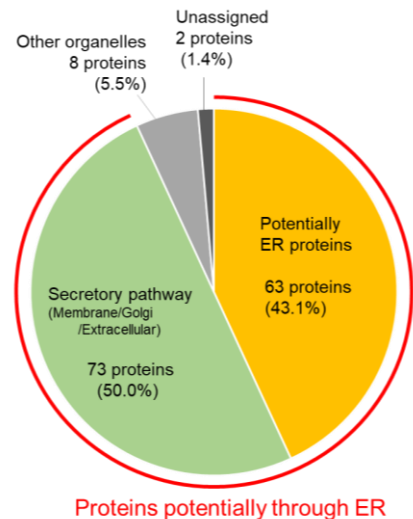
アプリケーションデータ

プロテオミクスによる回収タンパク質の網羅的解析

10 cm ディッシュの HeLa 細胞を 100 nM ERM で 1 時間処理し、細胞溶解バッファーで溶解させた。冷アセトンで全タンパク質を沈殿させた後、4% SDS 溶解バッファー (25 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 4% SDS, 1% sodium deoxycholate) で超音波処理しながらタンパク質を溶解し、RIPA バッファーで 4 倍に希釈して ~1% SDS 濃度とした。BCA アッセイで総タンパク質濃度を測定し、2.5 mg のタンパク質を免疫アフィニティ精製に使用した。Protein A ビーズと抗 Rhodol 抗体複合体をタンパク質溶液に添加し、4°C で一晩インキュベートした。インキュベーション後、ビーズを洗浄し、精製タンパク質を SDS-PAGE サンプルバッファーで溶出した。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、ゲルを固定した。ゲルをスライスした後、スライスしたゲルをトリプシン/Lys-C を用いたゲル内消化に供した。ゲルから溶出したペプチドを精製し、nanoLC-MS/MS 分析に供した。

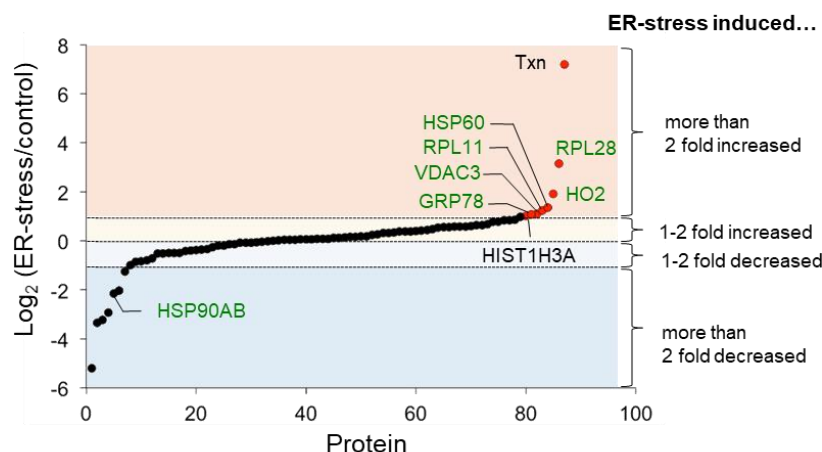
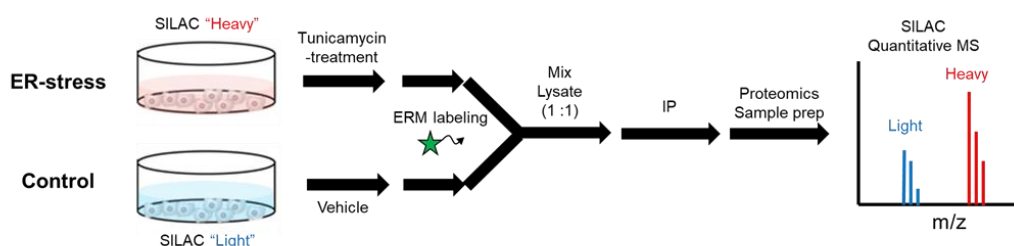
この実験では、合計 146 個のタンパク質が同定された。63 種類のタンパク質が小胞体常在タンパク質、73 種類のタンパク質が膜、ゴルジ体、細胞外タンパク質などの分泌経路に分類された。分泌経路のタンパク質は基本的に小胞体を経由して最終目的地に移動するため、小胞体関連タンパク質が約 93% を占めていた。

