

富士胶片 and 光 Phos-tag™ SDS-PAGE 实验指导手册

第6版 2020年1月



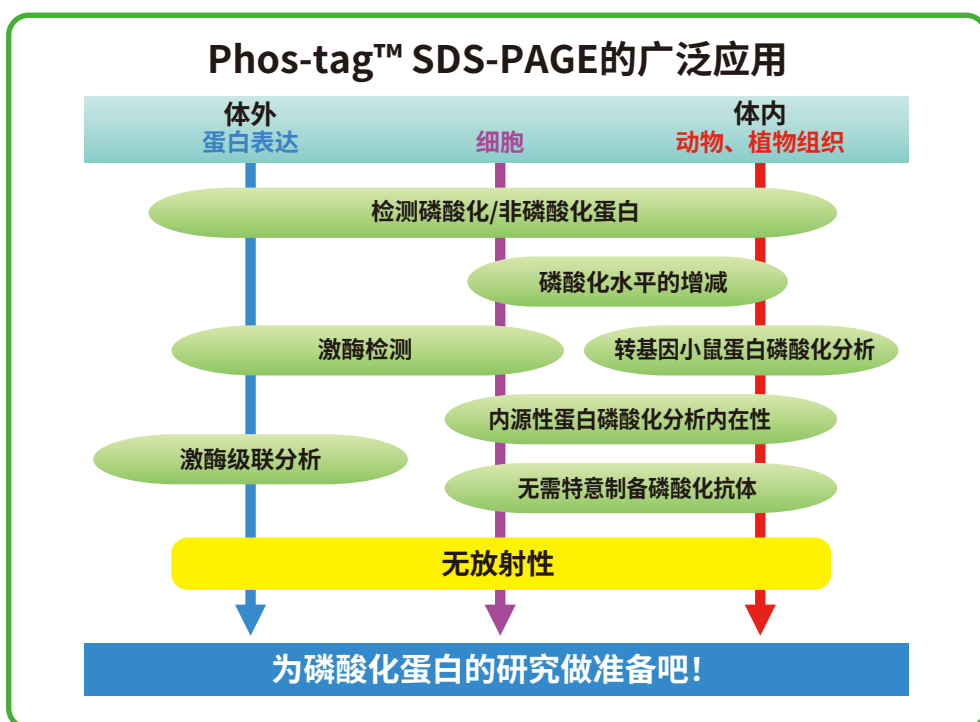
改良型 Phos-tag™ SDS-PAGE 实验流程

Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE (p.6、p.10-12)

<https://labchem-wako.fujifilm.com>

目 录

1. Phos-tag™ 简介	P.3
2. Phos-tag™ SDS-PAGE	P.4
3. 实验流程	P.6
4. 疑难问题	P.13
5. Phos-tag™ SDS-PAGE 条件优化	P.16
6. 应用与参考文献	P.17
7. Q & A	P.21
8. SuperSep™ Phos-tag™ 预制胶	P.25
9. 其他 Phos-tag™ 系列产品	P.26
10. 相关产品	P.28

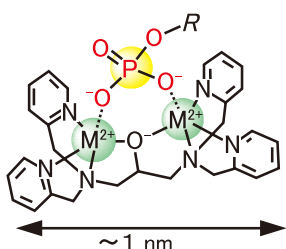


1. Phos-tag™ 简介

■ Phos-tag™

Phos-tag™ 是一种能与磷酸分子特异性结合的功能分子，可与与碱性磷酸活性中心为模型合成的丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸，还有天冬氨酸/赖氨酸/组氨酸等结合。可用于磷酸化蛋白的分离（Phos-tag™ 预制胶）、检测（Phos-tag™ Biotin）、质谱分析（Phos-tag™ Mass Analytical Kit）、纯化（Phos-tag™ Agarose）。

【Phos-tag™ 的基本结构】



2个金属离子捕获磷酸基团

M²⁺: 锌离子或锰离子

◆ 与-2价磷酸根离子的亲和性和选择性高于其他阴离子

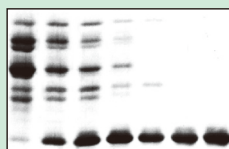
◆ 在pH5-8的生理环境下生成稳定的复合物

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。
http://www.phos-tag.com/

分离

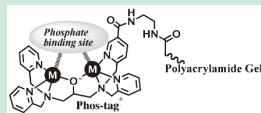
SDS-PAGE进行分离

只需在SDS-PAGE配胶过程中加入即可
Phos-tag™ Acrylamide



磷酸化 β -casein

非磷酸化 β -casein



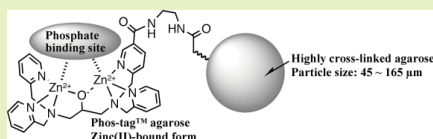
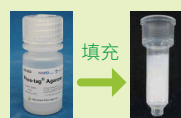
含Phos-tag™ 预制胶
SuperSep™ Phos-tag™



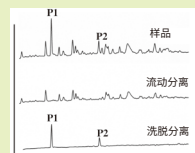
纯化

凝胶纯化

实验操作在生理环境下进行 (pH 7.5)
Phos-tag™ Agarose



即用型磷酸化多肽纯化枪头
Phos-tag™ Tip

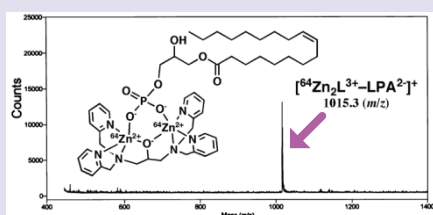


MS

MALDI-TOF/MS 分析

高灵敏度的检测磷酸化分子

Phos-tag™ Analytical Kit

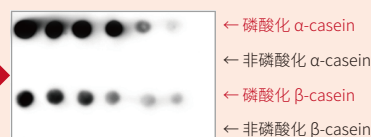
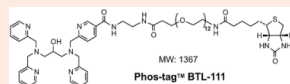


检测

化学发光检测

检测PVDF膜上所有磷酸化蛋白

Phos-tag™ Biotin



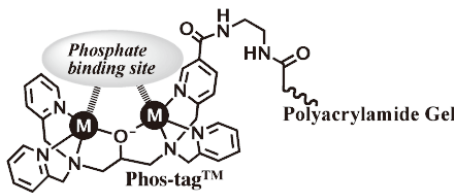
2. Phos-tag™ SDS-PAGE

Phos-tag™ SDS-PAGE简介

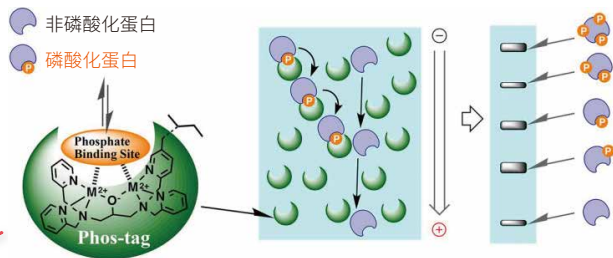
Phos-tag™ SDS-PAGE通过电泳，根据磷酸化水平不同可分离磷酸化和非磷酸化蛋白。分离后凝胶可用于染色、Western blotting和质谱分析（MS）等后续实验。Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶，只需在配胶过程中加入Phos-tag分子与Acrylamide结合而成的Phos-tag™ Acrylamide和二价金属（MnCl₂或ZnCl₂）即可进行实验。

Phos-tag™ SDS-PAGE 原理

【Phos-tag™ Acrylamide的结构】



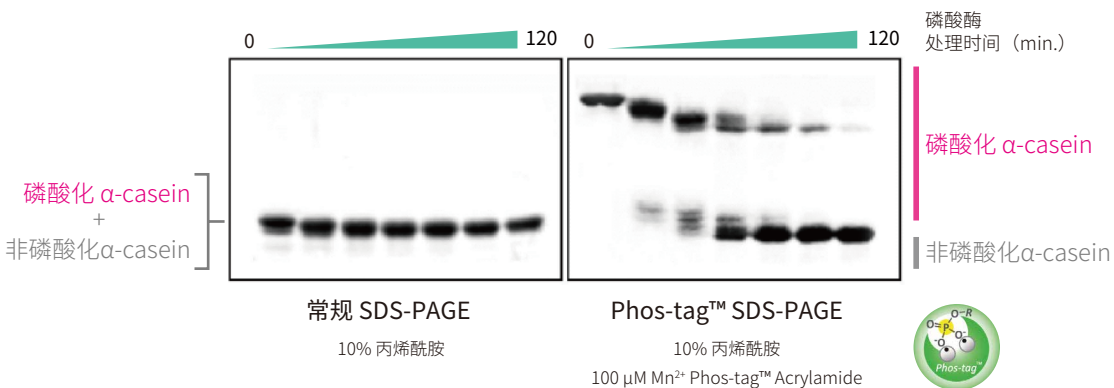
不同数目及位点
磷酸化修饰的蛋白亚型也可
被分离开来



- 1、电泳中的磷酸化蛋白捕获2个二价金属离子
- 2、磷酸化水平越高电泳速度越慢
- 3、根据磷酸化水平进行分离
(即使磷酸化水平相同，不同的磷酸化位点也可分离)

Phos-tag™ SDS-PAGE 应用案例 ~α-casein 随时间变化的去磷酸化反应~

α-casein经过碱性磷酸酶处理，将去磷酸化处理的样品通过Phos-tag™ SDS-PAGE或常规SDS-PAGE检测其随时间的变化（温育时间：0-120 min）。



产品编号	厂商编号	产品名称	包装	保存	备注
304-93526	AAL-107S1	Phos-tag™ Acrylamide 5 mM 水溶液	0.3 mL (相当于0.9 mg)	冷藏	即用型
300-93523	AAL-107M	Phos-tag™ Acrylamide	2 mg		用甲醇、水配制
304-93521	AAL-107		10 mg		



■ Phos-tag™ SDS-PAGE的特点

◆ 产品应用与氨基酸残基的种类和位置无关

- 可用于未知磷酸化蛋白的磷酸化分析
- 可用于检测新的磷酸化位点

◆ 磷酸化位点具有不同数目和位置的磷酸化形式也可以分离

- 可以确定磷酸化水平，以及磷酸化形式的数量

◆ 同时检测磷酸化和非磷酸化蛋白

- 可以定量多种磷酸化形式
- 轻松判断有无磷酸化现象发生

◆ 无放射性和特殊仪器需求（有SDS-PAGE相关试剂和设备即可）

- 实验简便且低成本

◆ 电泳后可进行WB，MS以及二维电泳分析。

- WB：结合内参进行蛋白分析（相关应用数据：p.18③、④、p.19⑤、⑥）
- MS：确定不同磷酸化形式的磷酸化位点组合（相关应用数据：p.17①、②）
- 二维凝胶电泳：具有相等等电点或分子量的磷酸化形式也可以进行分离（相关应用数据：p.17②）

Phos-tag™ SDS-PAGE的WB 实例

样品：大鼠脑提取液

检验：抗 p35 抗体

条带1：孵育前的大鼠脑提取液

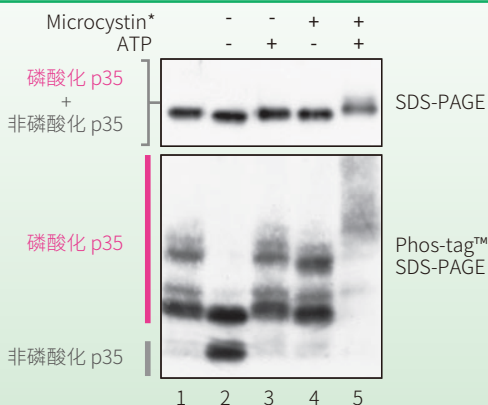
条带2-5：用MC或ATP孵育（+），未孵育（-）

*Microcystin：微囊藻毒素（一种磷酸酶抑制剂）

【数据提供】

理化学研究所 脑科学综合研究中心 细川智永 老师

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.



