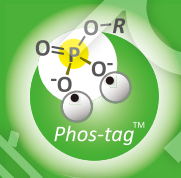


Wako

Wako

Phos-tagTM 实验指导手册



第二版

Phos-tagTM

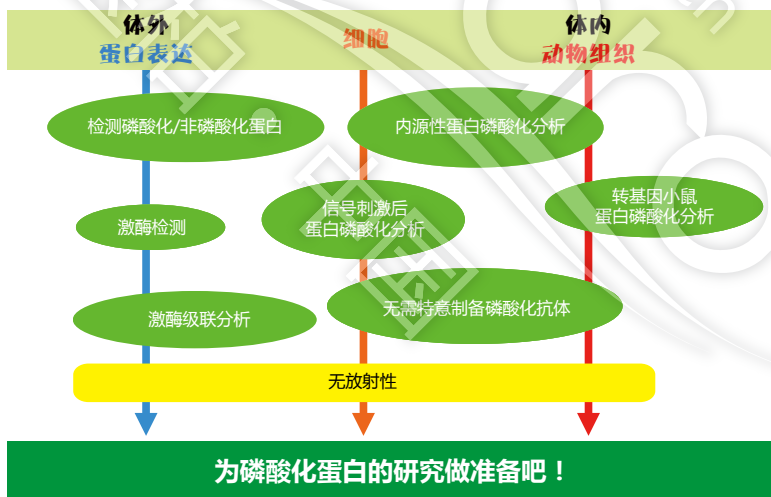


宝柏·中国

目录

一	原理与应用	3
二	Phos-tag™ Acrylamide 介绍	4
三	实验流程	5
四	疑难问题	9
五	Phos-tag™ PAGE 条件优化	10
六	应用与参考文献	11
七	FAQ	14
八	SuperSep Phos-tag™	18
九	Phos-tag™ 系列产品	19
十	相关产品	20

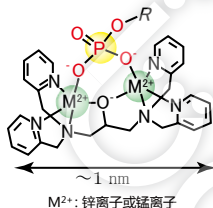
Phos-tag™ SDS-PAGE的广泛应用



一 原理与应用

Phos-tag™ 是一种能与磷酸离子特异性结合的功能性分子。它可用于磷酸化蛋白的分离 (Phos-tag™ Acrylamide)、Western Blot 检测 (Phos-tag™ Biotin)、蛋白纯化 (Phos-tag™ Agarose) 及质谱分析 MALDI-TOF/MS (Phos-tag™ Mass Analytical Kit)。

【Phos-tag™ 的基本结构】



特点:

- 与 -2 价磷酸根离子的亲和性和选择性高于其它阴离子
- 在 pH 5-8 的生理环境下生成稳定的复合物

产品名称	用途
Phos-tag™ Acrylamide	分离: SDS - PAGE 分离不同磷酸化水平的蛋白
SuperSep Phos-tag™	分离: 预制胶中含有 50 μ M Phos-tag™ Acrylamide
Phos-tag™ Biotin	检测: 代替 Western Blot 检测中的磷酸化抗体
Phos-tag™ Agarose	纯化: 通用柱层析, 纯化磷酸化蛋白
Phos-tag™ Mass Analytical Kit	分析: 用于质谱 MALDI-TOF/MS 分析, 提高磷酸化分子的检测灵敏度

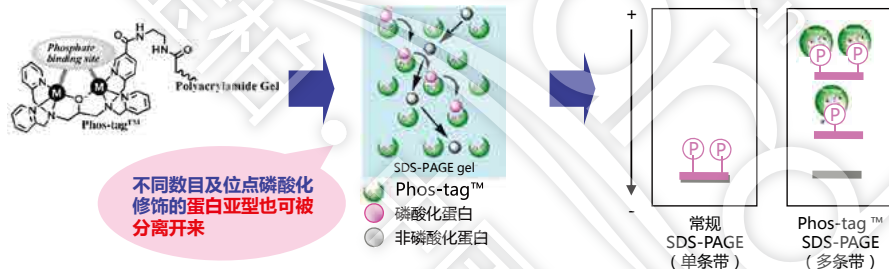
phos-tag™ 由日本广岛大学研究生院医齿药学综合研究科医药分子功能科学研究室开发。

原理

2 个金属离子捕获磷酸基团

凝胶中磷酸化蛋白与 Phos-tag™ 相结合

磷酸化蛋白迁移速度减慢, 从而与非磷酸化蛋白分离开来



应用

~ 使用酪氨酸激酶 Abl 检测磷酸化反应变化 ~

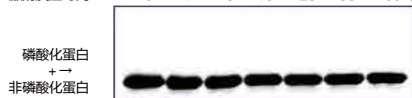
酪氨酸激酶 Abl 作用于带有 GST 标签的底物多肽 Abtide, 分别进行常规 SDS-PAGE 和 Phos-tag™ SDS-PAGE。

常规 SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色)

Phos-tag™ SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色)

激酶反应时间 → 0 1 5 10 20 30 60 (min)

激酶反应时间 → 0 1 5 10 20 30 60 (min)

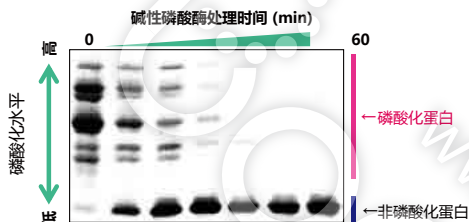


二 Phos-tag™ Acrylamide 介绍

Phos-tag™ Acrylamide

在不使用放射性同位素的情况下，利用 Phos-tag™ SDS-PAGE 即可分离不同条带中的磷酸化和非磷酸化蛋白。分离后的凝胶可用于 Western blotting 和质谱分析等后续实验。

Phos-tag™ SDS-PAGE 操作简单，只需在常规 SDS-PAGE 胶中加入 Phos-tag™ Acrylamide 和 $MnCl_2$ 即可进行实验。在电泳过程中，磷酸化蛋白的磷酸基团与 Phos-tag™ 中的二价金属离子相结合，降低其迁移速度，从而可区分磷酸化与非磷酸化蛋白。



特点：

- ※ 采用 Phos-tag™ SDS-PAGE 可轻松分离磷酸化蛋白
- ※ 无任何放射性元素及化学标记！
- ※ 可检测不同磷酸化水平的磷酸化蛋白
- ※ 无需任何磷酸化抗体！
- ※ 适用于内源性蛋白的磷酸化分析！

Phos-tag™ 更多应用

结合 Phos-tag™ SDS-PAGE 以及其它各种分析方法，可以得到更多磷酸化蛋白的有用信息。

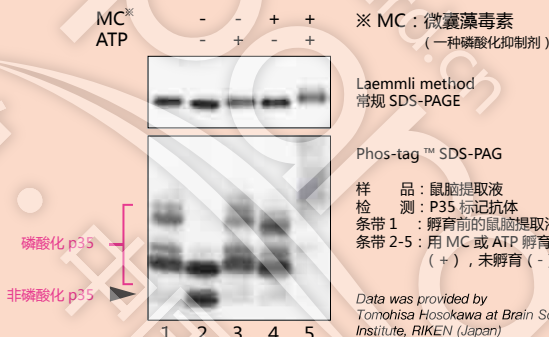
Western Blotting

从目的蛋白中很容易识别磷酸化蛋白。

利用常规抗体根据条带迁移的不同可以检测磷酸化和非磷酸化蛋白。

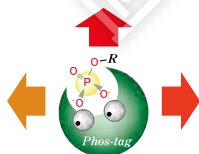
无需特意准备磷酸化抗体，适用于内源性的磷酸化蛋白。

■ 相关应用请参考 P12



Mass Analysis

分离磷酸化蛋白后进行质谱分析，可知具体的磷酸化位点。



2D Electrophoresis

可分离等电点相同（磷酸化位数相同）的不同磷酸化形式。

■ 相关应用请参考 P11

产品编号	产品名称	规格	应用
304-93526 (AAL-107S1)	Phos-tag™ Acrylamide 5 mM Aqueous Solution	0.3mL (0.9mg)	使用 SDS-PAGE Phos-tag™ 分离磷酸化和非磷酸化蛋白
300-93523 (ALL-107M)	Phos-tag™ Acrylamide	2 mg	
304-93521 (ALL-107)		10 mg	



三 实验流程*

[I] Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE 注意：请先制备蛋白胶

① 试剂准备

：此图标表示为即用型试剂。相关产品信息请查看“十 相关产品”。

丙烯酸胺溶液

**Sol. A : 30% (w/v) 丙烯酸胺溶液
(30% T, 3.3% C)**

丙烯酸胺 29.0 g
N,N' - 亚甲基双丙烯酸胺 1.0 g
→ 加入蒸馏水定容至 100 mL，过滤。

【保存条件】4℃，避光

分离胶
Tris/HCl 缓冲
溶液
pH 8.8**Sol. B : 1.5 mol/L Tris/HCl 缓冲溶液, pH 8.8 (x4 分离胶缓冲液)**

