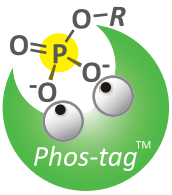
Wako

和光纯药工业
Phos-tag® SDS-PAGE 实验指导手册

第5版　2017年7月



改良型 Phos-tag® SDS-PAGE 实验流程

Zn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE (p.6、p.10-12)

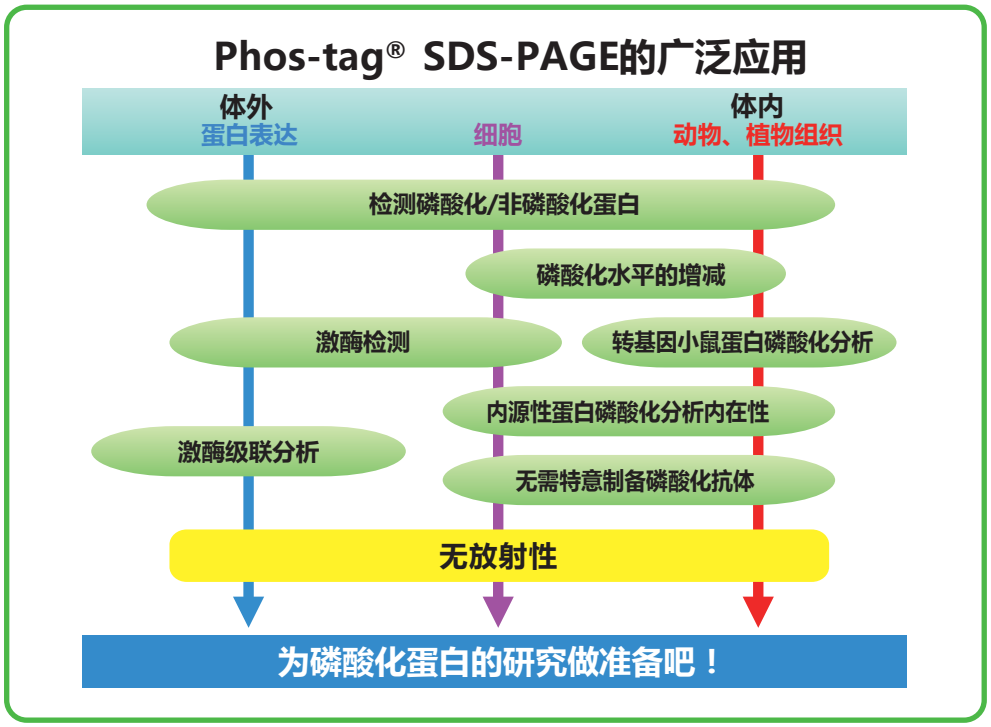
http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/

Phos-tag®

Wako

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

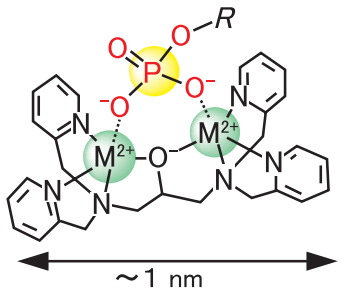


1．Phos-tag® 简介

■ Phos-tag®

Phos-tag® 是一种能与磷酸离子特异性结合的功能分子，可与以碱性磷酸酶的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® Acrylamide）、检测（Phos-tag® Biotin）、MS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

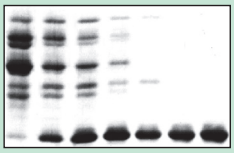
M^{2+}：锌离子或锰离子

- 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

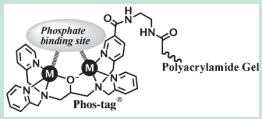
Phos-tag® 由日本广岛大学研究生院医齿药学综合研究科医药分子功能科学研究室开发。
http://www.phos-tag.com/

分离 SDS PAGE进行分离

只需与SDS-PAGE 凝胶混合
Phos-tag® Acrylamide





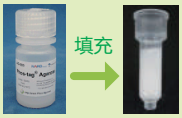


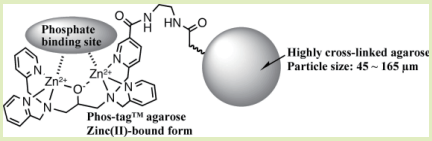
含 Phos-tag® 预制胶
SuperSep™ Phos-tag®



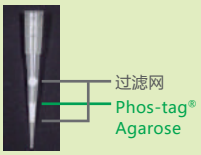
纯化 凝胶色谱纯化

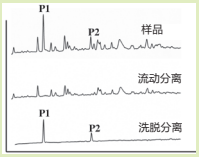
实验操作在生理环境下进行 (pH 7.5)
Phos-tag® Agarose





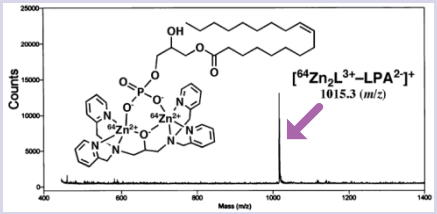
即用型磷酸化多肽纯化枪头
Phos-tag® Tip





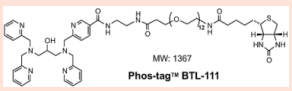
MS MALDI-TOF/MS 分析

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





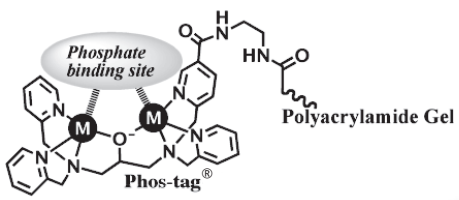
2．Phos-tag® SDS-PAGE

Phos-tag® SDS-PAGE简介

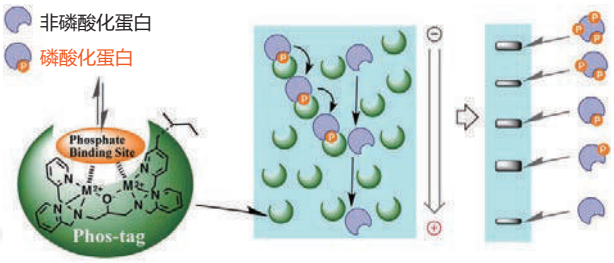
Phos-tag® SDS-PAGE通过电泳，根据磷酸化水平不同可分离磷酸化和非磷酸化蛋白。分离后的凝胶可用于各种染色、Western Blotting和质谱分析（MS）等后续实验。Phos-tag® SDS-PAGE凝胶，只需在常规SDS-PAGE胶中加入 Phos-tag 分子与Acrylamide 结合而成的 Phos-tag® Acrylamide 和2价金属（$MnCl_2$ 或$ZnCl_2$）即可实验。

Phos-tag® SDS-PAGE 原理

【Phos-tag® Acrylamide的结构】



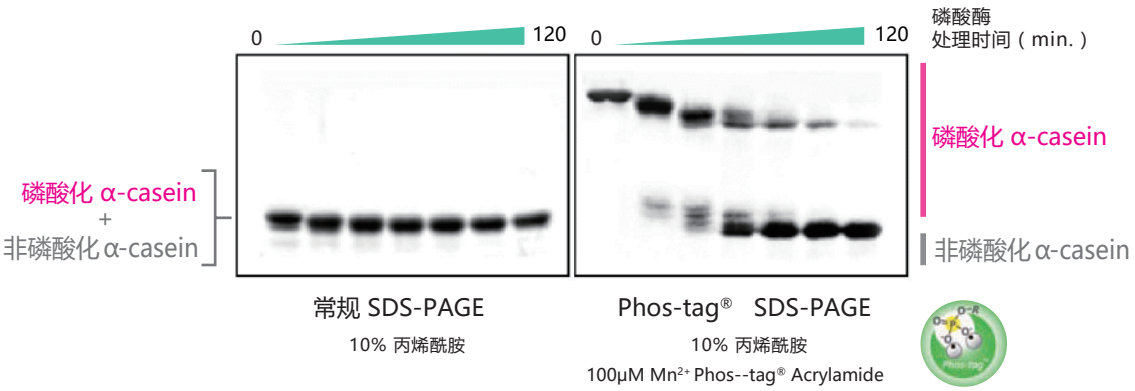
不同数目及位点
磷酸化修饰的蛋白亚型也可被
分离开来



1、电泳中的磷酸化蛋白捕获2个2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
（磷酸化部位的个数相同但位置不同也能分离开来）

