

Phos-tag™ Acrylamide FAQ

1. Phos-tag Acrylamide 的溶解

5mmol/Phos-tag 液体 (3v/v%甲醇):

- 1) 10mg Phos-tag Acrylamide 里加入 0.1mL 甲醇
- 2) 使用枪头搅拌混合直至完全溶解。
- 3) 加 3.2mL 蒸馏水, 用枪头混匀。

2-8°C 避光保存。不适合零度以下保存。建议保存时间 6 个月。

注意: 避免溶解过程出现白色悬浮颗粒。

2. α -Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated (038-23221),

阳性对照 (含有磷酸化和非磷酸化 α -Casein), 如何使用?

用水或者上样 buffer 溶解。用水溶解后, 冷冻保存。电泳条件:

Phos-tag 50 μ mol/L, 分离胶浓度 10%。电流: 30mA, 1 小时。

3. 用 Alkaline Phosphatase (for Biochemistry) (018-10693) 进行磷酸化蛋白的去磷酸化反应体系。

37°C, 过夜。#10mg/mL phosphorylated protein 50 μ L

#0.50M Tris/HCl buffer (pH 9.0) containing 0.10 M MgCl₂ 10 μ L

#Sterilized water 39 μ L

#Alkaline phosphatase (018-10693) .0.3 unit/1L 有一点需要注意:

注意: ALP 活化使用 Mg 离子, 相同的非磷酸化蛋白质用 ALP 处理的

样品的条带和没有用 ALP 处理的样品的条带的位置不同。

4. Phos-tag SDS-PAGE 实验没有成功分离高磷酸化蛋白：

1) 使用 α -Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated(038-23221) 作为阳性对照，确认实验条件和试剂均没有问题。

2) 可使用 Phos-tag Biotin 检测样品中是否有磷酸化蛋白。确认有磷酸化蛋白后，再通过 Phos-tag SDS-PAGE 进行分离鉴定。

3) 经质谱鉴定有表达磷酸化蛋白，建议增大样品的含量，可使用 Phos-tag Agarose 进行磷酸化蛋白的富集。磷酸化蛋白含量过低，会影响其分离效果。

4) 文献报道有表达磷酸化蛋白，或者同源蛋白有表达磷酸化蛋白的，建议用 Phos-tag Biotin 先确认样品中是否有磷酸化蛋白。

5) 建议样品的 pH 值在 7 左右。酸性或者碱性条件下， Mn^{2+} -Phos-tag 与磷酸化基团的特异性结合较差。

6) 避免样品中含有高浓度的还原剂，变性剂，表面活性剂等。 β -巯基乙醇浓度不高于 0.2M（或者 5%）。

7) 进行 Phos-tag SDS-PAGE 的最佳样品是纯化的蛋白。如果是细胞裂解液，体外激酶反应液，组织匀浆液等，需要摸索最佳的分离胶，Phos-tag Acrylamide 的浓度。建议 Phos-tag Acrylamide 浓度从 50 μ M 开始摸索。

5. Phos-tag SDS-PAGE 凝胶用于 Western Blotting 实验的优化建议：

- 1) 可以检测的样品包括体外激酶反应体系，细胞裂解液，组织均浆液。
- 2) 每孔样品的上样量是 $10\sim 30\mu\text{g}$ （请根据蛋白表达量进行调整）
- 3) 制备样品中含有的还原剂、变性剂、螯合剂、钒酸等会使电泳条带发生弯曲或者拖尾。通过 TCA 沉淀或渗析法降低杂质含量。
- 4) 建议样品的 pH 值在 7 左右。如果加入上样缓冲液后溶液显黄色或者橙色，加入 Tris 缓冲液调整 pH 值为 7。
- 5) 目的蛋白分子量大于 60kDa，分离胶的丙烯酰胺浓度为 6%；目的蛋白分子量小于 60kDa，分离胶的丙烯酰胺浓度为 8%。
- 6) 如果样品中含有大量蛋白，比如细胞裂解液，组织均浆液，Phos-tag Acylamide 浓度为 $5\sim 25\mu\text{M}$ 。若目的蛋白浓度低，建议 Phos-tag Acylamide 浓度为 $100\mu\text{M}$ 。
- 7) Phos-tag SDS-PAGE 凝胶用于 Western Blotting 实验，湿法转膜建议： 10mMEDTA 的转移缓冲液处理凝胶 10min，不含有 EDTA 的转移缓冲液处理凝胶 10min。重复 3 次。强烈建议湿法转膜
- 8) Phos-tag SDS PAGE 半干法转膜建议：
 - i. 电泳后用含有 EDTA 的转移缓冲液处理凝胶，EDTA 的浓度为 100mM 。 100mMEDTA 的转移缓冲液处理凝胶 10min，不含有 EDTA 的转移缓冲液处理凝胶 10min。重复 3 次。
 - ii. 转膜的电流值提高 $2\%\sim 3\%$ ，延长时间 2 成。
 - iii. 转膜的缓冲液加 SDS，加到大约 $0.05\sim 0.2\%$ ，转膜效率会提高。

- 9) 使用目的蛋白的非磷酸化抗体即可。比如检测各种肿瘤细胞系中 Src 激酶活性实验，用 Src 的非磷酸化抗体即可。
- 10) 和光的 WIDE-VIEW™ Prestained Protein Siza MarkerIII (230-02461) 可检测作为转膜效率，但是无法判断分子量。
- 11) 一般预染的蛋白 marker 在 Phos-tag SDS-PAGE 中条带会弯曲，无法判断蛋白分子量。
- 12) 不能确认磷酸化蛋白和非磷酸化蛋白的分离，请进行常规的 SDS-PAGE, Western Blotting 实验。比对目的蛋白的迁移率。
- 13) 不能确认是因为蛋白发生磷酸化还是出现降解造成蛋白条带迁移，请进行常规的 SDS-PAGE 实验，确认不会出现条带迁移。
- 14) 目的蛋白磷酸化与非磷酸化分离效果不佳，使用 α -Casein, from Bovine Milk, Dephosphorylated (038-23221) 作为阳性对照，确认实验条件和试剂均没有问题。如果确认能够分离，调整分离胶，Phos-tag Acylamide 的浓度。建议使用品质佳的 $MnCl_2$ (139-00722)。