■ Phos-tag™ SDS-PAGE分析应用

相关产品请参考p.28-31

目 的	样品种类	应用实例	相关产品	应用数据
特定磷酸化部位	裂解液	丙氨酸突变体+WB	ImmunoStar® series	p.18 ④
	纯化蛋白	重组蛋白+MS 免疫沉淀+MS	Silver Stain MS Kit nanoLC-MS/MS	p.17 ①、②
同时检测和定量多种磷酸化形式	裂解液	WB	ImmunoStar® series	p.18 ④、p.19 ⑤、⑥
	纯化蛋白	CBB染色，银染等	QUICK CBB PLUS Silver Stain MS Kit等	p.17 ①、②
磷酸化与否	裂解液	WB	ImmunoStar® series	p.18 ③、p.19 ⑤、⑥
进一步分离	免疫沉淀样品	双向电泳	QUICK CBB PLUS Silver Stain MS Kit等	p.17 ②
寻找目标蛋白的激酶或抑制剂	裂解液	柱层析+WB	ImmunoStar® series	p.18 ③
	纯化蛋白	重组激酶+ CBB染色，银染等	-	p.17 ①

■ 与普通SDS-PAGE的不同点·注意事项

Phos-tag™ SDS-PAGE 与普通SDS-PAGE的不同点和注意事项。

◆ 需要进行样品前处理

Phos-tag™ SDS-PAGE 容易受到EDTA等影响, 强烈建议对样品进行前处理 (TCA沉淀等)。

→详细请见P13

◆ 电泳速度变慢

Phos-tag™ SDS-PAGE与普通SDS-PAGE相比, 非磷酸化蛋白的电泳速度也比普通电泳慢。

→详细请见P16

◆ 无法通过分子量marker推断分子量

Phos-tag™ SDS-PAGE无法从marker推断分子量。marker只能用作转膜效率的基准。

→详细请见P21

使用市售预染marker也会导致条带弯曲。建议使用重组或去磷酸化蛋白作为marker。

→详细请见P13

◆ 转膜需要EDTA处理

Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶进行WB时, 为了提高转膜效率, 在转膜前凝胶需要用EDTA处理。

→详细请见P12

◆ 普通SDS-PAGE也同时进行

进行Phos-tag™ SDS-PAGE时, 普通SDS-PAGE作为对照组也同步进行, 用于判断目的蛋白是发生磷酸化还是降解的条带。

3. 实验流程

■ 两种Phos-tag™ SDS-PAGE

Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶根据Phos-tag™ 分子与二价金属离子结合的种类, 分成以下两种, 配制凝胶所用缓冲液成分也有所不同, 各具特点, 请根据实验目的选择。各使用例请看P17-19“6.应用与参考文献”。

[I] Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE 凝胶 (以Laemmli法为基础)

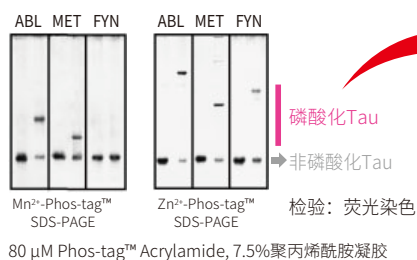
→ P17-19
②③④⑤

NEW!

[II] Zn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE 凝胶 (使用中性buffer)

→ P17 ①

凝胶种类	优点	缺点
Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE	- 与Laemmli法几乎相同 - 高浓度Phos-tag™也可进行半干式转膜	- 分离蛋白种类有限制 - 凝胶需现配
Zn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE	- 分离能力高 - 可分离的蛋白和磷酸化形式多 - 凝胶可长期保存	- 高浓度Phos-tag™半干式转膜效率差 - 不足5%的低浓度凝胶条带拖尾



Zn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE

- 分离性能提高 (ABL, MET)
- Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE无法分离的条带也能分离 (FYN)

【样品】

左侧泳道: 非磷酸化Tau

右侧泳道: 磷酸化Tau (ABL, MET, FYN引起的磷酸化形式)

Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. E Kinoshita and E Kinoshita-Kikuta. *Proteomics*, Jan 2011;11(2):319-23.

Phos-tag™ SDS-PAGE的实验流程

[I] Mn²⁺ Phos-tag™ SDS-PAGE ※凝胶请现配

①试剂准备

丙烯酰胺溶液

分离胶
Tris-HCl缓冲液
pH 8.8

浓缩胶
Tris-HCl缓冲液
pH 6.8

SDS 溶液

Phos-tag™ 丙烯酰胺
溶液，同时提供即用
型溶液（见P4，产品
编号：304-93526）

也可只用蒸馏水溶
解，但溶解缓慢，
用时较长。40℃加
热、使用超声可更
好溶解。

：此图标表示为即用型试剂。请参考“10. 相关产品”。

Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液 (30% T, 3.3% C)

丙烯酰胺 29.0 g
N,N'- 亚甲基双丙烯酰胺 1.0 g
→加入蒸馏水至100 mL，过滤。

【保存条件】4℃，避光

产品编号：015-25635
30w/v% 丙烯酰胺溶液
29:1 (500 mL)



Sol. B: 1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.8 (4×分离胶缓冲液)

Tris碱
(MW:121,pKa=8.2 at 20°C)..... 18.2 g
6.0 mol/L HCl
(0.19 等量 Tris) 4.85 mL

→加蒸馏水至100 mL，过滤。

【保存条件】4℃

产品编号：192-11041
分离胶缓冲液 (×4)
(250 mL)
※含SDS



Sol. C: 0.50 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH6.8 (4×浓缩胶缓冲液)

Tris碱 6.06 g
6.0 mol/L HCl
(0.96 等量 Tris 碱) 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 (×4)
(250 mL)
※含SDS



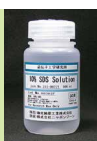
Sol. D: 10% (w/v) SDS溶液

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)



Sol. E: 5.0 mmol/L Phos-tag™ 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™ Acrylamide (MW: 594.7)..... 10 mg (2 mg)
甲醇 0.10 mL (0.02 mL)
蒸馏水 3.2 mL (0.64 mL)

本产品Phos-tag™ Acrylamide用0.1 mL甲醇完全溶解



该溶液需加入3.2 mL 蒸馏水稀释。

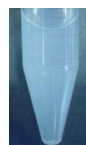
注) 加蒸馏水后呈乳浊状态 (如右图)，静置变透明再使用。如果溶液中出现微量白色粉末状 (杂质) 不溶物，使用2 mL离心管离心 (2000×g, 10 min)去除即可。

【保存条件】铝箔包裹后避光保存于4℃

NARD Institute, Ltd.



Phos-tag™ Acrylamide



刚混合后

MnCl₂溶液

Sol. F: 10 mmol/L MnCl₂溶液

MnCl₂·4H₂O (MW: 198) 0.10 g

蒸馏水 50 mL

注) 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。与此同时, Mn²⁺的功能也会被破坏。

APS溶液



Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液 (APS溶液)

※ 现配现用

(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)
即用型, 无需预先配制



电泳缓冲液



Sol. H: 电泳缓冲液, pH 8.3 (10×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, 无需加酸、碱调节pH。

【保存】4°C

使用前, 取450 mL 蒸馏水+50 mL Sol. H混匀即可。

产品编号: 184-01291
电泳缓冲液 (×10) (1 L)



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



上样缓冲液



Sol. I: 上样缓冲液 (3×溶液)

溴酚蓝 (BPB) 1.5 mg

SDS 0.60 g

甘油 3.0 mL

Sol. C: 0.5 mol/L Tris-HCl溶液,
pH 6.8 3.9 mL

2-巯基乙醇 1.5 mL

→加蒸馏水至 10 mL。

【保存】-20°C

【使用方法】参考④样品准备

产品编号: 196-11022
上样缓冲液 (2ME+) (×2)
(25 mL)



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: CBB 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: 174-00553
Quick CBB PLUS (250 mL)
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 分离胶配制

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, 也可以采用常规实验浓度。

分离胶溶液

配制10 mL浓度为12% (w/v) 聚丙烯酰胺, 50 $\mu\text{mol/L}$ Phos-tag™ Acrylamide的凝胶

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™ 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 (N,N-四甲基乙二胺)	10 μL *2)
蒸馏水	3.14 mL
<搅拌2 min, 去除空气>	
Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	20-50 μL *2)

注意

Sol.E (Phos-tag™ 溶液) 与Sol.A (丙烯酰胺溶液) 的添加量, 需探讨条件。
参考条件请看P30 “【参考】配制10 mL不同浓度分离胶的溶液组成”。
根据目的蛋白优化Phos-tag™ Acrylamide 浓度与丙烯酰胺溶液浓度。
详情请看P16 “5.Phos-tag™ SDS-PAGE条件优化”。

③ 浓缩胶配制

浓缩胶溶液

配制10 mL浓度4.5%聚丙烯酰胺凝胶

※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	10 μL (2 μL) *2)
蒸馏水	5.84 mL (1.17 mL)
<搅拌2 min, 去除空气>	
Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	20~50 μL (4-10 μL) *2)

※ 分离/浓缩胶不是一定需要加入SDS。含有SDS的凝胶, 蛋白质条带更宽, 可能有拖尾。

<分离200-350 kDa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。

②'含琼脂糖低浓度分离胶配制

分离胶溶液

(制备10 mL含0.5%琼脂糖的20 $\mu\text{mol/L}$ Phos-tag™ Acrylamide, 3.0%聚丙烯酰胺凝胶)

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™ 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	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)

*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。



在变硬之前直接把琼脂糖倒入制胶容器。

Agarose H (高强度型)

产品编号: 315-01203 (1 g)

产品编号: 319-01201 (10 g)

产品编号: 317-01202 (25 g)



③ 配制加入琼脂糖的低浓度浓缩胶

*2)*3)*4)

→参照前一页

浓缩胶

(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)

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 μL)
TEMED	10 μL (2 μL) ^{*2)}
蒸馏水	3.01 mL (602 μL)
1.5% (w/v) Agarose ^{*3)} *4)	3.33 mL (666 μL)
Sol.G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液	50 μL (10 μL) ^{*2)}



在变硬之前直接把琼脂糖倒进凝胶容器。

④ 样品制备

- 1) 将样品与3 μL Sol. I在离心管中混合, 加蒸馏水至9 μL。
 - 2) 95°C加热5 min后, 溶液冷却至室温。
 - 3) 用微量移液枪上样 (如: 1.5 μL/孔)。
- ※ β-casein上样量为5-10 μg/孔, 即可得到清晰条带。

强烈建议使用
TCA沉淀, 透析
处理等去除杂
质。结合参考
“4.疑难问题”

⑤ 电泳

关于分子量marker,
请参考“4.疑难问题”
或“7.Q&A”

- 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 (25-30 mA/gel), 直到BPB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分析时, 电泳后的步骤请参考P12。

⑥ CBB染色与脱色

可银染或荧光染色。

- 1) 将凝胶浸泡在Sol. J (50 mL) 中10 min, 轻轻摇动, 固定蛋白。
- 2) 将凝胶浸泡在CBB染色液中 (50 mL Sol. K) 2 h, 轻轻摇动。
- 3) 用脱色液 (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] Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE

※凝胶配制3个月仍可使用

NEW!

Mn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE适用于一般的Laemmli SDS-PAGE法, 操作简便, 但也有部分蛋白质无法分离磷酸化/非磷酸化蛋白。对此, 使用中性Bis-Tris凝胶的SDS-PAGE系的Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE, 能在中性pH进行电泳, 表现更高的磷酸基团结合功能, 分离效果更好。

① 试剂准备

丙烯酰胺溶液

SDS溶液

Phos-tag™

聚丙烯酰胺溶液

APS溶液

氯化锌溶液

也可使用

10 mmol/L Zn (NO₃)₂



: 此图示为即用型试剂。相关产品信息参考“10.相关产品”。



Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液 (30% T, 3.3 C)



Sol. D: 10% (w/v) SDS溶液



Sol. E: 5.0 mmol/L Phos-tag™ 溶液含3% (v/v) 甲醇



Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液 (APS溶液)