Note: 小胞体タンパク質 (63 個) は、2 つの方法で同定した。一つはデータベース解析によるもの (28 タンパク質)、もう一つは文献調査による手作業での割り当て (35 タンパク質) である。市販のデータベースでは、小胞体関連タンパク質の情報はまだ不完全である。同定されたタンパク質のデータ解析は慎重に行う必要があることに留意されたい。詳細なアノテーション方法は、文献 1 に記載されている。



SILAC 解析による ER ストレス時の小胞体関連タンパク質の定量的プロファイリング

HeLa 細胞を, SILAC Light 標識培地および SILAC Heavy 標識培地で培養をした。Heavy 標識培地の細胞に, ER ストレス誘導試薬として知られる Tunicamycin を添加して 4 時間培養し, Light 標識培地の細胞はコントロールとして DMSO を添加し同様に 4 時間培養した。Tunicamycin または DMSO 処理後, 両細胞を 100 nM ERM と 1 時間インキュベートし, 細胞溶解バッファーにより溶解させた。それぞれのライセートを 1:1 の割合で混合し, Rhodol 標識タンパク質を抗 Rhodol 抗体/Protein A ビーズで精製し, 上記のように解析した。合計 87 個のタンパク質が定量可能なものとして同定された。87 個のタンパク質のうち, 39 個 (45%) が ER タンパク質に分類され, 84 個 (97%) が分泌経路タンパク質を含む ER 関連タンパク質に割り振られた。SILAC 解析の結果, Tunicamycin 処理した細胞では, 6 つのタンパク質が 2 倍以上発現していることがわかった。一方, 7 つのタンパク質は tunicamycin 処理細胞で 2 倍以上発現が低下していた。



参考文献

1. Fujisawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 17060-17070 (2018) Chemical Profiling of the Endoplasmic Reticulum Proteome Using Designer Labeling Reagents.

免責事項

本製品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が製品化したもので、2020年4月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル（以下、製品資料）を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、製品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本製品の仕様および製品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しましては、弊社までご確認いただけますようお願い申し上げます。


ER-Protein Capture Kit

Catalog NO. FDV-0039

Research use only, not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

日本語版はこちらから
ダウンロードできます。
①弊社ウェブサイトより
Webページ番号検索にて
【70873】で検索

②QRコードより



Product Background

Endoplasmic reticulum (ER) is the largest organelle in the cell and has unique and dynamic tubular or sheet structures. ER plays essential roles in biosynthesis, precise folding and quality check of proteins and is a traffic origin of secreted pathway proteins including the Golgi apparatus, exocytosis, plasma membrane, and extracellular proteins. The major functions of ER are not only protein synthesis, but also carbohydrate metabolism, calcium storage, lipid metabolism, and lipid droplet synthesis. Although important roles of ER, biochemical isolation methods are highly limited presently because of its complicated structures. Some biochemical approaches with ultracentrifugation are utilized to roughly isolate ER membrane fractions, but conventional methods require time-consuming procedures with specialized equipment and show frequent contamination of other organelles such as endosomes, etc. To access the function of ER proteins, an isolation method for ER-associated proteins specifically with an easy procedure should be expected.

Our “**ER-Protein Capture Kit**” is based on the ER-localizable Reactive Molecule (ERM) technology originally developed by Dr. Itaru Hamachi and Dr. Tomonori Tamura, Kyoto University (Ref. 1). In this kit, there are two components, ERM (component A) and anti-rhodol antibody (component B). An overview of the kit principle is shown in Figure 1. ERM is a small compound which has two units, a rhodol-type green fluorescent dye, and a thioester-type protein labeling group (Figure 1). The rhodol-type dye has a high affinity to ER membranes and specifically and quickly accumulates into ER (Step-1 left). ER-specificity of the rhodol-type dye is comparable to a conventional ER staining reagent, fluorescent-labeled Glibenclamide. Immediately after the addition and specific accumulation of ERM into the ER, the labeling group of ERM reacts with nucleophilic amino acids in ER-proteins forming a covalent bond to proteins to label the rhodol-tag (Step-1 right). Subsequently, cells are lysed by cell lysis buffers (Step-2), and rhodol-tagged proteins are selectively purified by immunoaffinity purification with anti-rhodol antibody (Step-3). Purified rhodol-tagged proteins are separated by SDS-PAGE (Step-4) and analyzed by LS/MS-based proteomics or western blot method (Step-5). This kit enables to purify ER-associated proteins with easy procedures and no special equipment such as ultracentrifuge machine. Ref.1 shows proteomic analysis of ER-associated proteins using ERM. ERM-based proteomics shows that ERM enables to identify not only ER-resident proteins but also secreted pathway proteins including Golgi apparatus, plasma membrane and extracellular protein which are recruited to ER before their final destination. Ref.1 also shows a quantitative analysis of ER-associated proteins during tunicamycin-induced ER-stress and revealed some proteins clearly increased or decreased under the ER-stress condition. “**ER-Protein Capture Kit**” is a powerful tool to selectively purify ER-associated proteins to evaluate various ER roles.