Tris 碱
(MW: 121, pKa=8.2) 18.2 g
6.0 mol/L HCl 4.85 mL
→ 加蒸馏水至 100 mL。

【保存条件】4℃

产品编号：192-11041
分离胶缓冲液 (x 4)
(250 mL)

浓缩胶
Tris-HCl 缓冲
溶液
pH 6.8**Sol. C : 0.50 mol/L Tris/HCl 缓冲溶液, pH 6.8 (x4 浓缩胶缓冲液)**

Tris 碱 6.06 g
6.0 mol/L HCl 8.0 mL
蒸馏水 90 mL

→ 用 6.0 mol/L HCl (0.1 mL 左右) 调节 pH 至 6.8，加蒸馏水至 100 mL。

【保存条件】4℃

产品编号：199-11051
浓缩胶缓冲液 (x 4)
(250 mL)



SDS 溶液

**Sol. D : 10% (w/v) SDS 溶液**

SDS 10.0 g
蒸馏水 90 mL
→ 搅拌，加蒸馏水至 100 mL。

【保存条件】4℃

产品编号：311-90271
10% SDS 溶液 (100 mL)
产品编号：313-90275
10% SDS 溶液 (500 mL)

Phos-tag™ 溶
液
同时提供溶液即
用型 Phos-tag™
溶液，见 P4 (产
品编号：304-
93526)**Sol. E : 5.0 mmol/L Phos-tag™ AAL 溶液 (含 3% (v/v) 甲醇)**

※ 括号内是配制 2 mg Phos-tag™ 时所需各溶液的体积

Phos-tag™ AAL-107 (MW: 595) 10 mg (2 mg)
甲醇 0.10 mL (0.02 mL)
蒸馏水 3.2 mL (0.64 mL)



Phos-tag™ Acrylamide
AAL-107

也可只用水溶
解，但溶解缓
慢，用时较长。

油状产品 Phos-tag™ AAL-107 (10 mg) 用 0.1 mL
甲醇完全溶解在一个小胶管中。



该溶液需加入 3.2 mL 蒸馏水稀释。

注意：如果溶液中出现微量白色粉末状 (杂质) 不溶物，用
离心管离心分离即可 (2000 × g, 10 min)

【保存条件】溶液置于离心管中，4℃ 避光保存

溶液上清部分可制备蛋白胶 (50 μmol/L Phos-tag™，
厚 1 mm，宽 9 cm，长 7.7 cm)



刚混合后

*：实验溶液配制及实验方法仅供参考，具体实验条件请自行摸索优化。



MnCl₂ 溶液

Sol. F : 10 mmol/L MnCl₂* 溶液

* : 金属离子为 Mn²⁺, 不是 Mg²⁺

MnCl₂(H₂O)₄ (MW: 198) 0.10 g

蒸馏水 50 mL

注意: 不要使用其它阴离子盐, 比如 Mn(NO₃)₂ 和 Mn(CHCOO)₂。在碱性溶液中, 会形成 Mn(OH)₂ 白色沉淀, 被氧化后逐渐变成棕色 MnO(OH), 凝胶也会因此变色。同时 Mn²⁺ 的功能也会被破坏。

APS 溶液

Sol. G : 10% (w/v) 过硫酸铵溶液

(NH₄)₂S₂O₈ (MW: 228) 10 mg

蒸馏水 0.10 mL

产品编号: 019-15922
10w/v% 过硫酸铵溶液
(25 mL)
溶液型, 无需预先配制



【保存条件】配好的 Sol.G 溶液可分装后可在 -20°C 长期保存

电泳缓冲液

Sol. H : 电泳缓冲液, pH 8.3 (x10 溶液)

Tris 碱 (0.25mol/L) 15.1 g

SDS 5.0 g

甘氨酸 (1.92 mol/L) 72.0 g

→加蒸馏水至 500 mL, 不需加酸或加碱调节 pH。只需在使用前,

取 450 mL 蒸馏水 + 50 mL Sol. H 混匀即可。

【保存条件】4°C

产品编号: 184-01291
电泳缓冲液 (x 10)
(1 L)



上样缓冲液

Sol. I : 上样缓冲液 (x3 溶液)

溴酚蓝 (BPB, 一种电泳指示剂) 1.5 mg

SDS 0.60 g

甘油 3.0 mL

Sol. C : 0.50 mol/L Tris/HCl, pH 6.8 3.9 mL

2- 巯基乙醇 1.5 mL

→加蒸馏水至 10mL。

【保存条件】-20°C

Sol. I 使用: 见第 8 页 “④样品制备”

产品编号: 318-90323
SDS-PAGE 10 x
电泳缓冲液 (5 L)



蛋白酸性固定液

Sol. J : 蛋白酸性固定液 (1 L)

乙酸 0.10 L

甲醇 0.40 L

蒸馏水 0.50 L

CBB 染色液 (可用银染和荧光染色)

Sol. K : 考马斯亮蓝染色液 (0.5 L)

考马斯亮蓝 (CBB) 1.25 g

甲醇 0.20 L

乙酸 50 mL

蒸馏水 0.25 L

→用甲醇溶解 CBB, 再加入乙酸和水

产品编号: 191-13272
上样缓冲液 (2ME+)
(x 4) (25 mL)
产品编号: 196-11022
上样缓冲液 (2ME+)
(x 2) (25 mL)



产品编号: 174-00553
Quick-CBB PLUS (250mL)
产品编号: 178-00551
Quick-CBB PLUS (1 L)



漂洗和脱色

Sol. L : 漂洗脱色液 (1 L)

甲醇 0.25 L

乙酸 0.10 L

蒸馏水 0.65 L



②常规蛋白胶 溶液配制

凝胶需要现用
现配

*1) MnCl_2 溶液的摩尔浓度需为 Phos-tag™ 的 2 倍。

*2) 文中 TEMED 和 Sol. G (过硫酸铵溶液) 的浓度仅为参考, 您可以采用常规实验浓度。

分离胶溶液 (0.375 mol/L Tris, 0.1 mmol/L MnCl_2 , 0.1% SDS)

(例如: 总体积 10 mL; 丙烯酰胺 12 w/v%; Phos-tag™ AAL 50 $\mu\text{mol/L}$)

Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液	4.00 mL
Sol. B: 1.5 mol/L Tris/HCl 溶液, pH 8.8	2.50 mL
Sol. E: 5.0 mmol/L Phos-tag™ AAL 溶液	0.10 mL
Sol. F: 10 mmol/L MnCl_2 溶液	0.10 mL ^{* 1)}
Sol. D: 10% (w/v) SDS 溶液	0.10 mL
TEMED (四乙基乙二胺)	10 μL ^{* 2)}
蒸馏水	3.15 mL
→ 搅拌 2 分钟, 去除空气	
Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	50 μL ^{* 2)}

* : 请优化 Sol. A(Acrylamide) 和 Sol. E(Phos-tag™ AAL 107) 的浓度。

【参考】分离胶的制备 (10 mL)

Phos-tag™ Acrylamide 溶液	20 μM				50 μM				100 μM			
丙烯酰胺浓度	12%	10%	8%	6%	12%	10%	8%	6%	12%	10%	8%	6%
Sol. A (mL)	4	3.33	2.67	2	4	3.33	2.67	2	4	3.33	2.67	2
Sol. B (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sol. E (mL)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Sol. F (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sol. D (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED (mL)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Sol. G (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
蒸馏水 (mL)	3.2	3.87	4.53	5.2	3.14	3.81	4.47	5.14	3.04	3.71	4.37	5.04

③浓缩胶 溶液

浓缩胶溶液 (0.125 mol/L Tris, 0.1% SDS)

(例如, 制备 10 mL 含 4.5 w/v% 丙烯酰胺的溶液)

※ 括号内是配制 2 mL 溶液所需各溶液的体积

Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液	1.50 mL (0.30 mL)
Sol. C: 0.50 mol/L Tris/HCl 溶液, pH 6.8	2.50 mL (0.50 mL)
Sol. D: 10% (w/v) SDS 溶液	0.10 mL (20 μL)
TEMED (四乙基乙二胺)	10 μL (2 μL) ^{* 2)}
蒸馏水	5.84 mL (1.17 mL)
→ 搅拌 2 分钟, 去除空气	
Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	50 μL (10 μL) ^{* 2)}

