



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制及电泳试剂盒(Bis-Tris)

Ver.750769-1.0

货号	名称	规格
RTD5101	Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制及电泳试剂盒(Bis-Tris)	10 次 (1 mm 厚 12%胶)

● 贮存、效期及运输:

按照标签温度贮存; 有效期一年; 试剂盒湿冰运输。

● 产品组成:

编号	货号	名称	规格	贮存
1	RTD5101-01	30%PAA (29:1) (Phos-tag 专用)	30 ml	4°C, 避光
2	RTD5101-02	Bis-Tris 凝胶缓冲液 (4×)	20 ml	4°C, 避光
3	RTD5101-03	Phos-tag 溶液 (100×)	0.5 ml	4°C, 避光
4	RTD5101-04	ZnCl ₂ 溶液 (100×)	0.5 ml	4°C
5	TA1510	抗氧化剂 (400×)	15 ml	RT 注: 配成溶液后-20°C贮存
6	AP020P	APS (干粉)	0.5 g	RT 注: 配成溶液后-20°C贮存
7	TA0761-01	TEMED	0.5 ml	4°C, 避光
8	TM1270P	10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液(粉末型) (Phos-tag 专用)	1 升	RT 注: 配成溶液后 4°C避光贮存
9	EA018-15ml	0.5 M EDTA	15 ml	RT
10	RTD6172-01	PAGE 上层胶红色染料(500×)	0.1 ml	RT
11	PT0120	Phos-tag 磷酸化检测阳性对照	20 次	-20°C

● 产品简介:

Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制试剂盒(Bis-Tris)提供了可直接用于磷酸化蛋白分离的、基于 Bis-Tris 体系 SDS-PAGE 凝胶配制的各种试剂, 用户只需自备制胶器具和蒸馏水, 即可配制不同浓度的用于磷酸化蛋白电泳检测的 PAGE 凝胶(Bis-Tris), 无需特异性的磷酸化抗体, 仅需常规的目的蛋白抗体就可以进行目的蛋白的磷酸化检测。本产品特别适合用于缺少合适的磷酸化目的蛋白抗体以及研究目的蛋白多位点磷酸化的实验。

磷酸化蛋白电泳检测中的 Phos-tag 是一种能与磷酸分子特异性结合的功能性分子, 可以结合蛋白中含有磷酸化修饰的丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸(Ser/Thr/Tyr)残基以及天冬氨酸/赖氨酸/组氨酸(Asp/Lys/His)残基。在用 Phos-tag 配制的 Phos-tag SDS-PAGE 凝胶中, 蛋白的磷酸化水平越高电泳速度越慢, 能

根据磷酸化的位点和水平将磷酸化及非磷酸化蛋白分开成不同的条带；同时，具有不同数目和位置的磷酸化形式很多时候也可以分离。此时，使用常规的蛋白抗体也能可轻松判断目的蛋白是否有磷酸化修饰，并能确定磷酸化程度以及磷酸化位点的数量。具体原理参考图 1。