Sol. M: 10 mmol/L ZnCl₂ 溶液

※现配现用

ZnCl₂ (MW: 136, 纯度 98%以上) 0.70 g

蒸馏水 500 mL

注) ZnCl₂具有潮解性, 请使用新品。溶液中如有ZnO等杂质, 过滤后使用。

参考[I] Mn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE



Bis-Tris-HCl溶液	Sol. N: 1.4 mol/L Bis-Tris-HCl溶液, pH 6.8 (4×分离胶溶液)	
	Bis-Tris 碱 (MW:209, pKa=6.5 at 20°C) 29.9 g	
	6.0 mol/L HCl (0.42等量Bis-Tris) 10 mL	
	加蒸馏水至100 mL	【保存条件】4°C避光保存
亚硫酸氢钠溶液	Sol. O: 0.5 mol/L 亚硫酸氢钠溶液	
	NaHSO ₃ (MW:104) 5.2 g	
	加蒸馏水至100 mL	【保存条件】4°C避光保存
电泳缓冲液	Sol. P: 电泳缓冲液, pH 7.8 (5×溶液)	
	Tris 碱 (MW: 121, pKa=8.2 at 20°C, 0.50 mol/L) 30.3 g	
	MOPS (MW: 209, pKa=7.2 at 20°C, 0.50 mol/L) 52.3 g	
	Sol. D: 10% w/v SDS 溶液 (0.5% (w/v)) 25 mL	
	加蒸馏水至500 mL。不调节pH。	【保存条件】4°C避光保存
	电泳缓冲液 ※现用现配	
	Sol.P: 电泳缓冲液, pH 7.8 (5×溶液) 100 mL	
	Sol.O: 0.5 mol/L 亚硫酸氢钠溶液 5 mL	
	加蒸馏水至500 mL。	
	分离胶溶液	
	(例如配制10 mL 12%丙烯酰胺、50 μmol/L Phos-tag™ Acrylamide, 100 μmol/L ZnCl ₂ 凝胶)	
	Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液 4.00 mL	
	Sol. N: 1.4 mol/L Bis-Tris-HCl 溶液, pH 6.8 2.50 mL	
	Sol. E: 5.0 mmol/L Phos-tag™ 溶液 0.10 mL	
	Sol. M: 10 mmol/L ZnCl ₂ 溶液 0.10 mL ^{*1)}	
	TEMED 10 μL ^{*2)}	
	蒸馏水 3.24 mL	
	<搅拌2 min, 去除空气>	
	Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液 50 μL ^{*2)}	
^{*1)} ZnCl ₂ 添加量是Phos-tag™ Acrylamide的2倍 (摩尔比)	注 意 Sol.E (Phos-tag™ Acrylamide溶液) 与Sol.A (丙烯酰胺溶液) 的添加量, 需探讨条件。根据目的蛋白优化Phos-tag™ Acrylamide浓度与丙烯酰胺浓度。详细请看P16 “5.Phos-tag™ SDS-PAGE条件优化”。	
^{*2)} TEMED 与Sol.G使用普通浓度。此处添加量为同一个例子。		

浓缩胶

10 mL (2 mL) 4.5%聚丙烯酰胺凝	※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. N: 1.4 mol/L Bis-Tris-HCl 溶液, pH 6.8..... 2.50 mL (0.50 mL)	
TEMED 10 μL (2 μL) ^{*2)}	
蒸馏水 5.94 mL (1.19 mL)	
<搅拌2 min, 去除空气>	
Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液..... 50 μL (10 μL) ^{*2)}	

“样品配制”, “电泳”, “CBB染色与脱色”请参考[1]Mn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE。部分蛋白质可能引起条带弯曲等异常条带的产生。这是由于蛋白质的金属配体(硫醇基、咪唑基、羧基等)的影响, 导致Zn²⁺从Phos-tag™分子解离。在样品缓冲液加入1 mM左右的ZnCl₂, 条带弯曲得到改善, 分离能力上升。

<分离200 kDa 以上高分子磷酸化蛋白质>

通常[II]Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE分离/浓缩胶使用Bis-Tris。Bis-Tris与TEMED构造相似,可作为自由基淬灭剂使用。因此低浓度聚丙烯酰胺凝胶(低于5%)失去分离效果,条带弥散。在3%或4%的低浓度聚丙烯酰胺进行Zn²⁺-Phos-tag™ SDS PAGE时,用以下Tris-AcOH代替Bit-Tris配制凝胶(结合参考[I]-③含低浓度琼脂糖凝胶配制)。推荐200 kDa以上的高分子蛋白质使用。

组 成	Tris-AcOH 凝胶	Bis-Tris 凝胶
电泳缓冲液	• 50 mM Tris • 50 mM Tricine • 0.1%(w/v) SDS • 5.0 mM亚硫酸氢钠	• 100 mM Tris • 100 mM MOPS • 0.1%(w/v) SDS • 5.0 mM亚硫酸氢钠
浓缩/分离胶缓冲液	• 200 mM Tris-AcOH (pH7.0)	• 357 mM Bis-Tris-HCl (pH 6.8)
上样缓冲液	• 普通Laemmli体系	• 普通Laemmli体系
凝胶浓度	• 3-4%聚丙烯酰胺+0.5%琼脂糖	• ≥ 5% 聚丙烯酰胺

■ Phos-tag™ SDS-PAGE 后续分析

◆ Western blotting

重要

Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶进行转膜时,磷酸化蛋白的转膜效率显著低下。为了提高转膜效率,需使用EDTA去除Mn²⁺/Zn²⁺。根据转膜装置的种类选择下述操作。也可参考P14。

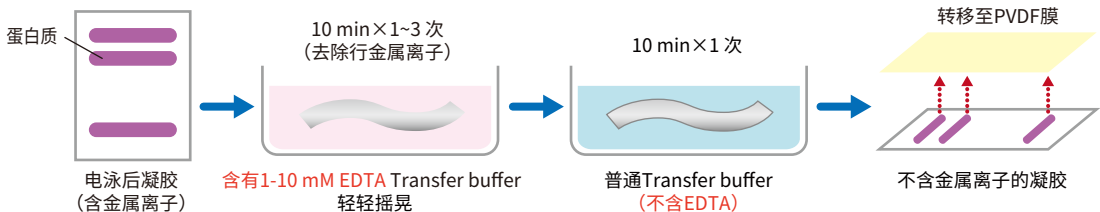
① 采用半干法

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10 min (重复1-3次)。

※ 这里只是简单举例了EDTA浓度,处理时间,更换含有EDTA缓冲液的次数,必要时根据情况优化实验条件。

※ 根据凝胶的厚度确定含EDTA缓冲液的处理时间和更换次数,如1.5 mm厚,20 min×2。

2、然后将凝胶浸泡在不含EDTA的Transfer Buffer中,轻轻摇晃10 min (一次)。



注意

若高浓度Zn²⁺-Phos-tag™ 凝胶(如100 μM Phos-tag™)即使经过EDTA处理,也不会得到较高的转膜效率,那么这种情况下请采用湿法转膜(tank式)。

② 采用tank(湿)法

使用含0.1% SDS的Transfer buffer。Tank法使用含有SDS的Transfer buffer,可省去EDTA处理。请注意蛋白质有可能从膜上脱离。SDS最适宜浓度为0.05-0.2%。

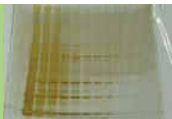
产品编号: 015-26213
AquaBlot™ 10×高效率转膜buffer (1 L)



◆ 定量分析

电泳后进行银染或CBB染色,按照普通胶内消化步骤操作。无需EDTA处理等特殊步骤。

产品编号: 299-58901
银染质谱试剂盒 (20 tests)



4. 疑难问题

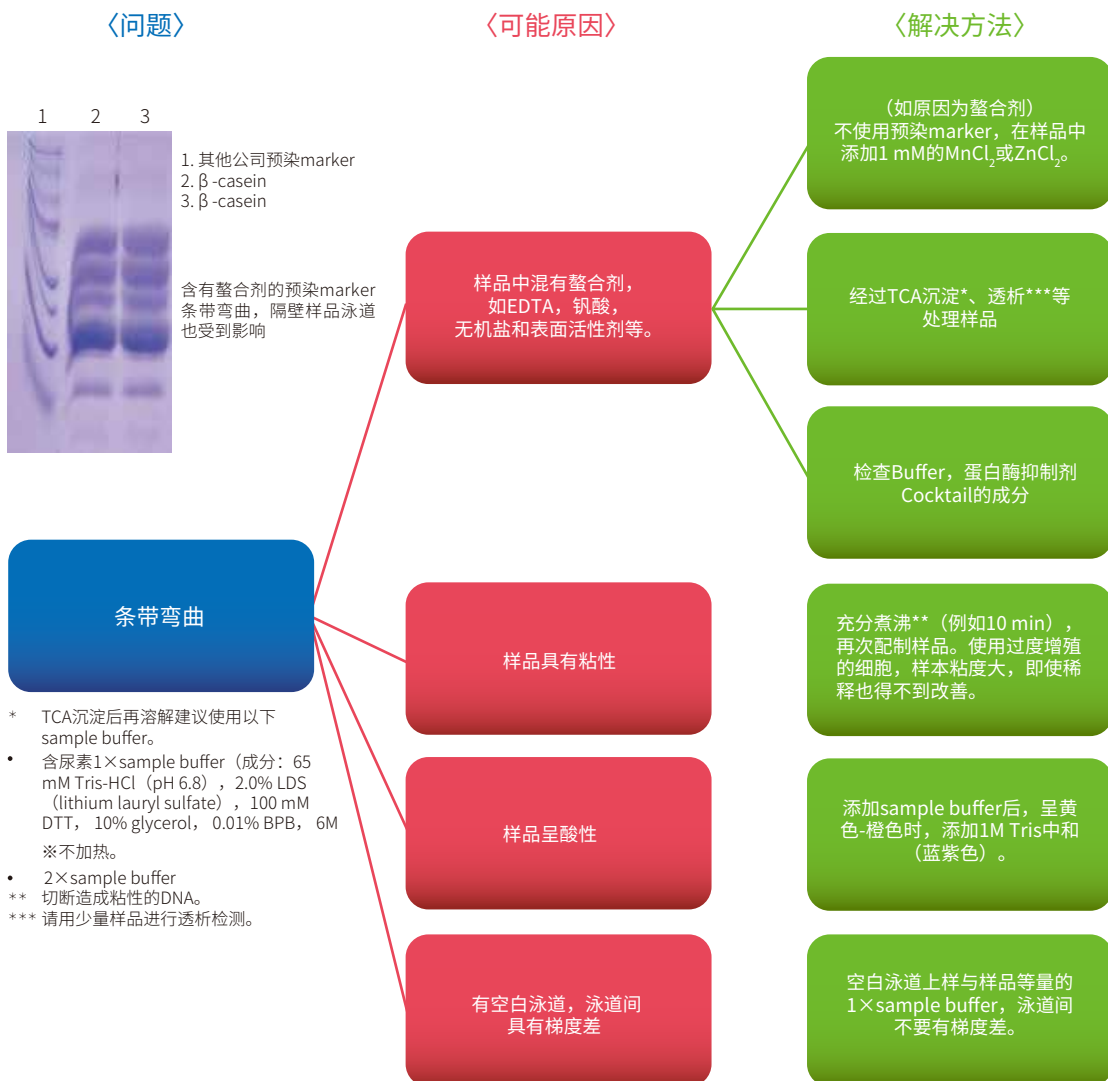
■ 开始-成功的关键是“样品的制备”

样品状态很大程度上影响着电泳结果。处理样品时注意以下事项。

- 含有实验干扰物质：避免使用EDTA等金属螯合剂；确保使用的商品化抑制剂和缓冲液等产品不含EDTA；同时也要去除培养基中所含EDTA成分。
- 样品状态：不要使用粘度高的样品，如过度生长细胞的裂解物（稀释也得不到改善）。
- 使用相同的样品缓冲液：上样的样品尽量保证使用相同成分的缓冲液。使用经磷酸酶处理的样品和markers时，请特别注意。除螯合剂和表面活性剂外， $MnCl_2$ 和 $ZnCl_2$ 的浓度也会产生一些影响。

如果制备样品时遇到麻烦，建议**重新准备样品**，并注意以下几点。

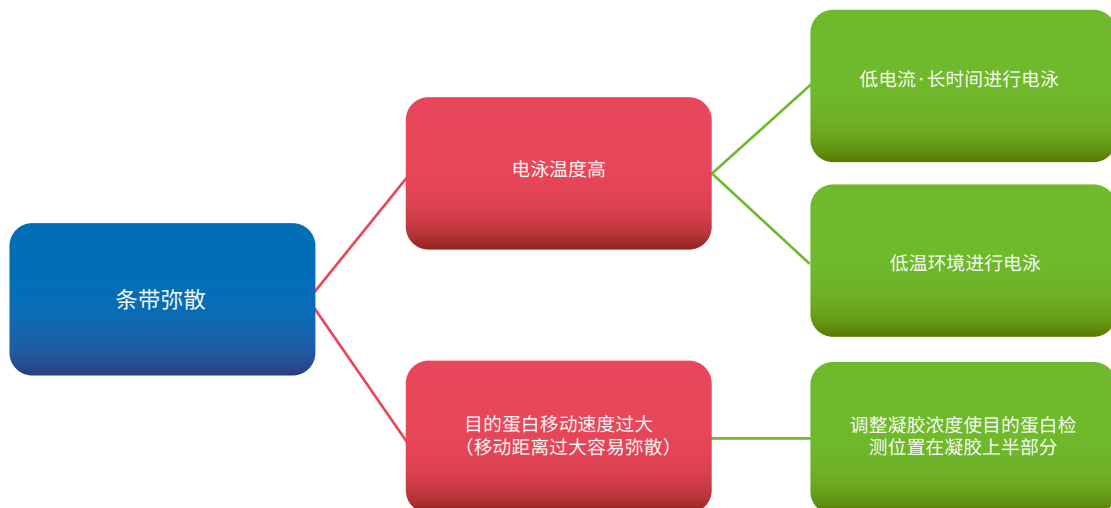
■ 常见疑难问题（原因与解决方法）



〈问题〉

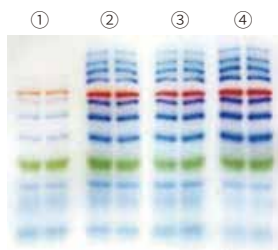
〈可能原因〉

〈解决方法〉



探讨以下方法
·增强电流 (例: 200 mA)。

半干式转膜后的膜



- ① 无EDTA处理
- ② 1 mM EDTA 10 min 两次
- ③ 10 mM EDTA 10 min 一次
- ④ 10 mM EDTA 10 min 两次