②'大分子量 蛋白胶溶 液配制

*3) 琼脂糖加入蒸馏水后在微波炉里完全融化, 此时溶液仍然是热的。

*4) 如有需要, 请预热枪头和制胶容器至 40~45°C

【分离 200-350kDa 磷酸化蛋白】

制备 3~5% 低浓度的聚丙烯酰胺凝胶, 为加强凝胶硬度可加入 0.5% 的琼脂糖。

分离胶溶液 (0.375 mol/L Tris, 0.1 mmol/L MnCl_2 , 0.1% SDS)

(例如: 总体积 10 mL 20 $\mu\text{mol/L}$ Phos-tag™ Acrylamide 含 3.0% 聚丙烯酰胺凝胶和 0.5% 琼脂糖)

Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液	1.00 mL
Sol. B: 1.5 mol/L Tris/HCl 溶液, pH 8.8	2.50 mL
Sol. E: 5.0 mmol/L Phos-tag™ AAL 溶液	0.04 mL
Sol. F: 10 mmol/L MnCl_2 溶液	0.04 mL ^{* 1)}
Sol. D: 10% (w/v) SDS 溶液	0.10 mL
TEMED (四乙基乙二胺)	10 μL ^{* 2)}
蒸馏水	2.93 mL
1.5% (w/v) 琼脂糖 ^{*3) *4)}	3.33 mL
Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	50 μL ^{* 2)}

↓

在变硬之前直接把琼脂糖倒入制胶容器。



③ '浓缩胶溶液

低浓度
含琼脂糖

浓缩胶溶液 (0.125 mol/L Tris, 0.1% SDS)

(例如, 制备 10 mL (或 2 mL) 3.0 w/v% 丙烯酰胺含 0.5% (w/v) 琼脂糖的溶液)

※ 括号内是配制 2 mL 溶液所需各溶液的体积

Sol. A : 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液	1.00 mL (0.20 mL)
Sol. C : 0.50 mol/L Tris/HCl 溶液, pH 6.8	2.50 mL (0.50 mL)
Sol. D : 10% (w/v) SDS 溶液	0.10 mL (20 μ L)
TEMED (四乙基乙二胺)	10 μ L (2 μ L) ^{*2)}
蒸馏水	3.01 mL (602 μ L)
1.5% (w/v) 琼脂糖 ^{*3) *4)}	3.33 mL (666 μ L)
Sol. G : 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	50 μ L (10 μ L) ^{*2)}

↓
在变硬之前直接把琼脂糖倒进凝胶容器。

Agarose H
(High Strength type)
1 g (产品编号 315-01203)
10 g (产品编号 319-01201)
25 g (产品编号 317-01202)



④ 样品制备

- 1) 将样品与 3 μ L Sol. I 在离心管中混合, 加蒸馏水至 9 μ L。
 - 2) 溶液冷却至室温。
 - 3) 加入上样缓冲液 (如: 1.5 μ L/孔)。
- ※ β -casein 上样量为 5-10 μ g/孔, 即可得到清晰条带。

⑤ 电泳

- 1) 安装好电泳装置, 电泳槽中加入电泳缓冲液 (即 Sol. H)。
 - 2) 轻轻拔出浓缩胶中的梳子, 向每个孔中加样。
 - 3) 接通电源, 恒流条件下跑胶 (30 mA/gel), 直到溴酚蓝跑到分离胶底部为止。
- 如同时跑 2 块蛋白胶, 请用 50 ~ 60 mA 的条件进行电泳。
- ※ 进行 Western Blotting 时, 电泳后的步骤请参考 [II]。

⑥ CBB 染色

- 1) 将凝胶浸泡在 Sol. J (50 mL) 中 10 分钟, 轻轻摇动, 固定蛋白。
- 2) 将凝胶浸泡在染色液中 (即 50 mL Sol. I) 2 小时, 轻轻摇动。
- 3) 用脱色液 (即 50 mL Sol. L) 漂洗 3 次, 除去多余的染液, 直到背景变得足够干净。
- 4) 凝胶拍照。

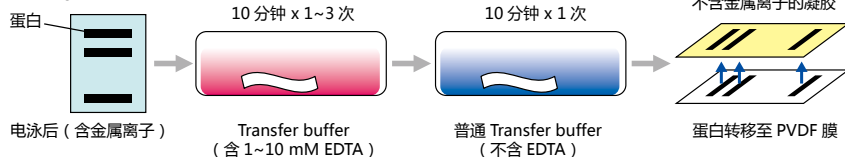
[II] Phos-tag™ SDS-PAGE 凝胶用于 Western Blotting

重要

电泳结束后, 进行转膜之前, 必须要进行一步操作: 用 EDTA 去除凝胶中混有的 Mn^{2+} 。此步骤可提高磷酸化与非磷酸化蛋白转移到 PVDF 膜上的效率。

1. 电泳结束后, 将凝胶浸泡在含 1~10 mmol/L EDTA 的 Transfer Buffer 中, 轻轻摇动十分钟 (重复 1-3 次)。
※ 电泳结束后, 根据凝胶的厚度等调整与 EDTA 缓冲溶液作用的时间、温度 (如较厚 1.5 mm : 20 分钟 $\times$ 2)。
※ 除了 Transfer Buffer 外, 也可使用 1 $\times$ Running Buffer。
2. 然后将凝胶浸泡在不含 EDTA 的 Transfer Buffer 中, 轻轻摇晃 10 分钟 (一次)。
※ 转膜时强烈建议采用湿法, 此法可有效地使蛋白从 Mn^{2+} -Phos-tag 丙烯酰胺凝胶中转移到 PVDF 膜上。(也可用半干法)
※ 需要对整个实验操作进行优化, 如时间、温度等。

Phos-tag™ SDS-PAGE



[III] Phos-tag™ SDS-PAGE 凝胶用于质谱分析

无需 EDTA 处理等特殊步骤



四 疑难问题

条带弯曲

Phos-tag™ SDS-PAGE 最常见的问题是“条带弯曲”。特别需要注意的是**样品中不能含有 EDTA**。

1. 预染的 marker：marker 和样品的泳道会因为泳道间盐浓度的改变而受到影响。
 ■ 预染的 marker 不能使用（如右图所示）。推荐使用碱性磷酸处理样品或者使用磷酸化的蛋白作为对照代替预染的 marker。
2. 酸性样品：条带可能弯曲。如果加入上样缓冲液后样品溶液显**黄色**或者**橙色**，需要加入 Tris 缓冲液使之中和为中性（**紫色**）。
3. EDTA（整合 Mn^{2+} ）、钋酸、无机盐及表面活性剂等导致条带弯曲或拖尾。
 ■ 通过 TCA 沉淀或透析法降低杂质含量。
4. 空白泳道：空白泳道会导致条带弯曲。
 ■ 空白泳道加与样品相同体积的上样缓冲液。
5. 钋酸：与磷酸竞争性的结合会引起条带弯曲。
 ■ 使用不同的磷酸抑制剂或者利用 TCA 及透析法去除钋酸。
6. 在样品中加入 $MnCl_2$ （ $MnCl_2$ 终浓度为 1 mM）可以提高分离效果。因为如果样品中含有残留 EDTA，就可以螯合上样缓冲液中的 Mn^{2+} ，而不是凝胶中的 Mn^{2+} 。



①：预染 marker
②③：β-酪蛋白 CBB 染色

低分辨率

1. 提高加入 Phos-tag™ Acrylamide 中 $MnCl_2$ 的浓度可以提高分辨率。
2. 使用 Tris-Tricine Buffer 作为电泳缓冲液，可以提高分辨率。

Tricine Running Buffer
Solution (x10) 1 L
(产品编号 200-17071)



蛋白弥散

在恒流作用下长时间的电泳，由于温度过高会引起蛋白分解和弥散。

1. 如果要在恒流作用下进行电泳，可以尝试在低温环境中进行，在使用之前将电泳缓冲液充分冷却，也可以在电泳槽周围缠绕冷却的绑带等（但是切记不要用冰块，以防引起触电）。
2. 若能提供恒压，也可以使用恒压进行电泳（例如：200 V）。电泳速度会变慢，但是可以防止电泳过程中产生的热量。

凝胶易碎

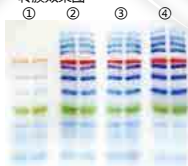
当蛋白质分子量较高时，凝胶会因为低浓度的丙烯酰胺而变软。

1. 可通过提高 N,N' -四甲基乙二胺的比例（如：24:1），添加琼脂糖（如：3% 丙烯酰胺 + 0.5% 琼脂糖）等方法来增加凝胶的硬度。具体请参考：“七 FAQ【分选】”