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：0-120min）。



产品编号	产品名称	包装	保存	备注
304-93526	Phos-tag® Acrylamide 5mM 水溶液	0.3 mL（相当于0.9mg）	冷藏	已配制的水溶液类型
300-93523	Phos-tag® Acrylamide	2 mg		用乙醇、水配制
304-93521		10 mg		

■ Phos-tag® SDS-PAGE的特点

◆ 任何氨基酸残基的种类/位置都可使用

・可用于未知磷酸化分析
・可用于检测无市售的磷酸化抗体的磷酸化部位

◆ 可分离不同的磷酸化部位个数/位置的磷酸化蛋白

・可知磷酸化程度、磷酸化形式

◆ 同时检测磷酸化/非磷酸化蛋白

・可定量检测各磷酸化蛋白
・简易得知有无磷酸化

◆ 无放射性，无需特别仪器（有SDS-PAGE试剂和装置即可操作）

・简便低耗

◆ 电泳后可进行WB，MS分析，可进行二维电泳

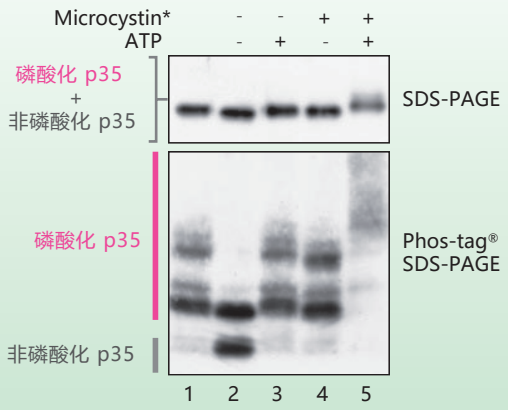
・WB：可分析内源性蛋白（相关应用数据：p.18 ③, ④、p.19 ⑤，⑥）
・MS：可知各磷酸化蛋白的磷酸化部位组成
（相关应用数据：p.17 ①，②）
・二维电泳：可分离等电点相同（磷酸化位数相同、分子量相同）的不同磷酸化蛋白
（相关应用数据：p.17 ②）

Phos-tag® SDS-PAGE 的 WB 实例

样品：大鼠脑提取液
检验： 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（一种磷酸化抑制剂）

【数据提供】
理化学研究所 脑科学综合研究中心 细川智永

Quantitative Measurement of ***in vivo*** Phosphorylation States of Cdk5 Activator p35 by Phos-tag SDS-PAGE
T. Hosokawa, T. Saito, A. Asada, K. Fu kunaga, and S. Hisanaga
Md. 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	Ala 替代品 +WB	ImmunoStar® series	p.18 ④
	纯化蛋白质	重组蛋白 + MS 免疫沉淀 + MS	银染MS试剂盒 nanoLC-MS/MS	p.17 ①, ②
同时检测（定量）各磷酸化蛋白	裂解液	WB	ImmunoStar® series	p.18 ④、p.19 ⑤, ⑥
	纯化蛋白质	CBB染色，银染等	QUICK CBB PLUS 银染MS kit等	p.17 ①, ②
是否磷酸化	裂解液	WB	ImmunoStar® series	p.18 ③、p.19 ⑤, ⑥
进一步分离	免疫沉淀样品	二维电泳	QUICK CBB PLUS 银染MS kit等	p.17 ②
寻找目标蛋白激酶的抑制剂	裂解液	柱层析 + WB	ImmunoStar® series	p.18 ③
	纯化蛋白质	重组激酶+ CBB染色，银染等	激酶指南 抑制剂指南①	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）。

→详细请看P13

◆ 电泳速度变慢

Phos-tag® SDS-PAGE与普通SDS-PAGE相比，非磷酸化蛋白电泳速度较慢。

→详细请看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。

→详细请看P21

使用市售预染marker也是条带弯曲的原因。建议用目的蛋白的重组蛋白或去磷酸化的样品代替。

→详细请看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。

→详细请看P12

◆ 普通SDS-PAGE也同时进行

进行Phos-tag® SDS-PAGE时，普通SDS-PAGE作为对照组也一起进行。Phos-tag® SDS-PAGE检测出复数的条带时，需要判断目的蛋白是磷酸化还是分解形成的。

3．实验流程

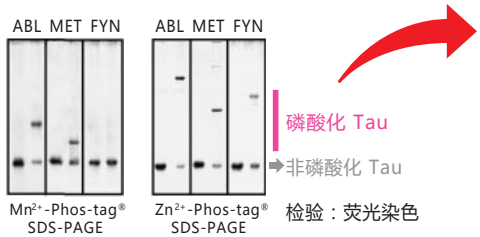
■ 两种Phos-tag® SDS-PAGE

Phos-tag® SDS-PAGE凝胶根据Phos-tag® 分子与2价金属离子结合的种类，分成以下2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	・部分蛋白质无法分离 ・凝胶需现配
Zn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE	・分离能力高 ・可分离的蛋白质和磷酸化形式多 ・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



80 μM Phos-tag® Acrylamide, 7.5 % 聚丙烯酰胺凝胶

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】
泳道左侧：非磷酸化Tau
泳道右侧：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] Mn^{2+}Phos-tag® SDS-PAGE ※凝胶请现配

①试剂准备

：此图标表示为即用型试剂。请参考“10. 相关产品”。

丙烯酰胺溶液

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

→加入蒸馏水定容至 100mL，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）



分离胶
Tris-HCl缓冲液
pH 8.8

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

Tris 碱
(MW：121, p*Ka*= 8.2 20℃) ……18.2 g

6.0 mol/L HCl
(0.19 等量Tris)…… 4.85 mL

→加蒸馏水至 100mL。
【保存条件】 4℃

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



浓缩胶
Tris-HCl缓冲液
pH 6.8

Sol. C ：0.50 mol/L Tris/HCl 缓冲溶液, pH 6.8 (4x 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



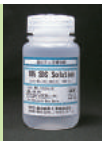
SDS 溶液

Sol. D ：10% (w/v) SDS溶液

SDS …… 10.0 g
蒸馏水 …… 90 mL

→搅拌，加蒸馏水至100mL
【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®
丙烯酰胺溶液
提供溶液即用型溶液

（见P4
产品编号：304-93526）

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）

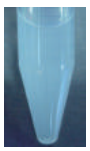
本产品 Phos-tag® Acrylamide用0.1 mL
甲醇完全溶解在一个小胶管中。
↓
该溶液需加入 3.2 mL 蒸馏水稀释。



Phos-tag®Acrylamide

也可只用蒸馏水溶解，但溶解缓慢，用时较长。40℃加热，使用超声波清洗机可更好溶解。

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，用离心管离心分离取上清即可



刚混合后

【保存条件】铝箔遮光，4℃遮光

$MnCl_2$溶液

Sol. F：10 mmol/L $MnCl_2$ 溶液

$MnCl_2(H_2O)_4$ (MW：198) ····· 0. 10 g

蒸馏水 ····· 50 mL

注）不要使用其它阴离子盐，比如$Mn(NO_3)_2$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Mn^{2+}的功能也会被破坏。

APS溶液

Sol. G：10% (w/v) 过硫酸铵溶液

※ 现配现用

$(NH_4)_2S_2O_8$（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



电泳缓冲液

Sol. H：电泳缓冲液, pH 8.3（10x 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，无需加酸或加碱调节pH。

【保存】4℃

产品编号：184-01291
电泳缓冲液（×10）（1L）



使用前，取450 mL 蒸馏水+ 50 mL Sol. H 混匀即可。

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



上样缓冲液

Sol. I：S上样缓冲液（3x 溶液）

溴酚蓝 (BPB) ····· 1.5 mg

SDS ····· 0.60 g

甘油 ····· 3.0 mL

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

2-巯基乙醇 ····· 1.5 mL

→加蒸馏水至 10mL。

【保存】-20℃

【使用方法】参考④样品准备

产品编号：191-13272
上样缓冲液（2ME+）
（×4）（25 mL）
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 固定液 (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（250mL）
产品编号：178-00551
Quick CBB PLUS（1L）