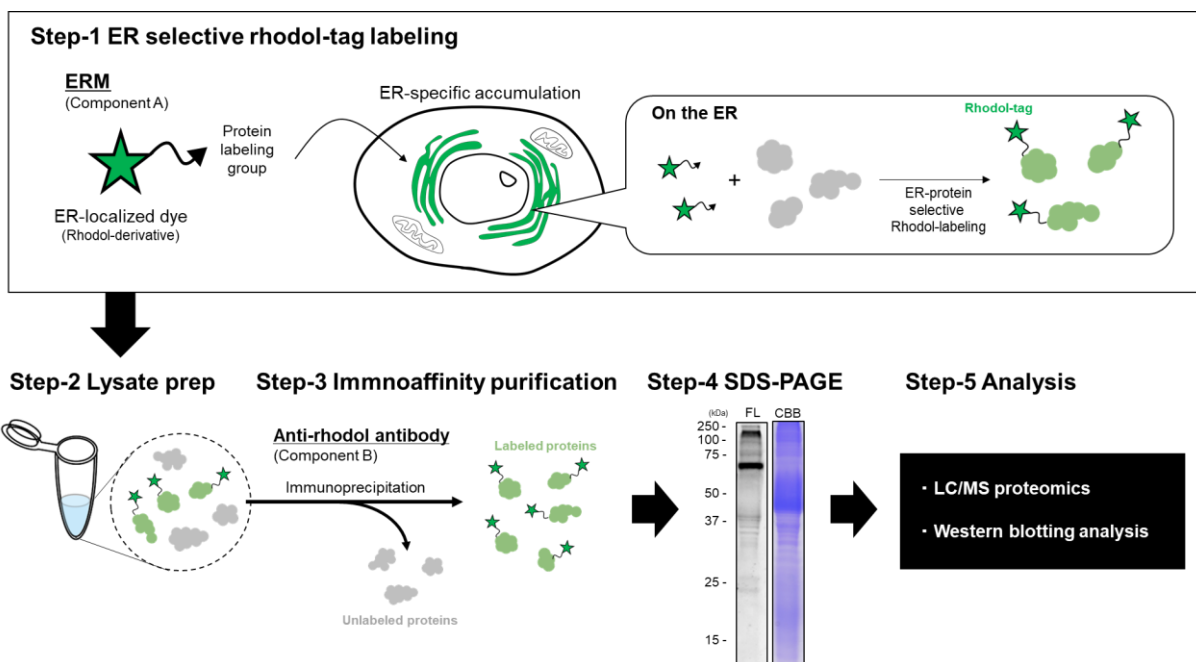


Figure 1. Overview of “ER-Protein Capture Kit”

Description

Catalog Number: FDV-0039

Kit component:

A: ERM

Size: 10 nmol

Formulation: $C_{37}H_{28}F_2N_2O_4S$

Molecular weight: 634.6g/mol

Solubility: Soluble in DMSO

Ex/Em: 509/524 nm

* Commercial FITC filter sets are available

Storage: -20°C

Reconstitution: Stock solution recommended concentration 0.1mM to 1 mM in 100% DMSO

Note:

After reconstitution in DMSO, aliquot and store at -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Protect from light.

B: anti-Rhodol antibody

Size: 200 µg

Conc. 1 mg/ml

Formulation: 1 x PBS containing 50% glycerol

Host/Clonality: Rabbit polyclonal

Purification : Protein G purified

Lot Number: See vial label

Storage : -20°C

<Note>

ERM and anti-Rhodol antibody can be purchased separately as Catalog code #FDV-0038 (product name ERseeing) and Catalog code #FDV-0039B, respectively.