转膜困难

1. EDTA 处理不充分。延长处理时间或增加缓冲液的更换频率（如：20 分钟 × 2 次）。
2. 增加电流可能提高转移效率（如：200mA）。
3. 蛋白非阴性染色，如 CBB 染色会降低转膜效率。
4. 用低浓度的凝胶可以提高转膜效率。
5. 可以采用较厚的凝胶或增加样品上样量来提高转膜效率。
6. Transfer Buffer 中含有 SDS 可以提高转膜的效率。当转移到膜上时，立即往 Transfer Buffer 中加入 SDS 溶液以防起泡，或者在 EDTA 处理与转膜之间用含 SDS 的 Transfer Buffer 浸泡凝胶，轻轻摇动（10 分钟 × 1 次）。SDS 浓度保持在 0.02% 到 0.2% 之间。

转膜效果图



样品：WIDE-VIEW™ III 预染 marker
(产品编号：230-02461)^{*)}

- ① 不用 EDTA 处理
- ② 1 mM EDTA 处理 10 分钟 × 2 次
- ③ 10 mM EDTA 处理 10 分钟 × 1 次
- ④ 10 mM EDTA 处理 10 分钟 × 2 次

EDTA 溶液用 1× 电泳缓冲液配制

12.5% Phos-tag™ Super Sep

(50mM)

由图可知 10 mM EDTA 处理 10 分钟 × 2 次的转膜效果最好，推荐使用。
*) 分子量在 Phos-tag™ 凝胶中不能体现。利用转膜效率作为对照。

染色背景高

可将凝胶用 EDTA 处理，去除金属离子后再进行染色。

不能确认是因为蛋白发生磷酸化还是出现降解造成蛋白条带迁移

请进行常规 SDS-PAGE（不加入 Phos-tag™ 的情况下），确认不会出现条带迁移。



五 Phos-tag™ PAGE 条件优化

为了保证 Phos-tag™ PAGE 的分离效率,需要优化丙烯酰胺和 Phos-tag™ Acrylamide 的浓度。第一步要优化丙烯酰胺的浓度,其次是 Phos-tag™ Acrylamide 浓度。

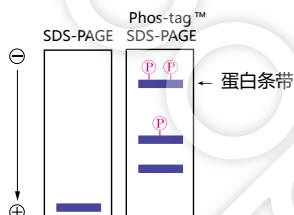
① 优化丙烯酰胺的浓度

首先,确定进行常规 SDS-PAGE 时目标蛋白迁移到凝胶最底部的最佳丙烯酰胺浓度。

Phos-tag™ PAGE 时蛋白迁移速度比常规 SDS-PAGE 低(包括非磷酸化蛋白),因此丙烯酰胺的浓度要进行摸索(见下图)。随着 Phos-tag™ 浓度升高,迁移速度变慢。

※ 使用溴酚蓝进行凝胶电泳,当溴酚蓝到达分离胶底部时,溴酚蓝的染色位置可以作为 1.0 Rf 值的标准。选择合适的丙烯酰胺浓度进行凝胶电泳。在常规 SDS-PAGE 凝胶电泳中,当电泳条带 Rf 值在 0.8 和 0.9 之间能观察到目的蛋白时,此时的丙烯酰胺浓度也适合于 Phos-tag SDS-PAGE 电泳。

【例: 10% 凝胶】



蛋白胶浓度建议

> 60 kDa : 6%
< 60 kDa : 8%
< 在高分子量蛋白质 (>200 kDa) 的情况下 >
当凝胶中的丙烯酰胺量少于 4% 时,可添加琼脂糖以增加凝胶硬度。(参见“七 FAQ【分离】”)
另外,提高 N, N'- 亚甲基双丙烯酰胺的比例也可增加凝胶硬度。

② 优化 Phos-tag™ Acrylamide 的浓度

其次,确定 Phos-tag™ Acrylamide 的最佳浓度。
请从最低到最高依次摸索出最佳浓度。

例) 20 μ M $\rightarrow$ 50 μ M $\rightarrow$ 100 μ M

【细胞裂解液】

如果样品中含有大量蛋白,如:细胞裂解液, Phos-tag™ 应在 5 至 25 μ M 之间。但若目的蛋白浓度很低、如在非过度表达体系中,则建议提高 Phos-tag™ 浓度,如 100 μ M。

※ 最佳浓度主要取决于目的蛋白。请根据每个目的蛋白的具体情况摸索合适的条件

(数据提供: Yasunori Sugiyama at Science Research Cencer, Kochi University)

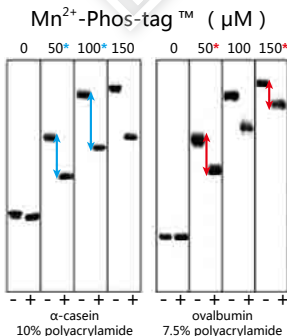
Phos-tag™ 浓度越高,分离能力越好?

通常情况下,浓度较高时分离能力更好。(左图*: 50 μ M 和 100 μ M 的 Mn^{2+} -Phos-tag™ 分离 α -酪蛋白效果比较)

但是高浓度会降低蛋白泳动速度。有时由于蛋白浓度较低,低浓度的 Phos-tag™ 分离能力反而更好(右图*: 50 μ M 和 150 μ M Mn^{2+} -Phos-tag™ 分离卵清蛋白效果比较)

【两条条带间距离】
 α -casein : 50 μ M < 100 μ M
ovalbumin : 50 μ M > 150 μ M

请根据目的蛋白的具体情况
调整最佳浓度



- : 磷酸化蛋白
+ : 非磷酸化蛋白
(碱性磷酸酶处理)

Reprinted with permission.
© 2006 The American Society
for Biochemistry and
Molecular Biology

六 应用与参考文献

实验结果

在此介绍使用过 Phos-tag™ 丙烯酰胺各位研究者的感想和经验。以下分别是日本东京大学小川觉之的结果和评价、横滨市立大学木村弥生二维电泳的实验结果以及高知大学杉山先生和理化学研究所细川先生的 Western Blotting 的实验结果。

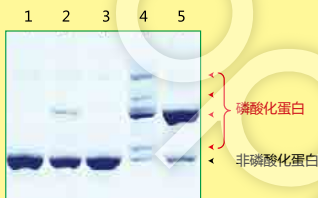
① 使用了 Phos-tag™ SDS-PAGE 的磷酸化 / 非磷酸化蛋白比较

我推荐使用 Phos-tag™

——东京大学研究生院医学研究科 小川觉之

Phos-tag™ 是专为研究磷酸化蛋白而新开发出来的试剂。此产品使用方便，不但可用于体外实验，还能定量分析体内蛋白的磷酸化水平。Phos-tag™ SDS-PAGE 可用于常规电泳实验，无需购买特殊设备，性价比高。传统蛋白磷酸化的研究需要特异的磷酸化抗体、RI 等其它试剂，操作复杂，花费大，且放射性元素会有安全隐患，而 Phos-tag™ 的出现恰恰可以弥补这些缺点，为磷酸化蛋白研究提供新的方向。

磷酸化蛋白和非磷酸化蛋白利用 Phos-tag™ SDS-PAGE 的分离效果图



Lane 1 为非磷酸化蛋白，Lane 2-5 为磷酸化蛋白，各蛋白因磷酸化状态不同而条带迁移率也有所不同。

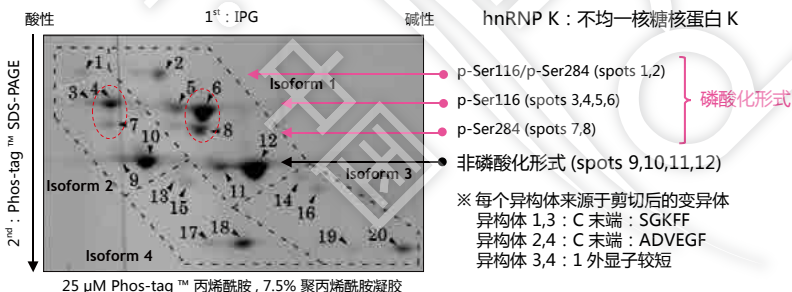
磷酸化 / 非磷酸化蛋白的数量比、磷酸化程度、磷酸化蛋白的丰度等都可根据条带迁移和条带宽度求得。

(资料提供：日本东京大学研究生院医学系研究科)

② 二维电泳中的应用：分析 hnRNP K 磷酸化异构体

小鼠巨噬细胞 J774.1 经 LPS 刺激后，裂解细胞，经过免疫沉淀法分离得到 hnRNP K。在二维电泳中，一维是 IPG 胶，二维是 Phos-tag™ SDS-PAGE，可分离 hnRNP K 的异构体。利用质谱仪，可以确认不同的点代表不同的亚型或修饰蛋白。

二维电泳



同一个等电点的位置上，不同位点发生磷酸化都可以被区分开来
(例: spots 6 vs. 8 and spots 4 vs. 7)

【参考文献】

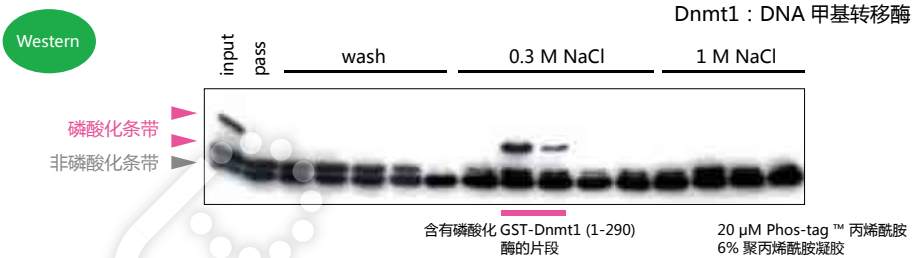
Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. Y. Kimura, K. Nagata, N Suzuki, R. Yokoyama, Y. Yamanaka, H. Kitamura, H. Hirano, and O. Ohara, *Proteomics*, Nov 2010; **10**(21): 3884-95.

