

Phos-tag™ 系列产品 Ver.6

Phos-tag™ 磷酸化蛋白分析应用



Phos-tag™ Acrylamide

SDS-PAGE 分离磷酸化蛋白P2



SuperSep Phos-tag™

Phos-tag™ SDS-PAGE 预制胶分离磷酸化蛋白P5



Phos-tag™ Mass Analytical Kit

质谱分析磷酸化多肽P6



Phos-tag™ Agarose

纯化富集磷酸化蛋白P7



Phos-tag™ Tip

含有 Phos-tag™ 琼脂糖的枪头.....P7



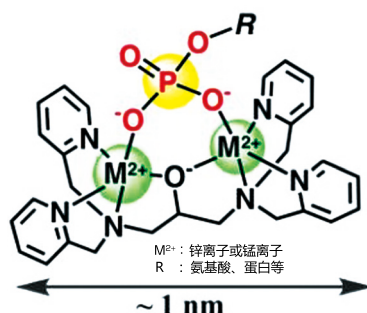
Phos-tag™ Biotin

免疫印迹检测磷酸化蛋白P8

什么是Phos-tag™？

Phos-tag™ 是一种能与磷酸离子特异性结合的功能性分子，更容易分离和检测分析磷酸化蛋白。

【Phos-tag™基本结构】



- 2个金属离子合力捕捉磷酸离子
- 与磷酸离子有高亲和性和选择性
- 在pH 5-8的生理环境下生成稳定的复合物

■ 可识别和捕捉所有所有氨基酸位点上的磷酸化基团

■ 无放射性

■ 不影响质谱分析等后续实验

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研发。

SDS-PAGE 分离磷酸化蛋白——Phos-tag™ 丙烯酸酰胺

Phos-tag™ Acrylamide

NARD Institute, Ltd.



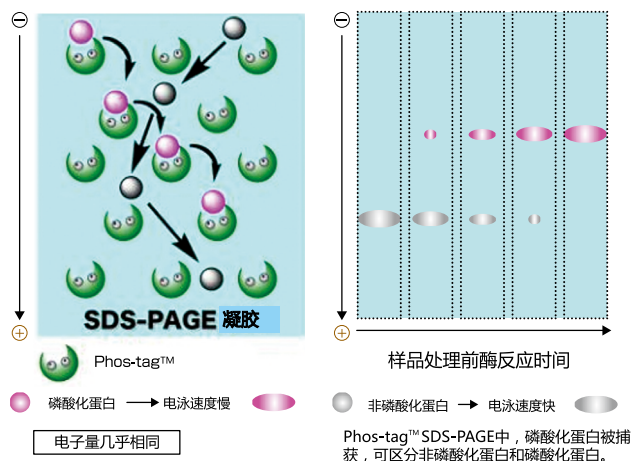
Phos-tag™ Acrylamide AAL-107

Phos-tag™ SDS-PAGE 可根据迁移率不同，区分磷酸化蛋白与非磷酸化蛋白。该方法只需在常规的 SDS-PAGE 胶中添加 Phos-tag™ Acrylamide (Phos-tag™ 丙烯酸酰胺) 和锌离子或者锰离子即可实验。