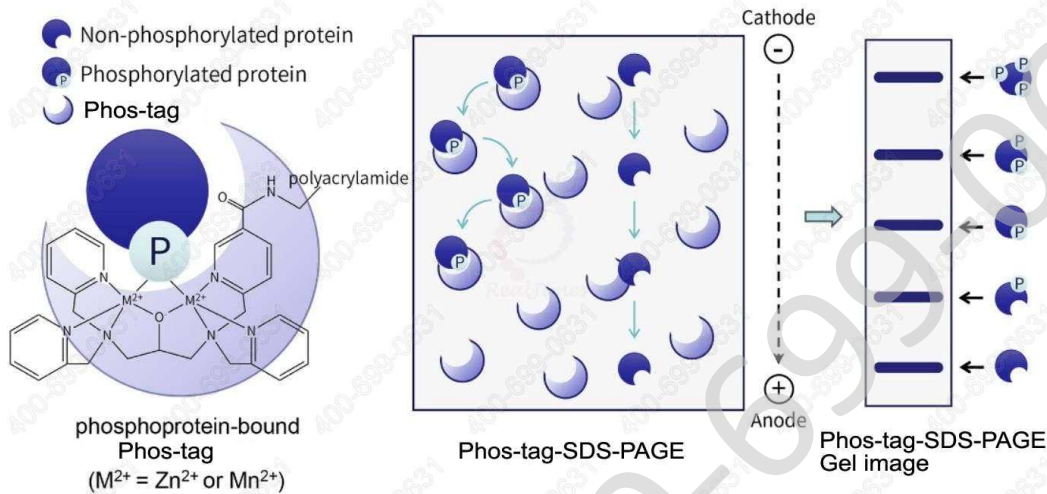


图 1. Phos-tag-SDS-PAGE 磷酸化蛋白电泳检测原理示意图

基于常用的 Bis-Tris 缓冲体系 Tris-Glycine 缓冲体系，提供两种 Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制试剂盒 (RTD5101/RTD5102)。Tris-Glycine 体系与传统的 Laemmli 方法基本一致，但可分离蛋白种类有限，分辨率低，并且凝胶建议现配现用；Bis-Tris 体系对于磷酸化蛋白的分离能力和分辨率更高，因此可识别的磷酸化形式更多，凝胶配制后可进行冷藏保存（6 个月），可根据样品种类和检测需求选择合适的磷酸化蛋白电泳检测的 SDS-PAGE 凝胶体系。

本试剂盒为基于 Bis-Tris 缓冲体系的 Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制试剂盒，提供的凝胶缓冲液采用近中性 pH 的 Bis-Tris 缓冲液，不含 SDS。制备凝胶的浓缩胶为红色上层胶，方便观察梳孔，易于上样。电泳时可使用配套的 MOPS 缓冲系统的 SDS-PAGE 电泳液 (TM1270P)，电泳时直接向其中添加抗氧化剂 (TA1510) 即可进行电泳。

样品裂解液建议使用 EDTA-free、phosphate-free 体系，可加入 NaF 作为磷酸酶抑制剂；避免 EDTA、EGTA、原钒酸钠 (Sodium orthovanadate)、甘油磷酸钠 (β -glycerophosphate)、焦磷酸钠 (pyrophosphate) 等可能干扰 Phos-tag 结合的成分。

本试剂盒提供了经优化 Phos-tag 磷酸化检测阳性对照 (PT0120)，可以经过凝胶考染后方便判断磷酸化蛋白的检测效果。

本试剂盒约可配制 1.0 mm 厚度 12% 凝胶约 10 块，具体可以配制的凝胶数量和凝胶的厚薄以及凝胶的大小有关。

● 使用说明：

一. 凝胶配制的准备工作。

1.1 准备制胶的模具。可以使用常规的制备蛋白电泳胶的模具，制胶前必须把制胶模具清洗干净。

1.2 10% APS 配制-5 ml：

将 0.5 g APS 干粉溶于 5 ml 灭菌水中，彻底溶解后分装，1 ml/支，-20℃ 备存，每次取一管使用。

10% APS 应尽量减少常温存放时间，以防失效。10%APS 在 4℃有效期为一周，-20℃有效期 6 个月。若发现凝胶聚合时间延长，应考虑更换使用-20 度保存的 10% APS。

二. 分离胶配制:

2.1 由于 Phos-tag-SDS-PAGE 的特殊性，蛋白的迁移率要比常规胶要慢大约 20%，根据表 1 选择凝胶浓度。 表 1 不同浓度的 Zn-Phos-tag-SDS-PAGE 分离胶的最佳分离范围：