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，您可以采用常规实验浓度。

分离胶溶液

12% 聚丙烯酰胺凝胶、50μmol/L Phos-tag® Acrylamide 10mL

- 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（四乙基乙二胺）……10 μL *2)
- 蒸馏水 ……3.14 mL

＜搅拌2分钟，去除空气＞

- Sol. G：10%（w/v）过硫酸铵溶液 ……20～50μL *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。
优化Phos-tag® Acrylamide 浓度与丙烯酰胺溶液浓度。
详细请看P16“5.Phos-tag® SDS-PAGE条件优化”。

③ 浓缩胶配制

浓缩胶溶液

10 mL 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（20μL）
- TEMED（四乙基乙二胺）……10μL（2μL）*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……20～50μL（4～10μL）*2)

※ SDS不是必须加进分离/浓缩胶。含有SDS的凝胶，蛋白质条带更宽，可能有拖尾。

〈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。

②'含琼脂糖低浓度分离胶配制

分离胶溶液

（制备10 mL 20μmol/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® 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H *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℃

在变硬之前直接把琼脂糖倒进制胶容器。

Agarose H（高强度型）
产品编号：315-01203（1g）
产品编号：319:01201（10g）
产品编号：317-01202（25g）



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（20μL）
TEMED（四乙基乙二胺）	10μL（2μL）*2)
蒸馏水	3.01 mL（602μL）
1.5%(w/v)Agarose H *3)*4)	3.33 mL（666μL）
Sol. G：10%（w/v）过硫酸铵溶液	50μL（10μL）*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）溶液冷却至室温。
3）加入上样缓冲液（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，透析处理等去除杂事。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 (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 60 mA 的条件进行电泳。

※进行Western Blotting，质谱分析时，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] Zn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE

※凝胶配制3个月仍可使用

NEW!

Mn^{2+}-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Zn^{2+}-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

：此图示为即用型试剂。相关产品信息参考“10.相关产品”。

丙烯酰胺溶液
SDS 溶液
Phos-tag®
Acrylamide 溶液
APS 溶液

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

参考[I] Mn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE

氯化锌溶液
也可使用
10 mmol/L $Zn(NO_3)_2$

Sol. M：10 mmol/L $ZnCl_2$ 溶液 ※现配现用

$ZnCl_2$（MW: 136, 纯度 98 % 以上）	0. 70 g
蒸馏水	500 mL

注）$ZnCl_2$具有潮解性，请使用新品。溶液中如有ZnO等杂物，过滤后使用。

Bis-Tris - 盐酸溶液

Sol. N：1.4 mol/L Bis-Tris/HCl 溶液，pH 6.8（4x 分离胶溶液）

Bis-Tris 碱（MW: 209, pKa=6.5 at 20℃）…… 29.9 g

6.0 mol/L HCl (0.42 等效 Bis-Tris)…… 10 mL

加蒸馏水至100 mL 【保存条件】4℃

亚硫酸氢钠溶液

Sol. O：0.5 mol/L 亚硫酸钠溶液

$NaHSO_3$（FW：106）…… 5.3 g

加蒸馏水至100 mL 【保存条件】4℃（密封保存）

电泳缓冲液

Sol. P：电泳缓冲液，pH 7.8（5x 溶液）

Tris 碱 (FW: 121, p*K*a = 8.2 at 20℃, 0.50 mol/L) …… 30.3 g

MOPS (FW: 209, p*K*a = 7.2 at 20℃, 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℃

电泳缓冲液 ※现用现配

Sol. P：电泳缓冲液， pH 7.8（5x 溶液）…… 100 mL

Sol. O：0.5 mol/L 亚硫酸钠溶液 …… 5 mL

加蒸馏水至500 mL。

分离胶溶液

（例如配制10mL 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（四乙基乙二胺）…… 10 μL *2)

蒸馏水 …… 3.24 mL

＜搅拌2分钟，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）

*2) TEMED 与Sol.G使用普通浓度。此处添加量为同一个例子。

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。优化Phos-tag® Acrylamide浓度与丙烯酰胺溶液浓度。
详细请看P16 “5.Phos-tag® SDS-PAGE条件优化”。

浓缩胶

10 mL（2mL） 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. N：1.4 mol/L Bis-Tris/HCl 溶液，pH 6.8 …… 2.50 mL（0.50 mL）

TEMED（四乙基乙二胺）…… 10 μL（2 μ L）*2)

蒸馏水 …… 5.94 mL（1.19 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)

※ 分离/浓缩胶无需添加SDS。

“样品配制”，“电泳”，“CBB染色与脱色”请参考[Ⅰ]Mn^{2+}-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Zn^{2+}从Phos-tag® 分子解离。在样品缓冲液加入1mM左右的$ZnCl_2$，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 >

通常[Ⅱ]Zn^{2+}-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%）分子失去原有效果，条带弥散。在3%或4%的低浓度聚丙烯酰胺进行Zn^{2+}-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200kDa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	·50mM Tris　·0.1%(w/v) SDS ·50mM Tricine　·5.0 mM 亚硫酸氢钠	·100mM Tris　·0.1%(w/v)SDS ·100mM MOPS　·5.0 mM 亚硫酸氢钠
浓缩/分离胶缓冲液	·200mM Tris-AcOH（pH7.0）	·357 mM Bis-Tris-HCl（pH 6.8）
上样缓冲液	·普通Laemmli系	·普通Laemmli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Mn^{2+}/Zn^{2+}。根据转膜装置的种类选择下述操作。也可参考P14。

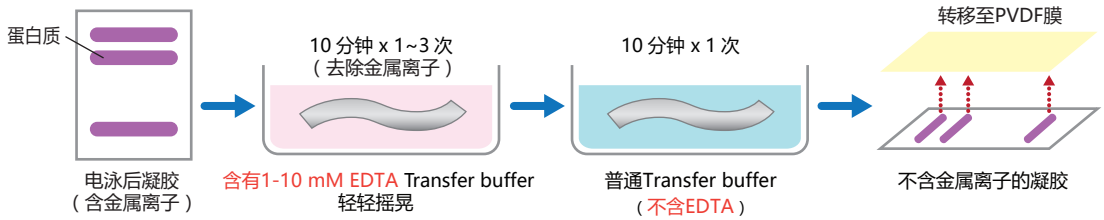
① 采用半干法

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 ×2）。
※ 除了 Transfer Buffer 外，也可使用 1×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）。

※ 需要对整个实验操作进行优化，如时间、温度等。



注意　若高浓度Zn^{2+}-Phos-tag® 凝胶（如100μM 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

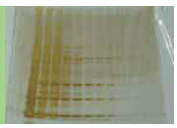
使用含0.1% Transfer buffer。tank法使用含有SDS的 Transfer buffer，可省去EDTA处理。蛋白质有可能从膜上脱离。SDS最适宜浓度为0.05-0.2%。

产品编号：019-25111
AqueBlot™ 10×Tris-Glycine-SDS Transfer Buffer
(1 L, 0.05% SDS)

◆质谱分析

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“样品的处理”

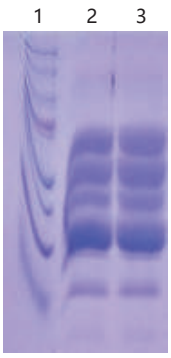
样品状态很大程度上影响着电泳结果。注意以下事项处理样品。

- 混进有影响物质：必须防止EDTA。市售抑制剂也可能含有混合物或buffer类物质。也要去除培养基成分。
- 样品状态：避免使用繁殖过度开始融合的细胞的裂解液等粘性高的样品（稀释也得不到改善）。
- 统一样品buffer成分：减少凝胶上样的各样品buffer成分的差别。特别是使用经磷酸处理的样品、marker。除螯合剂、表面活性剂之外等，$MnCl_2$、$ZnCl_2$的浓度也有影响。