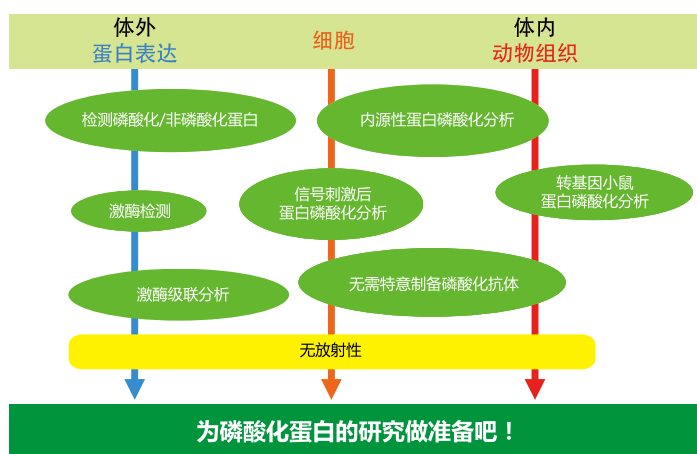
特点

- 不含放射性元素，非荧光物质
- 不同位点磷酸化修饰的蛋白在同一泳道中因迁移率不同而被分离开来
- 操作过程与常规 SDS-PAGE 相类似
- Phos-tag™ 的结合特异性与氨基酸种类、序列无关
- Phos-tag™ SDS-PAGE 实验后，可进行常规的免疫印迹或者质谱实验，也可进行 2 维电泳
- 可区分磷酸化蛋白与非磷酸化蛋白
- Phos-tag™ 母液可稳定保存至少 3 个月

Phos-tag™ SDS-PAGE 原理



Phos-tag™ 运用



Phos-tag™ 实验

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。

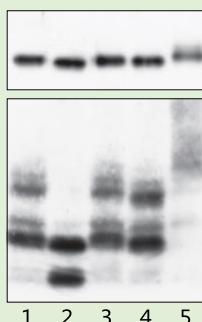
免疫印迹

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。

MC*
ATP

- - + +
- + - +

※ MC：微囊藻毒素
(一种磷酸化抑制剂)



Laemmli method
常规 SDS-PAGE

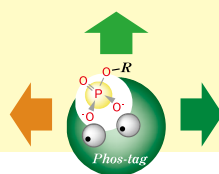
Phos-tag™ SDS-PAGE

样品：鼠脑提取液
检测：P35 标记抗体
条带 1：孵育前的鼠脑提取液
条带 2-5：用 MC 或 ATP 孵育 (+)，未孵育 (-)

Data was provided by
Tomohisa Hosokawa at Brain Science
Institute, RIKEN (Japan)

