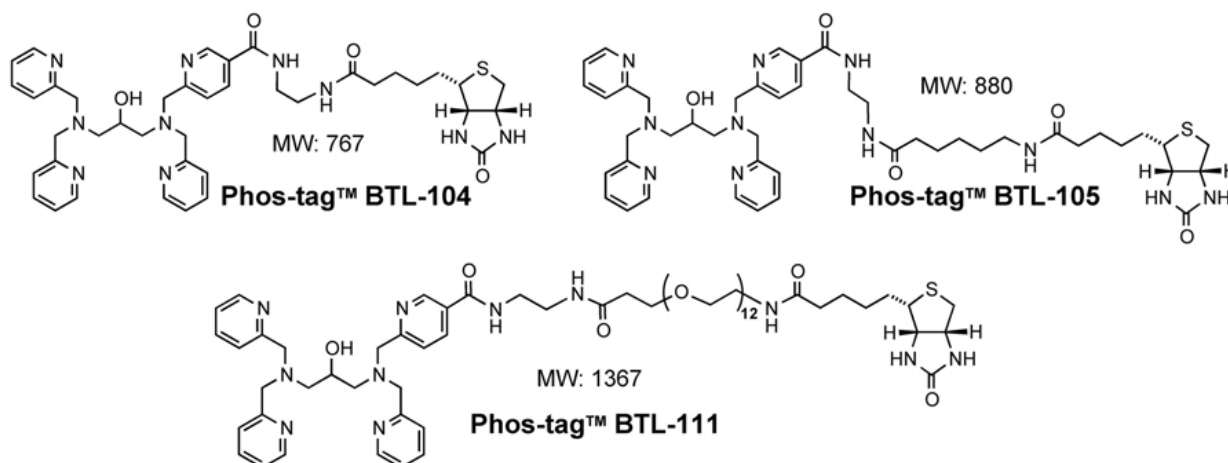


## 1. 背景

磷酸化是翻译后修饰的一种重要形式，与目标蛋白的功能调解、定位和特异性结合有关。检测磷酸化蛋白方法（比如磷酸蛋白质组学）在评估生物多样性和生理状态方面是非常重要的。2002年，Koike教授的团队（日本广岛大学）发现了一种双环的金属复合体（1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinc(II)），该复合体可作为磷酸结合标签分子（pH值为中性的Phos-tag™液体（比如Kd= 25 nM的苯基磷酸二阶阴离子， $Ph-OPO_3^{2-}$ ））。之后，Koike教授的团队研发了可用于磷酸化蛋白质组学研究Phos-tag™系列产品。这份操作手册是介绍在PVDF膜上进行电泳印迹时使用Phos-tag™锌(II)复合物进行化学发光检测所有磷酸化蛋白的方法。

## 2. Phos-tag™ BTL-104, BTL-105和BTL-111的介绍

Phos-tag™配体，BTL-104，BTL-105和BTL-111可在PVDF膜上高灵敏度检测磷酸化蛋白。该方法需要亲和素标记的辣根过氧化物酶（HRP）和化学发光检测试剂。该产品是无色固体，对皮肤无辐射。Phos-tag™生物素需在冰箱保存（4℃）。



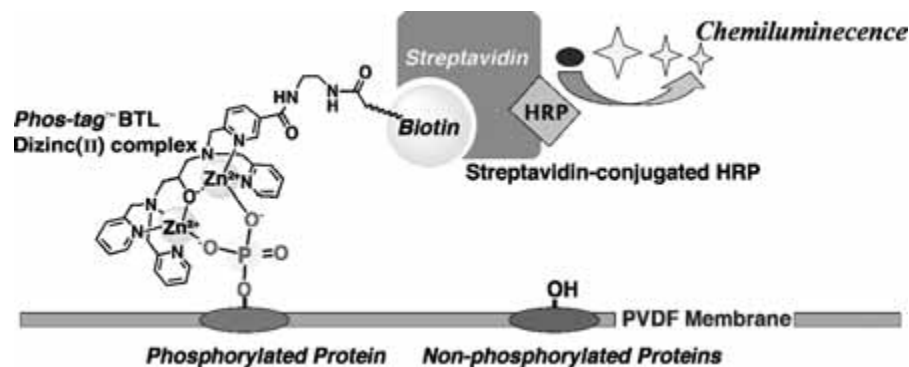
## 3. 警告和限制

Phos-tag™配体不能用于临床诊断和治疗。不能用于人或者动物的体内或者体表实验，只能用于科研。只有经过实验室技能培训的人才能使用该产品。避免接触皮肤或者眼睛。如果接触到，请立即用水清洗。