如无改善建议注意以上事项再次处理样品。

■ 常见疑难问题（原因与解决方法）

〈问题〉 〈可能原因〉 〈解决方法〉



1. 其他公司预染 marker
2. β -casein
3. β -casein

含有螯合剂的预染marker条带弯曲，隔壁样品泳道也受到影响

条带弯曲

- TCA沉淀后再溶解建议使用以下样品buffer。
- 含尿素1×样品buffer（成分：65 mM Tris-HCl（pH 6.8），2.0% LDS（lithium lauryl sulfate，）100 mM DTT，10% glycerol，0.01% BPB，6M尿素）
  ※不加热。
- 2×样品buffer

** 切断造成粘性的DNA。

*** 请用少量样品进行透析检测。

样品中混入EDTA等螯合剂，钒酸，无机盐、表面活性剂等

- （如原因为螯合剂）不使用预染marker，在样品中添加1 mM的$MnCl_2$或$ZnCl_2$。
- 经过TCA沉淀*、透析***等处理样品
- 检测buffer类、抑制剂混合物等成分

样品具有粘性

- 充分煮沸**（例，10min），再次处理样品。使用繁殖过度开始融合的细胞有粘性。即使稀释也得不到改善。

样品呈酸性

- 添加样品buffer后，呈黄色-橙色时，添加1M Tris中和（蓝紫色）。

有空白泳道，泳道间具有梯度差

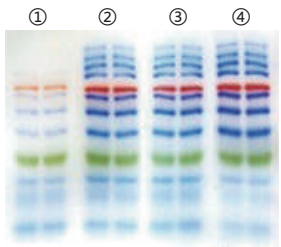
- 空白泳道上样与样品等量的1×样品buffer，泳道间不要有梯度差。

〈问题〉 〈可能原因〉 〈解决方法〉

- 条带弥散
  - 电泳温度高
    - 低电流・长时间进行电泳
    - 低温环境进行电泳
  - 目的蛋白质移动速度过快（移动距离过大容易弥散）
    - 调整凝胶浓度使目的蛋白质检测位置在凝胶上半部分
- 转膜困难
  - 没有充分去除$MnCl_2$、$ZnCl_2$
    - 延长EDTA处理时间，增加含EDTA buffer的交换次数
    - EDTA 处理时剧烈震荡
  - 凝胶硬
    - 降低丙烯酰胺浓度
    - 降低Transfer Buffer中甲醇浓度
  - 高浓度Zn^{2+}-Phos-tag®（例.100μM）
    - 将含EDTA Transfer Buffer添加至0.5-2% SDS

探讨以下方法
- 电流过强（例 200mA）。

半干式转膜后的膜



① 无EDTA处理
② 1 mM EDTA 10分钟2次
③ 10 mM EDTA 10分钟1次
④ 10 mM EDTA 10分钟2次

【样品】WIDE-VIEW TM Prestained Protein Size Marker Ⅲ（产品编号230-02461等）
【凝胶】SuperSep™ Phos-tag® (50 μmol/L),12.5%,13 well（产品编号196-16701）

* 不经过EDTA处理，转膜效率显著低下。（①与②③④比较得出）。
建议1-10mM EDTA 一次10分钟，重复2次。
处理时间与含EDTA的交换次数尤为重要。

〈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

- 凝胶中Phos-tag® Acrylamide 与金属离子（$MnCl_2$或$ZnCl_2$）的摩尔比变大。（例如1:4）。
- Tris-Tricine 缓冲液用作电泳缓冲液。
- （Mn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE）Zn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE需要探讨
- 重新调整试剂。

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复，无法获取磷酸化蛋白。免疫沉淀提纯目的蛋白时，建议使用多克隆抗体。
- 样品状态异样
  处理细胞裂解液时，使用PBS 洗涤有可能对磷酸化状态产生影响。去除培养基后，直接加入TCA。
- 凝胶有问题，但无法判断样品是否有问题。
  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，牛奶源，去磷酸化，1mg）。本产品可当作样品，进行普通SDS-PAGE.
- Phos-tag® Acrylamide 无法溶解
  加入甲醇或水后，加热至40℃，使用超声波清洗机，就能变得容易溶解。
- 不同泳道分离能力、电泳速度各不相同
  不同样品，与Phos-tag®活性相关物质的浓度可能区别很大（EDTA、Mn^{2+}、Zn^{2+}等）。建议处理时，样品间浓度差尽可能减小。
- 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绷带等（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
  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‘-四甲基乙二胺的比例增加凝胶的硬度。（例.24:1）
  ②凝胶浓度不足5%：
  添加琼脂糖增加凝胶的硬度。具体请参考“3.实验流程”的[Ⅰ]-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

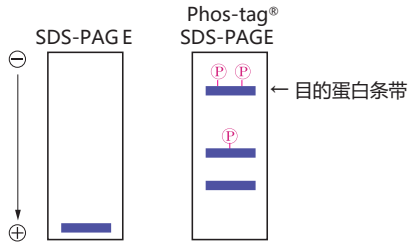
为了保证Phos-tag® PAGE的分离效率, 需要优化丙烯酰胺和Phos- tag® Acrylamide的浓度。
第一步要优化丙烯酰胺的浓度，其次是Phos-tag® Acrylamide浓度。

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值为标准。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，此时的丙烯浓度最适合进行凝胶电泳。

【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少于 4%时，可添加琼脂糖以增加凝胶硬度。有报道认为能分离350kDa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

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 μM → 50 μM → 100 μM

【细胞裂解液】

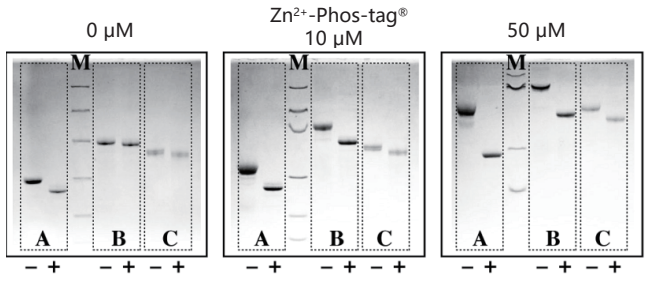
样品为细胞裂解液时，Phos-tag® Acrylamide 从低浓度20μM开始摸索，提高至100μM，将凝胶浓度设定为磷酸化与非磷酸化蛋白的迁移距离差变大的浓度。

（数据提供：香川大学 农学部 应用生物科学科 杉山康宪）

Phos-tag® 浓度与分离能力，迁移距离的关系

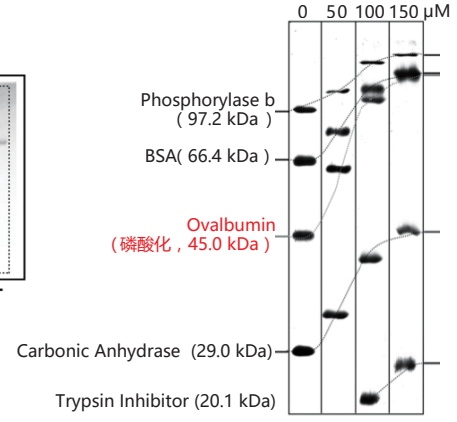
通常情况下，浓度较高时分离能力更好。但是高浓度会降低蛋白（包括磷酸化蛋白）泳动速度。有时由于蛋白浓度较低，相同时间低浓度的Phos-tag® 分离能力反而更好。结果根据蛋白质种类来决定。建议从低浓度开始摸索。

【Phos-tag® 浓度与分离能力】



A: β-casein, B: Ovalbumin, C: Pepsin, M: Marker
+：磷酸化蛋白（A：5处，B：2处，C：1处）
−：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 → 分离能力高

Phos-tag®浓度高 → 移动距离小

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®

——东京大学研究院医学研究科　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的分离比较



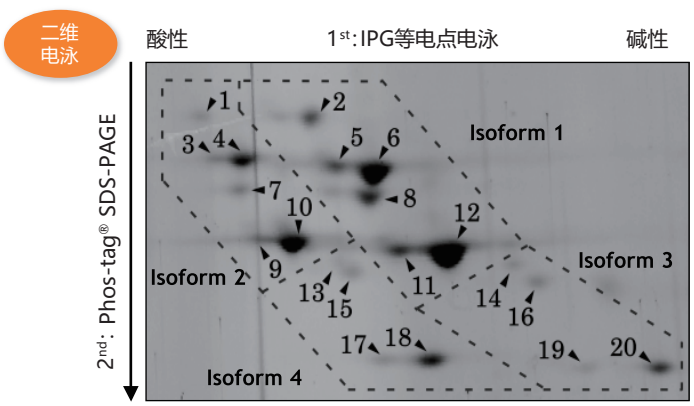
7.5% acrylamide, 75μMPhos-tag®acrylamide, 150μM $Zn(NO_3)_2$