质谱分析

分离磷酸化蛋白后进行质谱分析，可知具体的磷酸化位点。



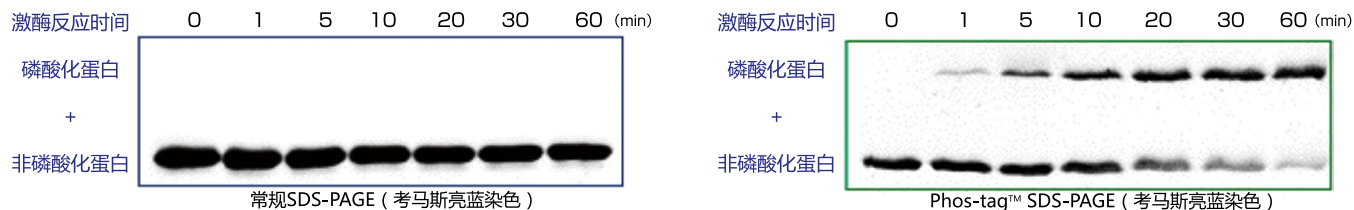
2 维电泳

可分离等电点相同（磷酸化位数相同）的不同磷酸化形式。

体外检测激酶的活性

使用例 1：酪氨酸激酶 Abl 磷酸化反应的变化

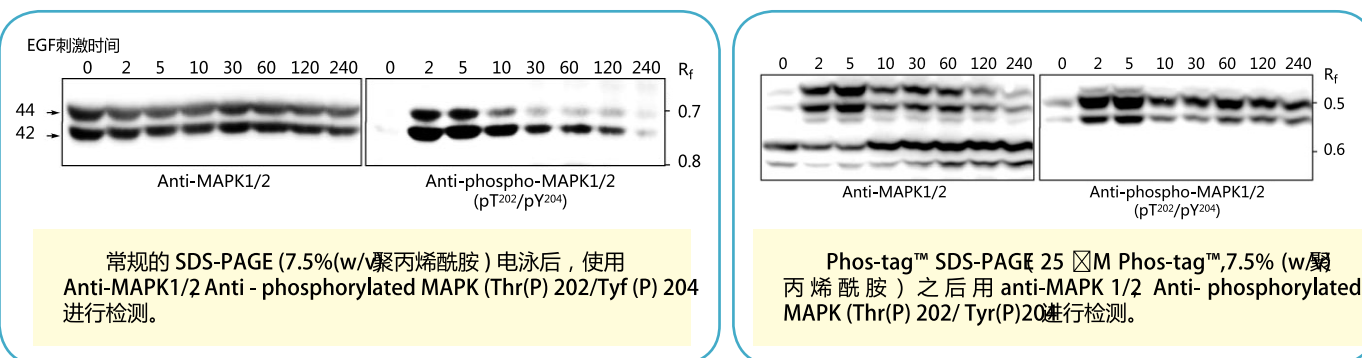
酪氨酸激酶 Abl 作用于带有 GST 标签的底物 ABLTIDE，采用 Phos-tag™ SDS-PAGE，可检测底物上酪氨酸的磷酸化反应。



常规 SDS-PAGE (上左图：不存在 Phos-tag™) 不能确认底物是否被磷酸化。
而 Phos-tag™ 的 SDS-PAGE (上右图：100 μM Phos-tag™) 里，随着磷酸化反应的进行，电泳速度慢的条带慢慢出现，相对应电泳速度快的非磷酸化蛋白的条带逐渐减少。