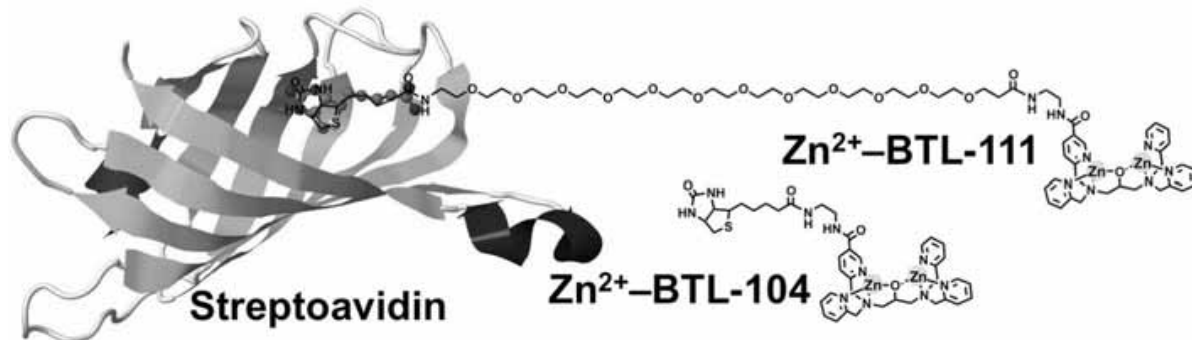
## 4. Phos-tag™方法的优势

- # 无辐射。
- # 不需要对PVDF膜进行封闭处理。
- # Phos-tag™结合的特异性与氨基酸和氨基酸序列无关。
- # 可进行下游的实验，比如再用抗体进行检测或者质谱分析。
- # Phos-tag™ BTL液体可在室温至少保存6个月。
- # 与HRP标记抗体的使用步骤基本一致。

## 5. Phos-tag™方法的原理



注意：BTL-111有很大的亲水空间，所以在免疫印迹实验中灵敏度最高。



## 6. Phos-tag™方法需配置的溶液

**溶液 A：** Tris盐缓冲液 ( 10×TBS , 1L , pH7.5 )

|                        |       |
|------------------------|-------|
| # Tris ( 0.10mol/L )   | 12.1g |
| # NaCl ( 1.0mol/L )    | 58.4g |
| # 灭菌水                  | 0.9L  |
| # 2mol/L 液体盐酸，调pH值至7.5 | 适量    |
| # 灭菌水，调整试剂至1L          | 适量    |

**溶液 B：** 10%(v/v) 吐温20 ( Tween 20 ) 溶液 ( 50ml )

|                     |      |
|---------------------|------|
| # 吐温20 ( Tween 20 ) | 5mL  |
| # 灭菌水               | 45mL |

**溶液 C：** 1×TBS-T ( 1L )

|       |       |
|-------|-------|
| # 溶液A | 100mL |
| # 溶液B | 10mL  |
| # 灭菌水 | 890mL |

**溶液 D：** Phos-tag™ BTL-104和BTL-105 甲醇溶液

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| # Phos-tag™ BTL-104或者Phos-tag™ BTL-105 | 10mg   |
| # 甲醇                                   | 0.13mL |

**溶液 E-104&E-105：** Phos-tag™ BTL溶液 ( 4℃避光保存 )

|                                                               |  |
|---------------------------------------------------------------|--|
| # 10mmol/L Phos-tag™ BTL-104: 溶液D ( 0.13mL ) + 溶液C ( 1.17mL ) |  |
| # 10mmol/L Phos-tag™ BTL-105: 溶液D ( 0.13mL ) + 溶液C ( 1.00mL ) |  |