【样品】 WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III (产品编号: 230-02461等)

【凝胶】 SuperSep™ Phos-tag™ (50 $\mu M/L$), 12.5%, 13 well (产品编号: 196-16701)

* 不经过EDTA处理, 转膜效率显著下降。(①与②③④比较得出)。
建议使用1-10 mM EDTA洗膜两次, 每次10 min。
使用含EDTA缓冲液处理的时间和次数尤为重要。



〈问题〉

〈可能原因〉

〈解决方法〉

分离能力低

丙烯酰胺浓度、Phos-tag™
浓度不是最适宜浓度探讨最适宜浓度条件
(详情请参考P16“5. Phos-tag™
SDS-PAGE条件优化”)

探讨以下方法

- 增大凝胶中Phos-tag™ Acrylamide与金属离子(MnCl_2 或 ZnCl_2)的摩尔比。(例如1:4)。
- 使用Tris-Tricine缓冲液作为电泳缓冲液
- 使用 Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE的话,考虑改为 Zn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE。
- 重新配制相关试剂

产品编号: 200-17071
甘氨酸电泳缓冲液 (×10)
(1 L)



其他疑难问题

◆ 免疫沉淀样品无法获得磷酸化蛋白

使用单克隆抗体时,表位和磷酸化部位重叠,无法获取磷酸化蛋白。免疫沉淀纯化目的蛋白时,建议使用多克隆抗体。

◆ 样品状态异常

配制细胞裂解液时,使用PBS清洗细胞有可能对磷酸化状态产生影响。去除培养基后,直接加入TCA。

◆ 无法判断是凝胶还是样本的问题。

有作为阳性对照的磷酸化 α -casein与去磷酸化 α -casein的混合物(产品编号: 038-23221, α -casein, 牛乳源, 去磷酸化, 1 mg)。将本品作为样品,同时进行普通SDS-PAGE。

◆ Phos-tag™ Acrylamide 无法溶解

加入甲醇和水后, 40℃加热或超声水浴处理, 就能变得容易溶解。

◆ 不同泳道分离能力、电泳速度各不相同

Phos-tag™ 相关物质的浓度(EDTA、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等)会对样品产生相当大的影响。建议处理时,尽可能减小样品间浓度差

◆ 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降解和弥散。

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预冷,也可以在电泳槽周围缠绕冷却剂(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

请参考下列凝胶浓度探讨方法。

① 凝胶浓度大于5%:

提高N, N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺的比例(例如1:24)来增加凝胶的硬度。

② 凝胶浓度不足5%:

添加3-5%的琼脂糖增加凝胶的硬度。具体请参考“3.实验流程”的[1]-②'③', P12的“Tris-AcOH凝胶”。

◆ 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。

5. Phos-tag™ SDS-PAGE 条件优化

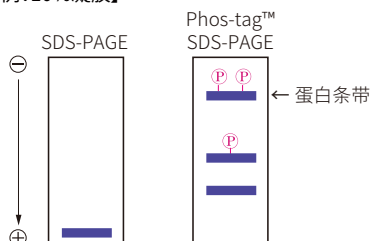
为了保证Phos-tag™ SDS-PAGE的分离效率,需要优化丙烯酰胺和Phos-tag™ Acrylamide的浓度。第一步要优化丙烯酰胺的浓度,其次是Phos-tag™ Acrylamide浓度。

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™ SDS-PAGE时蛋白迁移速度比常规SDS-PAGE慢(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。

※在凝胶电泳时,当上样缓冲液中的溴酚蓝染料到达分离胶底部时,此时可以将溴酚蓝染料的位置定义为Rf值为1.0。根据上述电泳条件,选择最适的丙烯酰胺浓度。在进行常规SDS-PAGE凝胶电泳时,当观察到目的蛋白的条带位于Rf值0.8-0.9之间,此时的丙烯酰胺浓度最适合进行Phos-tag™ SDS-PAGE。

【例:10%凝胶】



建议

> 60 kDa: 6%凝胶, < 60 kDa: 8%凝胶

< 在高分子量蛋白质 (>200 kDa) 的情况下 >

当凝胶中的丙烯酰胺量低于4%时,可添加琼脂糖以增加凝胶硬度。有文献报导能分离350 kDa的蛋白质。(参考“7. Q&A【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。例 5%丙烯酰胺 (24:1)。

② 优化Phos-tag™ Acrylamide的浓度

首先,从20 μ M的低浓度开始摸索电泳条件,逐渐提高Phos-tag™ Acrylamide的浓度到100 μ M,选择不同浓度对于磷酸化和非磷酸化蛋白的分离具有很大区别。其次,确定最佳的Phos-tag™ Acrylamide浓度。评估最适浓度按照由低到高的顺序进行。

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

【细胞裂解液】

如果样本中有多种蛋白,如细胞裂解液,Phos-tag™ 的浓度可以选择5-25 μ M。如果是非过表达的蛋白体系,目的蛋白的浓度很低,建议选择高浓度Phos-tag™,如100 μ M。

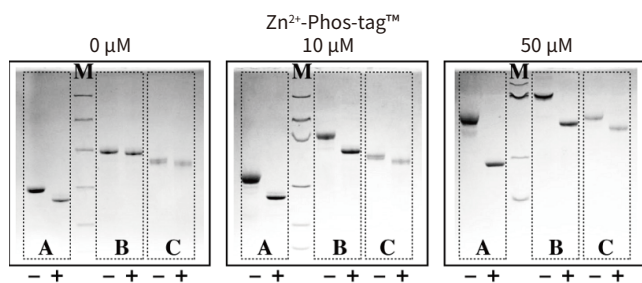
※ 根据蛋白情况优化实验条件,请根据实验目的蛋白选择最适的实验条件。

(数据提供: 香川大学 农学部 应用生物科学科 杉山康久)

Phos-tag™ 浓度与分离能力, 迁移距离的关系

通常情况下,浓度较高时分离能力更好(左图中比较了样品在50 μ M和100 μ M的Zn²⁺-Phos-tag™ 中的分离效果)。然而,过高的浓度会降低蛋白迁移速度。有时较低浓度的Phos-tag™ 反而具有更好的分离效果(右图比较了ovalbumin在50 μ M和150 μ M的Mn²⁺-Phos-tag™ 中的分离情况)。

【Phos-tag™ 浓度与分离能力】

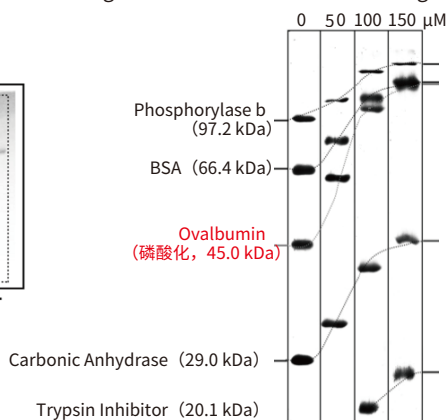


A: β -casein, B: Ovalbumin, C: Pepsin, M: Marker

+: 磷酸化蛋白 (A: 5P, B: 2P, C: 1P)

-: 去磷酸化蛋白 (碱性磷酸酶处理)

【Phos-tag™ 浓度与迁移距离】Mn²⁺-Phos-tag™



Phos-tag™ 浓度(高) $\rightarrow$ 分离能力(高)

Phos-tag™ 浓度(高) $\rightarrow$ 移动距离(低)



6. 应用与参考文献

实验数据

在此介绍使用过Phos-tag™ Acrylamide 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。

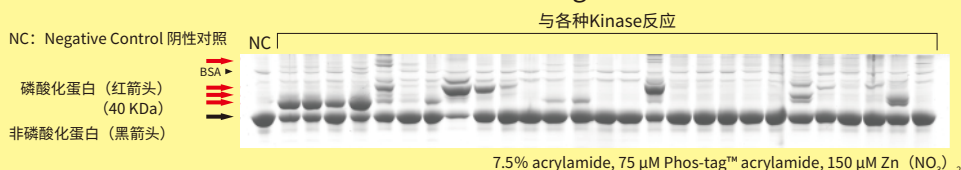
①Phos-tag™ SDS-PAGE的磷酸化/非磷酸化蛋白比较

我推荐使用Phos-tag™

——东京大学大学院医学研究科 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。此产品不但可以用于体外蛋白的定量分析，而且还可用于体内蛋白磷酸化状态的分析。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的分离比较



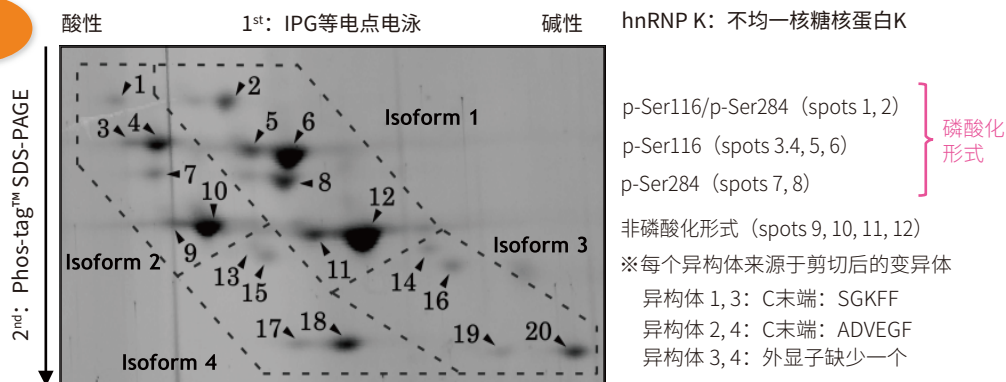
摸索约40 kDa的蛋白质的磷酸化激酶，经过激酶反应的样品用Phos-tag™ SDS-PAGE分离。与无磷酸化样品 (NC) 比较，其他样品因反应的激酶种类不同，磷酸化/非磷酸化蛋白的数量比、磷酸化程度、磷酸化蛋白丰度等不同，可从少量样品量获取更多信息。以此信息为基础，可利用质谱等进行更详细的数据分析，进而确定每种激酶作用的特定磷酸化位点。

(参考文献: Ogawa T, Hirokawa N. *Cell Rep.* 2015 Sep 22; 12 (11) : 1774-88)

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 (pH4.7-5.9)，二维是Phos-tag™ SDS-PAGE，可分离hnRNP K的异构体 (66 kDa, 64 kDa)。利用质谱仪可以确认不同的点代表不同的亚型或修饰位点。

二维电泳



25 μM Mn²⁺-Phos-tag™ Acrylamide, 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶

在同一等电点的每个异构体的不同磷酸化形态都能被检测出来。
(如: spots 6 vs. 8和spots 4 vs. 7)

【参考文献】

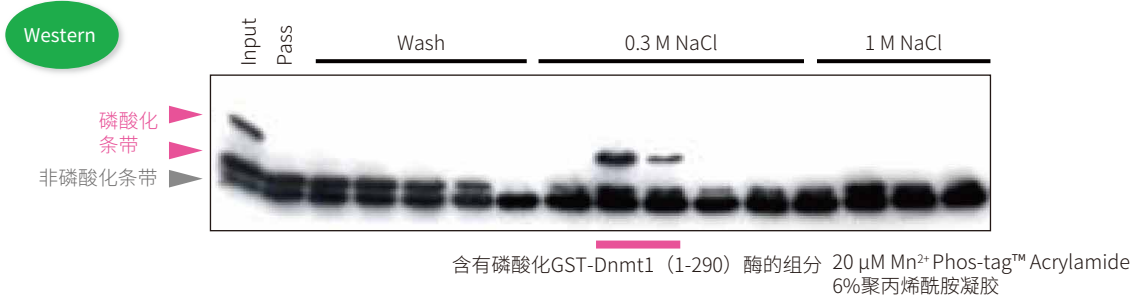
Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. Y Kimura, K Nagata, N Suzuki, R Yokoyama, Y Yamanaka, H Kitamura, H Hirano, and O Ohara, *Proteomics*, Nov 2010; 10(21): 3884-95.

