

FUJIFILM**Wako**

<For Research Use Only> Code No. 195-16391 (5 Gels)
193-16571 (5 Gels)

SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 13well

SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 17well

SuperSep™ Phos-tag™ are precast polyacrylamide gels containing Phos-tag™. Phos-tag™ is a functional molecule that binds specifically to the phosphate group^{1), 2), 3)}. This product can trap phosphorylated proteins during SDS-PAGE, and it allows detection of phosphorylated and non-phosphorylated proteins as different bands. The Gels have a neutral pH to obtain sharp bands.

[Note]

· It is not recommended to apply ordinary prestained protein ladders to polyacrylamide gels containing Phos-tag™ such as this product because the ladder patterns is disturbed. A prestained ladder recommended is WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III (Code No. 230-02461), which is designed to reduce disturbance of a ladder pattern in Phos-tag SDS-PAGE.

[Features]

- Separates phosphorylated and non-phosphorylated proteins
- High resolution and sharp bands
- Long-term stability

[Format]

Plate Size	100 × 100 × 3 (mm)
Gel Size	90 × 85 × 1 (mm)
Well Volume	13wells : 30 μL/well 17wells : 25 μL/well

[Additional materials required]

- Running Buffer Solution (× 10) (Code No. 184-01291)
0.25 mol/L Tris, 1.92 mol/L Glycine, 1% SDS
- Sample Buffer Solution (2ME +) (× 2) (Code No. 196-11022)
0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 4% SDS, 10% 2-Mercaptoethanol, 0.002% BPB
- Electrophoresis apparatus – EasySeparator™ (Code No. 058-07681)
This product is optimized with the EasySeparator™.

[Procedure]

- 1) Remove the gel plate and set it into the apparatus.
- 2) Fill the reservoir with running buffer.
- 3) Carefully remove the comb from the gel
- 4) Load the samples* into the wells.
* Prepare the sample using the following method. Mix sample with Sample Buffer Solution (2ME +) (× 2) and heat for 5 min at 95 °C. Cool it to room temperature.
- 5) Start the electrophoresis at 20 mA/gel for 1 hour until the BPB reaches the bottom of the gel.
- 6) Remove the gel and proceed to the next step.

– 1/6 –

[Q & A]

Q1. What gel staining method can be used ?	A1. It is possible to use CBB staining, Silver staining, negative staining and fluorescent staining.
Q2. Can I destain the gel after CBB staining ?	A2. You can destain by using the following microwave method. [Processing method] Transfer the stained gel to a container with 100 mL of deionized water. Place a folded Kimwipe on the gel and heat 1min with microwave. Change the deionized water and repeat 3 times.
Q3. Can Western blot be performed ?	A3. It can be used for Western blot. However, transfer efficiency is poor, so it is necessary to remove zinc by EDTA processing. [Processing method] The gel is soaked in a general transfer buffer containing 5 mmol/L EDTA for 10 minutes with gentle agitation. Repeat the same process again three times. Finally, the gel is soaked in a general transfer buffer without EDTA for 10 minutes with gentle agitation. Transfer on a membrane. If transfer efficiency is poor, increase the treatment time or frequency of exchange of the buffer containing EDTA.
Q4. Why are the protein bands distorted ?	A4. EDTA, inorganic salts, surfactants, etc., cause distortion or tailing of bands. Desaltinate by precipitation with TCA or dialysis. Blank lanes also cause distortion. Load the same amount of sample buffer in blank lanes.
Q5. Why aren't the phosphorylated and non-phosphorylated of target proteins separated ?	A5. Load control samples such as β-casein and dephosphorylated β-casein and check that the band shift is occurred. When it doesn't occur, it may not be separated at the Phos-tag™ and/or acrylamide concentration of this product.
Q6. Can cell lysate be used ?	A6. It can be used. It is possible that Rf value is small and separation of bands is unclear. In that case, gels with low-concentration Phos-tag™ should be used.

– 2/6 –

Q7. What is the amount of protein loaded per well ?	A7. Purified proteins : 1~5 μg (For CBB staining) Tissue and cell lysate : 10~30 μg (Adjust the amount of sample according to the expression level of the target protein.)
Q8. What proteins size markers can be used ?	A8. A recombinant product of the target protein is recommended.
Q9. Which Mn complex or Zn complex Phos-tag TM acrylamide is formed in this product ?	A9. It forms a Zinc complex.
Q10. How do I verify if the band shift is due to phosphorylation ?	A10. Perform electrophoresis with the same acrylamide concentration gel without Phos-tag TM and confirm that the band shift is not occurred.

〔Storage〕

Store at 2~10 °C in the dark.

〔References〕

- 1) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. and Koike, T. : *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 749 (2006).
- 2) Yamada, S., Nakamura, H., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T. and Shiro, Y. : *Anal. Biochem.*, **360**, 160 (2007).
- 3) Kinoshita-Kikuta, E., Aoki, Y., Kinoshita, E. and Koike, T. : *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 356 (2007).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 195-16391 (5枚)
193-16571 (5枚)

スーパーセップTM Phos-tagTM (50 $\mu\text{mol/L}$), 12.5%, 13ウェル スーパーセップTM Phos-tagTM (50 $\mu\text{mol/L}$), 12.5%, 17ウェル

スーパーセップTM Phos-tagTM はPhos-tagTMを共重合させたプレキャストアクリルアミドゲルです。Phos-tagTMとは、りん酸基を特異的に捕捉する機能的化合物です^{1), 2), 3)}。本品はSDS-PAGE中にりん酸化タンパク質を捕捉し、泳動速度を遅らせることができるため、りん酸化タンパク質と非りん酸化タンパク質を異なるバンドとして検出することができます。中性ゲルバッファーを採用しているため、シャープなバンドが得られます。

