

Phospho-tag™磷酸化检测 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(Bis-Tris 体系)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS0091-1	Phospho-tag™磷酸化检测 SDS-PAGE	20gels
NBS0091-2	凝胶制备试剂盒(Bis-Tris 体系)	100gels

产品简介:

Phospho-tag™磷酸化检测 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(Bis-Tris), 即 SDS-PAGE Gel Preparation Kit (Bis-Tris) for Phosphorylated Proteins, 也称磷酸化蛋白检测 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适当的磷酸化目的蛋白抗体的情况, 以及研究目的蛋白多位点磷酸化的情况。

Phospho-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(His/Asp/Lys)残基。在用 Phospho-tag™配制的 Phospho-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。

本试剂盒为基于 Bis-Tris 缓冲体系的 Phospho-tag™磷酸化检测 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 提供的 Gel Buffer 采用近中性 pH 的 Bis-Tris 缓冲液, 不含 SDS。电泳时可使用常用的 MOPS 缓冲系统的 SDS-PAGE 电泳液, 直接向其中添加本试剂盒中提供的必需组分即可。

本试剂盒提供了经优化的二价阳离子溶液 MCl₂ Solution (10X), 确保能获得比较理想的检测效果。

本试剂盒小包装约可配制 1.5mm 或 0.75mm 厚度常规大小的凝胶 10 或 20 块, 中包装约可配制 1.5mm 或 0.75mm 厚度常规大小的凝胶 50 或 100 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。

保存条件:

Phospho-tag™ Solution (100X)在-20℃ 避光保存, 其余 4℃ 保存, 一年有效。

30% Acr-Bis (29:1)、TEMED Substitute 和 NaHSO₃ Solution (100X)须避光保存。

Bis-Tris Gel Buffer (4X)、MCl₂ Solution (10X)、凝胶聚合催化剂和 0.5M EDTA 也可以室温保存, 至少 1 个月有效。

Phospho-tag™ Solution (100X) 4℃ 避光保存, 至少 1 个月内有效。

凝胶聚合催化剂用水配制成 10%溶液后, 分装成小管-20℃ 保存, 通常半年内有效。

产品组成:

组分	名称	20gels	100gels
P0881S-1	30% Acr-Bis (29:1)	32ml	160ml
P0881S-2	Bis-Tris Gel Buffer (4X)	26ml	130ml
P0881S-3	Phospho-tag™ Solution (100X)	0.8ml	0.8ml×5
P0881S-4	MCl ₂ Solution (10X)	0.1ml	0.5ml
P0881S-5	凝胶聚合催化剂	0.1g	0.5g
P0881S-6	TEMED Substitute	0.2ml	1ml
P0881S-7	NaHSO ₃ Solution (100X)	55ml	255ml
P0881S-8	0.5M EDTA	15ml	75ml

产品使用:**1. 凝胶配制的准备工作:**

a. 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, 需特别注意不能有 SDS 残留。

b. 10%凝胶聚合催化剂的配制。例如称取 0.1g 凝胶聚合催化剂, 用水溶解, 并定容至 1ml, 即为 10%凝胶聚合催化剂。

c. MCl₂ Solution (1X)的配制。取 MCl₂ Solution (10X), 用超纯水稀释 10 倍得到 MCl₂ Solution (1X), 用于后续凝胶的配制。MCl₂ Solution (1X)宜现配现用, 也可在室温短暂放置 2-3 天, 如出现沉淀, 请配制并使用新的溶液。

d. 常用蛋白电泳胶的模具(胶板宽度为 10 厘米)所需下层胶和上层胶体积(下层胶按 6 厘米高

度计算，上层胶按 1.5 厘米高度计算，均含约 0.3ml 的冗余量)参见下表。

Gel Thickness	Volume of Resolving Gel	Volume of Stacking Gel
0.75mm	4.0ml	1.0ml
1.0mm	5.4ml	1.5ml
1.5mm	8.0ml	2.0ml

注：下层胶体积已包含适量冗余，请勿全部用于灌制下层胶，以免灌胶时上层胶高度不够。

2. 分离胶的配制：

a. 根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度。不同浓度的分离胶的最佳分离范围如下表所示。

Phospho-tag™ SDS-PAGE (Bis-Tris)分离胶浓度	最佳分离范围
6%胶	50-150kD
8%胶	30-90kD
10%胶	20-80kD
12%胶	12-60kD
15%胶	10-40kD

b. 按照下面的表格配制 Phospho-tag™-PAGE (Bis-Tris)分离胶(即下层胶)。

成分	配制不同体积分离胶所需各成分的体积(毫升)					
6%胶	5	10	15	20	30	50
Ultrapure Water	2.62	5.24	7.86	10.48	15.72	26.2
30% Acr-Bis (29:1)	1	2	3	4	6	10
Bis-Tris Gel Buffer (4X)	1.25	2.5	3.75	5	7.5	12.5
Phospho-tag™ Solution (100X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
MCI2 Solution (1X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%凝胶聚合催化剂	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15	0.25

