



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(Tris-Gly)

Ver.760857-1.0

货号	名称	规格
RTD5102	Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制试剂盒(Tris-Gly)	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	RTD5102-01	30%PAA (29:1) (Phos-tag 专用)	30 ml	4°C, 避光
2	RTD5102-02	Tris-Gly 分离胶缓冲液 (4×)	20 ml	4°C
3	RTD5102-03	Phos-tag 溶液 (100×)	0.5 ml	4°C, 避光
4	RTD5102-04	MnCl ₂ 溶液 (100×)	0.5 ml	4°C
5	RTD5102-05	Tris-Gly 浓缩胶缓冲液 (4×)		4°C
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	TG140P	1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液 (变性电泳, 粉末型)	10×1L	RT
9	EA018-15ml	0.5 M EDTA	15 ml	RT
10	PT0120	Phos-tag 磷酸化检测阳性对照	50 µl	-20°C

● 产品简介:

Phos-tag 磷酸化检测 PAGE 凝胶配制及电泳试剂盒(Tris-Gly)提供了可直接用于磷酸化蛋白分离的、基于 Tris-Gly 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(Tris-Gly),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,使用常规的目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。

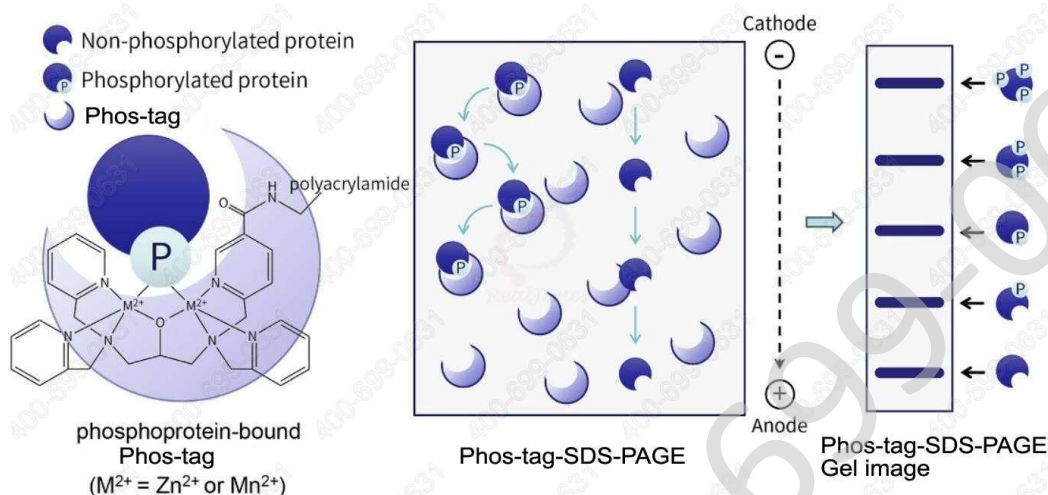


图 1. Phos-tag-SDS-PAGE 磷酸化蛋白电泳检测原理示意图

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-Gly 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 Tris-Gly 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碱性 pH 的 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 1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液即可进行电泳。

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)，可以通过考染方便判断磷酸化蛋白的检测效果。

本试剂盒约可配制 1.0mm 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 应尽量减少室温存放时间，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 Phos-tag-SDS-PAGE 分离胶的最佳分离范围:

Phos-tag-SDS-PAGE 分离胶浓度	最佳分离范围	备注
3%+0.5%琼脂糖	>200 kD	<i>Nature Protocols</i> , Vol 4, 2009 ,1513
6%	<60 kD	溴酚蓝压缩前沿~ 30 kD 检测结果参考实验示例
8%	>60 kD	溴酚蓝压缩前沿~ 20 kD
10%	-	浓度高, 分辨率有限, 请测试后使用
12%	-	
15%	-	

2.2 按照表 2 将不同体积的成分在小烧杯中混合; 加入 10%APS 和 TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

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 Mn-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
Tris-Gly 分离胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
MnCl 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
Tris-Gly 分离胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
MnCl 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
10% 胶	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml

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>

H ₂ O	1.95	3.9	5.85	7.8
30% PAA (29:1)	1.65	3.3	4.95	6.6
Tris-Gly 分离胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
MnCl 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
Tris-Gly 分离胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
MnCl 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
Tris-Gly 分离胶缓冲液 (4×)	1.25	2.5	3.75	5
Phos-tag 溶液 (100×)	0.05	0.1	0.15	0.2
MnCl 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 MnCl₂ 的工作浓度默认为 50 μM Phos-tag 和 100 μM MnCl₂，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。MnCl₂ 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 MnCl₂ 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 Mn-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
Tris-Gly 浓缩胶缓冲液（4×）	0.5	1	1.5	2
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；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；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 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 1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液（溶液型）配制:

