

# PhosSTOP 磷酸酶抑制剂混片

## 方便可靠地保护蛋白免受磷酸酶的攻击

### 简介

许多生物学过程和通路的调节都伴随着磷酸酯的形成和去除；而蛋白的磷酸化状态的平衡是由蛋白激酶和磷酸酶相互影响达到的。为了了解这些通道，大量的研究工作正在制药公司和研究院所开展。其中一个重要的步骤就是准确的观察一般和特异的磷酸化状态，而这就需要对磷酸化状态的有效保护。

磷酸化的蛋白可以被非特异性的磷酸酶（例如：碱性磷酸酶），特异性的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶、酪氨酸蛋白磷酸酶或双重特异性磷酸酶去磷酸化。这里，我们就一种新的磷酸酶抑制剂混合片的性能做一介绍，称之为 **PhosSTOP**。**PhosSTOP** 是一种即用型的片剂，其中的一些磷酸酶抑制剂只需要纳摩尔级的量。无需花费漫长的时间寻找合适的磷酸酶，也不必繁琐的称量和混合。**PhosSTOP** 可同时持续抑制包括酸性和碱性磷酸酶，及丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶（PP1, PP2A, PP2B）和酪氨酸蛋白磷酸酶在内的多种磷酸酶。

一片 **PhosSTOP** 可以溶解在 10 ml 的缓冲液中。**PhosSTOP** 具有极好的溶解性，如果需要，可以将 2 – 3 片 **PhosSTOP** 溶解在同样体积的缓冲液中；相反，也同样可以选用小体积的缓冲液。溶解后的储存液体 4°C 可以稳定保存一个月以上，- 20°C 下可以保存 6 个月。

### 结果和讨论

磷酸酶无处不在；依赖于不同的物种、细胞或组织类型、实验中使用的特异的细胞状态，磷酸酶的种类和数量都会有差异。每种磷酸酶都表现出不同的底物特异性，这里我们分离了几种来自不同物种的磷酸酶用以测试 **PhosSTOP**



的抑制效果（表 1）的范围。

**PhosSTOP** 可应用于多种细胞提取物中磷酸酶的抑制作用，对酸性和碱性磷酸酶，丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶

表 1 **PhosSTOP** 对分离的磷酸酶的抑制作用。每次检测使用不同的磷酸化多肽。malachite green assay 检测释放的磷酸盐。以百分比显示产品的抑制效果。**PhosSTOP** 的工作浓度为 1x。

磷酸酶	Units(U/10 ml)单位	Inhibition(%)
Calf alkaline phosphatase	140	98.4
Potato acidic phosphatase	2	93.7
Human acidic phosphatase	640	99.5
Rabbit PP1	200	98.6
Human PP2A	500	94.4
Human PTP	500	96.7

酶（PP1, PP2A, PP2B）和酪氨酸蛋白磷酸酶的抑制作用见表 2。

磷酸酶活性的检测通过 western blots 实验检测，例如，丝氨酸磷酸酶特异性抗体（图 2）。

**PhosSTOP** 片剂可与含有福尔马林的缓冲液配合兼容使用；适用于福尔马林固定样本，保持组织切片中蛋白的磷酸化状态。

**PhosSTOP** 片剂蛋白分离过程中有效保护蛋白，不会影响后继的蛋白检测（例如：western blot）或是蛋白浓度检测（例如：BCA 或是 Bradford）。

表 2 对不同细胞提取物中磷酸酶的抑制效果。每次检测使用不同的磷酸化多肽。malachite green assay 检测释放的磷酸盐。百分比显示产品效果 **PhosSTOP** 工作浓度为 1x。

	AP	SP	PP1	PP2A <sup>1</sup>	PTP <sup>1</sup>
A431 lysate <sup>3</sup>	100	88.5	98.2	80.2	67.1
COS lysate <sup>3</sup>	100	100	95.8	52.3	68.1
Maize extract <sup>2</sup>	100	69.0	97.8	72.2	89.9
Tobacco extract <sup>2</sup>	93.0	70.2	96.8	100	96.0
Insect cell lysate <sup>3</sup>	100	86.8	94.6	10.9	50.2

<sup>1</sup>Other enzymes in the cell extract may interfere with the assay.