Zn-Phos-tag-SDS-PAGE 分离胶浓度	最佳分离范围	备注
3-4%加 0.5%琼脂糖	>200 kD	推荐用 Tris 醋酸凝胶体系替代 Bis-Tris 体系
6%	50-150 kD	低于 6%条带会弥散
8%	30-90 kD	常规推荐使用
10%	20-80 kD	
12%	12-60 kD	参见实验示例 可以有效分离磷酸化 OA (~45 kD) 和磷酸化 4E-BP1 (~17 kD)
15%	10-40 kD	浓度高，需要测试后使用

- 2.2 按照表 2 混合不同组份，最后加入 10%APS 和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。
- 2.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液（对于 mini-gel，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 cm 即可），然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层 1-3 cm 的蒸馏水或无水乙醇，使凝胶表面保持平整。
- 2.4 静置 20-40 分钟，待分离胶和水或乙醇层之间出现一个清晰的界面后，说明凝胶已聚合。注：当水（醇）和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝固；凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。下层胶 25℃ ~20 分钟可以聚合；18℃ ~40 分钟可以聚合。

表 2 Zn-Phos-tag SDS-PAGE 分离胶配方表

组份	不同凝胶体积对应各组份的取样量 (ml)			
6% 胶	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
H ₂ O	2.6	5.2	7.8	10.4
30% PAA (29:1)	1	2	3	4
Bis-Tris 凝胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
ZnCl ₂ 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02
8% 胶	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
H ₂ O	2.25	4.5	6.75	9
30% PAA (29:1)	1.35	2.7	4.05	5.4
Bis-Tris 凝胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
ZnCl ₂ 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2

注：本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。
中科瑞泰(北京)生物科技有限公司 电话:400-699-0631 E-mail:real-times@vip.163.com <http://www.real-times.com.cn>

10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02
10% 胶	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
H ₂ O	1.95	3.9	5.85	7.8
30% PAA (29:1)	1.65	3.3	4.95	6.6
Bis-Tris 凝胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
ZnCl ₂ 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02
12% 胶	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
H ₂ O	1.6	3.2	4.8	6.4
30% PAA (29:1)	2	4	6	8
Bis-Tris 凝胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
ZnCl ₂ 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02
15% 胶	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
H ₂ O	1.1	2.2	3.3	4.4
30% PAA (29:1)	2.5	5	7.5	10
Bis-Tris 凝胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
ZnCl ₂ 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02

注：本试剂盒中的 Phos-tag 和 ZnCl₂ 的工作浓度默认为 50 μM Phos-tag 和 100 μM ZnCl₂，如果仍觉得结果不理想，可在此基础上进行优化。试剂盒中提供的 Phos-tag 溶液(100×)，配制凝胶时较优的使用条件为稀释至 1×（终浓度为 50 μM），也可根据情况稀释至 0.5×（终浓度 25 μM）至 2×（终浓度 100 μM）进行使用。ZnCl₂ 溶液 (100×)的使用体积需要与实际加入的 Phos-tag 溶液体积一致（保持 Phos-tag 和 ZnCl₂ 的摩尔比为 1: 2），凝胶溶液的总体积需维持不变。通常情况下，Phos-tag 的浓度越高，凝胶对于磷酸化蛋白的分离能力越强；但相应的，蛋白在凝胶中的迁移速率会降低，整体的迁移距离会变短，又会反过来影响分辨率。

三. 浓缩胶制备：

3.1 去除覆盖在分离胶上的水或乙醇层。

3.2 按照表 3 将不同体积成分在一个小烧杯中混合；加入 10%APS 和 TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。

3.3 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。

3.4 将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。

3.5 静置 30-60 分钟，等待浓缩胶聚合。

注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。上层胶 25℃ ~30 分钟可以聚合；18℃ ~60 分钟可以聚合。