**溶液E-111：** Phos-tag™ BTL-111溶液 ( 4℃避光保存 )

|                                          |  |
|------------------------------------------|--|
| # 商业化提供的产品 ( 1mmol/L Phos-tag™ BTL-111 ) |  |
|------------------------------------------|--|

**溶液 F** : 10mmol/L Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 液体溶液 ( 50mL )

# Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> ( 分子量 : 297 )

0.15g

# 灭菌水

50mL

( 或者使用10mmol/L ZnCl<sub>2</sub>溶液 )

**溶液 G** : 亲和素标记的辣根过氧化物酶溶液

# 亲和素-辣根过氧化物酶偶联物 ( GE Healthcare Bio-Sciences: RPN1231 )

## 7. 以4:1的比例制备Phos-tag™ BTL和亲和素标记的HRP的复合物

1) 将下列试剂混合后, 获得溶液H。可在室温保存30分钟。

# 溶液C ( 1×TBS-T )

469μl

# 溶液E-104, E-105或者溶液 E-111 ( Phos-tag™ BTL溶液 ) \*1

1~10μl

# 溶液F ( 10mmol/L Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> )

20μl

# 溶液G ( 亲和素标记的辣根过氧化物酶 )

1μl

2) 将溶液H加入到离心过滤装置 ( NMWL = 30,000, Nanosep™ 30K, Pall Life Sciences )。用附带的帽子封住。

3) 室温离心 ( 14,000×g ) 20分钟 ( 去除过多的Phos-tag™ BTL )。

4) 在帽子中保留的液体( 制备的复合物 )( <10μl )用30mL 溶液C( 1×TBS-T )稀释, 这样制备了溶液PB-SH ( 以4:1的比例制备Zn<sup>2+</sup>—Phos-tag™ BTL和亲和素标记的HRP的复合物 ) \*2。多余的Phos-tag™ BTL在装置的底部, 不在帽子中。

\*1 PB-SH溶液中的 ( Phos-tag™ BTL )<sub>4</sub>- ( 亲和素标记的HRP ) 在4℃保存30天。

\*2 [Phos-tag™ BTL] >> 4 × [亲和素标记的HRP]

### 《常见问题 1》

## 8. 用Phos-tag™ 生物素结合亲和素标记的HRP检测

1) 转移了蛋白的PVDF膜用溶液C ( 1×TBS-T ) 浸泡在相应的装置中。

请戴塑料手套操作。膜需要温和震荡至少1小时。确定膜不会和装置粘在一起。

确保膜不会干。

### 《常见问题 2 & 3 》

2) 在塑料袋中溶液PB-SH ( ca. 1 mL/5 cm<sup>2</sup> ) 和膜一起孵育。

袋子温和震荡30分钟。

3) 将膜从袋中取出, 在装置中用溶液C ( ca. 10 mL/5 cm<sup>2</sup> ) 室温洗2次, 每次洗5分钟 ( 装置可以温和晃动 )

确定膜不会和装置粘在一起。

保证膜不会干。

4) 用化学发光试剂进行显色。

## 9. 转移了蛋白的PVDF膜再用抗体检测

**溶液K**：0.5mol/L Tris-HCl缓冲液（1L，pH 6.8）

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| # Tris                  | 60.6g |
| # 灭菌水                   | 0.8L  |
| # 6mol/L 液体HCl，调pH值至6.8 | 适量    |
| # 灭菌水，调整体积至1L液体         | 适量    |

**溶液 L**：10%(w/v)SDS液体（1L）

|               |      |
|---------------|------|
| # SDS         | 100g |
| # 灭菌水，调整体积至1L | 适量   |

**溶液 M**：剥离（Stripping）缓冲液（1L）

|          |       |
|----------|-------|
| # 溶液K    | 125mL |
| # 溶液L    | 200mL |
| # 2-巯基乙醇 | 7mL   |
| # 灭菌水    | 668mL |

