

# Phos-tag™ 系列产品

Ver.7

## Phos-tag™ 磷酸化蛋白分析应用



### Phos-tag™ Acrylamide

SDS-PAGE分离磷酸化蛋白 .....P2



### SuperSep Phos-tag™

Phos-tag™ SDS-PAGE预制胶分离磷酸化蛋白 .....P5



### Phos-tag™ Mass Analytical Kit

质谱分析磷酸化多肽 .....P6



### Phos-tag™ Agarose

纯化富集磷酸化蛋白 .....P7



### Phos-tag™ Tip

含有Phos-tag™ 琼脂糖的枪头 .....P7



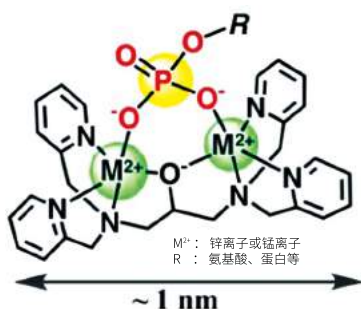
### Phos-tag™ Biotin

免疫印迹检测磷酸化蛋白 .....P8

## 什么是Phos-tag™ ?

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

【Phos-tag™ 基本结构】



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

■ 可识别和捕捉所有氨基酸位点上的磷酸化基团

■ 无放射性

■ 不影响质谱分析等后续实验

Phos-tag™ 由日本广岛大学研究生院医齿药综合研究科医药分子功能科学研究室研发。

SDS-PAGE 分离磷酸化蛋白——Phos-tag™ 丙烯酸胺

# Phos-tag™ Acrylamide



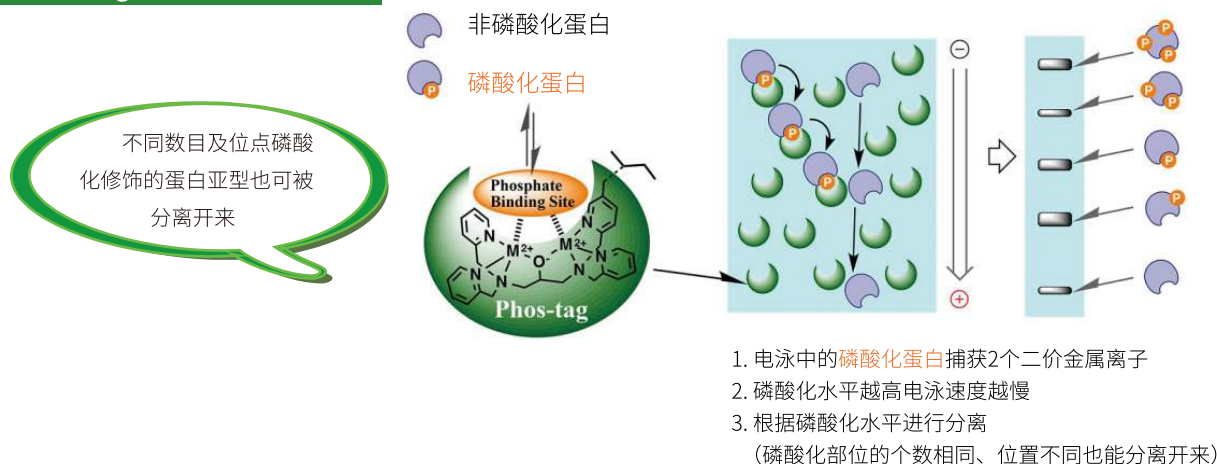
Phos-tag™ Acrylamide AAL-107

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

## 特点

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

## Phos-tag™ SDS-PAGE原理



## Phos-tag™ 实验

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

### 免疫印迹

从目的蛋白中很容易识别磷酸化蛋白。

利用**常规抗体**根据条带迁移的不同可以检测磷酸化和非磷酸化蛋白。

无需特意准备磷酸化抗体,适用于内源性的磷酸化蛋白。

MC*	-	-	+	+	
ATP	-	+	-	+	
		磷酸化 p35		非磷酸化 p35	
	1	2	3	4	5

※ MC: 微囊藻毒素 (一种磷酸化抑制剂)