TEMED Substitute	0.005	0.01	0.015	0.02	0.03	0.05
成分	配制不同体积分离胶所需各成分的体积(毫升)					
8%胶	5	10	15	20	30	50
Ultrapure Water	2.27	4.54	6.81	9.08	13.62	22.7
30% Acr-Bis (29:1)	1.35	2.7	4.05	5.4	8.1	13.5
Bis-Tris Gel Buffer (4X)	1.25	2.5	3.75	5	7.5	12.5
Phospho-tag™ Solution (100X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
MCl2 Solution (1X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%凝胶聚合催化剂	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15	0.25
TEMED Substitute	0.005	0.01	0.015	0.02	0.03	0.05
成分	配制不同体积分离胶所需各成分的体积(毫升)					
10%胶	5	10	15	20	30	50
Ultrapure Water	1.97	3.94	5.91	7.88	11.82	19.7
30% Acr-Bis (29:1)	1.65	3.3	4.95	6.6	9.9	16.5
Bis-Tris Gel Buffer (4X)	1.25	2.5	3.75	5	7.5	12.5
Phospho-tag™ Solution (100X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
MCl2 Solution (1X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%凝胶聚合催化剂	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15	0.25
TEMED Substitute	0.005	0.01	0.015	0.02	0.03	0.05
成分	配制不同体积分离胶所需各成分的体积(毫升)					
12%胶	5	10	15	20	30	50
Ultrapure Water	1.62	3.24	4.86	6.48	9.72	16.2
30% Acr-Bis (29:1)	2	4	6	8	12	20

Bis-Tris Gel Buffer (4X)	1.25	2.5	3.75	5	7.5	12.5
Phospho-tag™ Solution (100X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
MCl ₂ Solution (1X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%凝胶聚合催化剂	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15	0.25
TEMED Substitute	0.005	0.01	0.015	0.02	0.03	0.05
成分	配制不同体积分离胶所需各成分的体积(毫升)					
15%胶	5	10	15	20	30	50
Ultrapure Water	1.12	2.24	3.36	4.48	6.72	11.2
30% Acr-Bis (29:1)	2.5	5	7.5	10	15	25
Bis-Tris Gel Buffer (4X)	1.25	2.5	3.75	5	7.5	12.5
Phospho-tag™ Solution (100X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
MCl ₂ Solution (1X)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%凝胶聚合催化剂	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15	0.25
TEMED Substitute	0.005	0.01	0.015	0.02	0.03	0.05

注 1:按照上述顺序依次加入各种试剂,加入 TEMED Substitute 前先充分混匀,加入 TEMED Substitute 后立即混匀,并马上加入到制胶的模具中,用异丙醇、0.1% SDS 或蒸馏水封住液面,直至下层胶凝固充分。通常 10-30 分钟内胶会凝固。具体的凝固时间和温度及光照有关,说明书中 10%凝胶聚合催化剂和 TEMED Substitute 的正常推荐用量是室温为 25°C 时的推荐用量。为达到与 25°C 时相近的凝固时间,当室温低于 25°C 时,可以适当同时加大 10%凝胶聚合催化剂和 TEMED Substitute 的用量,例如 20°C 时建议用量是正常推荐用量的 1.5 倍,15°C 时建议用量是正常推荐用量的 2 倍。

注 2:避免产生气泡。如果发现非常容易形成气泡,可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

c. 本试剂盒中的 Phospho-tag™和 MCl₂ 的工作浓度与比例已经过适当优化,如果仍觉得结果不理想,可在此基础上进行优化。(a) 试剂盒中提供的 Phospho-tag™ Solution (100X),配制凝胶时较优的使用条件为稀释至 1X,也可根据情况稀释至 0.5X 2X 进行使用。(b) MCl₂ Solution (1X)的使用体积需要与实际加入的 Phospho-tag™ Solution 体积一致,或根据实

验情况提高为其 2 倍。凝胶溶液的总积需维持不变。

注 1: 通常情况下, Phospho-tag™ 的浓度越高、MCI2 与 Phospho-tag™ 的比例越大, 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。

注 2: 凝胶中如果使用 2X 工作浓度的 Phospho-tag™, 即使经过 EDTA 处理, 半干式转膜效率可能也会受影响。这种情况下需采用传统的湿法转膜。

3. 浓缩胶的配制:

