

Zn²⁺-Phos-tag Protocol

2021. 8 ver. 3

by A. Yamaguchi, T. Sato, S. Honda, K. Kamisaki

1. 細胞を PBS で 3 回洗浄した後、PhosSTOP 添加済みの 1% Triton X-100 Lysis Buffer を添加して、氷上にて 15~30 min 溶解させる。セルスクレーパーにてチューブに細胞を回収した場合には、チューブ内に Lysis Buffer を添加した後、ピペットマンにて細胞を懸濁する。
 - ☞ Lysis buffer が均一に行き渡るよう 5~10 min 置きに軽く攪拌するとよい。
 - ☞ Lysis buffer 添加量の目安：1 mL/90 mm dish、600 μ L/35 mm dish
 - ☞ 必要に応じて阻害剤を添加する。
 - ☞ PhosSTOP (Roche, Cat. No. 04 906 837 001) は、Lysis Buffer の 1/10 量の液量を添加する。
(PhosSTOP 作製方法: チューブに MQW を 1 mL 入れ、その中に室温に戻したタブレット 1 錠を入れて、Micro Tube Mixer を用いて溶解させる。作製後はすぐに使用して OK。-30℃保存。)
2. 15,000 rpm $\times$ 15~30 min 遠心分離した後に、細胞抽出液 (上清)を新しい 1.5 mL チューブに移す。
3. 必要に応じてタンパク定量 (BCA Protein Assay Kit, PIERCE #23225)によりサンプルの濃度を測定後、下記のようにして WB 用サンプルを調製する。

細胞抽出液 1 vol. (5~40 μg 相当)

4×SDS Sample Buffer 1/3 vol.

- ☞ タンパク量は目的に応じて調節する。
- ☞ この状態で凍結保存可能（その場合、保存前にも 99℃で 3 min 程度加熱する）。

4. アプライする直前に 99°C で 3 min 程度加熱する。

- ## 5. Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE

目的タンパク質の分子量に応じて Phos-tag の濃度を適宜変える (例: 20 μ M $\rightarrow$ 50 μ M $\rightarrow$ 100 μ M)。

はじめは 20 μ M が基本。

濃縮ゲル: 10~20 mA/ゲル 1 枚

分離ゲル: 20~30 mA/ゲル 1 枚

Lower gel 組成 Mini gel 1 枚当たりの組成を記載 (全量 10 mL)

	6%	8%
Sol A (30% アクリルアミド)	2.0 mL	2.7 mL
Sol N (Bis-Tris/HCl)	2.5 mL	2.5 mL
Sol M (10 mM ZnCl ₂)	100 μL	100 μL
Sol E (5 mM Phos-tag)	40 μL (20 μM の場合)	40 μL (20 μM の場合)
TEMED	10 μL	10 μL
APS	50 μL	50 μL
MQW	5.3 mL	4.6 mL

→ 混和後ゲル板に注ぎ、RT 一晩静置（遮光の必要はない）

※ リン酸化をみたいタンパクの大きさに応じてゲルの濃度を使い分ける。

目安: 60 kDa より大きい→6%、60 kDa より小さい→8%

※ Sol E (5 mM Phos-tag)の濃度を変更する際は、Sol M もそれに応じて調整する。

(例: Sol E を 2 倍量の 80 μ L にする場合、Sol M も 2 倍量の 200 μ L で調整する。)

他の Sol の組成は上記の通りに調製する。

Sol A (30%アクリルアミド)

WB 用アクリルアミド

Sol N (Bis-Tris/HCl)

Bis-Tris 14.95 g ※普通の Tris と別物なので注意。

→MQW 約 40 mL でスターラーを用いて溶かした後、pH 6.8 に調整。

→MQW で 50 mL にメスアップ。

(4°C保存)

Sol M (10 mM ZnCl₂)

ZnCl₂ 0.14 g

→MQW 100 mL に溶解。

Sol E (5 mM Phos-tag)

Phos-tag アクリルアミド (wako, Cat. #304-93521) 10 mg を 100 μ L の MeOH で溶解

→MQW 3.2 mL で希釈し、よく混ぜる。

→遮光チューブ 3 本に分注。

(4°C保存)

upper gel 組成 Mini gel 1 枚当たりの組成を記載 (全量 3 mL)

Sol A 0.45 mL

Sol N 0.75 mL

TEMED 6 μ L

APS 15 μ L

MQW 1.8 mL

→混和後ゲル板に注ぎ、コームをさして、RT 30 min 静置 (遮光の必要はない)。

(ウェルを洗う際はゲルが柔らかいため注意する)

1×Sol P (Phos-tag 用 Running Buffer) ※用時調製

	Total	<u>400 mL</u>	<u>600 mL</u>
5×Sol P		80 mL	120 mL
Sol O (NaHSO ₃)		0.23 g	0.32 g
MQW		up to 400 mL	up to 600 mL

♣ H 型の泳動槽の場合→400 mL、U 型の泳動槽の場合→600 mL あればよい。

<u>5×Sol P</u>	(final)	(500mL)
Tris	25 mM	30.3 g
MOPS	50 mM	52.3 g
Sol D (10% SDS sol)	25 mL	→結晶化している場合は 37°Cで溶かした後に使用する →MQW を 350 mL 程度入れてスターラーで溶解後、500 mL にメスアップ (4°C保存)

Sol D (10% SDS sol)

SDS	10 g
→MQW を 90 mL 程度入れてスターラーで溶解後、100 mL にメスアップ。(4°C保存)	

6. 泳動後、EDTA を添加した Transfer Buffer にてゲルを 15 min 平衡化する。

📌 ゲルが非常に柔らかいため注意！

7. ゲルを Transfer Buffer にて 10～15 min 平衡化する。

<u>Transfer Buffer</u>	(3.0 L)
10×Transfer Buffer	0.3 L
MeOH	0.6 L
イオン交換水	2.1 L

<u>5 mM EDTA + Transfer Buffer</u>	(100 mL)
上記の組成の Transfer Buffer	100 mL
0.5 M EDTA	1 mL

8. メンブラン (BioTrace PVDF 0.45 μ m, PALL #P/N66543) をメタノールに 30 sec 程度浸した後、イオン交換水で軽く洗浄し、その後 Transfer Buffer にて 10～15 min 平衡化する。

以降の操作は通常のセミドライ式のプロットイングと同様の手順で行う。