【数据提供】

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磷酸化激酶的组分

Dnmt1: DNA甲基转移酶



- ① 采用亲和层析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从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后进行Western blotting, 确定迁移条带中每个组分的激酶活性(检验: 抗小鼠Dnmt1 (72-86) 抗体)

我们可以确定各组分中含有目的激酶!

【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.

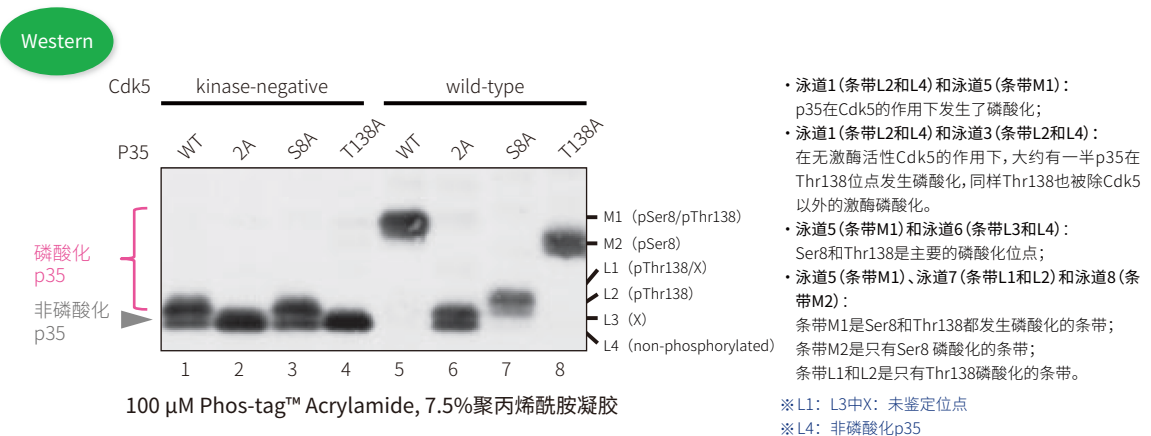
【数据提供】

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 杉山康宪 (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Ala替代突变体寻找cdk5激活的亚基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或没有激酶活性的Cdk5都来源于COS-7细胞。这些细胞提取液用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】

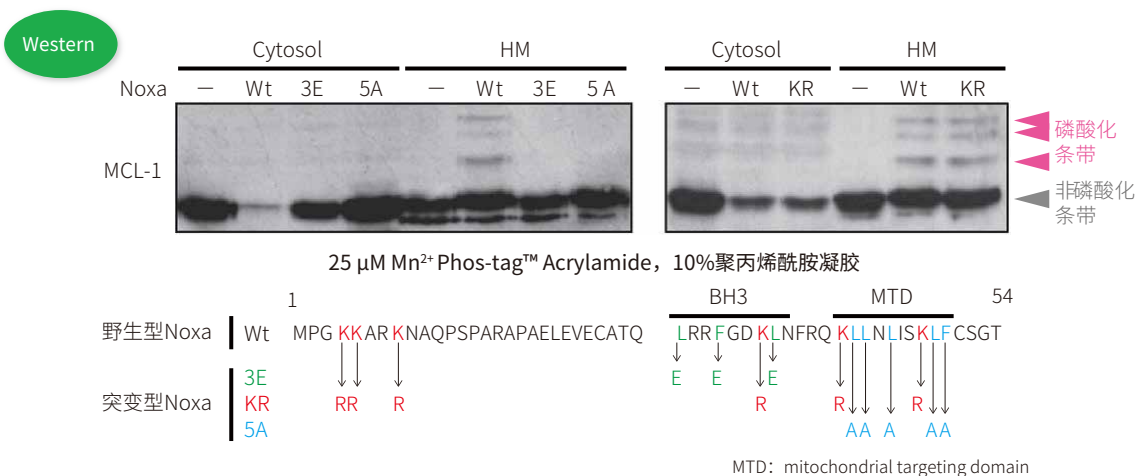
Quantitative Measurement of in Vivo Phosphorylation States of Cdk5 Activator p35 by Phos-tag™ SDS-PAGE. T. Hosokawa, T. Saito, A. Asada, K. Fukunaga, and S. Hisanaga, *Mol. Cell. Proteomics*, Jun 2010; **9**: 1133 - 1143.

【数据提供】

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 生命专业 神经分子功能研究室 久永真市 (Dr. S. Hisanaga)

⑤ 野生型/突变型Noxa中表达的MCL-1磷酸化水平变化

野生型 (wt) 及突变型 (3E, KR, 5A) 的Noxa基因在肺小细胞癌细胞株H209细胞中的表达, 进行细胞溶质 (Cytosol) 组分和HM (Heavy Membrane, 含线粒体较多) 组分分离。通过Phos-tag™ SDS-PAGE分离出样品中的MCL-1 (40 kDa), 使用抗MCL-1抗体进行Western blotting检测。



结果发现, 野生型和KR突变型的H209细胞系,
其线粒体中的MCL-1的磷酸化水平提高。

【参考文献】

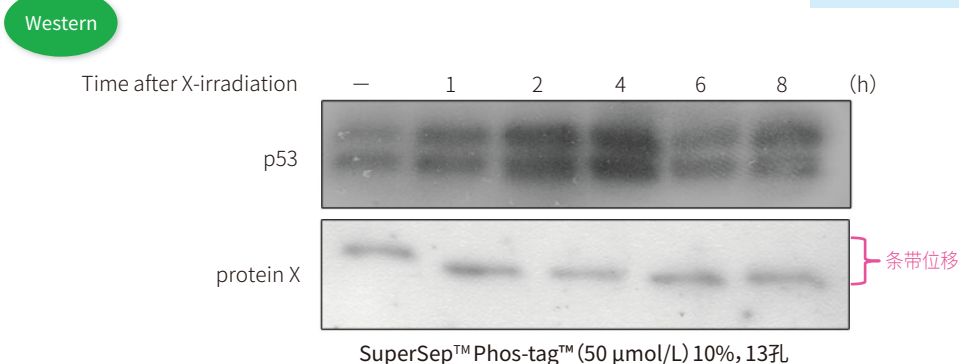
Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. Wataru Nakajima, Mark A. Hicks, Nobuyuki Tanaka, Geoffrey W. Krystal, and Hisashi Harada. *Cell Death and Disease* (2014) **5**, e1052; doi:10.1038/cd-dis.2014.6

【数据提供】

日本医科大学 先进医学研究所 基因控制部门 中嶋亘

⑥ p53 和protein X在X射线照射后磷酸化随时间变化

使用X射线 (5Gy) 照射人肺癌来源的Lu99 细胞, 一定时间回收细胞。制备细胞提取液, 使用SuperSep™ Phos-tag™ (50 $\mu\text{mol/L}$), 10%, 13 wells预制胶进行SDS-PAGE。用含10 mM EDTA的转膜缓冲液处理凝胶, 转至PVDF膜。用2% Milk/TBS-T 对膜进行封闭后, 与一抗反应 (上图:p53, 下段:细胞周期相关蛋白protein X)。再用化学发光试剂检测。



在X射线照射下, p53的累积在4 h后达到最高, protein X
磷酸化状态能随着时间变化。

【数据提供】

东京学医学系研究科 疾病生命工学中心 放射线分子医学部门 榎本敦

参考文献

Phos-tag™ 试剂

- [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

Mn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE

- [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. Ramrath, D. Caille, H. Jiang, K. A. Platt, P. Meda, R. Aebersold, P. Rorsman, and R. Ricci, I.
- [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
- [7] PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria, *Science*, Apr 2013; **340**: 471-475., Yun Chen and Gerald W. Dorn, II
- [8] Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice, *Science*, Dec 2015; **350**: aad2459., Guohua Gong, Moshi Song, Gyorgy Csordas, Daniel P. Kelly, Scott J. Matkovich and Gerald W. Dorn, II

Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE

- [1] Phosphorylation of Phytochrome B Inhibits Light-Induced Signaling via Accelerated Dark Reversion in Arabidopsis, *PLANT CELL*, Feb 2013; **25**: 535 - 544., Mátyás Medzihradszky, János Bindics, Éva Ádám, András Viczián, Éva Klement, Séverine Lorrain, Péter Gyula, Zsuzsanna Mérai, Christian
- [2] MAPK feedback encodes a switch and timer for tunable stress adaptation in yeast, *Sci. Signal.*, Jan 2015; **8**: ra5., Justin G. English, James P. Shellhammer, Michael Malahe, Patrick C. McCarter, Timothy C. Elston, and Henrik G. Dohlman
- [3] Mechanism of Activity-Dependent Cargo Loading via the Phosphorylation of KIF3A by PKA and CaMKIIα., *Neuron*. 2015 Sep 2; **87**(5):1022-35., Ichinose S, Ogawa T, and Hirokawa N.
- [4] Microtubule Destabilizer KIF2A Undergoes Distinct Site-Specific Phosphorylation Cascades that Differentially Affect Neuronal Morphogenesis, *Cell Reports*, 2015 Sep 22; **12**(11):1774-88

SuperSep™ Phos-tag™

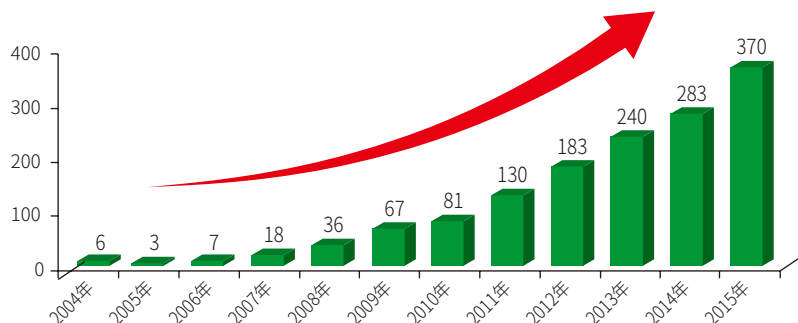
- [1] A labor-saving, time-saving, and more reliable strategy for separation of low-molecular-mass phosphoproteins in Phos-tag affinity electrophoresis. *Int. J. Chem.* **4**, 1-8(2012), Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., and Koike, T.
- [2] *In vivo* collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity, *J. Cell Biol.*, Jul 2014; **206**: 113-127., Sei Kuriyama, Eric Theveneau, Alexandre Benedetto, Maddy Parsons, Massamitsu Tanaka, Guillaume Charras, Alexandre Kabla, and Roberto Mayor
- [3] DNA replication and spindle checkpoints cooperate during S phase to delay mitosis and preserve genome integrity, *J. Cell Biol.*, Jan 2014; **204**: 165-175., Maria M. Magiera, Elisabeth Gueydon, and Etienne Schwob

Phos-tag™ 使用文献数目的变化

Google Scholar统计

※不含专利・引用部分

检索 Phos-tag



7. Q&A

■ Phos-tag™ Acrylamide

定 量

Q. 可以定量磷酸化蛋白吗？

A. 可以根据对条带染色的情况进行定量分析，如CBB染色。

推荐使用：Quick-CBB PLUS⇒ Quick-CBB PLUS (1 L: Wako Cat.#178-00551; 250 mL: 174-00553)

分 离

Q. 使用Phos-tag™，对于蛋白大小是否有限制

A. 据文献报道，最大可分离350 kDa的磷酸化蛋白。可在低浓度Acrylamide加入琼脂糖。详细请参考“3.实验流程”的[1]-②'，③'、P12的“Tris-AcOH凝胶” (20 μM Phos-tag™ Acrylamide, 3%丙烯酰胺+0.5% 琼脂糖)。