- 1) 在装置中，转移蛋白的PVDF膜用 $\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag™ BTL和亲和素标记的HRP孵育后，用溶液C（1×TBS-T，25 mL/5 cm<sup>2</sup>）浸泡。  
膜温和震荡至少1小时，确保膜不会干。  
如果膜干了，在剥离（Stripping）处理前用甲醇浸泡。
- 2) 用溶液M（剥离缓冲液，25 mL/5 cm<sup>2</sup>）浸泡膜。  
膜在室温温和震荡20分钟。不需要加热。  
确定膜不会和装置粘在一起。
- 3) 膜用溶液C（1×TBS-T，25 mL/5 cm<sup>2</sup>）浸泡。  
膜在室温温和震荡1小时。  
确定膜不会和装置粘在一起。去除洗涤溶液。
- 4) 用溶液C（1×TBS-T，25 mL/5 cm<sup>2</sup>）浸泡膜。  
膜温和震荡至少1小时。  
确定膜不会和装置粘在一起。去除洗涤溶液。
- 5) 用溶液C（1×TBS-T，25 mL/5 cm<sup>2</sup>）浸泡膜。  
膜室温温和震荡1小时。  
确定膜不会和装置粘在一起。去除洗涤溶液。  
确定膜不会干。
- 6) 用合适的蛋白进行封闭，接着用抗体进行检测。之后进行化学发光检测。

## 10. 用Phos-tag™ BTL-104进行斑点杂交分析

样品

# 非磷酸化蛋白：

牛血清白蛋白，人血清，碳酸酐酶，β-半乳糖苷酶

# 磷酸化蛋白：

α-酪蛋白，β-酪蛋白，卵白蛋白，胃蛋白酶

# 去磷酸化蛋白（用碱性磷酸酶处理）

α-酪蛋白，β-酪蛋白，卵白蛋白，胃蛋白酶

膜

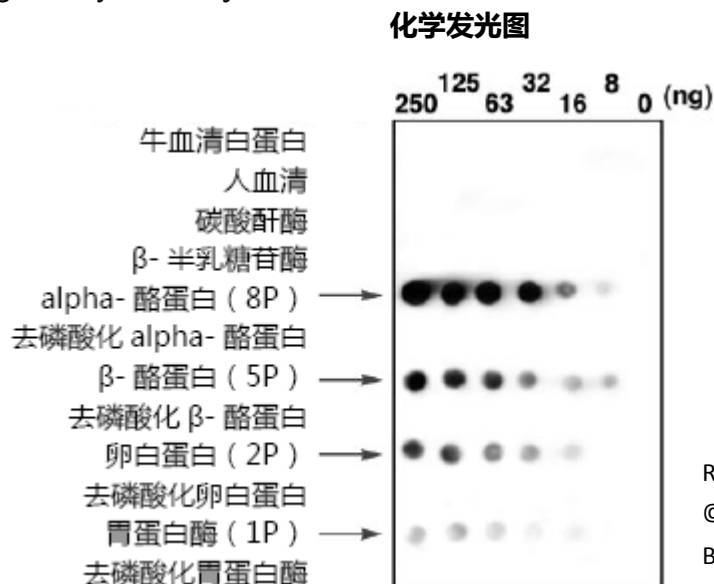
# PVDF膜 ( Hybond P, GE Healthcare Bio-Sciences )

化学发光检测试剂盒

# ECL™-plus western blotting detection reagent ( GE Healthcare Bio-Sciences )

仪器

# LAS 3000 Image Analyzer ( Fujifilm )



Reprinted with permission.

© 2006 The American Society for  
Biochemistry and Molecular Biology.

PVDF膜上的蛋白可以特异性检测到，可检测到ng级别。相应的去磷酸化蛋白和非磷酸化蛋白未检测到信号。

## 11. 用Phos-tag™ BTL-104 进行免疫印迹二维 ( 2D ) ( IEE/SDS-PAGE ) 实验

蛋白样品 ( 每份50μg )