使用例 2：EGF 刺激前后 MAPK 磷酸化水平的变化

常规 SDS-PAGE 和 Phos-tag™ SDS-PAGE 后进行免疫印迹实验分析 EGF 刺激的 A431 细胞中 MAPK 磷酸化水平。

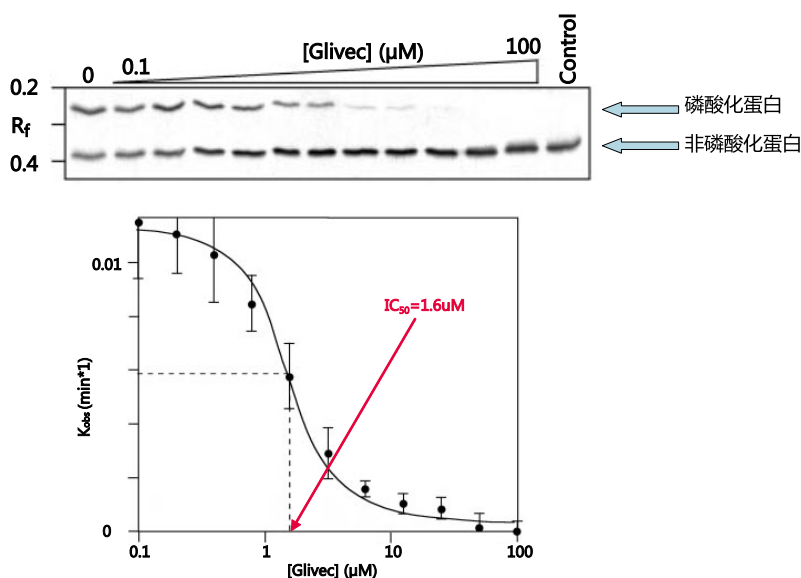


摘自 Kinoshita-Kikuta, E. et al., Mol.Cell. Proteomics. (2007)6: 356

体外实验检测激酶的抑制效应

使用例：体外检测磷酸化反应的变化，观察酪氨酸激酶的活性

Glivec 是酪氨酸激酶特异性抑制剂，底物是 ABLTIDE-GST。采用 Phos-tag™ SDS-PAGE，可检测底物上酪氨酸的磷酸化反应。

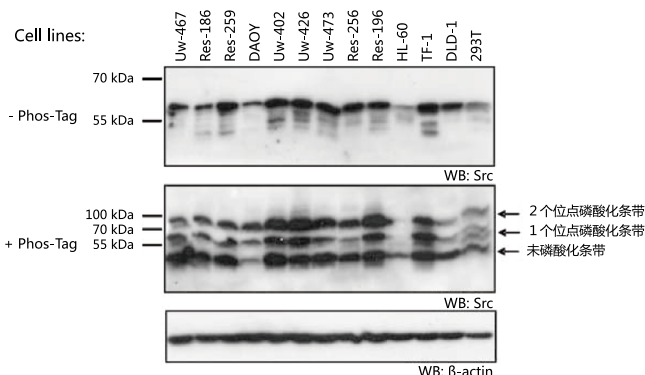


从图中可知，使用 Phos-tag™ SDS-PAGE 后，随着抑制剂浓度的增高，泳动速度慢的磷酸化条带就逐渐减少，而非磷酸化的条带逐渐增加。测定 Glivec 对底物的抑制率 $IC_{50} = 1.6 \mu M$ 。

摘自 Kinoshita-Kikuta, E. et al., Mol.Cell. Proteomics. (2007)6: 356

体外实验检测激酶的磷酸化状况

使用例：各种脑部肿瘤细胞系中检测 Src 激酶活性



上图在常规 SDS-PAGE (不存在 Phos-tag™) 用 Src 抗体检测, 只能看到一条明显的条带。

而在中间那幅图 (100 μM Phos-tag™) 中, 用 Src 抗体检测出三条带, 分别是 2 个位点磷酸化条带、1 个位点磷酸化条带和未磷酸化条带 (Src 激酶在 Tyr416 和 Tyr527 这两个氨基酸位点发生磷酸化)。

摘自 Arend H. Sikkema, et al., Cancer Res(2009)69:5987

实验检测 DNA 甲基化

使用例：使用甲基化特异性 PCR(MSP) 与 Zn^{2+} -SDS-PAGE 这两种技术, 可有效区分甲基化 DNA 和非甲基化 DNA。

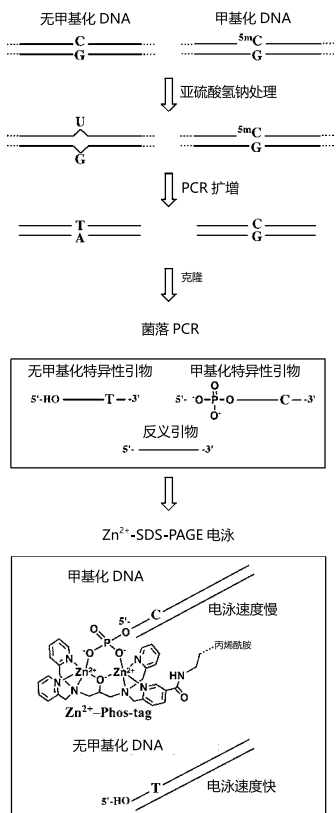


图 1. 联合使用甲基化特异性 PCR(MSP) 与 Zn^{2+} -SDS-PAGE 实验流程。

DNA 经过亚硫酸氢钠处理后, 进行 PCR 扩增, 克隆至 pUC19 载体后, 转入 DH5α 菌株, 挑取单克隆, 直接进行菌落 PCR, 获得的 DNA 进行 Zn^{2+} -SDS-PAGE 电泳。