原料	1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液 1 L
1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液（粉末型）	取一包粉末溶于 1 L 超纯水中，即配制成 1 L 1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液

注：配制好的电泳液建议 4℃ 贮存，使用时间不宜超过两周。回收的电泳液外槽可以重复使用 1-2 次，内槽建议每次使用新鲜配制的缓冲液。

- 5.2 电泳条件:

推荐使用恒压 80V 进行浓缩胶电泳，随后用 150 V 进行分离胶电泳，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。

6.2 Western Blot 检测:

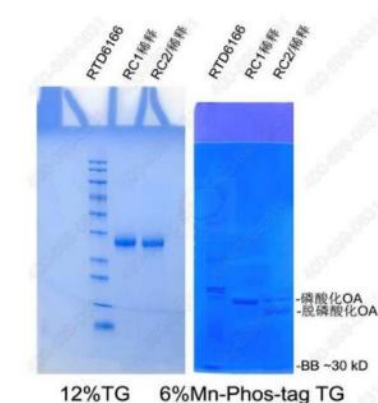
Phos-tag-SDS-PAGE 凝胶(Tris-Gly)进行转膜前,必须使用 EDTA 去除凝胶中的 Mn 离子,如不去除凝胶中的离子会导致转膜失败。推荐使用经典 Tris-甘氨酸转膜缓冲液(TB1040)进行湿转转膜。

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:

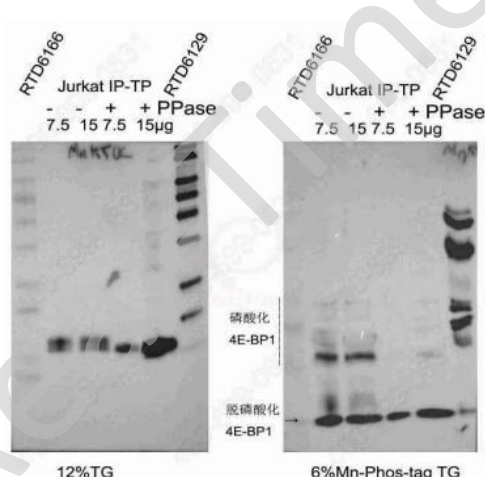
1. Phos-tag 磷酸化检测阳性对照电泳考染结果:



6% Mn-Phos-tag SDS-PAGE 检测 RC1 蛋白磷酸化效果

根据说明书步骤制备 6%Mn-Phos-tag SDS-PAGE 凝胶,同时使用 12%Tris-Gly SDS-PAGE(RTD6119-0012-11)作为对照;两板同时电泳;电泳条件:1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液(TG140P),80V 10min 后调节电压到 150V,至溴酚蓝前沿到达凝胶底部,电泳时间共 60 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 Mn-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(右图);而在常规 Tris-Gly SDS-PAGE 中,磷酸化和脱磷酸化 OA 几乎无法区分(左图)。

2. 4E-BP1 Mn-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 $2.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$;用脱盐柱(DS0540)去除盐离子(包括去除 NaF);脱盐后的样品用 λ PPase 消化(200 μg 蛋白加 300U PPase, 30 度 2 小时);不加 λ PPase 的作为酶解对照;TCA 沉淀样品后加 4×SDS-PAGE 上样缓冲液,最后得到 200 μl 上样液 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 70 度 10min, 上样 7.5 和 15 μl ;

凝胶: 12% Tris-Gly SDS-PAGE 作为对照平行胶; 6%Mn-Phos-tag SDS-PAGE 根据试剂盒 RTD5102 制备;

电泳: 1×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液, 两板同时电泳, 80V 20 min 后 150 V 60 min 终止电泳;

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

转膜: 两胶同时转膜, 转膜缓冲液 1×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 稀释) 四度双膜背靠背过夜孵育; 二抗: 羊抗兔 IgG-HRP 1: 5000 RT 60min;

检测: RealRCL 发光液检测, 均曝光 2 s;

结果：Mn-Phos-tag 胶中 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）（右图）；常规胶不能分辨磷酸化和脱磷酸化 4E-BP1（左图）。