表 3 Zn-Phos-tag SDS-PAGE 浓缩胶（4%）配方表

组份	不同凝胶体积对应各组份的取样量（ml）			
	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml
H ₂ O	1.21	2.42	3.63	4.84
30% PAA（29:1）	0.27	0.54	0.81	1.08
Bis-Tris 凝胶缓冲液（4×）	0.5	1	1.5	2
PAGE 上层胶红色染料(500×)	0.004	0.008	0.012	0.016
10% APS	0.02	0.04	0.06	0.08
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008

四. 样品制备：

由于样品的状态会很大程度上影响实验结果，进行样品制备和处理时须注意以下几点：

4.1 确保样品中不含实验干扰物质：避免使用如 EDTA，EGTA 等金属螯合剂，确认所使用的蛋白酶抑制剂和样品提取裂解液等产品不含 EDTA 和 EGTA，蛋白酶抑制剂可以选用 PMSF 溶液（100 mM）（PM1790）或者蛋白酶抑制剂 Cocktail（不含 EDTA，片剂，通用型）（PC2930）。由于多数磷酸酶抑制剂如甘油磷酸钠（Sodium β-glycerophosphate），焦磷酸钠（Pyrophosphoric acid Sodium）和原钒酸钠（Sodium orthovanadate）都会影响电泳结果，建议不要使用上述磷酸酶抑制剂。可以使用氟化钠（NaF）作为磷酸酶抑制剂。**如果结果中条带发生扭曲并确认是由样品中不兼容成分引起，样品可提前用 TCA 沉淀法进行处理。**

4.2 可以使用 RIPA 裂解液(强，不含抑制剂，不含螯合剂)（RL0120F）提取样品，结合超声破碎提取，避免使用过于粘稠的样品。

4.3 样品上样缓冲液推荐使用 5×MonoClolor 蛋白上样缓冲液（变性，还原）（PL080），该上样缓冲液不含 EDTA，已经测试完全兼容 phos-tag 凝胶。

五. 电泳：

5.1 电泳缓冲液的配制：

注：由于市面上销售的 Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液多数含有 EDTA，不能兼容 Phos-tag 电泳，一定使用试剂盒配套的 Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（Phos-tag 专用），该缓冲液不含有 EDTA，能够有效分离磷酸化和非磷酸化蛋白。

5.1.1 10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（溶液型）（Phos-tag 专用）配制：

原料	10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（溶液型） （Phos-tag 专用） 1 L
10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（粉末型） （Phos-tag 专用）	取 TM1270P 全部粉末溶于 1 L 超纯水中，即配制成 1 L 10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（溶液型）（Phos-tag 专用）

注：10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（溶液型）（Phos-tag 专用）4℃避光保存，有效期 6 个月。如

溶液颜色变为黄色，说明溶液缓冲能力下降，请测试后使用。

5.1.2 1×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（Phos-tag 专用）配制：

原料	1×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（Phos-tag 专用） 配制量		
	500 ml	1 L	2 L
10×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液 （溶液型）（Phos-tag 专用）	50 ml	100 ml	200 ml
400×抗氧化剂	1.25 ml	2.5 ml	5 ml
超纯水	定容至 500 ml	定容至 1 升	定容至 2 升

注：1×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（Phos-tag 专用）现用现配，不建议贮存。内槽缓冲液必须使用新鲜配制的电泳缓冲液；外槽可以使用回收的电泳液，可以重复使用 1-2 次。

5.2 电泳条件：

推荐使用恒压 80 V 浓缩胶，150 V 分离胶进行电泳，至溴酚蓝前沿到达凝胶底部时结束电泳。

5.3 蛋白分子量标准的使用：

由于在磷酸化蛋白 SDS-PAGE 中，蛋白的迁移速率除了与分子量大小相关外，还与其磷酸化水平有关，因此，预染蛋白分子量标准在 Phos-tag SDS-PAGE 中不能直接用于推断分子量，但可在电泳中起到粗略指示作用，也可作为转膜效率的参考。通常的预染蛋白分子量标准在 Phos-tag SDS-PAGE 凝胶中会出现比较严重的条带弯曲。可以选择使用三色预染蛋白 Marker（Phos-tag 专用）（RTD6166），该 Marker 已经测试兼容 Phos-tag SDS-PAGE，电泳时不会发生条带过度弯曲。