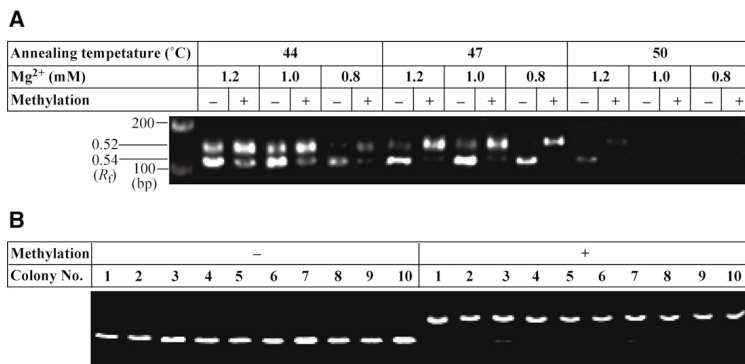


图 2. 联合使用甲基化特异性 PCR(MSP) 与 Zn^{2+} -SDS-PAGE 进行甲基化 DNA 分析。

(A) MSP 实验条件优化, 实验摸索了三种退火温度 (44、47 和 50 °C)、三种 $MgSO_4$ 浓度 (1.2、1.0 和 0.8 mM)。使用 20 μM Zn^{2+} -SDS-PAGE 和 20% (W/V) 丙烯酰胺。

(B) DNA 甲基化分析。左边 10 列为无甲基化 DNA, 泳动速度快。右边 10 列为甲基化 DNA, 泳动速度慢。

产品编号	生厂商编号	产品名称	规格	Phos-tag 在配胶中的使用浓度		
				20 μM	50 μM	100 μM
304-93526	AAL-107S1	Phos-tag™ Acrylamide AAL-107 5mM Aqueous Solution (Phos-tag™ 丙烯酰胺 AAL-107 5mM 液体型)	0.3 ml (约 0.9 mg)	约 10 块	约 4 块	约 2 块
300-93523	AAL-107M	Phos-tag™ Acrylamide AAL-107 (Phos-tag™ 丙烯酰胺 AAL-107)	2 mg	约 20 块	约 8 块	约 4 块
304-93521	AAL-107	Phos-tag™ Acrylamide AAL-107 (Phos-tag™ 丙烯酰胺 AAL-107)	10 mg	约 100 块	约 40 块	约 20 块

SuperSep Phos-tag™ 预制胶

Wako



SuperSep Phos-tag™



EasySeparator

SuperSep Phos-tag™ 是一种预制胶，预先加入了 50 $\mu\text{mol/l}$ 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。

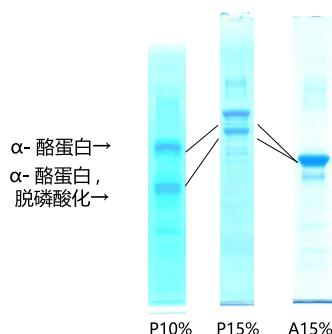
特点

- 即开即用
- 预制胶使用安全
- 有效期最长 15 个月
- 操作与普通 SDS-PAGE 一样

注意

- 这款产品为预制胶，适用于“EasySeparator”电泳槽。
- 使用预染的 marker 会使条带弯曲。推荐使用 WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III。(230-02461)
- 在使用产品之前，参考常规 SDS-PAGE 摸索样品的电泳条件。
- 进行免疫印迹之前，需要用 EDTA 先处理再进行转膜，具体参考“Phos-tag™ 实验指导手册（第三版）四．疑难问题”。

使用例



- 电泳条件：30 mA（恒电流），60 分钟
- 样品：5 $\mu\text{g/Lane}$ 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 $\mu\text{mol/L}$)，10%，13well
P15%（中）：SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/L}$)，15%，13well
A15%（右）：SuperSep™ Ace，15%，13well（不含 Phos-tag™）

产品编号	产品名称	电泳仪	规格
------	------	-----	----

用于Bio-Rad伯乐电泳仪

198-17981	SuperSep™ Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，7.5%，17well，83×100×3.9mm	Mini-PROTEAN™ Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.)	5 块
195-17991	SuperSep™ Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，12.5%，17well，83×100×3.9mm		5 块