Application

- ER-associated proteins specific fluorescent labeling
- ER-associated proteins selective purification
- Comprehensive identification of ER-associated proteins by LC/MS proteomics
- Quantitative analysis of ER-associated proteins by quantitative MS
- Individual detection of ER-associated proteins by western blotting

How to use

Materials in kit

- ERM (component A)
- Anti-Rhodol antibody (component B)

Materials additionally required

- Cell culture dish, medium
- PBS
- Cell lysis buffer (RIPA buffer, etc.)
- Protein A- or Protein G-conjugated beads for immunoaffinity purification
- Wash buffer: Cell lysis buffer (RIPA buffer etc.) or buffers including any detergent such as tween20 etc.
NOTE: High concentration of SDS or detergents may disrupt antibody-antigen interaction.
- Equipment and reagents for general SDS-PAGE
- Optional: Fluorescent microscopy
- Optional: Fluorescent gel imager
- Optional: BCA assay kit
- Optional: In gel protease-digestion reagents and the reagents/equipment for general LC/MS proteomics
- Optional: Equipment and reagents for general western blotting analysis

Step-1 Labeling of ER-associated proteins

1. Culture cells of interest in 10 cm dish (around $\times 10^6 \sim 10^7$ cells/dish) for over 24 hours
2. Prepare 0.1 μM ERM in serum-free fresh medium (5 mL medium / 1 dish)
NOTE: Highly recommend starting with 0.1 μM concentration, higher concentration shows non-specific labeling to mitochondrial and nucleolus proteins, etc.
3. Remove culture medium and wash cells by PBS or serum-free media several times
4. Add ERM-containing medium prepared in step-2 to the cells.
5. Incubate cells at 37°C for over 1 hour
NOTE: The reaction rate of rhodol-tag labeling to proteins by ERM is dependent on incubation time. To efficiently label proteins at least 1-hour incubation is recommended. To increase the labeling efficiency, incubation time may be increased.
6. Wash the cells by PBS several times to remove unreacted ERM reagent.
Optional: To confirm the ERM labeling, the cells can be observed by fluorescent microscopy (Ex / Em =509/524 nm, commercial FITC conditions are compatible).

Step-2 Preparation of cell lysate

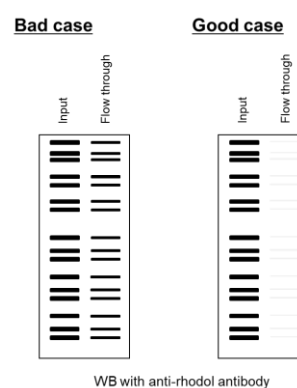
- Precaution:** Cell lysis procedure in this chapter is only a reference, empirical optimization may be required for your experiment.
1. Lyse the labeled cells with any cell lysis buffer such as RIPA buffer, etc.
Optional: Proteins are precipitated by chilled acetone, washed several times and re-solubilized by cell lysis buffer to concentrate proteins and eliminate non-protein components.
Optional: Protein quantification by BCA assay to check the total protein amount.

Step-3 Immunoaffinity purification (immunoprecipitation)

- Precaution:** Immunoaffinity purification procedure in this chapter is only a reference, empirical optimization may be required for your experiment.
0. Reserve a small portion of the lysate as “Input fraction”
 1. Add 10 μg of anti-rhodol antibody per one sample prepared from one 10 cm dish to protein lysate.
NOTE: The amount of anti-rhodol antibody is only a reference and highly depends on the amount of total protein, you may need to empirically optimize for your experiment.

2. Incubate for over 1 hour (or overnight) at 4°C with rotation or shake.
3. Add the appropriate volume of Protein A or G-beads into the lysate.
NOTE: As anti-rhodol antibody is a purified rabbit polyclonal IgG antibody, both Protein A and Protein G are compatible with immunoprecipitation. This kit does not contain Protein A or G-beads, the user must provide. The volume of purification-beads highly depends on its product specification. The researcher should empirically optimize the proper amount of Protein A or G-beads required.
4. Incubate for over 1 hour at 4°C with rotation or shake
5. After spin-down of Protein A or G-beads, the supernatant is transferred to a new tube label as “Flow-through fraction”.
6. Wash the beads with any wash buffers containing detergents such as tween 20 etc. several times.
7. Add appropriate volume (cf. 2-3 vol of beads) of SDS-sample buffer to the beads and heat beads for 5 min at 95°C
8. Collect SDS-sample buffer to a new tube label as “Purified fraction”