六.电泳后的相关分析：

6.1 考马斯亮蓝染色：

电泳后如需进行考马斯亮蓝染色，可按照普通 SDS-PAGE 凝胶的步骤操作，无需进行特殊处理。染色液可选择使用 FastBlue 蛋白染色液（RTD6202），然而需要注意的是由于凝胶的特殊性，考染后凝胶背景会深于普通 SDS-PAGE 凝胶。

注：如果需确认凝胶对于磷酸化蛋白的分离效果，可使用试剂盒配套的 Phos-tag 磷酸化检测阳性对照。

6.2 Western Blot 检测：

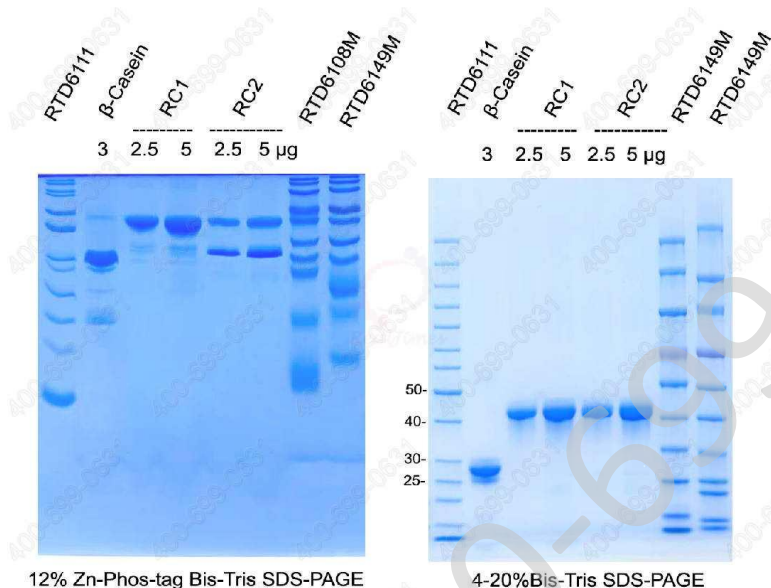
Phos-tag-SDS-PAGE 凝胶(Bis-Tris)进行转膜前，必须使用 EDTA 去除凝胶中的 Zn 离子，如不去除凝胶中的离子会导致转膜失败。推荐使用经典 Tris-甘氨酸转膜缓冲液（TB1040）进行湿转转膜。

6.2.1 将凝胶浸泡于含有 10 mM EDTA 的 1×转膜缓冲液（不含醇）中，摇床摇动孵育 10 分钟，重复漂洗 3 次。如果凝胶较厚，可适当延长每次孵育的时间。

6.2.2 凝胶转移到 1×转膜缓冲液中（根据蛋白分子量大小添加醇），漂洗 5 分钟，随后推荐用湿转法转膜。本试剂盒中提供了 0.5 M EDTA，可按需进行配制。