# EGF刺激前的A431细胞 ( 人表皮癌细胞 ) 裂解液

# EGF刺激后的A431细胞 ( 人表皮癌细胞 ) 裂解液

膜

#PVDF膜( Hybond P, GE Healthcare Bio-Sciences ) EGF 刺激前

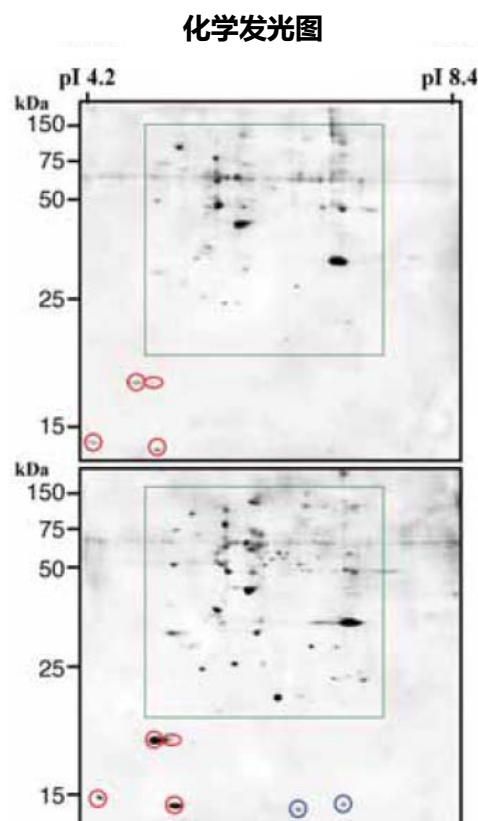
化学发光检测试剂盒

# ECL™-plus western blotting detection reagent  
( GE Healthcare Bio-Sciences )

仪器

# LAS 3000 Image Analyzer ( Fujifilm )

EGF 刺激后



比较膜上的信号强度 ( 比如红圈，MW<20 kDa )  
和信号点的数量 ( 比如蓝圈，MW<20 kDa )，我们得  
知EGF刺激后的信号更强，信号点也更多。

## 12. 用Phos-tag™ BTL-104 进行免疫印迹二维 ( 2D ) ( IEE/SDS-PAGE ) 实验

样品

# 上述实验提到的A431细胞经过EGF刺激后进行免疫印迹的膜 ( 剥离后 )

抗体和HRP标价的抗体

# HRP-anti-pTyr antibody ( PY20, GE Healthcare Bio-Sciences )

# anti-pSer antibody ( Rabbit-Polyclonal, Zymed Laboratories )

# HRP-anti-IgG antibody ( GE Healthcare Bio-Sciences )

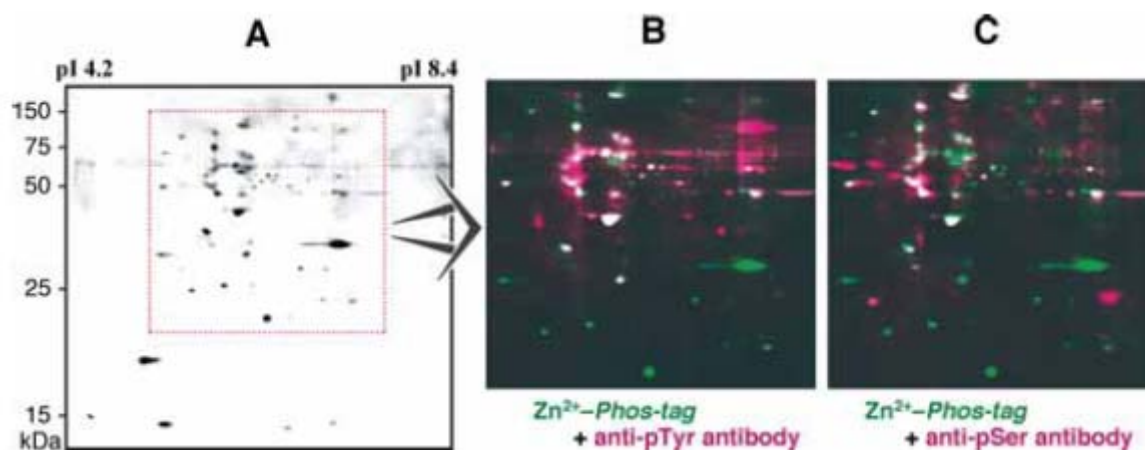
化学发光检测试剂盒

# ECL™-plus western blotting detection reagent ( GE Healthcare Bio-Sciences )

仪器

# LAS 3000 Image Analyzer ( Fujifilm )

化学发光图像 ( A ) 和叠加图像 ( B & C )



A : 利用Phos-tag™ BTL-104 进行化学发光

B : A 图与HRP-anti-pTyr antibody 进行化学发光的叠加图片

C : A 图与anti-pSer antibody/HRP-anti-IgG antibody 进行化学发光的叠加图片

B 图和C 图中绿色的点是使用Phos-tag™ BTL-104 , 红色的点是使用抗体 , 绿色和红色重叠的部分呈现白色。

Reprinted with permission.

