

蛍光アッセイの解析方法

黄色蛍光基 yFL を含む MfTag は図 1 のような励起・蛍光スペクトルを有します。325 nm 励起における 525 nm 蛍光強度測定を推奨しています。蛍光スペクトルは可溶化溶媒に依存する場合がありますので、指定のバッファーで測定してください。

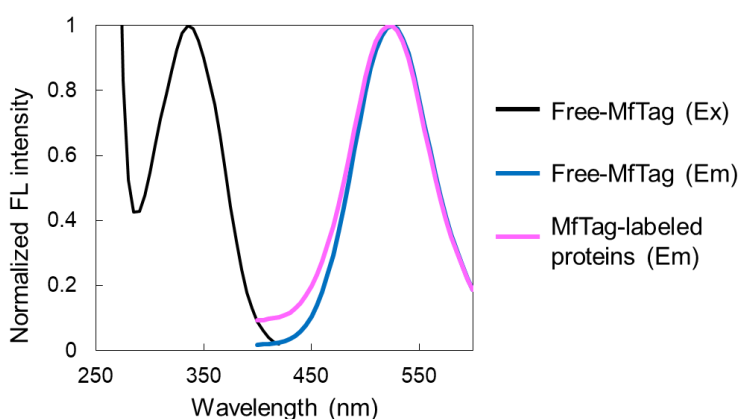


図 1 MfTag の励起・蛍光スペクトル

蛍光アッセイでは 1 試料につき **-/-**、**-/+**、**+/+** の 3 種類の処理試料の 325 nm 励起における 525 nm 蛍光強度を測定し、下記のように数値解析を行います。

<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

試料毎のパルミトイル化修飾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 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 を基準に大きいほど S-パルミトイル化修飾特異的に検出できていることを示しています。

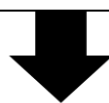
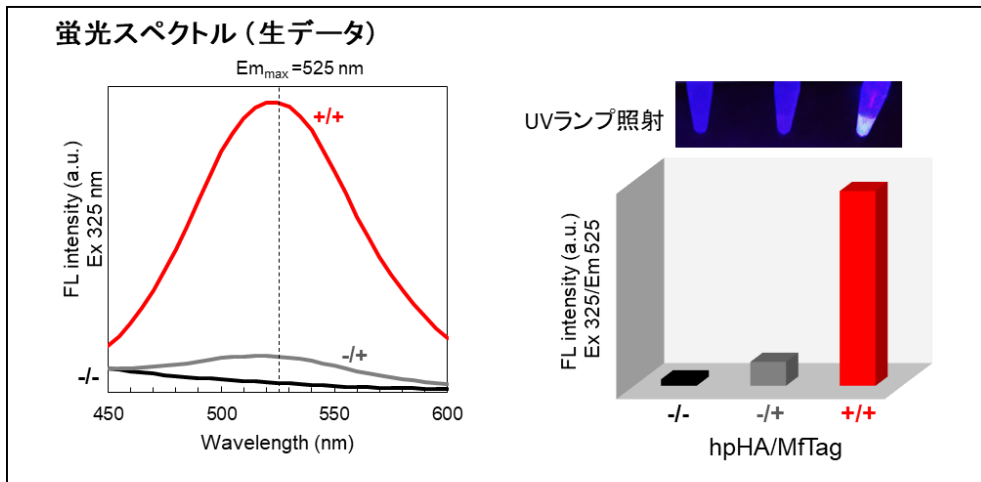
$$\text{Normalized FL intensity} = [\text{+/+ or -/+}] - [-/-] \quad (\text{式 1})$$

$$\text{Specificity hpHA(+)/(-)} = ([\text{+/+}] - [-/-]) / ([\text{-/+}] - [-/-]) \quad (\text{式 2})$$

2) 複数試料間の S-パルミトイル化総量の比較解析

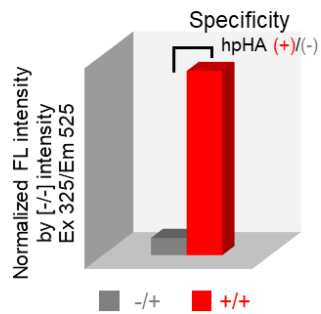
複数の試料間の S-パルミトイル化特異的シグナルの比較を行う場合、**-/+** を非特異的な MfTag 標識バックグラウンドシグナルとして **+/+** を補正します(式 3、図 2 右下)。

$$\text{Palmitoylation specific FL intensity} = [\text{+/+}] - [-/+] \quad (\text{式 3})$$



目的に応じた補正データ

**特異性検証用
バックグラウンド補正**



**サンプル間比較用
特異的シグナル補正**

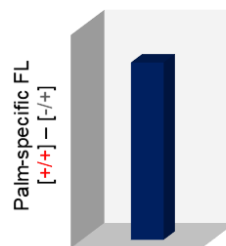


図 2 蛍光アッセイの解析方法概略