【结果提供】

横滨市立大学 生命纳米系统科学研究所 生物体超分子系统科学专业 木村弥生 (Dr. Y. Kimura)、平野久 (Dr. H. Hirano) 理化学研究所 RCAI 小原收



③ 检测含有 Dnmt1 磷酸化激酶的片段



- ① 采用亲和色谱法从鼠脑提取液中纯化 GST-Dnmt1 (1-290) 结合蛋白
- ② 使用 0.3 M 和 1 M NaCl 的 DNA 纤维素柱洗脱得到目的蛋白
- ③ GST-Dnmt1 (1-290) 作为体外激酶实验的反应底物
- ④ Phos-tag™ SDS-PAGE 用于 Western blotting, 确定迁移条带中每个片段的激酶活性

我们可以确定在片段中含有目的激酶！

【参考文献】

The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1delta/epsilon. Y. Sugiyama, N. Hatano, N. Sueyoshi, I. Suetake, S. Tajima, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, and I. Kameshita, *Biochem. J.*, May 2010; 427(3): 489-97.

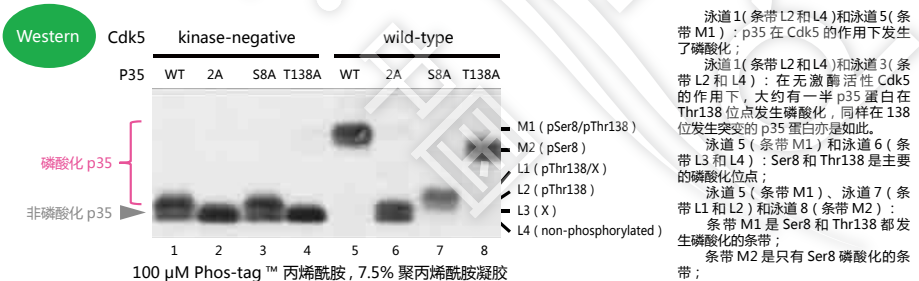
【结果提供】

高知大学 综合研究中心 生命、功能物质部门 实验实习机器设施 杉山康亮 (Dr. Y. Sugiyama)
香川大学 农学部 应用生物科学科 动物功能生化学研究室 龟下勇 (Dr. I. Kameshita)

④ 利用 p35 的丙氨酸突变体确定 Cdk5 激活 p35 的磷酸化位点

Cdk5: 细胞周期依赖性蛋白激酶 5

p35 常见的磷酸化位点是 Ser8 和 Thr138。但是 Ser8 和 Thr138 位点往往会发生丙氨酸突变, 产生 3 种突变体 (Ser8 突变体: S8A, Thr138 突变体: T138A, Ser8 和 Thr138 双突变体: 2A)。这 3 种突变体、野生型 p35、Cdk5 和没有激活活性的 Cdk5 都来源于 COS-7 细胞。这些细胞裂解液用 Phos-tag™ SDS-PAGE 和 Western blotting 进行检测 (检测抗体: p35 抗体)。



可明确磷酸化位点和条带迁移率的关系！

【参考文献】

Quantitative Measurement of in Vivo Phosphorylation States of Cdk5 Activator p35 by Phos-tag™ SDS-PAGE. T. Hosokawa, T. Saito, A. Asada, K. Fukunaga, and S. Hisanaga, *Mol. Cell. Proteomics*, Jun 2010; 9: 1133 - 1143.

【结果提供】

理化学研究所 脑科学综合研究中心 回路功能研究核心 记忆功能研究团队 细川智永 (Dr. T. Hosokawa)
首都大学东京 理工学研究科 生命科学专业 神经分子功能研究室 久永真市 (Dr. S. Hisanaga)



参考文献

【Phos-tag™ 文献综述】

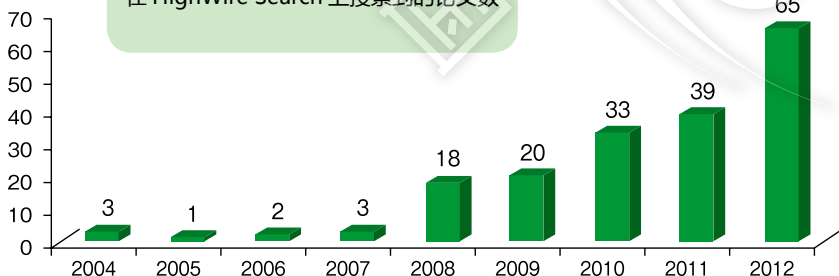
1. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule, *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, **17**, 2075-2081 (2003), H. Takeda, A. Kawasaki, M. Takahashi, A. Yamada, and T. Koike
2. Phosphate-binding tag: A new tool to visualize phosphorylated proteins, *Molecular & Cellular Proteomics*, **5**, 749-757 (2006), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, and T. Koike
3. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag™ SDS-PAGE, *Nature Protocols*, **4**, 1513-1521 (2009), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike

【Phos-tag™ 产品应用文献】

1. Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1319-1326 (2007), C. I. Maeder et.al. M. A. Hink, A. Kinkhabwala, R. Mayr, P. I. H. Bastiaens and M. Knop
2. Regulation of PKD by the MAPK p38δ in Insulin Secretion and Glucose Homeostasis, *Cell*, **136**, 235-248 (2009), G. Sumara, I. Formentini, S. Collins, I. Sumara, R. Windak, B. Bodenmiller, R. Ramracheya, D. Caille, H. Jiang, K. A. Platt, P. Meda, R. Aebersold, P. Rorsman, and R. Ricci
3. Dbf4-Dependent Cdc7 Kinase Links DNA Replication to the Segregation of Homologous Chromosomes in Meiosis I, *Cell*, **135**, 662-678 (2008), J. Matos, J. J. Lipp, A. Bogdanova, S. Guillot, E. Okaz, M. Junqueira, A. Shevchenko, and W. Zachariae
4. Kinome Profiling in Pediatric Brain Tumors as a New Approach for Target Discovery, *Cancer Res.*, **69**, 5987-5995 (2009), A. H. Sikkema, S. H. Diks, W. F.A. den Dunnen, A. ter Elst, F. J.G. Scherpen, E. W. Hoving, R. Ruijtenbeek, P. J. Boender, R. de Wijn, W. A. Kamps, M. P. Peppelenbosch, and E. S.J.M. de Bont
5. Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **32**, 2430-2441 (2012), K. Shahpasand, I. Uemura, T. Saito, T. Asano, K. Hata, K. Shibata, Y. Toyoshima, M. Hasegawa, S. Hisanaga
6. The Hsp90 Kinase Co-chaperone Cdc37 Regulates Tau Stability and Phosphorylation Dynamics, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16976-16983 (2011), Umesh K. Jinwal, Justin H. Trotter, Jose F. Abisambra, John Koren, III, Lisa Y. Lawson, Grant D. Vestal, John C. O'Leary, III, Amelia G. Johnson, Ying Jin, Jeffrey R. Jones, Qingyou Li, Edwin J. Weeber, and Chad A. Dickey

※ 应用文献 5、6 为 tau 蛋白使用例

在 HighWire Search 上搜索到的论文数



Phos-tag™ Acrylamide

【检测】

Q. 可检测磷酸化蛋白吗？

A. 可以，用定性染色法（如考马斯亮蓝）染色，再检测条带的强弱即可。推荐使用产品如“Quick-CBB PLUS”。

【相关产品】Quick-CBB PLUS（产品编号 178-00551，1 L；产品编号 174-00553，250 mL）

【分离】

Q. 此产品可分离多大的蛋白 (kDa)？

A. 据文献报道，可分离 350 kDa 的磷酸化蛋白（20 μ M Phos-tag, 3% 丙烯酰胺 + 0.5% 琼脂糖）。

【参考文献】*Proteomics*, 9, 4098-4101 (2009), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, H. Uchijima, and K. Koike