Laemmli method  
常规SDS-PAGE

Phos-tag™ SDS-PAGE

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

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

### 质谱分析

分离磷酸化蛋白后进行质谱分析,可知具体的磷酸化位点。

### 2维电泳

可分离等电点相同(磷酸化位数相同)的不同磷酸化形式。

## Phos-tag™ SDS-PAGE中分离胶 (10 mL) 的制备

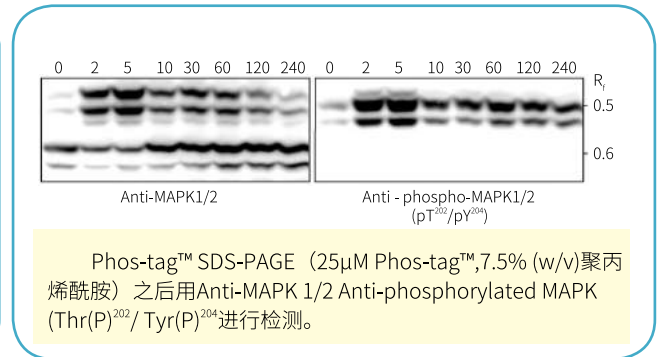
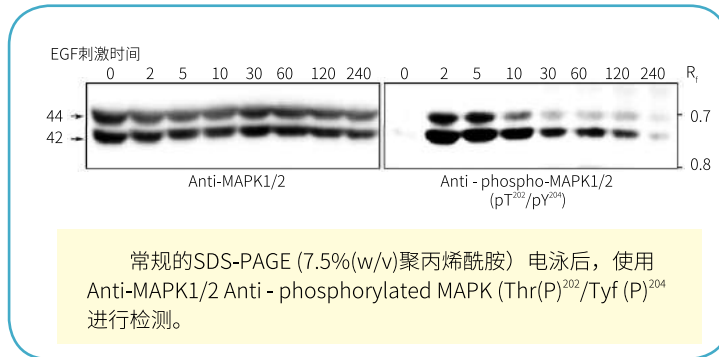
Phos-tag™ 浓度	20 μM				50 μM				100 μM			
	12%	10%	8%	6%	12%	10%	8%	6%	12%	10%	8%	6%
丙烯酰胺浓度												
30% (w/v) 丙烯酰胺溶液 (mL)	4	3.33	2.67	2	4	3.33	2.67	2	4	3.33	2.67	2
1.5 mol/L Tris-HCl buffer (pH 8.8) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
5.0 mmol/L Phos-tag™ Acrylamide 溶液 (3% (v/v) 甲醇) (mL)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
10% (w/v) SDS (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10 mmol/L MnCl <sub>2</sub> 溶液 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED (mL)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
10% (w/v) 过硫酸铵 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
蒸馏水 (mL)	3.2	3.87	4.53	5.2	3.14	3.81	4.47	5.14	3.04	3.71	4.37	5.04

※ 实验溶液配制仅供参考, 具体实验条件请自行摸索优化。

## 体外检测激酶的活性

**应用实例:** EGF刺激前后MAPK磷酸化水平的变化

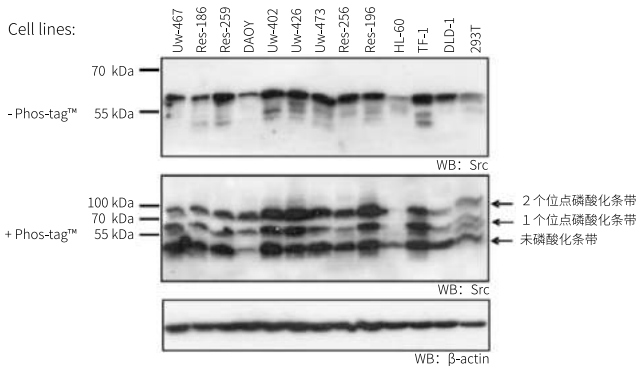
常规SDS-PAGE和Phos-tag™ SDS-PAGE后进行免疫印迹实验分析EGF刺激的A431细胞中MAPK磷酸化水平。