用于Life Technologies电泳仪

192-18001	SuperSep™ Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，7.5%，17well，100×100×6.6mm	XCell SureLock™ Mini-Cell (Life Technologies, Inc.)	5 块
199-18011	SuperSep™ Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，12.5%，17well，100×100×6.6mm		5 块

SuperSep Phos-tag™ 预制胶

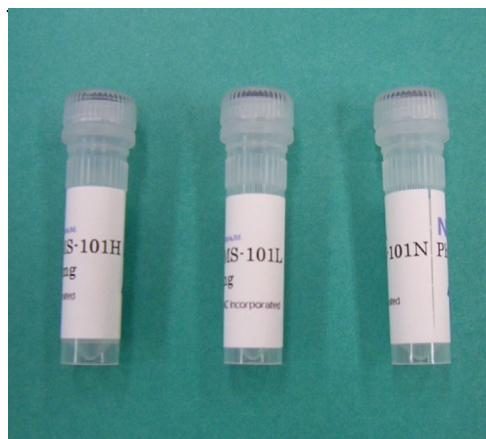
192-17401	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，6%，13well	EasySeparator (Wako Pure Chemical, Ltd.)	5 块
199-17391	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，6%，17well		5 块
195-17371	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，7.5%，13well		5 块
192-17381	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，7.5%，17well		5 块
193-16711	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，10%，13 well		5 块
190-16721	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，10%，17 well		5 块
195-16391	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，12.5%，13 well		5 块
193-16571	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，12.5%，17 well		5 块
193-16691	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，15%，13 well		5 块
196-16701	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，15%，17 well		5 块
197-16851	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，17.5%，13 well		5 块
194-16861	SuperSep Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/l}$)，17.5%，17 well		5 块

产品编号	产品名称	规格
------	------	----

相关产品

058-07681	EasySeparator < 配套电泳槽 >	1 套
230-02461	WIDE-VIEW restained Protein Size Marker III (11~245kDa)	500 μL (200 次)
038-23221	α -Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated (Phos-tag™ SDS-PAGE 阳性对照)	1 mg

Phos tag™ Mass Analytical Kit NARD Institute, Ltd.



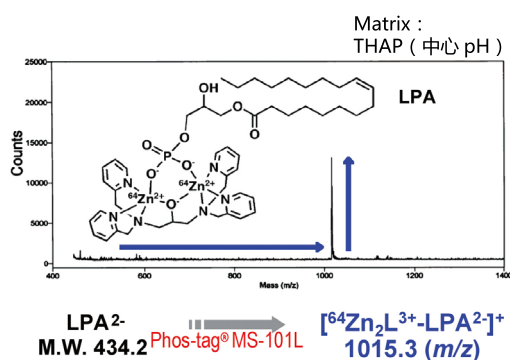
Phos-tag™ Mass Analytical Kit

Phos-tag™ Mass Analytical Kit (Phos-tag™ 质谱分析试剂盒) 是用于质谱分析的试剂套装。可配套 MALDI-TOF/MS 使用, 用于检测磷酸化多肽 - Phos-tag™ 复合体, 通常可提高低磷酸化分子的检测灵敏度。

特点

- CH₃COO⁻ 等价结合在 Phos-tag™ MS-101 上。
- 在溶液中, 不含有阴离子的 Phos-tag™ MS-101 带有 + 3 价
- 检测前需制备 1 mM 的 Phos-tag™ MS-101L, MS-101H 或者 MS-101N(溶于水)

■ 使用例: 检测 Phos-tag™ - 磷酸化 LPA 复合体



由于正电荷增大磷酸化 LPA 检测灵敏度上升。

■ 试剂盒组成

- Phos-tag™ MS-101L _____ 5mg
(C₂₇H₂₉N₆O₆Zn₂³⁺ 分子量: 581.4)
- Phos-tag™ MS-101H _____ 5mg
(C₂₇H₂₉N₆O₆Zn₂³⁺ 分子量: 589.4)
- Phos-tag™ MS-101N _____ 10mg
(C₂₇H₂₉N₆OZn₂³⁺ 分子量: 584.3)