© 2006 The American Society for  
Biochemistry and Molecular Biology.

## 13. Phos-tag™ BTL-111 和 Phos-tag™ BTL-104的比较

样品

# 磷酸化蛋白

β-酪蛋白, 卵白蛋白, 胃蛋白酶

# 去磷酸化蛋白 ( 用碱性磷酸酶 ( AP ) 处理 )

β-酪蛋白, 卵白蛋白, 胃蛋白酶

膜

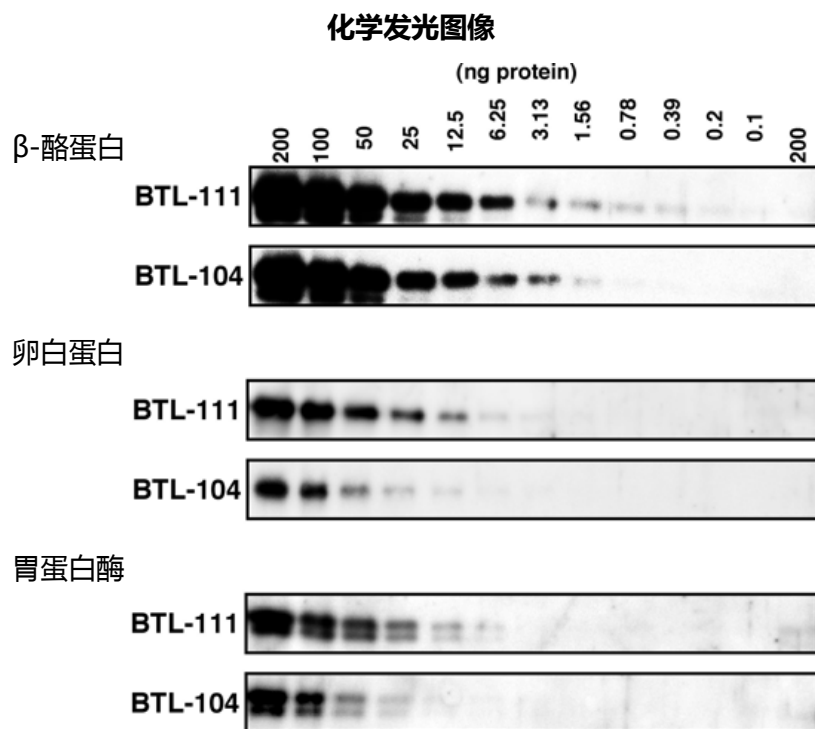
#PVDF膜 ( Hybond P, GE Healthcare Bio-Sciences )

化学发光试剂盒

# Lumigen™-TMA-6 , ( Lumigen )

仪器

# LAS 3000 Image Analyzer ( Fujifilm )



上面：β-酪蛋白 ( 200-0.1ng ) , 经过碱性磷酸酶 ( AP ) 处理12个小时的β-酪蛋白 ( 200ng , 最右边的那道 )  
中间商：卵白蛋白 ( 200-0.1ng ) , 经过碱性磷酸酶 ( AP ) 处理12个小时的卵白蛋白 ( 200ng , 最右边的那道 )  
下面：胃蛋白酶 ( 200-0.1ng ) , 经过碱性磷酸酶 ( AP ) 处理12个小时的胃蛋白酶 ( 200ng , 最右边的那道 )

结果显示Phos-tag与生物素之间的链接的长度影响免疫印迹实验中Phos-tag与磷酸化蛋白结合 ( 见 5. Phos-tag™ 方法 )

#### 14. 用Phos-tag™ BTL-111进行免疫印迹1维 ( SDS-PAGE ) 实验

蛋白样品 ( 每份5μg )