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

## 体外实验检测激酶的磷酸化状况

**应用实例:** 各种脑部肿瘤细胞系中检测Src激酶活性



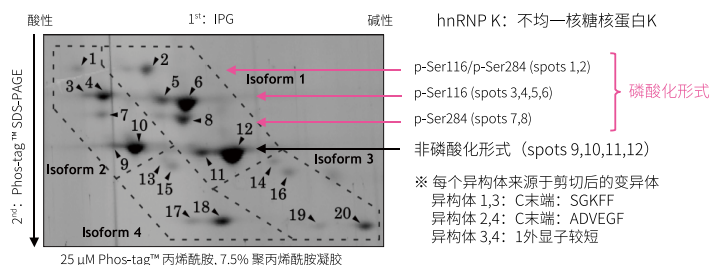
上图在常规SDS-PAGE (无Phos-tag™) 用Src抗体检测, 只能看到一条明显的条带。

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

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

## 二维电泳分析 hnRNP K磷酸化异构体

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



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

摘自Kimura Y, et al. *Proteomics*, Nov 2010, 10(21): 3884.

## 实验检测DNA甲基化

**应用实例：**使用甲基化特异性PCR (MSP) 与Zn<sup>2+</sup>-Phos-tag™ SDS-PAGE这两种技术，可有效区分甲基化DNA和非甲基化DNA。

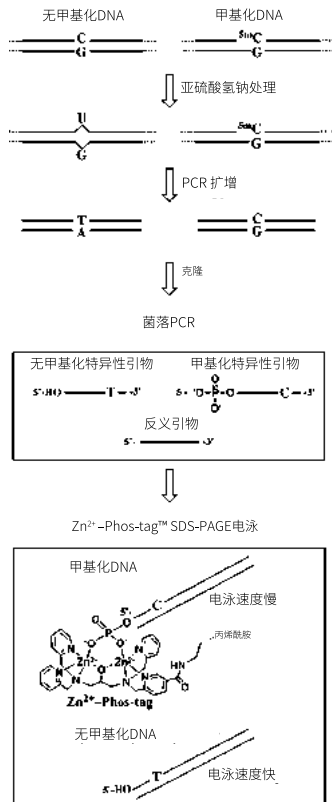


图1. 联合使用甲基化特异性PCR (MSP) 与Zn<sup>2+</sup>-Phos-tag™ SDS-PAGE实验流程。

DNA经过亚硫酸氢钠处理后，进行PCR扩增，克隆至pUC19载体后，转入DH5α菌株，挑取单克隆，直接进行菌落PCR，获得的DNA进行Zn<sup>2+</sup>-Phos-tag™ SDS-PAGE电泳。

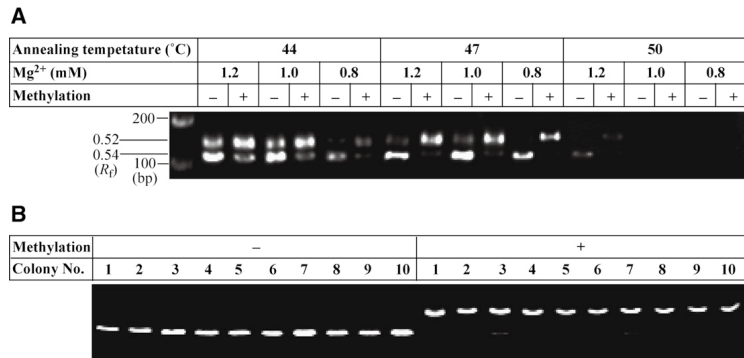


图2. 联合使用甲基化特异性PCR (MSP) 与Zn<sup>2+</sup>-Phos-tag™ SDS-PAGE进行甲基化DNA分析。  
(A) MSP实验条件优化，实验摸索了三种退火温度（44、47和50°C）、三种MgSO<sub>4</sub>浓度（1.2、1.0和0.8 mM）。使用20 μM Zn<sup>2+</sup>-Phos-tag™ SDS-PAGE和20% (W/V) 丙烯酰胺。  
(B) DNA甲基化分析。左边10列为无甲基化DNA，泳动速度快。右边10列为甲基化DNA，泳动速度慢。