产品编号	生产商编号	产品名称	规格
305-93551	MS-101KIT	Phos-tag™ Mass Analytical Kit (Phos-tag™ 质谱分析试剂盒)	1 kit

Q & A

- 1 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。
- 2 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 ⁶⁴Zn 和 ⁶⁸Zn。
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 ⁶⁴Zn 和 ⁶⁸Zn。使用这些试剂检测同一个样品时会产生不同的荷质比。
- 3 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。
- 4 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)

纯化富集磷酸化蛋白——Phos-tag™ 琼脂糖

Phos-tag™ Agarose



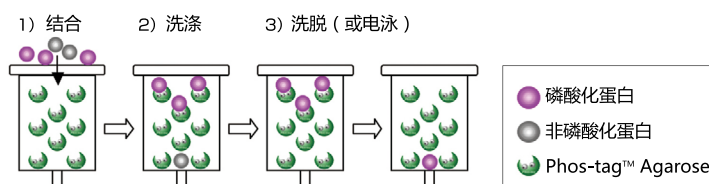
Phos-tag™ Agarose AG-503

在生理条件下，Phos-tag™ Agarose (Phos-tag™ 琼脂糖) 为分离、浓缩天然磷酸化蛋白和生物样品中的磷酸化多肽提供一种高效的方法。

特点

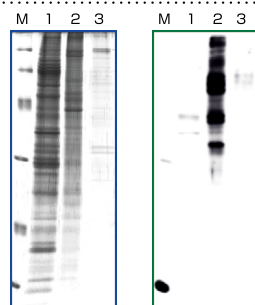
- 缓冲液不含有还原剂和去污剂，纯化过程中蛋白不会变性，可进行后续免疫共沉淀 (Co-IP) 实验
- 与亲和层析方法类似
- 可在 1 小时内纯化磷酸化蛋白
- Phos-tag™ Agarose 捕获结合到 Tyr, Thr, Ser, Asp, His 等氨基酸、糖类、脂类上的无机磷酸根 (HOPO_3^{2-}) 和大量二价磷酸根 (ROPO_3^{2-})

原理



使用例：

纯化细胞裂解液中的磷酸化蛋白



M: 标准蛋白 Marker
Lane1: 全蛋白, 未经纯化
Lane2: 纯化后的蛋白洗脱液
Lane3: 漂洗流出液

1. 将 Phos-tag™ Agarose 填充到柱里，加入细胞裂解液。
2. SYPRO Ruby 染色 (左图)，Anti-p Tyr 抗体进行 Western Blot (右图)。
3. 结果显示使用 Phos-tag™ Agarose 可高效纯化磷酸化蛋白。

产品编号	生产商编号	产品名称	规格
302-93561	AG-501	Phos-tag™ Agarose	0.5 ml
308-93563	AG-503	(Phos-tag™ 琼脂糖)	3 ml