按照如下表格配制 Phospho-tag™-PAGE (Bis-Tris) 浓缩胶(也称堆积胶、积层胶或上层胶)。

成分	配制不同体积分离胶所需各成分的体积(毫升)					
	2	3	4	6	8	10
上层胶						
Ultrapure Water	1.188	1.782	2.376	3.564	4.752	5.94
30% Acr-Bis (29:1)	0.3	0.45	0.6	0.9	1.2	1.5
Bis-Tris Gel Buffer (4X)	0.5	0.75	1	1.5	2	2.5
10%凝胶聚合催化剂	0.01	0.015	0.02	0.03	0.04	0.05
TEMED Substitute	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

注 1: 按照上述顺序依次加入各种试剂, 加入 TEMED Substitute 前先充分混匀, 加入 TEMED Substitute 后立即混匀。去除下层胶上面覆盖的液体, 尽量去干净, 然后倒入添加了浓缩胶预混液, 插入梳子待凝固。通常 10-30 分钟内胶会凝固。具体的凝固时间和温度及光照有关, 上表中 TEMED Substitute 和 10%凝胶聚合催化剂的正常推荐用量是室温为 25°C 时的推荐用量。为达到与 25°C 时相近的凝固时间, 当室温低于 25°C 时, 可以适当增加 10%凝胶聚合催化剂和 TEMED Substitute 的用量, 例如 20°C 时建议使用正常推荐用量的 1.5 倍, 15°C 时建议使用正常推荐用量的 2 倍。

注 2: 避免产生气泡。如果发现非常容易形成气泡, 可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

注 3: 配制完成的凝胶可在 4°C 保存 1-2 天后使用, 但由于凝胶的效果会随时间退化, 需尽早使用。

4. 电泳缓冲液的配制:

使用 MOPS 缓冲系统的 SDS-PAGE 电泳液, 并添加试剂盒中提供的 NaHSO₃ Solution

(100X), 将其稀释至 1X。例如在 1L 的电泳液中, 须添加 10ml NaHSO₃ Solution (100X)。注: 含 NaHSO₃ 的电泳液须现配现用。

5. 样品的制备:

进行蛋白样品收集。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:

- a. 确保样品中不含实验干扰物质: 避免使用如 EDTA 等金属螯合剂, 确认所使用的抑制剂和裂解液等产品不含 EDTA, 同时也需去除培养液中的 EDTA。避免样品中含有钒酸或钒酸盐。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。适用的样品裂解液推荐使用 Western 及 IP 细胞裂解液(无抑制剂), 并添加蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X)。
- b. 避免使用过于粘稠的样品。
- c. 样品使用相同的上样缓冲液。

6. 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, 蛋白分子量标准在磷酸化蛋白 SDS-PAGE 中不能直接用于推断分子量, 但可在电泳中起到指示作用, 也可作为转膜效率的参考。为避免干扰样品条带, 蛋白分子量标准可与其它样品之间保留一条或更多空白泳道。

7. 电泳后的相关分析:

a. 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。

b. Western 检测。

Phospho-tag™-PAGE 凝胶(Bis-Tris)进行转膜前, 须使用 EDTA 去除其中的 M2⁺。将凝胶浸泡于含有 10mM EDTA 的转膜液中, 摇床摇动孵育 10 分钟, 重复 1-3 次。EDTA 的浓度、孵育时间和次数可根据实际情况优化。如果凝胶较厚, 可适当延长每次孵育的时间。如需进行半干法转膜, 在 10mM EDTA 浸泡后需额外再将凝胶浸泡在不含 EDTA 的转膜液中摇床摇动孵育 10 分钟。本试剂盒中提供了 0.5M EDTA, 可按需进行配制。

注意事项：

1. 目的蛋白抗体的质量非常重要。如果目的蛋白抗体本身有非特异性条带，可能会影响目的蛋白磷酸化的判断。通常即使没有进行磷酸化的诱导处理，目的蛋白本身也可能有一定程度的磷酸化。
2. 短期内如果频繁使用，Phospho-tag™ Solution (100X)也可以 4°C 避光保存，并建议在 1 个月内用完。
3. 凝胶聚合催化剂用水配制成 10%溶液后，应当-20°C 保存。同时应尽量减少室温存放时间，以防失效。
4. 30% Acr-Bis (29:1)和 0.5M EDTA 对人体有呼吸道、生殖等特定器官毒性，或致畸致癌毒性，操作时请特别小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
5. TEMED Substitute 易挥发，使用后请盖紧瓶盖。另外凝胶凝聚的速度和温度及光照关系密切，可通过适当调节凝胶聚合催化剂和 TEMED Substitute 的用量，控制在不同的室内环境下凝胶凝聚的速度。
6. TEMED Substitute 易燃，有毒，有腐蚀性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或腐蚀其它物品。
7. NaHSO₃ Solution (100X)对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！