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

染 色

Q. 除CBB以外，还有其它方法对凝胶染色吗？

A. 有，如负染色、银染和荧光染色。

产品使用量

Q. 每种规格的产品可以制作多少块凝胶？

A. 配制数量取决于Phos-tag™的使用浓度。

右图是在配制1 mm厚，9 cm×7.7 cm凝胶的情况下，可以配制的凝胶数量。

Phos-tag™	20 μM	50 μM	100 μM
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	—

凝胶硬度

Q. 如果凝胶过软，如何处理？

A. 可以参考“4.疑难问题”中“凝胶易碎”部分。

凝胶的使用期限

Q. 配制含Phos-tag™凝胶后能否保存？

A. Mn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶无法保存。配制凝胶后，当天使用。

Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶可冷藏保存3个月。

Phos-tag™ Acrylamide溶液的使用期限

Q. 用甲醇和蒸馏水溶解后，可保存多久？

A. 低温避光可稳定保存1年。

Phos-tag™ Acrylamide溶液的配制

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™？

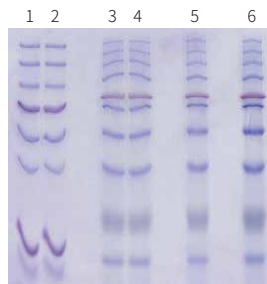
A. 可以仅用水溶，只是比溶解在含甲醇的水中时间长些。若不能完全溶解，离心，取上清使用。

分子marker

Q. 可使用哪种预染marker？

A. 一般的预染marker在Phos-tag™凝胶里条带会弯曲(如图1)。使用FUJIFILM Wako的WIDEVIEW™ 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。Marker和其他上样溶液之间最少保留一条空白泳道(可使用1×的上样缓冲液)。

图1. 预染色marker的比较



1、2: 其他公司的预染色marker (3 μL)
3、4、5: WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III (3 μL)
6: WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III (5 μL)
空白Lane: 1×样品缓冲液 (5 μL)
SuperSep™ Phos-tag™ (50 μM), 12.5% (20 mA恒流)

ATP的影响

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。使用范围尚不清楚。

预制胶的使用

Q. 能否能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“8.SuperSep™ Phos-tag™”)，节省制备时间。

复数条带的解释

Q. 在Phos-tag™ SDS-PAGE中有一条条带发生迁移和检测出了多个条带的情况，如何区分是磷酸化还是目的蛋白降解？

A. 同时进行普通SDS-PAGE（无Phos-tag™），确认目的蛋白是否降解。

使用Phos-tag™分离DNA

Q. Phos-tag™ 适合用于分离DNA吗？

A. 可以。参考以下文献：

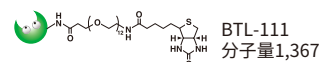
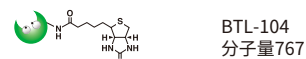
- A SNP genotyping method using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. **361**, 294-298 (2007), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike (The phosphate group at DNA-terminal is efficiently captured by Zn²⁺-Phos-tag.)
- A mobility shift detection method for DNA methylation analysis using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. **378**, 102-104 (2008), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike

■ Phos-tag™ Biotin（产品相关请看“9. Phos-tag™ 系列产品”）

BTL-104与BTL-111的区别

Q. BTL-104与BTL-111有什么区别？

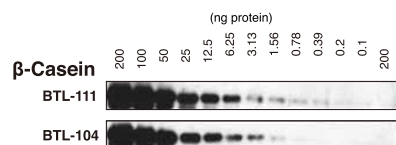
A. BTL-104和BTL-111的链长不同。建议优先选择BTL-104，其有较高的溶解性。如果需要高检测灵敏度，则选择BTL-111。



灵敏度

Q. 检测灵敏度到什么水平？

A. 可以达到ng级别。需要使用高灵敏度发光试剂，比如ImmunoStar® LD
ImmunoStar® LD请参考“10. 相关产品”。



碱性磷酸酶处理

其他必需试剂

Q. 除了这个产品还需要其他试剂吗？

A. 请准备Streptavidin-conjugated HRP溶液、ImmunoStar® 系列等化学显色试剂。

ImmunoStar® 系列请参考“10. 相关产品”试剂。

使用次数

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-111 1 mM水溶液: 10-100 次

定 量

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. 可以用来确定结合磷酸基团的数目吗？

A. 不可以。

细胞、组织的染色

Q. 可细胞染色或者组织染色吗？

A. 无法检测。清洗时会用甲醇冲走，无法染色。

剥 除

Q. 能否去除膜上的Phos-tag™ Biotin？

A. 可以。与含有62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% (w/v) SDS和0.1 M 2-mercaptoethanol溶液混合后，振荡15 min，将膜用1×TBS-T漂洗3次，每次10 min。

膜

Q. 推荐使用哪种膜？

A. 推荐使用PVDF膜。

终止反应

Q. 使用Phos-tag™ Biotin需要进行封闭反应吗？

A. 不需要，因为封闭反应会降低灵敏度。



■ Phos-tag™ 质谱分析试剂盒 (产品请参考“9.其他Phos-tag™ 系列产品”)

使用次数

Q. Phos-tag™ Mass Analytical kit 可以使用多少次?

A. 如果每次用量为5 μ L, 至少可以使用1000次。

3种试剂的区别使用

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:

①摸索条件: 使用101N。

②如有其中含多个同位素, 图谱结果复杂化; 为了证明磷酸基团的出现, 则使用101L和101H。

这些试剂中分别含有质量数为64和68的Zn。因此, 使用这些试剂测定单一样品时, 结果是m/e相差8。

非磷酸化分子的检测

Q. 为什么无法检测出非磷酸化分子的峰?

A. 因为磷酸化和非磷酸化分子的离子化效率有相当大的区别, 使用Phos-tag™ 方法的样品溶液适合pH6-8, 弱酸性酚基质 (例如THAP) 和弱碱性HAMAN的缓冲液体系。多肽分析使用一般的正离子模式, 另外, 酸性样品使用酸性基质。因此, 磷酸化分子-Phos-tag™ 复合物的离子化效率显著增加, 而非磷酸化分子则变得很低。

Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶的样品

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。

ESI 法

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作为探针进行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。

文献: *Anal. Chem.* (2008) **80**, 2531-2538 (MS-101N ESI-MS)

■ Phos-tag™ Agarose (产品请参考“9.其他Phos-tag™ 系列产品”)

SDS-PAGE前处理

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

A. 不可以。实验中推荐使用的洗脱缓冲液中的盐浓度较高, 可能引起条带弯曲。建议使用SDS-PAGE的样本缓冲液作为洗脱缓冲液。

重复利用

Q. Phos-tag™ Agarose可以重复使用吗?

A. 不建议重复使用。

与 IMAC 比较

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。

His-tag蛋白质纯化

Q. 本产品可用于His-tag磷酸化蛋白的纯化吗?

A. His-tag对Zn²⁺ 有较弱的亲和性, 尽可能使用GST等其他种类的标签。

Zn²⁺ 对Phos-tag™ 的亲和性高于His-tag, 因此有报道称可以使用Zn²⁺-Phos-tag™ SDS-PAGE分离His-tag蛋白, 但未有使用Phos-tag™ Agarose分离His-tag蛋白的报道。

Q. 适合使用的试剂和不适用的试剂有哪些？

A. 参考下表。避免使用螯合剂和磷酸衍生物。

种类	试剂	是否可用	允许的浓度
还原剂	DTT	○	≤0.1 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≥0.5%会对结合产生影响
	脱氧胆酸钠	○	浓度≥0.25%会对结合产生影响
表面活性剂 (非离子)	Nonidet P40	○	≤ 1 %
	Tween 20	○	≤ 1 %
表面活性剂 (两性)	CHAPS	○	≤ 0.2 %
磷酸衍生物	β-甘油磷酸盐	×	不能使用
	焦磷酸盐	×	不能使用
螯合剂	EDTA	×	不能使用

参考文献

Phos-tag™ Biotin

- [1] Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin., E Kinoshita, E Kinoshita-Kikuta, Y Sugiyama, Y Fukada, T Ozeki, and T Koike, *Proteomics*, Apr 2012; **12**(7):932-7.
- [2] Protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*: localization and identification of phosphoproteins., Yoichiro Sogame, Katsuhiko Kojima, Toshikazu Takeshita, Shigeki Fujiwara, Seiji Miyata, Eiji Kinoshita, and Tatsuomi Matsuoka., *FEMS Microbiol Lett*, Jun 2012; **331**: 128 - 135.
- [3] Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1., Jun Nakae, Yongheng Cao, Fumihiko Hakuno, Hiroshi Takemori, Yoshinaga Kawano, Risa Sekioka, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Toshiya Tanaka, Juro Sakai, Shin-ichiro Takahashi, and Hiroshi Itoh., *EMBO J*. May 2012; **31**:2275-2295.
- [4] Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling., Ning Liu, Masaki Matsumoto, Kiyoko Kitagawa, Yojiro Kotake, Sayuri Suzuki, Senji Shirasawa, Keiichi I Nakayama, Makoto Nakanishi, Hiroyuki Niida, and Masatoshi Kitagawa., *EMBO J*. May 2012; **31**: 2365-2377.
- [5] TGFβ-activated kinase 1(TAK1)-binding proteins(TAB) 2 and 3 negatively regulate autophagy., Giichi Takaue, Takashi Kobayashi, and Akihiko Yoshimura, *J. Biochem.*, Feb 2012; **151**: 157-166.
- [6] Arabidopsis heterotrimeric G protein β subunit, AGB1, regulates brassinosteroid signalling independently of BZR1., Daisuke Tsumagari, Shenkui Liu, and Tetsuo Takano., *J. Exp. Bot.*, Aug 2013; **64**: 3213-3223.

Phos-tag™ 质谱分析试剂盒

- [1] Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule., H Takeda, A Kawasaki, M Takahashi, A Yamada, and T Koike., *Rapid communications in mass spectrometry* **17**. 18(2003):2075-2081.
- [2] Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves., Tanaka T, Horiuchi G, Matsuoka M, Hirano K, Tokumura A, Koike T, Satouchi K., *Biosci Biotech Biochem.*, 2009; **73**: 1293-1300.

Phos-tag™ Agarose

- [1] Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using Phosphate-affinity chromatography at physiological pH, *Proteomics*, **6**. 5088-5095 (2006), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, A. Yamada, M. Endo, and T. Koike
- [2] Improved method of phosphopeptides enrichment using biphasic phosphate-binding tag/C18 tip for versatile analysis of phosphorylation dynamics., T Nabetani, YJ Kim, M Watanabe, Y Ohashi, H Kamiguchi and Y Hirabayashi., *Proteomics*, Dec 2009; **9**(24):5525-33.
- [3] Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast., Kikuchi J, Iwafune Y, Akiyama T, Okayama A, Nakamura H, Arakawa N, Kimura Y, and Hirano H., *Proteomics*. 2010; **10**:2769-2779.