* 添加琼脂糖，可增强凝胶强度。

Q. 如何提高分辨率？

A. 一般情况下，较高浓度的 Phos-tag™ 可以获得较高的分辨率。然而，增加 Phos-tag™ 的浓度会引起整个蛋白电泳的速度成比例地变慢。

【染色】

Q. 除考马斯亮蓝外，凝胶是否可以用银染、荧光染色和阴性染色？

A. 可以。

【相关产品】Silver Stain 2 Kit Wako（产品编号 291-50301; 10 sheets），Silver Stain Kit Wako（产品编号 299-13841; 10 sheets）；Negative Gel Stain MS Kit（产品编号 293-57701; 20 tests）

Q. CBB 染色后，脱色效果不好？

A. 脱色时可用微波炉略微加热。

方法：把染色后的凝胶放入 100 mL 去离子水中，放入几张面巾纸，用微波炉略微加热数分钟，更换去离子水与面巾纸。重复操作 3-4 次。

【试剂及凝胶的配制】

Q. 除此产品外，还需要哪些试剂和仪器？

A. 需 10 mM 的 $MnCl_2$ 溶液。其余试剂和仪器与常规 SDS-PAGE 相同。

Q. 实验中需要的甲醇与 $MnCl_2$ 是哪个级别的试剂？

A. 都是市售分析纯。

【样品要求】

Q. 样品必须是纯化的蛋白吗？是否可以用细胞裂解液？

A. 不一定是纯化的蛋白，细胞裂解液也可以。如果是纯化的样品，做 SDS-PAGE 就可以。如果是蛋白裂解液则需要做免疫印迹。

【Phos-tag™ Acrylamide 的使用】

Q. 该产品 10mg 包装可做多少次实验？

A. 取决于 Phos-tag™ 的使用浓度，如：10 mg 包装，若凝胶厚 1 mm，宽 9 cm，长 7.7 cm，则 Phos-tag™ 20 μ M 可制 100 块胶，50 μ M 40 块，100 μ M 20 块。其他包装及对应次数见右图。

Phos-tag™	20 μ M	50 μ M	100 μ M
0.3 mL 包装 (0.9 mg)	约 9 块	约 4 块	约 2 块
2 mg 包装	约 20 块	约 8 块	约 4 块
10 mg 包装	约 100 块	约 40 块	约 20 块
SuperSep™ Phos-tag™	-	5 块	-

【Phos-tag™ SDS-PAGE 配制胶】

Q. 如何配制 Phos-tag™ SDS-PAGE 胶？

A. 只需在配常规 SDS-PAGE 胶时加入 Phos-tag™ Acrylamide 和 $MnCl_2$ 。凝胶时间略长于常规 SDS-PAGE。配制好的凝胶在几天内会不稳定，建议现用现配。

【Phos-tag™ SDS-PAGE 操作】

Q. 每孔样品的上样量是多少？

A. 纯化蛋白：1-5 μ g（CBB 染色法），组织细胞抽提液：10-30 μ g（请根据蛋白表达量进行调整）。

※ 以上为估计值，请先用适量的样品进行常规蛋白免疫印迹、SDS-PAGE 来摸索。



【凝胶强度】

Q. 凝胶容易破损，请问要如何改善？

A. 丙烯酰胺浓度低的凝胶容易破损，因此，提高亚甲基双丙烯酰胺对丙烯酰胺的比例（如 24:1）即可改善。

【配制好的含 Phos-tag™ 的凝胶稳定性】

Q. 配制好的含 Phos-tag™ Acrylamide 的凝胶可存放多久？

A. 配制好的凝胶在几天内会不稳定，因此建议现用现配。

【Phos-tag™ 溶液稳定性】

Q. 溶于甲醇和水中的母液可保存多久？

A. 据报道，4℃避光条件下能保存 6 个月以上。

【试剂制备】

Q. Phos-tag™ 的浓度与溶液中 Mn^{2+} 的摩尔比例是多少？

A. Phos-tag™ 丙烯酰胺与 Mn^{2+} 的摩尔比应该为 1:2，两个 Mn^{2+} 离子结合一个 Phos-tag™ 分子（如图 1）。

Q. 按照实验流程中的方法配制 Phos-tag™，结果出现混浊，这正常吗？

A. 正常。混浊是由于甲醇造成的，静置一会，溶液就会变得澄清。

Q. 可否仅用水来溶解 Phos-tag™？

A. 可以仅用水溶，只是比溶解在含甲醇的水中时间长些。若不能完全溶解，离心，取上清使用。

【分子 marker】

Q. 可使用哪种预染 marker？

A. 一般的预染 marker 在 Phos-tag™ 凝胶里条带会歪曲（如图 2）。使用和光的 WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III（产品编号 230-02461）效果会好一些，可作为转膜效率的标记，但是无法推断分子量。请单独留出泳道。

【有 ATP 存在下的磷酸化反应】

Q. 磷酸化反应液中存在 ATP，是否会对电泳造成影响？

A. ATP 浓度在 2.0 mM 时不会有什么特殊影响。使用限量还不清楚。

【预制胶】

Q. 能否将此产品与样品混合后，在普通预制胶中进行电泳？

A. 不可以。但可选择使用含有 Phos-tag™ 的预制胶 SuperSep™ Phos-tag™（参考 p18）。

【分解和磷酸化 Phos-tag™ 的区别】

Q. 如何区别 Phos-tag™ SDS-PAGE 条带分离的原因是磷酸化还是目的蛋白降解？

A. 进行普通 SDS-PAGE（无 Phos-tag™），确认是否有目的蛋白降解。

【DNA 的分离】

Q. Phos-tag™ 适合用于分离 DNA 吗？

A. 参考以下文献：

- A SNP genotyping method using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, **361**, 294-298 (2007), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike (The phosphate group at DNA-terminal is efficiently captured by Zn^{2+} -Phos-tag™.)
- A mobility shift detection method for DNA methylation analysis using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, **378**, 102-104 (2008), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike

【实验结果分析】

Q. 为什么会出现条带弯曲、拖尾现象？

A. EDTA、无机盐类、表面活性剂都是造成条带偏移或者拖尾的原因。所以电泳前可先用 TCA 沉淀法或者透析把样品脱盐。在样品量不够的情况下，可在空的泳道中加入适量上样缓冲液（×1），随后再进行电泳。

Q. 电泳后，怎么判断这些条带是因为蛋白的磷酸化引起的？

A. 相同样品使用 12.5% SuperSep™ Ace（产品编号 199-14971）进行电泳，确认目的蛋白没有出现多条带。

Q. 靶蛋白磷酸化与非磷酸化分离效果不佳，怎么办？

A. 请先确认作为阳性对照的 β -酪蛋白和作为阴性对照的经去磷酸化酶处理过的 β -酪蛋白的分离情况（产品编号：038-23221）。如果确认能够分离的话，可能本产品的 Phos-tag™ 浓度或者丙烯酰胺的浓度不能分离目的蛋白的磷酸化和非磷酸化。

图 1. Phos-tag™ 的基本结构

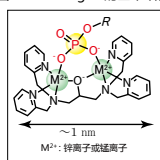
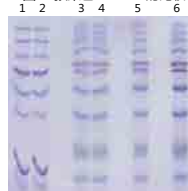


图 2. 预染色 marker 的比较



1. 2: 其他公司的预染色 marker (3 μ l)
3. 4. 5: WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III (3 μ l)
6: WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III (5 μ l)
空白 Lane: 1 x 样品缓冲液 (5 μ l)
SuperSep™ Phos-tag™ (50 μ M), 12.5% (20mA 电流)



【后续实验】

Q. Phos-tag™ Acrylamide 实验后进行质谱分析，需要进行特殊处理吗？

A. 无需进行特殊处理，即可进行质谱实验。

Q. 做免疫印迹实验时，是否可以用 NC 膜代替 PVDF 膜？

A. 可以。但是 Phos-tag™ 与 PVDF 膜亲和力更高，因此建议用 PVDF 膜。

Q. 可以使用免疫印迹吗？

A. 可以，但由于转膜效果不好，必须用 EDTA 处理除去凝胶中的金属离子。

方法：把凝胶放入含有 10 mmol/L 的 EDTA 缓冲液（25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycine, 10% MeOH）中，在摇床上缓慢摇动 10 分钟。更换 EDTA 缓冲液，重复操作 3 次。随后将凝胶放入不含有 EDTA 的缓冲液（25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycine, 10 %MeOH）中，摇动 10 分钟，最后将凝胶转移至 PVDF 膜或者 NC 膜上。

※如果转膜效果仍然不理想，可多进行几次 EDTA 处理或者增加 EDTA 的浓度，或者适当优化转膜方法等。

SuperSep Phos-tag™ (产品请见 p18)

Q. 是否有低浓度的聚丙烯酰胺预制胶？

A. 目前正在研发浓度为 6%、7.5% 这两种低浓度聚丙烯酰胺的预制胶。

Q. Phos-tag™ polyacrylamide 中有没有其它 Phos-tag™ 浓度的预制胶？

A. 目前正在研发浓度为 20 μM 和 100 μM 两种浓度的预制胶。

Q. 是否有方法可提高分离能力？

A. Running Buffer 中加入 Tris-Tricine 可提高分离能力。

Q. 是否有一些参考文献？

A. Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Koike T., "A Laborsaving, Timesaving, and More Reliable Strategy for Separation of Low-Molecular-Mass Phosphoproteins in Phos-tag Affinity Electrophoresis", *Int. J. Chem.* **4**, 1-8 (2012) DOI: 10.5539/ijc.v4n5p1.