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。以此信息作为线索运用到质谱分析进行详细的分析，能确认各激酶特异性磷酸化部位。

（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（pH4.7-5.0），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蛋白。



hnRNP K：不均一核糖核蛋白K

p-Ser116/p-Ser284（spots 1,2）
p-Ser116（spots 3.4,5,6）
p-Ser284（spots 7,8）
磷酸化版本

非磷酸化蛋白（spots 9，10,11,12）

※每个异构体来源于剪切后的变异体
异构体 1,3：C末端：SGKFF
异构体 2,4：C末端：ADVEGF
异构体 3,4：外显子缺少一个

25 μM Mn^{2+}-Phos-tag® Acrylamide, 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶

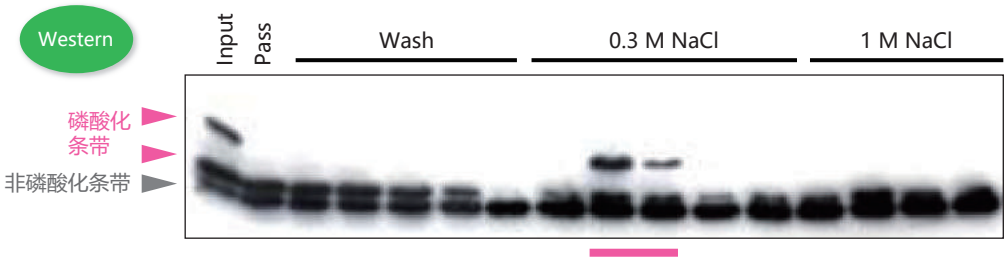
同一个等电点的位置上，不同位点发生磷酸化都可以被区分开来
（例．spots 6,与8,4与7）

【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科 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

Dnmt1：DNA甲基转移酶



含有磷酸化GST-Dnmt1 (1-290)酶的片段　20 μM Mn^{2+}Phos-tag® Acrylamide 6% 聚丙烯酰胺凝胶

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0.3M和1M NaCl 洗脱DNA纤维素柱获得目的蛋白

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

（检验：抗小鼠Dmnt1（72-86）抗体）

详细解说请看网络研讨会！

确定DNA甲基转移酶磷酸化蛋白激酶



https://www.youtube.com/watch?v=Ks7qlzRKHx4&feature=youtu.be

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.

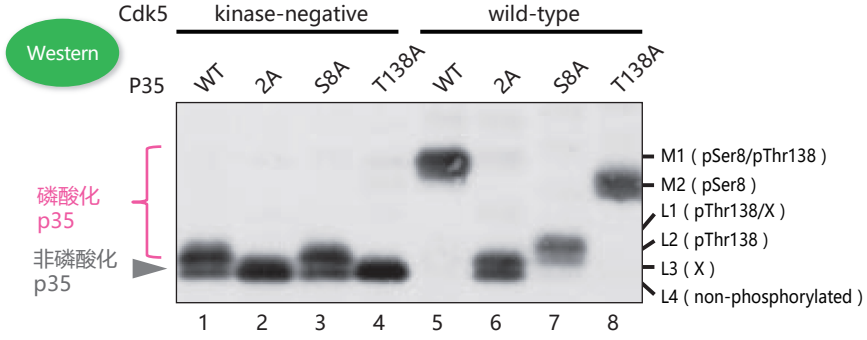
【数据提供】

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）。



100 μM Phos-tag® Acrylamide, 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶

泳道1（条带L2和L4）和泳道5（条带M1）：p35 在 Cdk5 的作用下发生了磷酸化；

泳道1（条带L2和L4）和泳道3（条带L2和L4）：在无激酶活性Cdk5的作用下，大约有一半p35蛋白在Thr138位点发生磷酸化，同样在138位发生突变的p35蛋白亦是如此。

泳道5（条带M1）和泳道6（条带L3和L4）：Ser8和Thr138是主要的磷酸化位点；

泳道5（条带M1）、泳道7（条带L1和L2）和泳道8（条带M2）：

条带M1是Ser8和Thr138都发生磷酸化的条带；

条带M2是只有Ser8磷酸化的条带；

条带L1和L2是只有Thr138磷酸化的条带

※ 条带L1和L3中的X是不确定哪个位点发生磷酸化的条带；

※ 条带L4是非磷酸化的p35。

可明确磷酸化位点和条带迁移率的关系！

【参考文献】

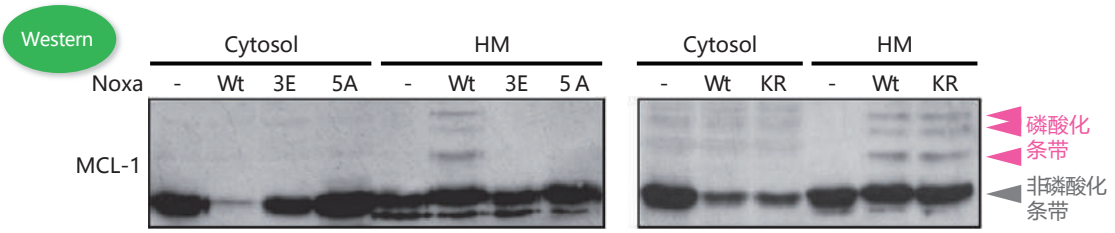
Quantitative Measurement of in Vivo Phosphorylation States of Cdk5 Activator p35 by Phos-tag ™ SDS-PAGE. T.Hosokawa, T. Saito, A. Asada, K. Fukunaga, and S. Hisanaga, *Mol. Cell. Proteomics*, Jun 2010; **9**: 1133 - 1143.

【数据提供】

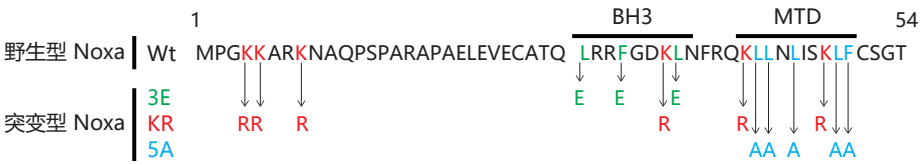
理化学研究所 脑科学综合研究中心 回路功能研究核心 记忆功能研究团队 细川智永（Dr. T. Hosokawa）
首都大学东京 理工学研究科 生命科学专业 神经分子功能研究室 久永真市（Dr. S. Hisanaga）

⑤野生型/突变型 Noxa 表达中的 MCL-1磷酸化水平变化

野生型（wt）及突变型（3E，KR，5A）的Noxa在肺小细胞癌细胞株H209细胞表达，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。



25 μM Mn^{2+}Phos-tag® Acrylamide，10%聚丙烯酰胺凝胶



MTD：线粒体靶向域 mitochondrial targeting domain

在表达野生型和KR突变型Noxa的H209细胞线粒体中，
MCL-1的磷酸化水平上升。

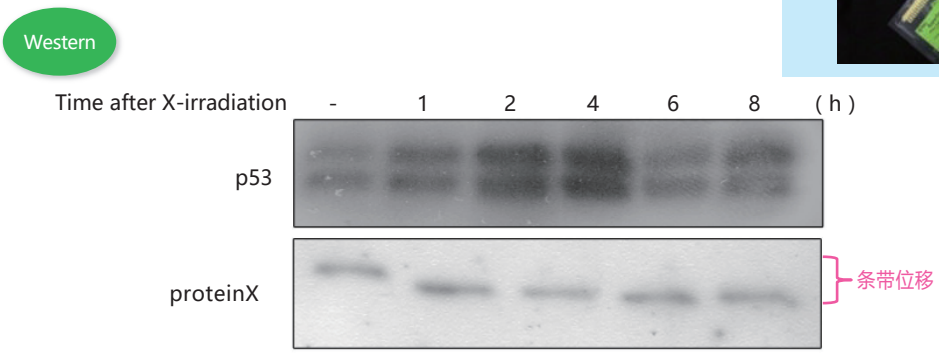
【参考文献】
Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer.
Wataru Nakajima, Mark A. Hicks, Nobuyuki Tanaka, Geoffrey W. Krystal, and Hisashi Harada
Cell Death and Disease（2014）5, e1052; doi:10.1038/cddis.2014.6
【数据提供】 日本医科大学 先进医学研究所 基因控制部门 中嶋亘