8. SuperSep™ Phos-tag™ 预制胶

SuperSep™ Phos-tag™ 是一种即用型的预制胶产品。本品由于使用中性凝胶缓冲液和 ZnCl_2 ，因此具有很好的保存稳定性并可获得整齐的实验条带。

产品特点

- 即用型
- 使用安全，无需接触危险试剂
- 可稳定保存 (9个月)
- 与普通SDS-PAGE的使用原理相同
- 高重复性

产品规格

孔数	13	17
孔容积	30 μL	25 μL
Phos-tag™ 浓度	50 $\mu\text{mol/L}$	
丙烯酰胺浓度	6%、7.5%、12.5%、15%	
ZnCl_2 浓度	100 $\mu\text{mol/L}$	
制胶规格	BioRad型: $83 \times 100 \times 3.9 \text{ mm}$ Life Technologies型: $100 \times 100 \times 6.6 \text{ mm}$ Easyseparator™ 型: $100 \times 100 \times 3 \text{ mm}$	



Easyseparator™



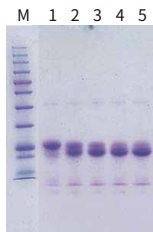
SuperSep™ Phos-tag™

使用例

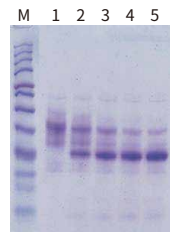
- β -casein随时间的脱磷酸化-

※WB的应用数据请看P19

SuperSep™ Ace
12.5%, 13孔



SuperSep Phos-tag™
12.5%, 13孔



磷酸化
 β -casein
+
脱磷酸化
 β -casein

磷酸化
 β -casein
—
脱磷酸化
 β -casein

[样品]

M: Wide-View™ Prestained Protein Size Marker III

- 1: 0 min β -casein (AP处理)
- 2: 15 min β -casein (AP处理)
- 3: 30 min β -casein (AP处理)
- 4: 45 min β -casein (AP处理)
- 5: 60 min β -casein (AP处理)

[电泳缓冲液]

Tris-glycine-SDS电泳缓冲液

[电泳条件]

35 mA 恒定电流, 60 min

[染色] QUICK-CBB

(产品编号: 299-50101)

[脱色] 去离子水 (微波炉处理)

β -casein 随时间经碱性磷酸酶 (AP) 进行去磷酸化处理。使用本产品可以分离 β -casein和去磷酸化 β -casein。

产品编号	产品名称	规格	保存
匹配Bio-Rad伯乐电泳仪			
198-17981	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 7.5%, 17 well, 83×100×3.9 mm	5 块	冷藏
195-17991	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 17 well, 83×100×3.9 mm		
匹配Life Technologies电泳仪			
192-18001	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 7.5%, 17 well, 100×100×6.6 mm	5 块	冷藏
199-18011	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 17 well, 100×100×6.6 mm		
匹配Easyseparator™ 电泳槽			
192-17401	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 6%, 13 well	5 块	冷藏
199-17391	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 6%, 17 well		
195-17371	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 7.5%, 13 well		
192-17381	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 7.5%, 17 well		
193-16711	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 10%, 13 well		
190-16721	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 10%, 17 well		
195-16391	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 13 well		
193-16571	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 17 well		
193-16691	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 15%, 13 well		
196-16701	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 15%, 17 well		
Easyseparator™ 电泳槽			
058-07681	Easyseparator™	1 Kit	室温

注意：使用普通预染Marker容易引起条带弯曲，推荐使用Wide-View™ Prestained Protein Size Marker III (产品编号: 230-02461)。使用本产品前，利用普通SDS-PAGE摸索和优化实验条件。在进行WB转膜前，利用EDTA处理凝胶。



9. 其他Phos-tag™ 系列产品

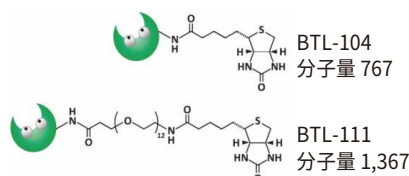
■ Phos-tag™ Biotin

- 利用Western blotting检测磷酸化蛋白 -

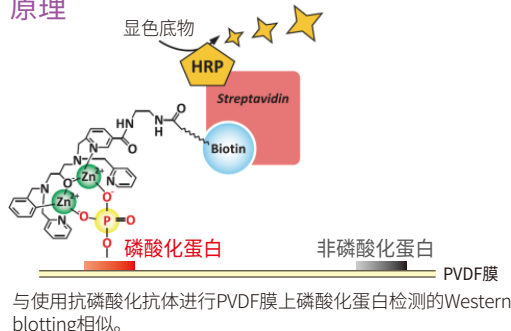
NARD institute, Ltd.

Phos-tag™ Biotin是与生物素结合的Phos-tag™，利用WB, 无需抗磷酸化抗体, 也可实现磷酸化蛋白的检测。

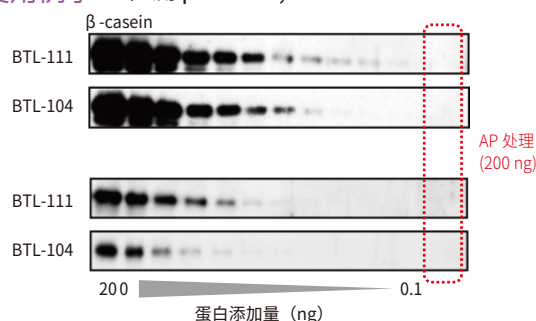
- 特点**
- Phos-tag™ 的特异性结合与氨基酸种类、序列无关
 - 无特异性磷酸化抗体时的理想选择
 - 无需特别试剂、仪器



原理



使用例子 ~检测 β-casein, Ovalbumin ~



产品编号	产品名称	保存	规格
308-97201	Phos-tag™ Biotin BTL-111 1mM 水溶液	冷藏	0.1 mL
301-93531	Phos-tag™ Biotin BTL-104	冷藏	10 mg

■ Phos-tag™ 质谱分析用试剂盒

- 用于提高MALDI-TOF/MS检测灵敏度 -

NARD institute, Ltd.

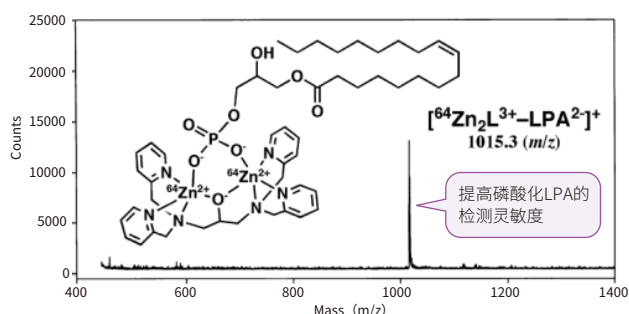
使用前, 将进行MALDI-TOF/MS分析的样品与Phos-tag™ 质谱分析试剂盒中的试剂混合。用正离子模式检测磷酸化分子-Phos-tag™ 复合体, 之前难以检测的磷酸化分子的检测灵敏度提高。三种不同的试剂含有3种类型的Zn。

特点

- 提高磷酸分子的检测灵敏度
- 不检测非磷酸化分子
- 除磷酸化肽以外也适用于其他磷酸化分子

使用例子

~检测Phos-tag™-磷酸化LPA复合体~



LPA²⁻: 1-oleoyl-L-α-lyzophosphatidate (分子量 434.2)

※请参考P23【3种试剂的使用区别】

产品编号	产品名称	保存	规格
305-93551	Phos-tag™ 质谱分析用试剂盒	冷藏	1 Kit



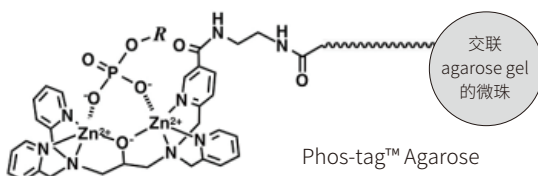
Phos-tag™ Agarose

- 亲和层析纯化磷酸化蛋白 -

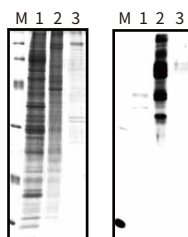
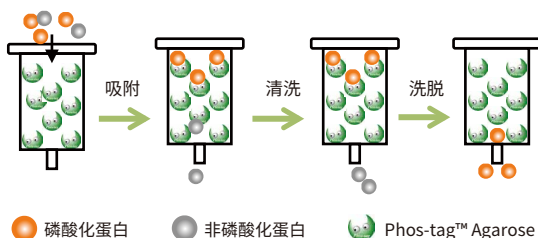


使用前将Phos-tag™ Agarose添加到层析柱中，可用于分离、纯化、浓缩磷酸化蛋白。因为无需表面活性剂和还原剂，可在类似体内生理条件下获得磷酸化蛋白。

- 特点**
- 可在1 h内纯化磷酸化蛋白
 - 可在生理条件下 (pH7.5) 捕获蛋白
 - 纯化无需表面活性剂和还原剂



使用例子 ~ A431 细胞裂解液中的磷酸化蛋白纯化 ~



M: 分子量Marker
Lane1: 非吸附组分
Lane2: 吸附组分
Lane3: 洗柱组分
(左) 荧光染色
(右) 使用anti-phosphorylated Tyr的WB

结果分析: 将裂解液上样到含Phos-tag™ Agarose的层析柱中, 磷酸化蛋白被浓缩到了吸附组分中。

产品编号	产品名称	保存温度	规格
302-93561	Phos-tag™ Agarose	冷藏	0.5 mL
308-93563			3 mL

Phos-tag™ Tip

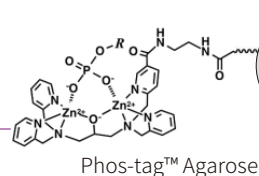
- 即用型浓缩磷酸化多肽的枪头 -

NARD institute, Ltd.

- 特点**
- 操作时间<30 min
 - 高回收率
 - 无需昂贵仪器



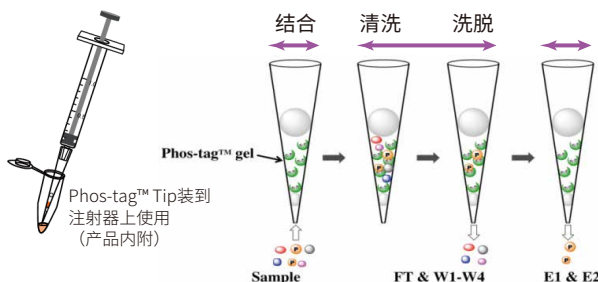
Phos-tag™ Tip



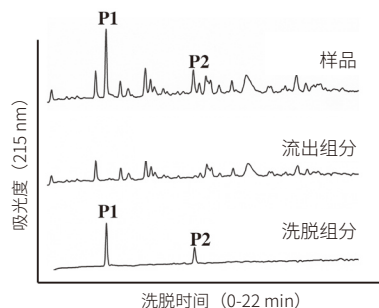
交联导入型
琼脂糖
凝胶磁珠

使用例子

~ 6 nmol β-casein 胰蛋白酶消化物的分离 ~



检测
(HPLC)



产品编号	产品名称	保存	规格
387-07321	Phos-tag™ Tip	冷藏	8 支



10. 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
015-25635	30w/v% Acrylamide/Bis Mixed Solution(29:1)	500 mL	冷藏	Sol.A, 30%T, 3.3%C
315-01203	Agarose H（高强度型）	1 g	室温	用于含琼脂糖的低灵敏度凝胶制备。适合高强度、低琼脂糖浓度或浓度高的大型核酸片段电泳
319-01201		10 g		
317-01202		25 g		
311-90271	10% SDS Solution	100 mL	室温	Sol.D
313-90275		500 mL		
134-15302	Manganese(II) Chloride Tetrahydrate	25 g	室温	分子生物学用，纯度99.0%以上 用于制备Sol.F
136-15301		100 g		
268-01902	Zinc Chloride	25 g	室温	分子生物学用，纯度98.0%以上 用于制备Sol.M
345-04741	Bis-Tris	100 g	室温	用于制备Sol.N
196-01372	Sodium Hydrogensulfite（试剂特级）	25 g	阴凉处 (25℃以下)	用于制备Sol.O
198-01371		100 g		
345-01804	MOPS	100 g	室温	用于制备Sol.P
341-01801		250 g		
341-08241	MOPS,分子生物学用	100 g	室温	
343-08245		500 g		
192-11041	Separating Gel Buffer Solution(*4)	250 mL	冷藏	Sol.B、D, 用于分离凝胶(含有SDS)
199-11051	Stacking Gel Buffer Solution(*4)	250 mL	冷藏	Sol.C、D, 用于浓缩凝胶(含有SDS)
205-06313	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	25 mL	阴暗处	TEMED
019-15922	10w/v% Ammonium Peroxodisulfate Solution	25 mL	冷藏	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(*10)	1 L	冷藏	Sol.H
312-90321	SDS-PAGE 10x Running Buffer	1 L	室温	Sol.H
318-90323		5 L		
192-16801	SDS-PAGE Buffer, pH8.5	5 L	阴凉处	Sol.H, 无需稀释, 1×buffer
200-17071	Tricine Running Buffer Solution(×10)	1 L	冷藏	组分: 0.5 M Tris/0.5 M 甘氨酸/ 1% SDS
196-11022	Sample Buffer Solution(2ME+)(×2)	25 mL	冷藏	SDS-PAGE (Laemmli 法) 用样品缓冲液, 含有2- 巯基乙醇
199-16132	Sample Buffer Solution with 3-Mercapto-1,2-propanediol (×2)	25 mL	冷藏	含有可代替2-ME 的非剧毒还原剂3- 巯基-1,2- 丙二醇
196-16142	Sample Buffer Solution with 3-Mercapto-1,2-propanediol (×4)	25 mL	冷藏	



■ 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 min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	冷藏	省去戊二醛处理操作 因此蛋白几乎不会被化学修饰 灵敏度高, 可检测低至纳克级的蛋白
291-50301	Silver Stain II Kit Wako	for 10 gels	冷藏	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
236-02463	WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III	25 μ L	冷冻	用于Phos-tag™ SDS-PAGE 可保持条带不弯曲
230-02461		500 μ L		
234-02464		500 μ L $\times$ 3		