<sup>2</sup>Lysis via P-PER Plant Protein Extraction Kit (Pierce)

<sup>3</sup>Lysis via Lysis-M solution from complete Lysis-M Kit

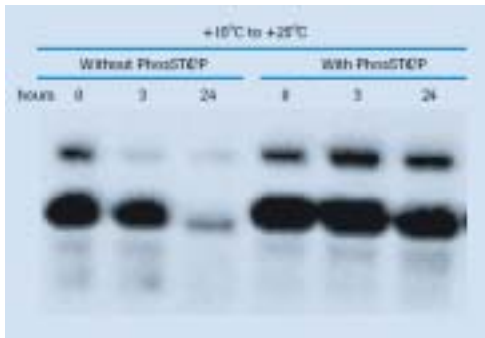


图2: 如 western blot 结果所示, **PhosSTOP** 有效保护昆虫细胞裂解物中蛋白的磷酸化状态。昆虫细胞裂解使用 **PhosSTOP** 处理右边为未处理的对照组, 如所示时间孵育后, 加入抗磷酸酶丝氨酸抗体和相应二抗, Lumi-Light plus westenn Blotting 检测。

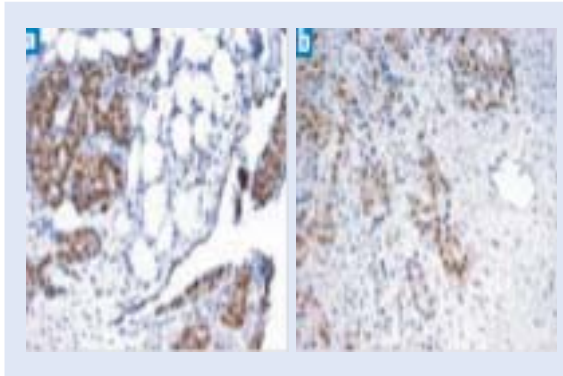


图3: **PhosSTOP** 福尔马林固定, 石蜡蜡包埋人胎盘癌切片中蛋白磷酸化状态的有效保护。使用 p44/42 MARK 抗阵检测 4% 福尔马林固定的人胎盘癌切片中 PERK。(a) 加入 **PhosSTOP** (b) 没有加入 **PhosSTOP**。

### 结论和讨论

**PhosSTOP** 可以方便地保护磷酸化蛋白免受去磷酸化作用; 可持续抑制包括酸性和碱性磷酸酶, 及丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (PP1, PP2A, PP2B), 酪氨酸蛋白磷

酸酶及双特异性磷酸酶在内的多种磷酸酶。

**PhosSTOP** 可抑制多种来源的磷酸酶, 包括动物, 细菌, 植物和酵母细胞; 同时还可以与含有福尔马林的缓冲液兼容, 适用福尔马林和石蜡固定的组织切片。

**PhosSTOP** 与蛋白酶抑制剂兼容, 实现对磷酸酶和蛋白酶的全面抑制作用。

cOmplete Protease Inhibitor Tablets		
Product	Cat.No	Pack Size
cOmplete	11 697 198 001	20 tablets
	11 838 145 001	3X20 tablets
cOmplete Mini	11 838 153 001	25 tablets
cOmplete EDTA-free	11 873 580 001	20 tablets
cOmplete Mini, EDTA-free	11 836 170 001	25 tablets

cOmplete Protease Inhibitor Tablets in EASYpacks		
Product	Cat.No	Pack Size
cOmplete	04 693 116 001	20 tablets (for 50 ml each)
cOmplete Mini	04 693 124 001	30 tablets (for 10 ml each)
cOmplete EDTA-free	04 693 132 001	20 tablets (for 50 ml each)
cOmplete Mini, EDTA-free	04 693 159 001	30 tablets (for 10 ml each)

Product	Cat.No	Pack Size
<b>PhosSTOP</b>	<b>EASYpacks</b>	
	04 906 845 001	10 tablest (for 10 ml each)
	04 906 837 001	20 tablest (for 10 ml each)