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

## Q & A

- Q. 我的实验已找到对应的磷酸化抗体，如何在磷酸化抗体与Phos-tag™中作出选择呢？

A. 在大部分实验中，需要检测是否发生了磷酸化的同时，常常也需要研究该蛋白不同形式的总表达量。如果使用磷酸化抗体，需要压完磷酸化抗体后，将抗体从膜上剥离(strip)后再压一次总蛋白抗体。如果使用Phos-tag™ Acrylamide，在电泳这一步先将磷酸化(或几种不同磷酸化形式)与非磷酸化分离，转膜封闭后，只需要用使目的蛋白的非磷酸化抗体(常规抗体)作为一抗，就能在同一块膜上标记出磷酸化(或几种不同磷酸化形式)与非磷酸化的条带，并可以根据条带灰度比较两者的量。和使用磷酸化抗体相比，节省了剥离及再压抗体的时间和工作量，并且在同一张膜上进行灰度比较结果更为准确。
- Q. Phos-tag™ Acrylamide可分离多大的蛋白？

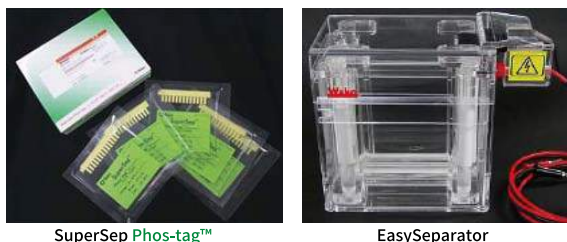
A. 据文献报道，最大可分离350kDa的磷酸化蛋白\*。需要蛋白大小调整凝胶的浓度及配方。  
\*可联系客服索取文献资料。
- Q. 样品必须是纯化的蛋白吗？如果是细胞裂解液是否可以？

A. 不一定必须是纯化的蛋白，细胞裂解液也可以。如果是纯化的样品，进行Phos-tag™ SDS-PAGE即可进行检测。如果是蛋白裂解液或粗提液，则需要进行Western Blotting。  
需要进一步探讨实验设计，请浏览宝柏官网 (<http://www.boppard.cn/gories/show/24.html>) 或咨询客服。
- Q. 如果我的实验必须要使用Marker来指示分子量，但预染Marker在Phos-tag™胶中条带完全弥散，不能指示分子量，怎么办？

A. 如果是只进行Phos-tag™ SDS-PAGE，可以使用普通非预染重组Marker。考染或银染时Marker条带便能显现出来。  
如果是进行WB，可以同时制作两块凝胶，同时等量上样并使用普通非预染重组Marker作为对照，在同一个电泳槽中同时进行电泳，取其中一块进行考染，另一块进行转膜等后续实验。也可以只配一块胶，转膜后用丽春红染膜，观察完毕后用纯水或PBS将丽春红洗洗干净再进行后续实验。

# SuperSep Phos-tag™ 预制胶

Wako



SuperSep Phos-tag™ 是一种预制胶，预先加入50 μmol/L的Phos-tag™ Acrylamide，打开包装即可直接使用。预制胶中含有Zn<sup>2+</sup>作为金属离子，在中性凝胶缓冲液中保存稳定性很好，得到的结果条带也很整齐。

## 特点

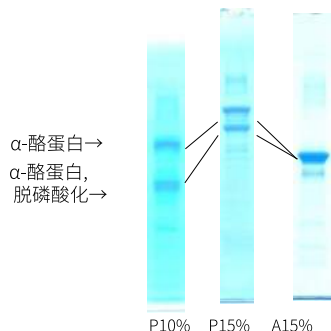
- 即开即用
- 预制胶使用安全
- 有效期最长6个月
- 操作与普通SDS-PAGE一样

## 注意

- 这款产品为预制胶，适合用于指定型号的电泳槽。
- 使用预染的maker会使条带弯曲。推荐使用WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III (230-02461)。
- 在使用产品之前，参考常规SDS-PAGE摸索样品的电泳条件。
- 进行免疫印迹之前，需要使用EDTA先处理再进行转膜，具体参考“Phos-tag™ 实验指导手册（第五版）四. 疑难问题”。

制胶规格	100 × 100 × 3 (mm)	
凝胶大小	90 × 85 × 1 (mm)	
孔数	13	17
孔容积	30 μL	25 μL
Phos-tag™ 浓度	50 μmol/L	
丙烯酰胺浓度	6%、7.5%、10%、12.5%、15%和17.5%	
ZnCl <sub>2</sub> 浓度	100 μmol/L	