⑥p53 和proteinX经过X射线照射后磷酸化状态随时间的变化

人肺癌源Lu99细胞使用X射线（5Gy）照射，一定时间回收细胞。配制细胞提取液，使用SuperSep Phos-tag®（50μmol/L）（10%，13孔）进行SDS-PAGE。用含10mM EDTA Transfer Buffer处理凝胶，转膜至PVDF膜。用2% Milk/TBS-T对膜进行封闭后，与一抗反应（上段：p53，下段：细胞周期相关蛋白 proteinX）。再进行化学显色试剂检测。

SuperSep™Phos-tag®
使用数据





SuperSep™ Phos-tag®（50μmol/L）10%，13孔

在X射线照射下，p53的累积在4小时后达到最高，proteinX
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

- 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
- 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
- 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

Mn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE

- 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
- Regulation of PKD by the MAPK p38d 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. R orsman, and R. Ricci1
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolicmaturation in mice, *Science*, Dec 2015;**350**: aad2459., Guohua Gong, Moshi Song, Gyorgy Csordas, Daniel P. Kelly, Scot J. Matkovich,and Gerald W. Dorn, II

Zn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE

- 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
- 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 CElston, and Henrik G. Dohlman
- Mechanism of Activity-Dependent Cargo Loading via the Phosphorylation of KIF3A by PKA and CaMKIIa., *Neuron*. 2015 Sep 2;**87** (5):1022-35., Ichinose S, Ogawa T,and Hirokawa N.
- 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®

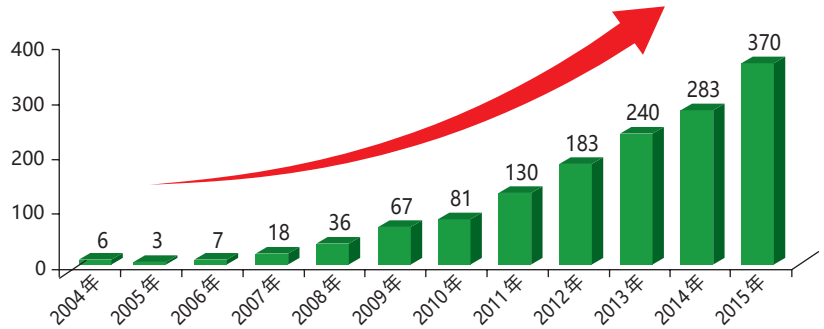
- A laborsaving, timesaving, and more reliable strategy for separation of low-molecular-mass phosphoproteins in Phos-tag affinity electrophoresis. *Int. J. Chem.* **4**, 1-8 (2012), Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., and Koike, T.
- In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity, *J. Cell Biol.*, Jul 2014; **206**: 113 - 127., Sei Kuriyama, Eric Theveneau, Alexandre Benedetto, Maddy Parsons, Masamitsu Tanaka, Guillaume Charras, Alexandre Kabla, and Roberto Mayor
- 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 调查

※不含专利・引用部分

检索 Phos-tag



7．Q&A

Phos-tag® Acrylamide

检　测

Q. 可定量检测磷酸化蛋白吗？

A. 通过定量性质的染色剂（考马斯亮蓝等），可定量检测条带浓度。

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。可在低浓度Acrylamide加入琼脂糖。详细请参考“3.实验流程”的[I]-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. 除了CBB以外，凝胶可以用其他方法染色吗？

A. 可以，可用阴性染色、银染、荧光染色。

使用次数

Q. 包装内有多少块凝胶？

A. 取决于使用浓度。请参考右表。

※ 凝胶厚1mm，宽9cm，长7.7cm

Phos-tag®	20 μM	50 μM	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	—

凝胶的使用期限

Q. 配制含Phos-tag® 凝胶后能否保存？

A. Mn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE凝胶无法保存。配制凝胶后，当天使用。

Zn^{2+}-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®？

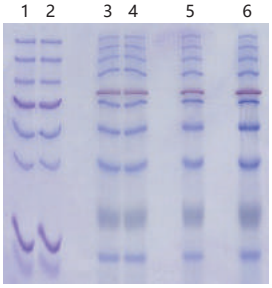
A. 可以仅用水溶，只是比溶解在含甲醇的水中时间长些。若不能完全溶解，离心，取上清使用。

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。请单独留出一泳道上样1 x 样品缓冲液。

图1. 预染色marker的比较



1、2　：其他公司的预染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 x 样品缓冲液（5 μL）
凝胶　：SuperSep™ Phos-tag®（50 μM），12.5%（20mA电流）

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。使用临界量仍未清楚。

预制胶的使用

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“8.SuperSep™ Phos-tag®”）。

复数条带的解释

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. 可以。参考以下文献：

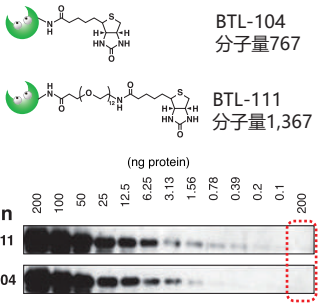
- A SNP genotyping method using phosphate-affnity polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 361 , 294-298 (2007), E. Kinoshita, E.Kinoshita-Kikuta, and T. Koike (The phosphate group at DNA-terminal is effciently captured by Zn^{2+}-Phos-tag.)
- A mobility shift detection method for DNA methylation analysis using phosphate affnity 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. 连接链(Linker)的长度不同。BTL-111灵敏度更高。



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”。

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”

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. 可定量检测磷酸化蛋白吗？

A. 根据条带的浓度可以进行半定量分析。

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。洗脱时会将甲醇带走，无法染色。

剥 除

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 0.1 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。

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 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® 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. 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。

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^{64}Zn 和^{68}Zn。
请参考以下建议：
摸索条件时使用101N，其中含有多种同位素，结果比较复杂；
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。（m/e差值8）

非磷酸分子的检测

Q. 为什么无法检测出非磷酸分子的峰？

A. 为了更好区分磷酸分子与非磷酸分子的离子化效率。含Phos-tag® 的样品溶液使用pH6-8的缓冲液，matrix、酚类类似弱酸性（THAP等）溶液，弱碱性的HAMAN等均适用。另外，普通阳性模式的多肽分析，所用样品溶液为酸性，matrix也为酸性。因此，磷酸化分子-Phos-tag®复合体的离子化效率急剧增加，而非磷酸化离子化效率变得很低。

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质谱分析？

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。
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。protocol推荐的洗脱缓冲液中盐浓度高。会使得条带弯曲，应使用SDS-PAGE样品缓冲液作为洗脱液。

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. 能用于His-tag 蛋白质纯化吗？

A. His-tag对Zn^{2+}亲和性弱，尽可能使用GST等其他种类tag。
有报道称使用Phos-tag® Agarose无法进行蛋白质纯化，但使用Zn^{2+}-Phos-tag® SDS-PAGE可分离His-tag蛋白质，Zn^{2+}比His-tag对Phos-tag® 有更高的亲和性。

Q. 在制备样品时，哪些试剂可用哪些试剂不可用？

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

- 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.
- 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.
- 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 Hioshi Itoh., *EMBO J.*, May 2012; 31: 2275 - 2295.
- Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling., Ning Liu, Masaki Matsumoto, Kyoko Kitagawa, Yojiro Kotake, Sayuri Suzuki, Senji Shirasawa, Keiichi I Nakayama, Makoto Nakanishi, Hiroyuki Niida, and Masatoshi Kitagawa., *EMBO J.*, May 2012; 31: 2365 - 2377.
- TGFβ-activated kinase 1（TAK1）-binding proteins（TAB）2 and 3 negatively regulate autophagy., Giichi Takaesu, Takashi Kobayashi, and Akihiko Yoshimura, *J. Biochem.*, Feb 2012; 151: 157 - 166.
- Arabidopsis heterotrimeric G protein β subunit, AGB1, regulates brassinosteroid signalling independently of BZR1., Daisuke T sugama, Shenkui Liu, and Tetsuo Takano., *J. Exp. Bot.*, Aug 2013; 64: 3213 - 3223.