Option: The efficiency of immunoaffinity purification can be estimated by SDS-PAGE with fluorescence gel imager or western blotting with anti-rhodol antibody using “Input fraction”, “Flow-through fraction. If “Flow-through fraction” still has a large amount of rhodol-tagged proteins (left), an increase of anti-rhodol antibody or decrease the input sample is highly recommended. A small amount of the labeled signal in “Flow-through fraction” (right), indicates the immunoaffinity purification is going well.



Step-4 SDS-PAGE

Purified proteins can be separated by conventional SDS-PAGE and detected by total protein staining (CBB, silver staining, etc.) or fluorescence gel imager (FITC filter set compatible).

Step-5 Analysis of purified proteins

LC/MS-based proteomics: Proteins on SDS-PAGE gel are digested by proteases and peptides are purified according to the general proteomics procedure.

Western blotting: Purified proteins can be analyzed by a specific antibody of interest.

Note: Because our capture antibody (anti-rhodol antibody) is rabbit polyclonal IgG antibody, the first choice of WB-detection antibody is mouse/rat monoclonal antibodies to avoid non-specific detection of heavy or light chain fragments of the capture antibody. If there is no desirable mouse/rat antibody of interest, the alternative choice is using rabbit antibodies as primary antibody and non-denatured IgG-specific (conformation-specific) anti-Rabbit antibody as secondary antibody.

Troubleshooting

Q. Low labeling efficiency.

A. Labeling efficiency depends on the labeling time of ERM, prolong the labeling incubation time. The increase of ERM concentration may increase non-specific labeling to non-ER proteins, changing the concentration of ERM is not recommended. Serum proteins may inhibit specific labeling of ERM, carefully check labeling media. Serum-free buffers are highly recommended for ERM labeling media.

Q. Low purified proteins.

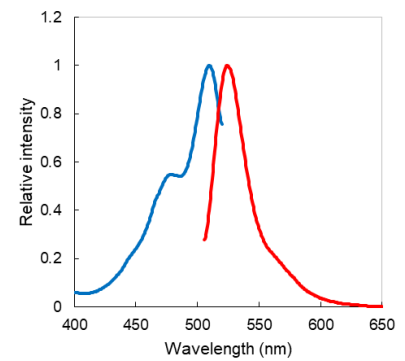
A. There are some suggestions to increase purified protein. 1) Increase the starting cell number to increase the total protein amount. 2) Increase the amount of antibody in the immunoaffinity purification step to increase purification efficiency.

Reference data

Absorption and fluorescent spectrum of ERM

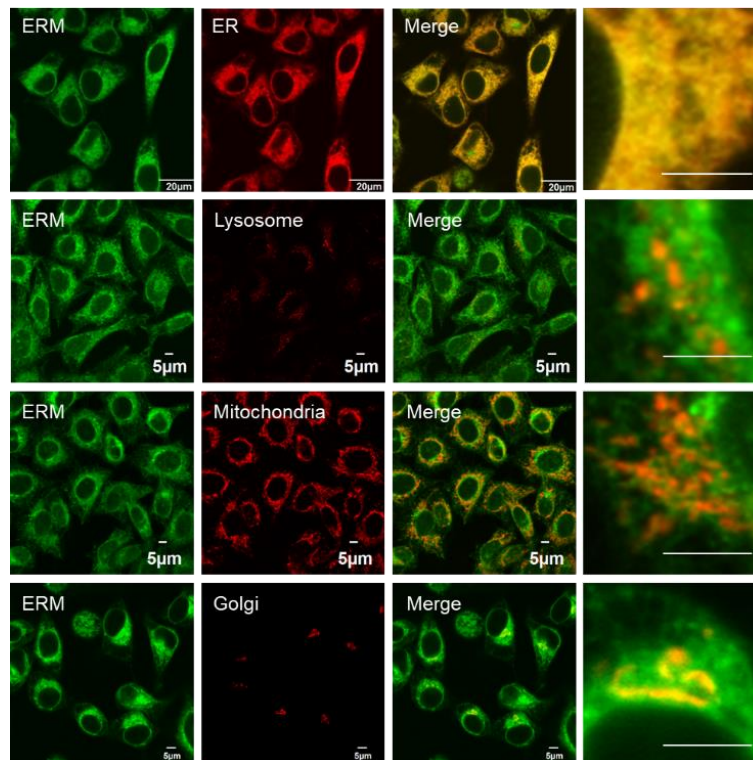
Excitation (blue) and fluorescent (red) spectrum. $Ex_{max}/Em_{max} = 509/524$ nm.