## 应用实例



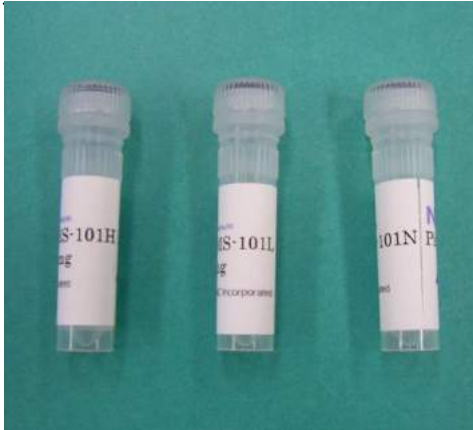
- 电泳条件：30 mA (恒流), 60 min
- 样品：5 μg/Lane α-酪蛋白 (含磷酸化与去磷酸化α-酪蛋白) (产品编号 038-23221)  
*普通SDS-PAGE只观察到一条条带，而Phos-tag™ SDS-PAGE里可见α酪蛋白磷酸化和α-酪蛋白去磷酸化两条条带。*
- 样品缓冲液：Sample Buffer Solution (2ME+) (X4) (产品编号 191-13272)
- 电泳缓冲液：SDS-PAGE缓冲液, pH 8.5 (产品编号 192-16801)
- 染色：QUICK-CBB PLUS (产品编号 174-00553)  
P10% (左)：SuperSep Phos-tag™ (50 μmol/L), 10%, 13 well  
P15% (中)：SuperSep Phos-tag™ (50 μmol/L), 15%, 13 well  
A15% (右)：SuperSep™ Ace, 15%, 13 well (不含Phos-tag™)

产品编号	产品名称	电泳仪	规格
用于Bio-Rad伯乐电泳仪			
198-17981	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 7.5%, 17 well, 83 × 100 × 3.9 mm Phos-tag™ 预制胶50 μmol/L, 7.5%, 17孔, BioRad型	Mini-PROTEAN™ Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.)	5 块
195-17991	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 17 well, 83 × 100 × 3.9 mm Phos-tag™ 预制胶50 μmol/L, 12.5%, 17孔, BioRad型		5 块
用于Life Technologies电泳仪			
192-18001	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 7.5%, 17 well, 100 × 100 × 6.6 mm Phos-tag™ 预制胶50 μmol/L, 7.5%, 17孔, Life Technologies型	XCell SureLock™ Mini-Cell (Life Technologies, Inc.)	5 块
199-18011	SuperSep™ Phos-tag™ (50 μmol/L), 12.5%, 17 well, 100 × 100 × 6.6 mm Phos-tag™ 预制胶50 μmol/L, 7.5%, 17孔, Life Technologies型		5 块

SuperSep Phos-tag™ 预制胶的相关产品，详情请咨询客服

产品编号	产品名称	规格
相关产品		
058-07681	EasySeparator Phos-tag™ 预制凝胶的配套电泳槽	1 套
免疫印迹转膜效率标记		
230-02461	WIDE-VIEW restained Protein Size Marker III (11~245kDa) WIDE-VIEW™ 预染蛋白质标记III	500 μL (200次)
阳性对照		
038-23221	α-Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated 牛奶源去磷酸化α酪蛋白	1 mg