Phos-tag® 质谱分析试剂盒

- 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.
- 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

- 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
- 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.
- 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® 是一种预制胶，含有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。全批次均经过出厂检验。

■ 产品规格

孔数	13	17
孔容积	30μL	25μL
Phos-tag® 浓度 $ZnCl_2$浓度	50μmol/L 100μmol/L	
板大小	100×100×3 mm	
凝胶大小	90×85×1 mm	

这款产品为预制胶，适合用于“EasySeparator™”电泳槽。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。



Easyseperator™



SuperSep™ Ace



SuperSep™ Ace Phos-tag®
（50μmol/L），12.5%，13孔

■ 使用例 -β-casein随时间的去磷酸化-

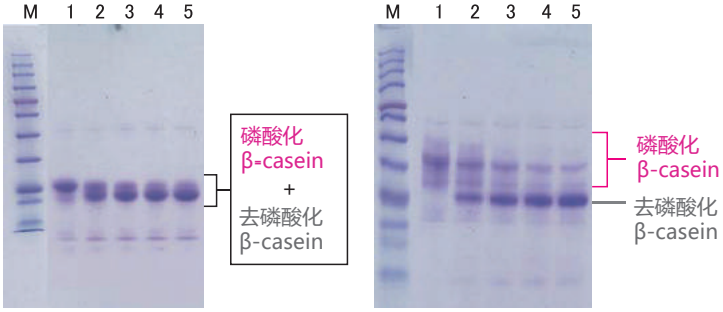
※WB的应用数据请看P19

SuperSep™ Ace
12%，13孔



SuperSep™ Ace Phos-tag®
12.5%，13孔





[电泳缓冲液]
Tris-glycine-SDS电泳缓冲液

[样品]
M：Wide-ViewTM Prestained Protein Size Marker III
1：0 分钟 β-casein（AP处理）
2：15 分钟 β-casein（AP处理）
3：30 分钟 β-casein（AP处理）
4：45 分钟 β-casein（AP处理）
5：60 分钟 β-casein（AP处理）

[电泳条件] 35 mA 恒定电流，60分钟
[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
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		
197-16851	SuperSep™ Phos-tag® (50 μmol/L), 17.5%, 13 well		
194-16861	SuperSep™ Phos-tag® (50 μmol/L), 17.5%, 17 well		
058-07681	Easyseperator™	1 Kit	室　温

SuperSep™ Ace 的列表请参考P29.

9．其他Phos-tag®系列产品

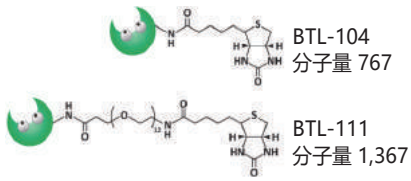
■ Phos-tag® Biotin

NARD institute,ltd.

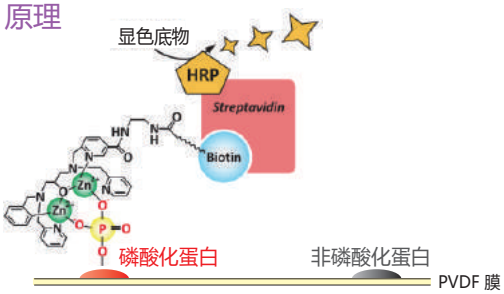
－检测Western Blotting磷酸化蛋白 -

Phos-tag® Biotin是与生物素结合的Phos-tag®，无需抗磷酸化抗体。可灵敏检测PVDF膜上的磷酸化蛋白。比BTL-111S1灵敏度更高。

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最佳选择
- 无需特别试剂、仪器

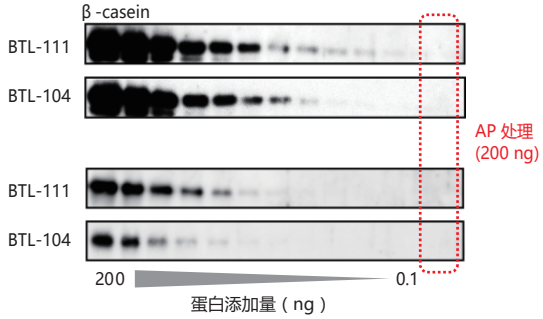


原理



与检测Western Blotting的抗磷酸化抗体同样的方法，检测PVDF膜上的磷酸化蛋白。

使用例 ～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

NARD institute,ltd.

- 用于MALDI-TOF/MS检测，提高检测灵敏度 -

与MALDI-TOF/MS的样品混合使用。用于检测阳性磷酸化分子-Phos-tag® 复合体，通常可提高小磷酸分子的检测灵敏度。3种试剂所含锌的种类不同。

备注：MALDI-TOF-MS（基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 英文名Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry）是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱，其无论是在理论上还是在设计上都是十分简单和高效的。

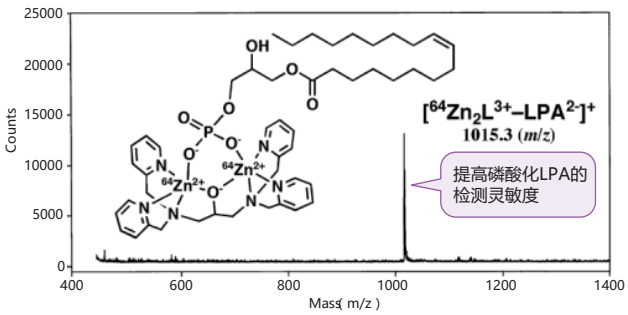
特 点
- 提高磷酸分子的检测灵敏度
- 不检测非磷酸分子
- 除磷酸化肽以外也适用于其他磷酸化分子

试剂盒内容	分子式	分子量	规格
Phos-tag® MS-101L	$[(C_{27}H_{29}N_6O^{64}Zn_2]^{3+}$	581.4	5 mg
Phos-tag® MS-101H	$[(C_{27}H_{29}N_6O^{68}Zn_2]^{3+}$	589.4	5 mg
Phos-tag® MS-101N	$[(C_{27}H_{29}N_6OZn_2]^{3+}$	584.3	10 mg

※请参考P23【3种试剂的使用区别】

使用例

～检测Phos-tag® -磷酸化LPA复合体～



LPA^{2-} : 1-oleoyl-L-α- lyzophosphatidate （分子量 434.2）

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

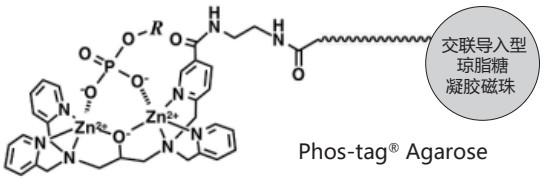
■ Phos-tag® Agarose

MANAC Incorporated

－亲和层析纯化磷酸化蛋白－

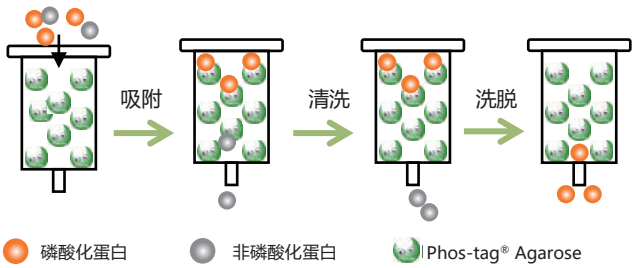
Phos-tag® Agarose是与琼脂糖结合的Phos-tag®，可分离、纯化、浓缩磷酸化蛋白和磷酸化多肽。

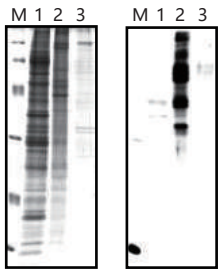
特 点
- 可在1小时内纯化磷酸化蛋白
- 可在生理条件下 (pH7.5)操作
- 不使用界面活性剂、还原剂



Phos-tag® Agarose

使用例 ～A431 细胞裂解液中的磷酸化蛋白纯化～





荧光染色　使用抗pTyr抗体检测

M: 分子量marker
1：未吸附层
2：吸附层
3：柱清洗层

结果确认磷酸化蛋白浓缩在柱吸附层里。

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

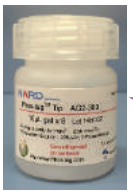
■ Phos-tag® Tip

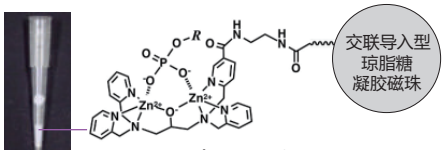
NARD institute,ltd.