■ 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	冷冻	蛋白样品去磷酸化
012-10691		100 U		

■ 阳性对照 (用于检测Phos-tag™ SDS-PAGE凝胶的分离性能)

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
038-23221	α -Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated	1 mg	冷冻	磷酸化 α -casein与 去磷酸化 α -casein的混合物
034-23223		10 mg		

■ 电泳装置、预制胶

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
058-07681	EasySeparator™	1 set	室温	SuperSep™ 系列电泳槽

■ Western blotting试剂

产品编号	产品名称	规格	保存条件	用途
296-69901	ImmunoStar® LD	200 cm ²	冷藏	高灵敏度Western blotting化学显色试剂 (fg级)。操作简便, 两液等量混合 A液、B液各100 mL (2000 cm ²)
292-69903		1000 cm ²		
290-69904		2000 cm ²		
291-72401	ImmunoStar® Zeta	200 cm ²	冷藏	检测飞克低等-中等级的蛋白质。发光信号稳定性好, 具有持续性
297-72403		1000 cm ²		
295-72404		2000 cm ²		
294-68601	Immuno-enhancer	2次	冷藏	Western blotting信号增强试剂。有一抗反应的试剂A与二抗反应的试剂B。原液直接用作抗体稀释液
290-68603		10次		
298-68604		40次		

【发光强度】



样品: FLAG-BAP

凝胶: SuperSep™ Ace, 10-20%, 17孔 (产品编号: 198-15041)

一抗: 抗DYKDDDDK tag, 单克隆抗体 (产品编号: 014-22383), 2000倍稀释

二抗: Anti Mouse IgG(H+L), Rabbit, IgG Whole, Peroxidase Conjugated, 20000倍稀释

曝光时间: 60 s (LAS4000, standard)

泳道	FLAG-BAP
1	20 ng
2	10 ng
3	5 ng
4	2.5 ng
5	1.3 ng



ImmunoStar® LD

■ Kinase Assay Screening Kit (ADP荧光测定试剂盒)

Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit 是FUJIFILM Wako与东京大学药物发现机构共同开发的ADP荧光测定试剂盒。具有高通量筛选 (HTS) 所需的高灵敏度、高准确度、低成本、简便等特性。本试剂盒不仅可检测激酶, 同时可用于检测产生ADP的酶 (ATP酶、乙酰基-CoA羧化酶等) 的活性。

【特点】

- 适合终点 (endpoint) 和实时检测
- 优异的Z'-factor数据 (数据差异小)
- 高灵敏度检测ADP量
- 检测直到ADP 30 μmol/L仍可保持线性关系
- 一步反应, 检测时间短 (~30 min)
- 成本较低

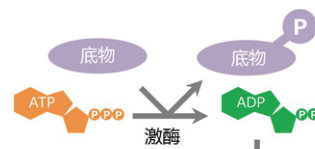
【试剂盒内容】

- ①底物液
- ②酶液
- ③刃天青溶液
- ④还原剂封闭剂
- ⑤反应终止液 (停止偶联反应)
- ⑥10 mmol/L ATP溶液 (激酶底物、制作标准曲线)
- ⑦10 mmol/L ADP溶液 (制作标准曲线)

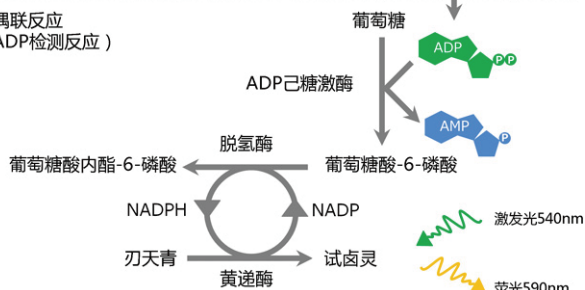


【试剂盒概要】

激酶反应



酶偶联反应 (ADP检测反应)



通过激酶反应产生的ADP, 转换成红色荧光物质试卤灵进行定量, 从而测定激酶活性。

产品编号	产品名称	规格	等级	保存
291-77401	Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit	1000 次	用于酶活性测定	冷冻

【参考】配制10 mL不同浓度分离胶的溶液组成

Phos-tag™ Acrylamide conc.	20 μM				50 μM				100 μM			
Acrylamide conc.	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			
Sol.E (mL)	0.04				0.1				0.2			
Sol.F (mL)	0.04				0.1				0.2			
Sol.D (mL)	0.1				0.1				0.1			
TEMED (mL)	0.01				0.01				0.01			
Distilled water (mL)	3.26	3.93	4.59	5.26	3.14	3.81	4.47	5.14	2.94	2.65	4.31	4.98
Sol.G (mL)	0.05				0.05				0.05			

Sol. A: 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液 (30% T, 3.3% C)

Sol. B: 1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.8 (4×分离胶缓冲液)

Sol. D: 10% (w/v) SDS溶液

Sol. E: 5.0 mmol/L Phos-tag™ 溶液 (含3%(v/v)甲醇)

Sol. F: 10 mmol/L MnCl₂ / ZnCl₂ 溶液

Sol. G: 10% (w/v) 过硫酸铵溶液 (APS溶液)



参考文献

- [1] Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling[J]. *Nature communications*, 2016, 7, Shindo Y, Iwamoto K, Mouri K, *et al*.
- [2] PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7[J]. *Nature communications*, 2016, 7, Shinde S R, Maddika S.
- [3] Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31502, Kawasaki Y, Sakimura A, Park C M, *et al*.
- [4] Plastid-nucleus communication involves calcium-modulated MAPK signalling[J]. *Nature Communications*, 2016, 7, Guo H, Feng P, Chi W, *et al*.
- [5] Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation[J]. *Nature communications*, 2016, 7, Mitterer V, Murat G, Réty S, *et al*.
- [6] Phos-tag analysis of Rab10 phosphorylation by LRRK2: a powerful assay for assessing kinase function and inhibitors[J]. *Biochemical Journal*, 2016: BCJ20160557, Ito G, Katsemonova K, Tonelli F, *et al*.
- [7] Analysis of phosphorylation of the myosin targeting subunit of smooth muscle myosin light chain phosphatase by Phos-tag SDS-PAGE[J]. *The FASEB Journal*, 2016, 30(1 Supplement): 1209.1-1209. 1, Walsh M P, MacDonald J A, Sutherland C.
- [8] Using Phos-Tag in Western blotting Analysis to Evaluate Protein Phosphorylation[J]. *Kidney Research: Experimental Protocols*, 2016: 267-277, Horinouchi T, Terada K, Higashi T, *et al*.
- [9] The Abundance of Nonphosphorylated Tau in Mouse and Human Tauopathy Brains Revealed by the Use of Phos-Tag Method[J]. *The American journal of pathology*, 2016, 186(2): 398-409, Kimura T, Hatsuta H, Masuda-Suzukake M, *et al*.
- [10] Phos-tag SDS-PAGE resolves agonist- and isoform-specific activation patterns for PKD2 and PKD3 in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2016, Qiu W, Steinberg S F.
- [11] Analysis of phosphorylation of the myosin-targeting subunit of myosin light chain phosphatase by Phos-tag SDS-PAGE[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2016, 310(8): C681-C691, Sutherland C, MacDonald J A, Walsh M P.
- [12] Electrochemical biosensor for protein kinase A activity assay based on gold nanoparticles-carbon nanospheres, phos-tag-biotin and β -galactosidase[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 508-515, Zhou Y, Yin H, Li X, *et al*.
- [13] Validation of Cis and Trans Modes in Multistep Phosphotransfer Signaling of Bacterial Tripartite Sensor Kinases by Using Phos-Tag SDS-PAGE[J]. *PloS one*, 2016, 11(2): e0148294, Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Eguchi Y, *et al*.
- [14] Phosphopeptide Detection with Biotin-Labeled Phos-tag[J]. *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*, 2016: 17-29, Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T.
- [15] A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1[J]. *Proteomics*, 2016, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Kubota Y, *et al*.
- [16] Difference gel electrophoresis of phosphoproteome: U.S. Patent Application 15/004,339[P]. 2016-1-22, Tao W A, Wang L. ERK1/2-induced phosphorylation of R-Ras GTPases stimulates their oncogenic potential[J]. *Oncogene*, 2016, Frémín C, Guégan J P, Plutoni C, *et al*.
- [17] Microtubules Inhibit E-Cadherin Adhesive Activity by Maintaining Phosphorylated p120-Catenin in a Colon Carcinoma Cell Model[J]. *PloS one*, 2016, 11(2): e0148574, Maiden S L, Petrova Y I, Gumbiner B M.
- [18] Serine 231 and 257 of Agamous-like 15 are phosphorylated in floral receptacles[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11(7): e1199314, Patharkar O R, Macken T A, Walker J C.
- [19] A small molecule pyrazolo [3, 4-d] pyrimidinone inhibitor of zipper-interacting protein kinase suppresses calcium sensitization of vascular smooth muscle [J]. *Molecular pharmacology*, 2016, 89(1): 105-117, MacDonald J A, Sutherland C, Carlson DA, *et al*.
- [20] The RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like protein FIERY2/CPL1 interacts with elf4AIII and is essential for nonsense-mediated mRNA decay in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2016: TPC2015-00771-RA, Chen T, Qin T, Ding F, *et al*.
- [21] Vasorelaxant Effect of 5'-Methylthioadenosine Obtained from *Candida utilis* Yeast Extract through the Suppression of Intracellular Ca^{2+} Concentration in Isolated Rat Aorta[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016, 64(17): 3362-3370, Kumrungsee T, Akiyama S, Saiki T, *et al*.
- [22] Inhibition of deubiquitinating activity of USP14 decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19 in PC12D cells[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 472(4): 598-602, Nakashima A, Ohnuma S, Kodani Y, *et al*.
- [23] Actin Tyrosine-53-Phosphorylation in Neuronal Maturation and Synaptic Plasticity[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2016, 36(19): 5299-5313, Bertling E, Englund J, Minkeviciene R, *et al*.
- [24] AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA[J]. *Autophagy*, 2016, 12(2): 432-438, Kaushik S, Cuervo A M.
- [25] Myocardin-related transcription factor a and yes-associated protein exert dual control in G protein-coupled receptor- and RhoA-mediated transcriptional regulation and cell proliferation[J]. *Molecular and cellular biology*, 2016, 36(1): 39-49, Olivia M Y, Miyamoto S, Brown J H.
- [26] Extensive phosphorylation of AMPA receptors in neurons[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(33): E4920-E4927, Diering G H, Heo S, Hussain N K, *et al*.
- [27] The transmembrane region of guard cell SLAC1 channels perceives CO₂ signals via an ABA-independent pathway in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(2): 557-567, Yamamoto Y, Negi J, Wang C, *et al*.
- [28] The Hippo pathway mediates inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by cAMP[J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2016, 90: 1-10, Kimura T E, Duggirala A, Smith M C, *et al*.
- [29] Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice[J]. *Molecular and cellular biology*, 2016, 36(4): 585-595, Kaizuka T, Mizushima N.
- [30] The ChrSA and HrrSA two-component systems are required for transcriptional regulation of the hemA promoter in *Corynebacterium diphtheriae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016: JB. 00339-16, Burgos J M, Schmitt M P.
- [31] Intergenic Variable-Number Tandem-Repeat Polymorphism Upstream of rocA Alters Toxin Production and Enhances Virulence in *Streptococcus pyogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(7): 2086-2093, Zhu L, Olsen R J, Horstmann N, *et al*.
- [32] Receptor for advanced glycation end products (RAGE) knockout reduces fetal dysmorphogenesis in murine diabetic pregnancy[J]. *Reproductive Toxicology*, 2016, 62: 62-70, Ejdesjö A, Brings S, Fleming T, *et al*.
- [33] Aurora kinase-induced phosphorylation excludes transcription factor RUNX from the chromatin to facilitate proper mitotic progression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(23): 6490-6495, Chuang L S H, Khor J M, Lai S K, *et al*.
- [34] Quantitative phosphoproteomics of protein kinase ShRK1 regulated protein phosphorylation in Arabidopsis under submergence[J]. *Journal of experimental botany*, 2016: erw107, Cho H Y, Wen T N, Wang Y T, *et al*.
- [35] Temporal regulation of lipin activity diverged to account for differences in mitotic programs[J]. *Current Biology*, 2016, 26(2): 237-243, Makarova M, Gu Y, Chen J S, *et al*.



上述试剂仅供实验研究用,不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako; <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片 and 光 (广州) 贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002、3003、3011室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询