● 实验示例：

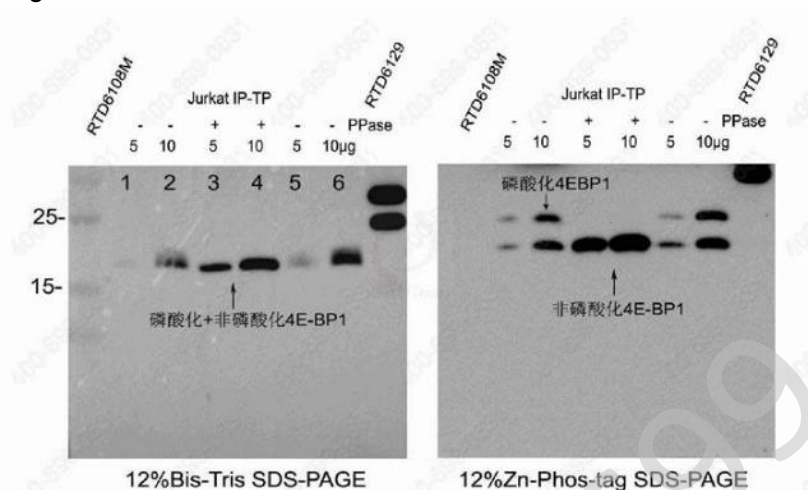
1. Phos-tag 磷酸化检测阳性对照电泳考染结果：



12% Zn-Phos-tag SDS-PAGE 检测 RC1 蛋白磷酸化效果

根据说明书步骤制备 12%Zn-Phos-tag SDS-PAGE 凝胶，同时使用 4-20%Bis-Tris SDS-PAGE（RTD6118-0420-11）作为对照；两板同时电泳；电泳条件：1×Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液（TM1270P），加抗氧化剂（TA1510），70V 10min 后调节电压到 140V，至溴酚蓝前沿到达凝胶底部，电泳时间共 55 min；FastBlue 蛋白染色液（RTD6202）染色；RC1 为天然磷酸化卵清蛋白（Ovalbumin, OA），RC2 为 RC1 经 λ Protein Phosphatase 部分脱磷酸化处理所得样品（PT0120, Phos-tag 磷酸化检测阳性对照），包含磷酸化和脱磷酸化 OA 两种形式，在 Zn-Phos-tag SDS-PAGE 中，RC2 分离为两条迁移率不同的条带，其中慢迁移条带对应磷酸化 OA，快迁移条带对应脱磷酸化 OA（左图）；而在常规 Bis-Tris SDS-PAGE 中，磷酸化和脱磷酸化 OA 几乎无法区分（右图）。

2. 4E-BP1 Phos-tag 检测结果:



样品处理: Jurkat 2×10^7 细胞加 0.5 ml IP lysis buffer(不含抑制剂, 不含螯合剂, 加 PI, 加 NaF), 得到蛋白浓度 $2.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; lane 1,2-未脱盐处理样品; lane 3,4-0.2 ml 样品脱盐柱脱盐后 λ PPase 消化 ($100 \mu\text{g}$ 蛋白加 150U PPase, 30°C 1.5 小时); lane 5,6-不加 λ PPase 的作为孵育对照; 样品加 $4 \times \text{SDS-PAGE}$ 上样缓冲液配成 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 上样液, 70°C 10 min ;

凝胶: 12% Bis-Tris SDS-PAGE 作为对照平行胶; 12%Zn-Phos-tag SDS-PAGE 根据试剂盒 RTD5101 制备;

电泳: $1 \times \text{Tris-MOPS-SDS}$ 电泳缓冲液 (不含 EDTA, 加抗氧化剂), 两板同时电泳, 70V 20 min 后 140V 40 min 终止电泳;

洗膜: Phos-tag 胶用洗胶缓冲液 ($1 \times \text{Tris-甘氨酸转膜缓冲液} + 10 \text{mM EDTA}$) 10 min 3 次;

转膜: 两胶同时转膜, 转膜缓冲液 $1 \times \text{Tris-甘氨酸转膜缓冲液} + 20\%$ 乙醇, 恒流 200 mA 冰浴转膜 1 小时; 封闭: 3% BSA 封闭 1 小时;

一抗: 4E-BP1 RmAb 1: 1000 WP1080 四度双膜背靠背孵育 2 小时;

二抗: 羊抗兔 IgG-HRP 1: 5000 RT 60 min ;

检测: RealRCL 发光液检测, 均曝光 150 s ;

结果: 4EBP1 出现明显的快迁移 (脱磷酸化) 和慢迁移 (磷酸化), λ PPase 消化的样品全部为快迁移 (脱磷酸化)。