－即用型浓缩磷酸化多肽的枪头－

Phos-tag® 填入琼脂糖的移液枪头，即用型磷酸化多肽前处理工具

特 点
- 操作时间< 30 min
- 高回收率
- 无需高价仪器

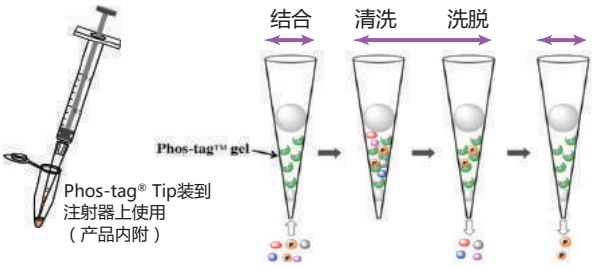

Phos-tag® Tip



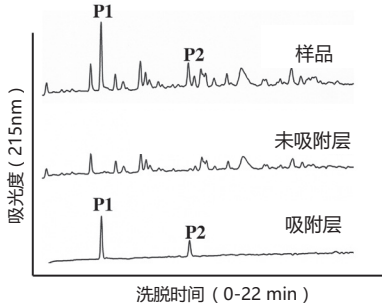
Phos-tag® Agarose

使用例子

～6 nmol β-casein 胰蛋白酶消化物的分离 ～



P1 : FQpSEEQQQTERELQDK
P2 : RELEELDVPGEIVE pSLpSpSpSEESITR



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		
190-16461	Sodium Hydrogensulfite（分子生物学用）	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 x 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（Laemml 法）用样品缓冲液，有2- 巯基乙醇。
191-13272	Sample Buffer Solution (2ME+) (X4)	25 mL	冷藏	
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	
019-25111	AquaBlot™ 10×Tris-Glycine-SDS Transfer Buffer	1 L	室温	转膜时使用。含0.05% SDS。

■ 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	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。
299-13841	Silver Stain Kit Wako	for 10 gels	冷藏	灵敏度是CBB 法的50-100 倍。
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 μL	冷冻	用于Phos-tag ™ SDS-PAGE 可保持条带不弯曲
230-02461		500 μL		
234-02464		500 μL×3		

■ 去磷酸化酶

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		

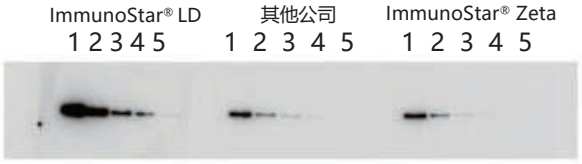
■ 电泳装置、预制胶

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
195-15171	SuperSep (TM) Ace, 6%, 13well	10 EA	冷藏	使用SuperSep™ Phos-tag® 时，作为对照组一起使用
198-14941	SuperSep (TM) Ace, 7.5%, 13well	10 EA	冷藏	
191-14931	SuperSep (TM) Ace, 7.5%, 17well	10 EA	冷藏	
195-14951	SuperSep (TM) Ace, 10%, 13well	10 EA	冷藏	
192-14961	SuperSep (TM) Ace, 10%, 17well	10 EA	冷藏	
199-14971	SuperSep (TM) Ace, 12.5%, 13well	10 EA	冷藏	
196-14981	SuperSep (TM) Ace, 12.5%, 17well	10 EA	冷藏	
193-14991	SuperSep (TM) Ace, 15%, 13well	10 EA	冷藏	
190-15001	SuperSep (TM) Ace, 15%, 17well	10 EA	冷藏	

■ 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 cm²	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100mL（2000 cm²）。
292-69903		1000 cm²		
290-69904		2000 cm²		
291-72401	ImmunoStar® Zeta	200 cm²	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 cm²		
295-72404		2000 cm²		
295-75101	ImmunoStar® Basic	200 cm²	冷藏	注重性价比、显色稳定的中灵敏度试剂。为了能持续稳定发光，曝光时间可变，发光信号可简便调节。广泛的蛋白质量范围，能得到较好的线性标准曲线。
291-75103		2000 cm²		
299-75104		5000 cm²		
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】



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

样品：FLAG-BAP
凝胶：SuperSepTM 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：小鼠IgG（H+L），兔，IgG分级，过氧化物酶结合，20000倍稀释
曝光时间：60秒（LAS4000，standard）



ImmunoStar® LD

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

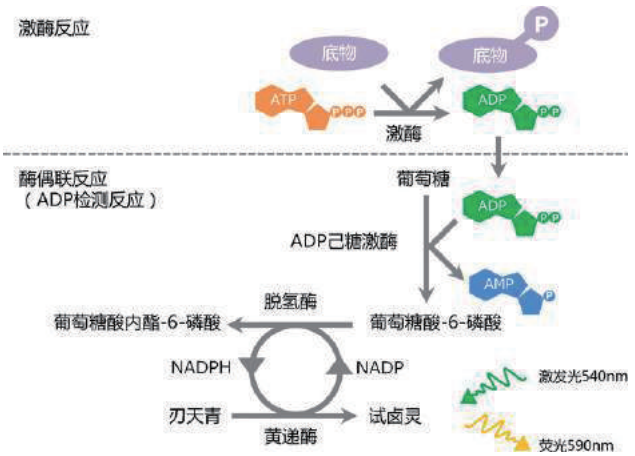
Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit 是Wako与东京大学药物发现机构共同开发的ADP荧光测定试剂盒。具有高通量筛选（HTS）所需的高灵敏度、高准确度、低成本、简便等特性。本试剂盒不仅可检测激酶，同时可用于检测产生ADP的酶（ATP酶、乙酰基-CoA羧化酶等）的活性。

【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 30μmol/L仍可保持线性关系
- 一步反应，检测时间短（～30分钟）
- 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
（配制2×检测液）
⑤反应终止液 (停止偶联反应)
⑥10mmol/L ATP溶液 (激酶底物、制作标准曲线)
⑦10mmol/L ADP溶液 (制作标准曲线)



【试剂盒概要】



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
297-77403		10000 次		

参考文献

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.
PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7[J]. Nature communications, 2016, 7 , Shinde S R, Maddika S.
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.
Plastid-nucleus communication involves calcium-modulated MAPK signalling[J]. Nature Communications, 2016, 7 , Guo H, Feng P, Chi W, et al.
Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation[J]. Nature communications, 2016, 7 , Mitterer V, Murat G, Réty S, et al.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
Phosphopeptide Detection with Biotin-Labeled Phos-tag[J]. Phospho-Proteomics: Methods and Protocols, 2016: 17-29 , Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T.
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.
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 , Frémin C, Guégan J P, Plutoni C, et al.
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.
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.
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 D A, et al.
The RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like protein FIERY2/CPL1 interacts with eIF4AIII 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.
Vasorelaxant Effect of 5′-Methylthioadenosine Obtained from Candida utilis Yeast Extract through the Suppression of Intracellular Ca2+ 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.
Inhibition of deubiquitinating activity of USP14 decreases tyrosine hydroxylase phosphorylated at Ser19 in PC12D cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2016, 472(4): 598-602 , Nakashima A, Ohnuma S, Kodani Y, et al.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice[J]. Molecular and cellular biology, 2016, 36(4): 585-595 , Kaizuka T, Mizushima N.
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.
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.
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.
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.
Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 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.
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.