Commercial FITC filter sets are compatible.



ER specificity

Hela cells were treated with ERM (100 nM) and organelle markers, Glibenclamide-type ER staining, lysosomal staining, mitochondrial staining and Golgi apparatus staining dyes. ERM was highly overlapped with ER (Piason coefficient >0.9) but not correlated with the lysosome marker or mitochondria marker. Only a small portion of staining by ERM was overlapped with the Golgi apparatus. It was considered that this is attributed to the vesicle transport of ERM itself or rhodol-labeled proteins from ER to the Golgi apparatus. The ER-to-Golgi traffic inhibitor decreased overlap between ERM-staining and Golgi apparatus-staining (Detail information is described in Ref. 1).



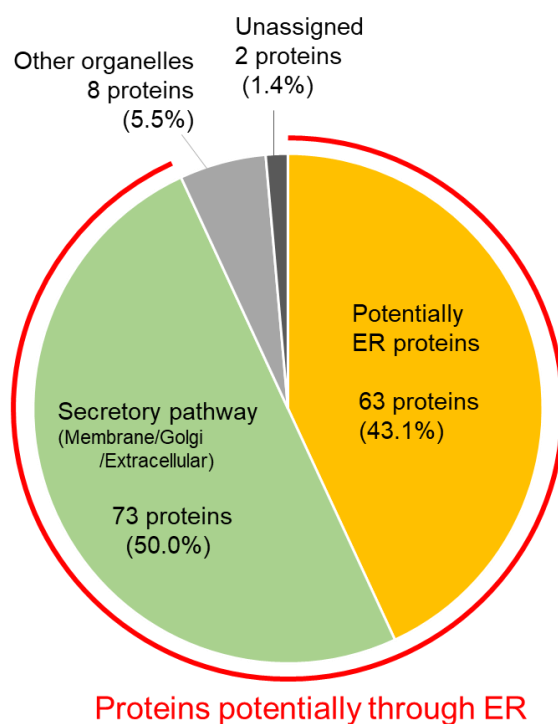
Application data

Comprehensive identification of ER-associated proteins by LC/MS-proteomics

HeLa cells in 10 cm dish were treated with 100 nM ERM for 1 hour and lysed by cell lysis buffer. After total protein precipitation by chilled acetone, proteins were resolved in 4% SDS lysis buffer (25 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 4% SDS, 1% sodium deoxycholate) with sonication, and then diluted 4-fold with RIPA buffer to ~1% SDS concentration. Total protein concentration was measured with BCA assay and 2.5 mg of total proteins were applied for immunoaffinity purification. Protein A-beads and anti-rhodol antibody complex was added to total protein solution and incubate for overnight at 4°C. After incubation, the beads were washed and purified proteins were eluted with SDS-PAGE loading buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and the gel was fixed. After slicing the gel, sliced gels were subjected to in-gel digestion using trypsin/Lys-C. The eluted peptides derived from the gel were purified and subjected to nanoLC-MS/MS analysis.

