

## 精製キットによる各種解析方法

精製キットを用いて MfTag 標識タンパク質を精製した後、還元条件下で SDS-PAGE をおこない、銀染色で総タンパク質を検出することで網羅的可視化が可能で、ウェスタンブロットをおこなうと目的タンパク質の S-パルミトイル化修飾の有無の判定が可能です。還元条件・非還元条件下 SDS-PAGE を比較して実施することで、目的タンパク質の S-パルミトイル化修飾割合の算定も可能です。

### 1. 特異性の判定

-/+ および +/+ 処理試料のカラム溶出画分を還元条件下 (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-パルミトイル化の特異性を評価することができます (図 1)。+/+ 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 右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。

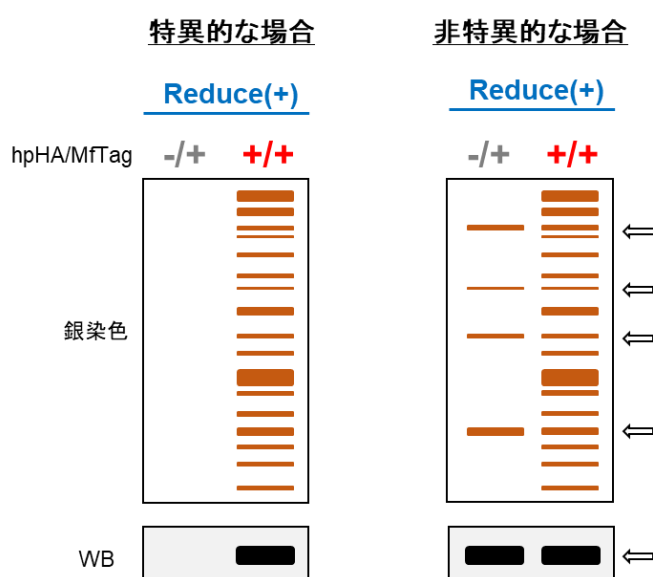


図 1 カラム精製における特異性の判断方法

## 2. 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 1. 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、**+/+** 処理のカラム精製前試料 (Input)、カラム素通り画分 (FT) およびカラム溶出画分 (Elution) 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 2 右側上段の **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 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 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** (MfTag を除去した状態) で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 2 下段の「悪い例」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注意ください。

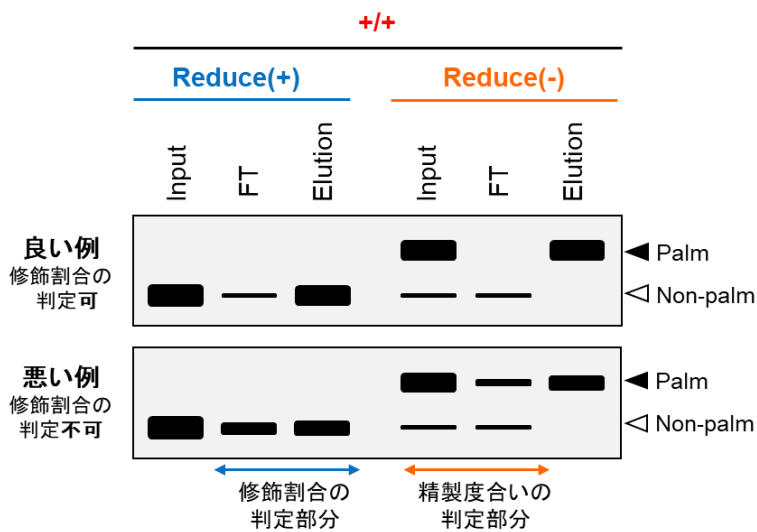


図 2 カラム精製における S-パルミトイル化修飾割合の判定方法