Phos-tag™ Biotin (产品请见 p19)

Q. BTL-104, BTL-105, BTL-111 之间有什么区别？

A. BTL-104, BTL-105 和 BTL-111 三者连接链(Linker) 的长度不同，但使用相同。BTL-111 灵敏度最高。

Q. 检测灵敏度到什么水平？

A. 可以达到 ng 级别。需要使用高发光试剂，比如 ImmunoStar LD。

Q. 使用该产品时还需要别的试剂吗？

A. 需要制备 Streptavidin-conjugated HRP 溶液。

Q. Phos-tag™ Biotin 可以使用多少次？

A. 主要决定于使用次数以及使用量，以下实验次数仅作参考

BTL-104：130-1300 次；

BTL-105：113-1130 次；

BTL-111 1 mM 水溶液：10-100 次

Q. 可测定磷酸化蛋白吗？

A. 根据条带的浓度可以进行半定量分析。

Q. 能否确定结合磷酸基团的数目？

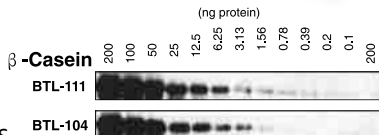
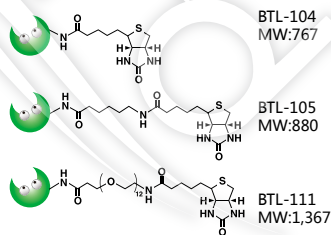
A. 不能。

Q. 能否剥除 Phos-tag™ Biotin 中的抗体？

A. 可以。与含有 62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)、2%(w/v) SDS 和 1 M 2-mercaptoethanol 溶液混合后，振荡 15 分钟。将混合液用 1×TBS-T 漂洗 3 次，每次 10 分钟。

Q. 推荐使用哪种膜？

A. 推荐使用 PVDF 膜。



Q. 使用 Phos-tag™ Biotin 要求终止反应吗？

A. 不需要，因为终止反应会降低灵敏度。

Phos-tag™ Mass Analytical Kit (产品请见 p19)

Q. Phos-tag™ Mass 用于实验可以使用多少次？

A. 如果每次用量为 5 μL ，至少可以使用 1000 次。

Q. 如何选择使用 Phos-tag™ MS-101L, Phos-tag™ MS-101H 和 Phos-tag™ MS-101N？

A. Phos-tag™ 101N 含有自然存在的 Zn，101L 与 101H 分别含有 Zn 的同位素 ^{64}Zn 和 ^{68}Zn 。

请参考以下建议：

摸索条件时使用 101N，其中含有多重同位素，结果比较详细；

鉴定磷酸基团是否存在，使用 101L 和 101H，这些试剂分别包含 ^{64}Zn 和 ^{68}Zn 。使用这些试剂检测同一个样品时会产生不同的荷质比。

Q. 如果想测定经过 Phos-tag™ SDS-PAGE 分离得到的样品，是否必须要在凝胶消化之前去除 Phos-tag™？

A. 没有必要。SDS-PAGE 结束之后根据一般的凝胶消化方法进行操作即可。

Q. 能否用于 ESI 质谱？

A. 是的，可以使用。请参考下面的文献 这篇报道使用 Phos-tag™ MS-101N 进行 ESI-MS 分析。在实验过程中，使用了中性溶液，若为酸性溶液会导致 Phos-tag™ 分离。

【参考文献】*Anal. Chem.* (2008), **80**, 2531-2538 (MS-101N ESI-MS)

Phos-tag™ Agarose (产品请见 p19)

Q. 使用 Phos-tag™ Agarose 纯化的样品能否直接用于 SDS-PAGE？

A. 不可以。洗脱液中包含了高浓度的盐，会使得条带弯曲，应使用 SDS-PAGE 样品缓冲液作为洗脱液。

Q. Phos-tag™ Agarose 可以重复使用吗？

A. 我们不建议重复使用。

Q. 相对于 IMAC 来说 Phos-tag™ Agarose 有什么优势？

A. Phos-tag™ Agarose 可在生理条件下 (pH7.5) 进行实验，实验中不需要使用还原剂或者表面活性剂，因此不会破坏磷酸化蛋白的天然构象。而且纯化的蛋白可以用于质谱和 Western blotting。

Q. 在制备样品时，哪些试剂可用哪些试剂不可用？

A. 参照以下表格：

种类	试剂	是否可用	允许的浓度
还原剂	DTT	○	$\leq 0.1 \text{ M}$
变性剂	尿素	○	内部实验，达到 8 M 时没有影响
表面活性剂（阴离子）	SDS	○	浓度 $\geq 0.5\%$ 会对结合产生影响
	脱氧胆酸钠	○	浓度 $\geq 0.25\%$ 会对结合产生影响
表面活性剂（非离子）	Nonidet P40	○	$\leq 1\%$
	Tween 20	○	$\leq 1\%$
表面活性剂（两性）	CHAPS	○	$\leq 0.2\%$
磷酸衍生物	β -磷酸甘油	×	不能使用
	焦磷酸	×	不能使用
螯合剂	EDTA	△	高浓度会有影响

※ ○：表示可用 △：表示有影响 ×：表示不能使用



八 SuperSep Phos-tag™预制胶

SuperSep Phos-tag™ 是一种预制胶，预先加入了 50 μmol/L 的 Phos-tag™ Acrylamide，打开包装即可直接使用。预制胶中含有锌作为金属离子，在中性凝胶缓冲液中保存稳定性很好，得到的结果条带也很整齐。

- 特点：
- 即开即用
 - 预制胶使用安全
 - 可长期保存（6 个月）
 - 操作与普通 SDS-PAGE 一样

板大小	100 x 100 x 3 (mm)	
凝胶大小	90 x 85 x 1 (mm)	
孔数	13	17
孔容积	30 μL	25 μL
Phos-tag™ 浓度	50 μmol/L	
丙烯酰胺浓度	10%、12.5%、15% 和 17%	
ZnCl ₂ 浓度	100 μmol/L	



SuperSep Phos-tag™

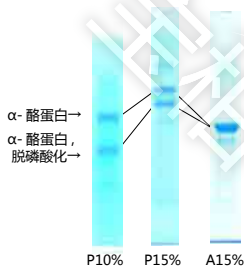


EasySeparator

注意！

- 这款产品为预制胶，适合用于“EasySeparator”电泳槽。
- 使用预染的 maker 会使条带弯曲。推荐使用 WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III。具体参考“七 FAQ”中的“Phos-tag™ Acrylamide-分子 marker”。
- 在使用产品之前，参考“SuperSep Ace”或者其它常用的 SDS-PAGE 摸索样品的电泳条件。
- 进行 Western blotting 之前，需要用 EDTA 先处理再进行转膜，具体参考“四. 疑难问题”。

使用例子



- 电泳条件：30 mA（恒电流），60 分钟
- 样品：5 μg/Lane α-酪蛋白（含磷酸化与去磷酸化 α-酪蛋白）（产品编号 038-23221）
普通 SDS-PAGE 只观察到一条条带，而 Phos-tag™ SDS-PAGE 里可见 α-酪蛋白磷酸化和 α-酪蛋白去磷酸化两条条带。
- 样品缓冲液：Sample Buffer Solution (2ME+) (X4)（产品编号 191-13272）
- 电泳缓冲液：SDS-PAGE 缓冲液，pH8.5（产品编号 192-16801）
- 染色：QUICK CBB PLUS（产品编号 174-00553）
P10%（左）：SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），10%，13well
P15%（中）：SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），15%，13well
A15%（右）：SuperSep™ Ace，15%，13well（不含 Phos-tag™）