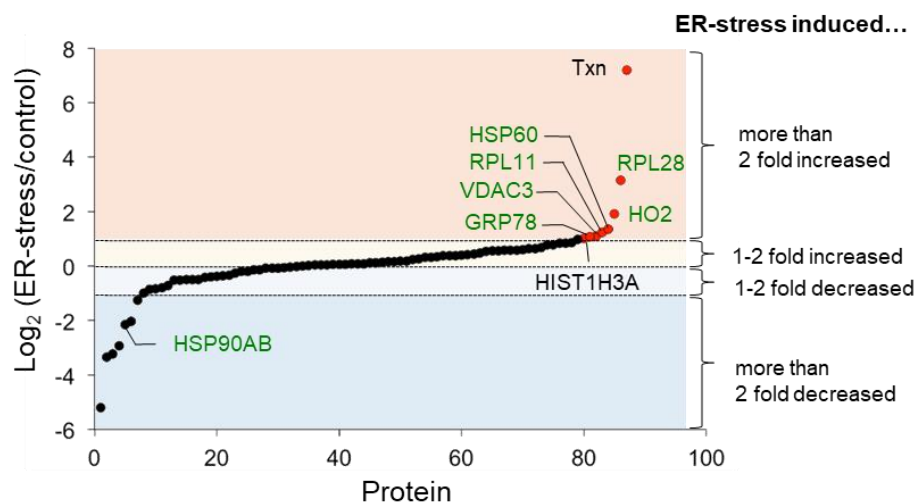
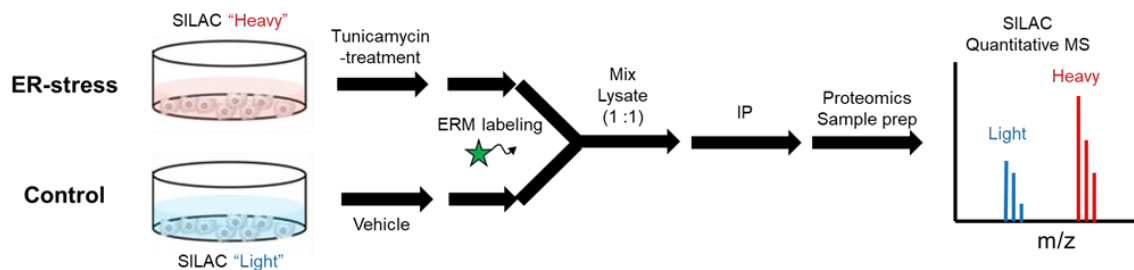
Total of 146 proteins were identified in this experiment. 63 proteins were categorized in ER-resident proteins and 73 proteins were categorized in the secretory pathways such as membrane, Golgi apparatus, and extracellular proteins. As secretory pathway proteins basically move to the final destination via ER, ERM-based assay could identify ER-associated proteins with around 93% probability.

Note: ER proteins (63 proteins) were assigned by two methods. One is based on database analysis (28 proteins) and another is manually assigned with a literature survey (35 proteins). The information for ER-associated proteins in the commercially available database is still incomplete. Please note data analysis of identified proteins should be carefully performed. The detail annotation method was described in Ref.1.



Quantitative profiling of ER-associated proteins during ER stress by SILAC assay

HeLa cells were continuously grown in “light” SILAC media or “heavy” SILAC media. The “heavy” isotope-labeled cells and the “light” isotope-labeled cells were treated with tunicamycin (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a chemical inducer of ER-stress, and DMSO as vehicle control for 4 hours, respectively. After tunicamycin or DMSO treatment, both cells were incubated with 100 nM ERM for 1 hour and lysed by cell lysis buffer. Equal amounts of “heavy” isotope-labeled proteins and “light” isotope-labeled proteins were mixed in a 1:1 ratio and rhodol-labeled proteins were purified with anti-rhodol antibody/protein A-beads and analyzed described above. A total of 87 proteins were identified and quantified. Among 87 proteins, 39 proteins (45%) were classified as ER proteins and 84 proteins (97%) were assigned with ER-associated proteins including secretory pathway proteins. SILAC analysis indicates 6 proteins were upregulated by more than 2-fold in tunicamycin-treated cells. On the other hand, 7 proteins were downregulated by more than 2-fold in tunicamycin-treated cells.



Reference

1. Fujisawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 17060-17070 (2018) Chemical Profiling of the Endoplasmic Reticulum Proteome Using Designer Labeling Reagents.

Disclaimer/免責事項

This product has been commercialized by Funakoshi Co., Ltd. based on the results of academic research, and the advertisement text, figures and manuals (hereinafter “Product information”) have been prepared based on published research reports on April, 2020. The academic interpretation at the time of creation of the Product Information may change in accordance with future developments in the relevant research field and expansion of various scientific findings, and the latest version and certainty of the Product Information are not guaranteed. The specifications of this product and the Product Information are subject to change without notice. Please contact us for the latest information.

本製品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が製品化したもので、2020年4月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル(以下、製品資料)を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、製品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本製品の仕様および製品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しましては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。



E-mail Newsletter
Sign Up

Japanese



English



 **funakoshi**
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE

URL: <http://funakoshi.co.jp>
9-7 Hongo 2-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033