〔注 意〕

- * 着色済み分子量マーカーを本品のようなPhos-tagTMを重合させたゲルに使用すると、マーカーの泳動パターンが乱れる恐れがあります。着色済み分子量マーカーを使用される場合は、泳動パターンの乱れを軽減したWIDE-VIEWTM Prestained Protein Size Marker III (コードNo. 230-02461) をご使用ください。

〔特 長〕

- りん酸化タンパク質、非りん酸化タンパク質を分離
- 分離度が良くバンドがシャープ
- 長期保存可能

〔仕 様〕

プレートサイズ	100 × 100 × 3 (mm)
ゲルサイズ	90 × 85 × 1 (mm)
ウェル容積	13ウェル : 30 μL /ウェル
	17ウェル : 25 μL /ウェル

〔準備する試薬・機器〕

- 泳動用緩衝液 (×10) (コードNo. 184-01291)
0.25 mol/L Tris, 1.92 mol/L Glycine, 1% SDS
- 試料用緩衝液 (2ME+) (×2) (コードNo. 196-11022)
0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 4% SDS, 10% 2-Mercaptoethanol, 0.002% BPB
- 電気泳動装置 イージーセパレーターTM (コードNo. 058-07681)
本品はイージーセパレーターTM専用のゲルです。

〔使用方法〕

- 1) ゲルを取り出し泳動装置にセットする。
- 2) リザーバーを泳動用緩衝液で満たす。
- 3) 注意深くコームを抜き取る。
- 4) ゲルの各ウェルにサンプル*をアプライする。
* サンプルは事前に下記の方法で準備下さい。サンプル溶液と等量の試料用緩衝液 (2ME+) (×2) を混合し、95 °C で5分間加熱後、室温で冷まして下さい。

- 5) ゲル1枚あたり20 mAの定電流をかけ約1時間泳動し、BPBが下端に到達するまで泳動する。
6) ゲルを取り出し、次の過程に進む。

〔Q & A〕

Q1. ゲル染色法は何か使用できますか？	A1. CBB染色、ネガティブ染色、銀染色、蛍光染色が可能です。
Q2. CBB染色後の色抜けが悪い。	A2. 脱色時に電子レンジを使用することできれいに色抜けします。 処理法： 脱イオン水 100 mLに染色ゲルを移し、丸めたキムワイブを一枚入れ、電子レンジにセットし約1分間加熱処理する。脱イオン水を換え同様の操作を3～4回繰り返して下さい。加熱の目安は、サラップに水滴がつくぐらいです。
Q3. ウェスタンブロットに使用できますか？	A3. 使用できます。ただし転写効率が悪いためEDTA処理によりゲル中の亜鉛を取り除く必要があります。 処理法： 5 mmol/L EDTAを含む転写バッファーに浸し、10分間ゆっくり振とうして下さい。同様の操作を3回行って下さい。その後、EDTAを含まない転写バッファーで10分間振とう後、メンブレンへ転写して下さい。転写効率が悪い場合はEDTA処理回数を増やす、EDTA濃度を上げるなど、転写条件をご検討下さい。
Q4. バンドが歪んでしまう。	A4. EDTA、無機塩類、界面活性剤などを含むサンプルはバンドの歪み、テーリングの原因となります。そのため、サンプルはTCA沈殿や透析で脱塩して下さい。また空レーンがある場合も歪みの原因となるため、空レーンに試料用緩衝液をアプラインして下さい。
Q5. 目的とするタンパク質のりん酸化、非りん酸化が分離されていない。	A5. コントロールとしてβ-カゼイン、アルカリホスファターゼ処理したβ-カゼインなどを泳動し、バンドシフトが起きているか確認して下さい。バンドシフトが起きていない場合は、本品のPhos-tag™濃度あるいはアクリルアミド濃度では分離できない可能性があります。

Q6. 細胞粗抽出液を使用することはできますか？	A6. 使用できます。ただし、目的とするタンパク質によってはRf値が小さくバンドの分離が不明瞭になる可能性があります。その場合は、低濃度のPhos-tag™を添加したゲルで検討して下さい。
Q7. ゲルにアプラインするサンプル量は？	A7. 精製タンパク質の場合：1～5 μg（CBB染色の場合） 組織・細胞抽出液の場合：10～30 μg * 目安の値ですので、必ず事前に通常のSDS-PAGE、western blotを行い適切な濃度を検討し、同条件で行って下さい。
Q8. 分子量マーカーは何を使用すればよいですか？	A8. マーカーは不要です。本品では分子量の決定はできません。そのため、マーカーの代わりにネガティブコントロールとして大腸菌由来の組換えタンパク質、脱りん酸化処理したサンプルを推奨致します。
Q9. 本品に含まれるPhos-tag™アクリルアミドはマンガン錯体、亜鉛錯体どちらを形成しているか？	A9. 亜鉛錯体を形成しています。
Q10. バンドシフトがりん酸化によるものか判別する方法は？	A10. 同じアクリルアミド濃度のSuperSep™で電気泳動を行い、目的タンパク質が分離されていないことを確認して下さい。

〔保存条件〕

2～10℃・遮光保存

〔参考文献〕

- 1) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. and Koike, T. : *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 749 (2006).
- 2) Yamada, S., Nakamura, H., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T. and Shiro, Y. : *Anal. Biochem.*, **360**, 160 (2007).
- 3) Kinoshita-Kikuta, E., Aoki, Y., Kinoshita, E. and Koike, T. : *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 356 (2007).

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741

2304KA2