产品编号	产品名称	规格
SuperSep Phos-tag™ 预制胶		
193-16711	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），10%，13 well	5 块
190-16721	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），10%，17 well	5 块
195-16391	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），12.5%，13 well	5 块
193-16571	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），12.5%，17 well	5 块
193-16691	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），15%，13 well	5 块
196-16701	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），15%，17 well	5 块
197-16851	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），17.5%，13 well	5 块
194-16861	SuperSep Phos-tag™（50 μmol/L），17.5%，17 well	5 块

相关产品

058-07681	EasySeparator < 配套电泳槽 >	1 套
230-02461	Wide-View Prestained Protein Size Marker III（11~245kDa）	500 μL（200 次）
038-23221	α-Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated	1 mg



九 Phos-tag™ 系列产品

产品编号	产品名称	规格	保存	用途
301-93531	Phos-tag™ Biotin BTL-104	10 mg	2~10℃保存	可替代抗磷酸化抗体。可检测出各种磷酸化氨基酸。
308-93541	Phos-tag™ Biotin BTL-105	10 mg	2~10℃保存	
308-97201	Phos-tag™ Biotin BTL-111 1mM Aqueous Solution Ref.1)	0.1 mL	2~10℃保存	比 BTL-104 检测更灵敏。
305-93551	Phos-tag™ Mass Analytical Kit	1 kit	2~10℃保存	MALDI-TOF/MS 分析
302-93561	Phos-tag™ Agarose	0.5 mL	2~10℃保存	柱层析纯化磷酸化蛋白
308-93563		3 mL	2~10℃保存	

【BTL-111 文献】

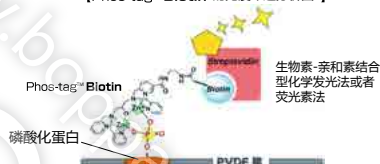
Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin, *Proteomics*. **12**(7), 932-7 (2012), Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Sugiyama Y, Fukada Y, Ozeki T, Koike T.

Phos-tag™ Biotin 无特异性磷酸化抗体时的最佳选择！

Phos-tag™ Biotin 是与生物素结合的 Phos-tag™，可用于免疫印迹法检测磷酸化蛋白。Phos-tag™ Biotin BTL-104 和 BTL-105 可灵敏检测 PVDF 膜上的磷酸化蛋白。

- 特点：
- 无辐射
 - 无需 PVDF 膜的封闭处理
 - Phos-tag™ 的特异性结合与氨基酸种类、序列无关
 - 可适用于免疫印迹和质谱分析等后续工作
 - Phos-tag™ BTL 母液可稳定保存至少 6 个月
 - 实验流程与使用 HRP 标记抗体相类似

【Phos-tag™ Biotin 的免疫印迹分析图】



※BTL-104、BTL-105、BTL-111 三者连接链 (Linker) 长度不一，但使用上基本相同。BTL-111 灵敏度最高。(参考 p16)。

Phos-tag™ Mass Analytical Kit 用于 MALDI-TOF/MS 检测，提高检测灵敏度

用于质谱分析的试剂套装。

可配套 MALDI-TOF/MS 使用的质谱分析试剂套装，用于检测磷酸化分子-Phos-tag™ 复合体，通常可提高磷酸化分子的检测灵敏度。

试剂盒内容：

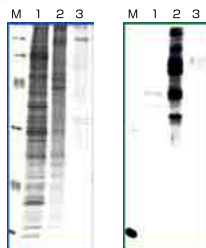
- Phos-tag™ MS-101L..... 5 mg ($[C_{27}H_{29}N_6O_{64}Zn_2]^{3+}$ MW: 581.4)
- Phos-tag™ MS-101H..... 5 mg ($[C_{27}H_{29}N_6O_{62}Zn_2]^{3+}$ MW: 589.4)
- Phos-tag™ MS-101N.....10 mg ($[C_{27}H_{29}N_6OZn_2]^{3+}$ MW: 584.3)

Phos-tag™ Agarose 亲和层析纯化磷酸化蛋白

填入色谱柱中使用。可分离、纯化、浓缩磷酸化蛋白。不使用界面活性剂、还原剂，可得到状态近似生物体内的磷酸化蛋白。

- 特点：
- 缓冲液不含有界面活性剂、还原剂
 - 与亲和层析方法类似
 - 可在 1 小时内纯化磷酸化蛋白
 - Phos-tag™ Agarose 捕获结合到 Tyr、Thr、Ser、Asp、His 等氨基酸、糖类、脂类上的无机磷酸根和大量二价磷酸根
 - 可在生理条件下 (pH7.5) 捕捉蛋白

【使用例：A431 裂解液中的磷酸化蛋白的纯化】



M: 分子量标记
Lane1: 未吸附层
Lane2: 吸附层
Lane3: 柱清洗层

把 Phos-tag™ 填充到柱里，再加上 A431 裂解液。
SYPRO Ruby 染色 (左图) 再使用 Anti-p Tyr 抗体进行免疫印迹 (右图)，检测出结果。
结果确认磷酸化蛋白浓缩在柱吸附层里。

十 相关产品

Phos-tag™ SDS-PAGE 凝胶配制试剂

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
315-01203	Agarose H (High-strength type)	1 g	室温	适合高强度、低琼脂糖浓度或浓度高的大型核酸片段电泳。可以在 0.2~1% 的浓度范围、1-200 kbp 的分离范围内使用
319-01201		10 g		
317-01202		25 g		
311-90271	10% SDS Solution	100 mL	室温	Sol.D
313-90275		500 mL		
139-00722	Manganese(II) Chloride Tetrahydrate	25 g	室温	分子生物学用。用于制备 Sol.F。
268-01902	Zinc Chloride	25 g	室温	分子生物学用
192-11041	Separating Gel Buffer Solution (x4)	250 mL	2~10°C	Sol.B、D，用于分离凝胶（含有 SDS）
199-11051	Stacking Gel Buffer Solution (x4)	250 mL	2~10°C	Sol.C、D，用于浓缩凝胶（含有 SDS）
205-06313	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	25 mL	阴暗处	电泳用
019-15922	10 w/v% Ammonium Peroxodisulfate Solution (Ammonium Persulfate Solution)	25 mL	2~10°C	Sol.G。即开即用十分方便。

预混合缓冲液

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
184-01291	Running Buffer Solution (x10)	1 L	2~10°C	Sol.H
312-90321	SDS-PAGE 10x Running Buffer	1 L	室温	Sol.H
318-90323		5 L		
192-16801	SDS-PAGE Buffer, pH 8.5	5 L	室温	Sol.H。无需稀释，1 x buffer。
200-17071	Tricine Running Buffer Solution (x10)	1 L	2~10°C	组分：0.5 M Tris/0.5 M 甘氨酸 / 1% SDS
191-13272	Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)	25 mL	2~10°C	SDS-PAGE (Laemmli 法) 用样品缓冲液，含有 2-巯基乙醇。
196-11022	Sample Buffer Solution (2ME+) (x2)	25 mL	2~10°C	
199-16132	Sample Buffer Solution with 3-Mercapto-1,2-propanediol (x2)	25 mL	2~10°C	
196-16142	Sample Buffer Solution with 3-Mercapto-1,2-propanediol (x2)	25 mL	2~10°C	

染色试剂

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
174-00553	Quick CBB Plus	250 mL	室温	可替代 Sol.K，不用有机溶剂，最快 10 分钟染色、脱色。
178-00551		1 L		
299-50101	Quick-CBB	2 L	室温	可替代 Sol.K 使用。
299-58901	Silver Stain MS Kit	20 tests	2~10°C	省去戊二醛处理操作，因此蛋白几乎不会被化学修饰。灵敏度低，可检测低至纳克级的蛋白。
299-13841	Silver Stain Kit Wako	for 10 gels	2~10°C	灵敏度是 CBB 法的 50~100 倍。
291-50301	Silver Stain II Kit Wako	for 10 gels	2~10°C	简便、染色快。里面的终止液可调整浓度。
293-57701	Negative Gel Stain MS Kit	20 tests	室温	质谱分析、免疫印迹用。

蛋白 Marker

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
230-02461	WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III	500 µL	-20°C	用于 Phos-tag™ SDS-PAGE 可保持条带不歪曲

脱磷酸化酶

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
018-10693	Alkaline Phosphatase (for Biochemistry)	50 U	-20°C	蛋白样品脱磷酸化
012-10691		100 U		

全国代理



宝柏 中国

www.boppard.cn
info@boppard.cn

北京 Tel: 010 85804838
上海 Tel: 021 62884751
广州 Tel: 020 87326381
香港 Tel: 852 27999019

更多即时新鲜资讯

欢迎关注



@ 宝柏 - 中国

或联系我们的 QQ 在线客服：



1433642494



562608361



1043735153