# A431细胞裂解液 ( 第2道 )

# 碱性磷酸酶处理的A431细胞裂解液 ( 第3道 )

# EGF刺激的A431细胞裂解液 ( 第4道 )

# 碱性磷酸酶处理的EGF刺激的A431细胞裂解液 ( 第5道 )

# 过钒酸钠刺激的A431细胞裂解液 ( 第6道 )

# 碱性磷酸酶处理的过钒酸钠刺激的A431细胞裂解液 ( 第7道 )

# HeLa细胞裂解液 ( 第8道 )

# 碱性磷酸酶处理的HeLa细胞裂解液 ( 第9道 )

# PMA刺激的HeLa细胞裂解液 ( 第10道 )

# 碱性磷酸酶处理的PMA刺激的HeLa细胞

膜

#PVDF膜 ( Hybond P, GE Healthcare Bio-Sciences )

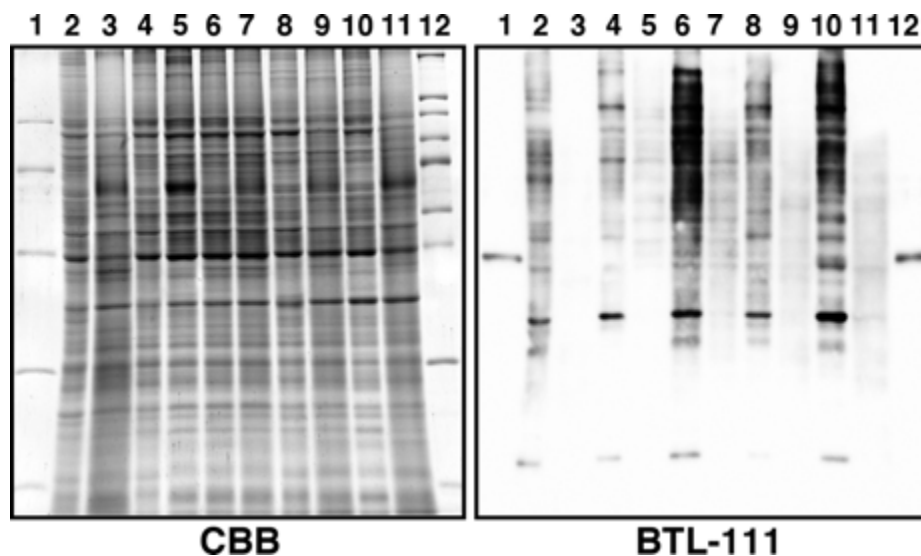
化学发光试剂盒

# Lumigen™-TMA-6 , ( Lumigen )

仪器

# LAS 3000 Image Analyzer (Fujifilm)

### 考马斯亮蓝 (CBB) 染色和化学发光图像



不同裂解液的10种样品 (第2~11道) 和两种蛋白分子marker (第1道和第12道)。第1道是APRO™ marker low orange (APRO Science), 第12道是Amersham marker broad range (GE Healthcare Bio-Sciences)。Phos-tag™ BTL-111可特异性检测转移蛋白的膜上的磷酸化蛋白。使用Phos-tag™ BTL-111分析裂解液, 无需进行膜封闭。

#### 《 问题1 》

在溶液 E (10μl) 中的Phos-tag™ BTL 比在溶液G (1μl) 中的亲和素标记的辣根过氧化物酶多很多。使用少量的Phos-tag™ BTL (比如1μl) 和溶液G (1μl) 也可以得到相同的结果。客户需要自己调整溶液E的用量获得高灵敏度或者减少成本。如果溶液E的用量减少, 不需要减少zinc(II)溶液 (溶液F) 的用量。在使用商业化提供的磷酸化蛋白和亲和素标记的辣根过氧化物酶 (GE Healthcare Bio-Sciences) 的实验中, BTL-104和BTL-105由于空间结构不一样导致检测效率有区别。

#### 《 问题2 》

如果膜没有完全在溶液C中浸泡, 那背景值会比较高, 并且有斑点。而且无法观察到蛋白信号 (比如右边图中的白色斑点)。确认膜完全浸泡在溶液C中。



#### 《 问题3 》

建议使用PVDF膜

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

全国代理



宝柏·中国

www.boppard.cn

info@boppard.cn

北京 Tel: 86 10 85804838

上海 Tel: 86 21 62884751

广州 Tel: 86 20 87326381

香港 Tel: 852 27999019