磷酸化肽纯化工具——含有 Phos-tag™ 琼脂糖的枪头

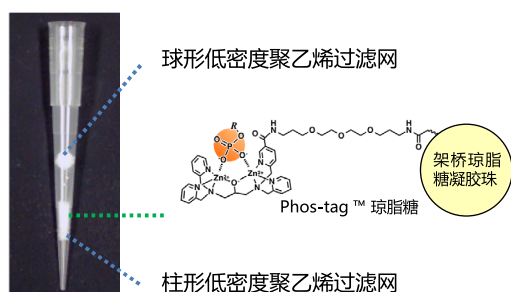
Phos-tag™ Tip



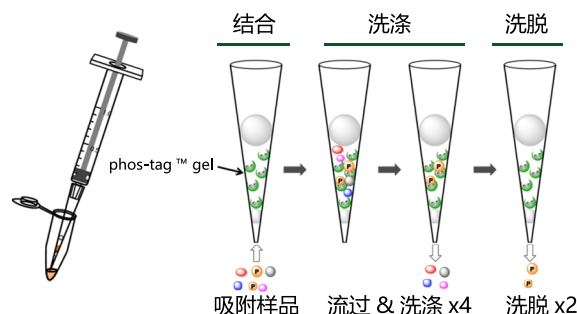
可特异性捕捉磷酸基团的功能性分子“Phos-tag™”的磷酸化肽纯化用枪头。

枪头里含有 Phos-tag™ 琼脂糖，是即开即用的前处理工具，适用于生理状态下低分子量磷酸化分子（核酸和多肽等）的分离和富集。

Phos™ Tip 的结构



把 Phos-tag™ Tip 装在注射器 (购买产品附送) 上使用。



产品编号	生产商编号	产品名称	规格	保存条件
387-07321	AG2-303	Phos-tag™ Tip	8 个	冷藏

免疫印迹检测磷酸化蛋白——Phos-tag™ 生物素

Phos-tag™ Biotin

NARD institute, ltd.



Phos-tag™ Biotin BTL-104

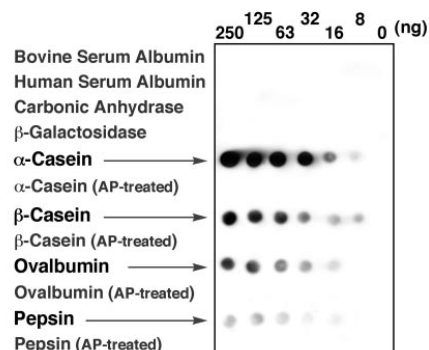
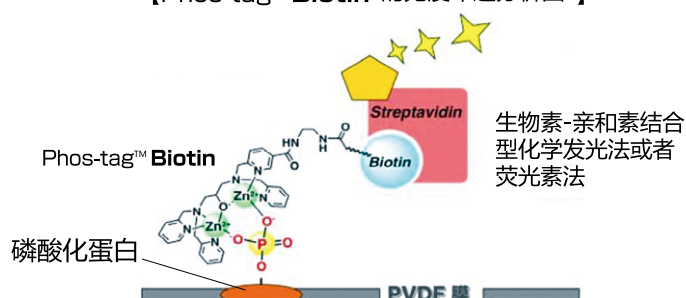
Phos-tag™ Biotin (Phos-tag™ 生物素) 是与生物素结合的 Phos-tag™, 可用于免疫印迹法检测磷酸化蛋白。Phos-tag™ Biotin BTL-104 可灵敏检测 PVDF 膜上的磷酸化蛋白。

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
- 不影响 2 维电泳和质谱分析等后续实验
- 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

■ 使用例：在 PVDF 膜上检测磷酸化蛋白

【Phos-tag™ Biotin 的免疫印迹分析图】



转印在 PVDF 膜上的磷酸化蛋白可精确检测到 ng 级水平，没有检测到相应的去磷酸化蛋白与非磷酸化蛋白的信号斑点。

摘自 Eiji Kinoshita, et al., *Mol.Cel.Proteomics* (2006) 5: 749

产品编号	生产商编号	产品名称	规格
301-93531	BTL-104	Phos-tag™ Biotin BTL-104 (Phos-tag™ 生物素 BTL-104)	10 mg (130 - 1300 次)
308-97201	BTL-111	Phos-tag™ Biotin BTL-111 (Phos-tag™ 生物素 BTL-111 液体型)	0.1 ml (10 - 100 次)

※ BTL-104 和 BTL-111 相比，BTL-111 灵敏度更高。

产品仅供科研使用



请联系我们
获取最新版的实验指导手册。

株式会社ナード研究所 **NARD** institute, ltd.

マナック株式会社 **MANAC** Incorporated

Wako 和光純薬工業株式会社
Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

全国代理

boppard

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