# Phos-tag™ Mass Analytical Kit



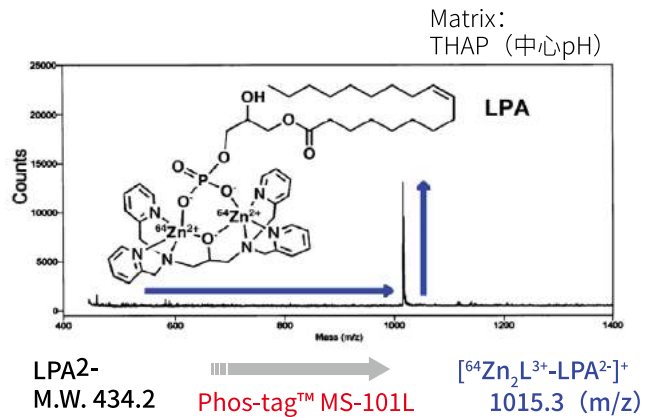
Phos-tag™ Mass Analytical Kit

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

## 特点

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

## 应用实例: 检测Phos-tag™ - 磷酸化LPA复合物



由于正电荷增大磷酸化LPA检测灵敏度上升。

## 试剂盒组成

- Phos-tag™ MS-101L ————— 5 mg  
(C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sup>64</sup>Zn<sub>2</sub><sup>3+</sup> 分子量:581.4)
- Phos-tag™ MS-101H ————— 5 mg  
(C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sup>68</sup>Zn<sub>2</sub><sup>3+</sup> 分子量:589.4)
- Phos-tag™ MS-101N ————— 10 mg  
(C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>OZn<sub>2</sub><sup>3+</sup> 分子量:584.3)

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

## Q & A

- Q. Phos-tag™ Mass用于实验可以使用多少次?

A. 如果每次用量为5 μL, 至少可以使用1000次。
- Q. 如何选择使用Phos-tag™ MS-101L, Phos-tag™ MS-101H和Phos-tag™ MS-101N?

A. Phos-tag™ 101N含有自然存在的Zn, 101L与101H 分别含有Zn的同位素<sup>64</sup>Zn 和<sup>68</sup>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, 结果比较详细;  
鉴定磷酸基团是否存在, 使用101L和101H, 这些试剂分别包含<sup>64</sup>Zn 和<sup>68</sup>Zn。使用这些试剂检测同一个样品时会产生不同的荷质比。
- Q. 如果想测定经过Phos tag™ SDS-PAGE分离得到的样品, 是否必须要在凝胶消化之前去除Phos tag™?

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

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

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

纯化富集磷酸化蛋白——Phos-tag™ 琼脂糖

# Phos-tag™ Agarose



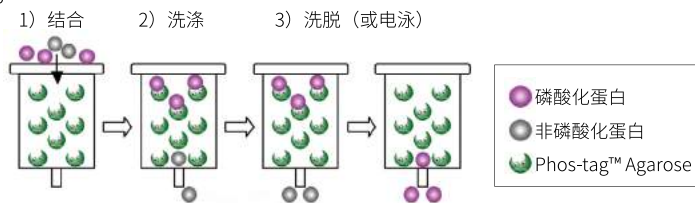
Phos-tag™ Agarose AG-503

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

## 特点

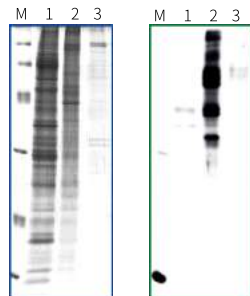
- 缓冲液不含有还原剂和去污剂，纯化过程中蛋白不会变性，可进行后续免疫共沉淀 (Co-IP) 实验
- 与亲和层析方法类似
- 可1小时内纯化磷酸化蛋白
- Phos-tag™ Agarose 捕获结合到 Tyr, Thr, Ser, Asp, His 等氨基酸、糖类、脂类上的无机磷酸根 ( $\text{HOPO}_3^{2-}$ ) 和大量二价磷酸根 ( $\text{ROPO}_3^{2-}$ )

## 原理



## 应用实例:

纯化细胞裂解液中的磷酸化蛋白



M: 标准蛋白 Marker

Lane1: 未吸附层

Lane2: 吸附层

Lane3: 柱清洗层

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

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

磷酸化肽纯化工具——含有Phos-tag™ 琼脂糖的枪头

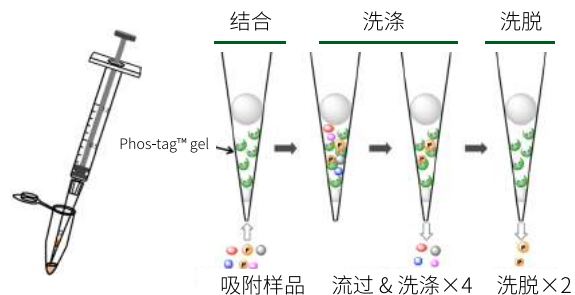
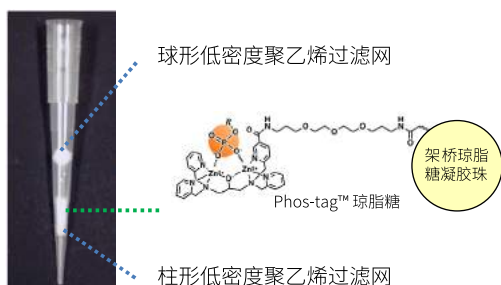
# Phos-tag™ Tip



可特异性捕捉磷酸基团的功能性分子“Phos-tag™”的磷酸化肽纯化用枪头。枪头里含有Phos-tag™ 琼脂糖，是即开即用前处理工具。

## Phos™ Tip 的结构

把Phos-tag™ Tip装在注射器 (购买产品附送) 上使用。



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

免疫印迹检测磷酸化蛋白——Phos-tag™ 生物素

# Phos-tag™ Biotin

**NARD** Institute, Ltd.



Phos-tag™ Biotin BTL-104

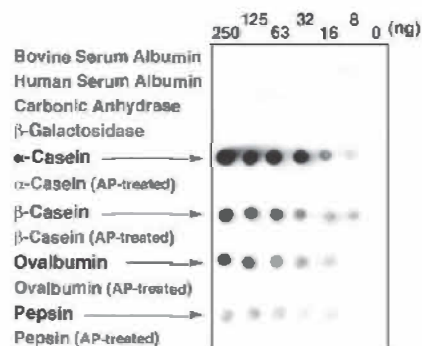
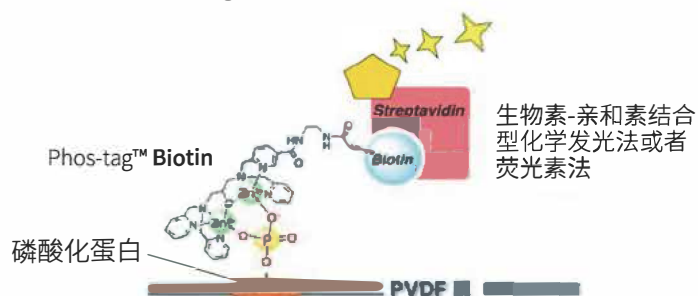
Phos-tag™ Biotin (Phos-tag™ 生物素) 是与生物素结合的 Phos-tag™, 可用于免疫印迹法检测磷酸化蛋白。Phos-tag™ Biotin BTL-104 可灵敏检测 PVDF 膜上的磷酸化蛋白。

## 特点

- 无辐射
- 无需 PVDF 膜的封闭处理
- Phos-tag™ 的特异性结合与氨基酸种类、序列无关
- 不影响 2 维电泳和质谱分析等后续实验
- Phos-tag™ BTL 母液可稳定保存至少 6 个月
- 实验流程与使用 HRP 标记抗体相类似

## 应用实例：在 PVDF 膜上检测磷酸化蛋白

### 【Phos-tag™ Biotin 的免疫印迹分析图】



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

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

产品编号	生产商编号	产品名称	规格
301-93531	BTL-104	Phos-tag™ Biotin BTL-104 Phos-tag™ 生物素 BTL-104	10 mg (130 - 1300次)
308-97201	BTL-111	Phos-tag™ Biotin BTL-111 Phos-tag™ 生物素 1 mM 水溶液	0.1 mL (10 - 100次)

※ BTL-104 和 BTL-111 相比，BTL-111 灵敏度更高。

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 Wako; <http://www.e-reagent.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.

**FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation**

[www.wako-chem.co.jp](http://www.wako-chem.co.jp)  
1-2, Doshomachi 3-Chome  
Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Tel.: +81 6 6203 3741  
Fax: +81 6 6203 1999  
[ffwk-cservice@fujifilm.com](mailto:ffwk-cservice@fujifilm.com)  
Online Catalog: [www.e-reagent.com](http://www.e-reagent.com)

Tel: 010 85804838  
Tel: 021 62884751  
Tel: 020 87326381  
el: 852 27999019  
[boppard.cn](mailto:boppard.cn)  
[oppard.cn](mailto:oppard.cn)



请联系我们获取：**实验指导手册**