

蛋白质互作/后修饰质谱筛选 (LFQ)
Universal IP-MS Enrichment Kit (3×DYKDDDDK tag, MS grade)
Catalog Number: MG01

■ **用户自备材料:**

1. 超纯水 (18.2MΩ·cm@25°C) 或超纯水系统 (如厦门锐思捷, #RODI-220B1)
2. 目的哺乳动物细胞系、细胞培养试剂及耗材、生物安全柜、细胞培养箱等仪器/系统
3. 哺乳动物细胞过表达载体 (用于顺转, transient transfection) 或慢病毒载体 (用于稳定细胞株构建, stable cell line)
4. 用户亦可使用高效的工具细胞系—[HEK-293T 进行 IP-MS 或 SILAC-IP-MS 实验](#)
5. 蛋白酶和磷酸酶抑制剂
6. 0.45μm 针头式过滤器 (如 Millipore, #SLHV033RB)、一次性无菌针头注射器 (5ml/10ml 等)
7. 1.5ml/2ml/5ml/15ml/50ml 离心管 (Axygen、ESCO 等)
8. 考马斯亮蓝染色液 (推荐使用 [Imultiomics, #MGR01](#))
9. Bradford 蛋白质定量试剂 (推荐使用 [Imultiomics, #MGR02](#)) 及检测系统 (酶标仪等)
10. 带制冷的台式高速离心机 (>16000g, 如 BeckmanCoulter: Microfuge 20R)
11. 制冰机
12. SDS-PAGE 电泳系统及 Western blot 转印系统
13. ECL 试剂 (如 ThermoFisher Scientific, #34577) 及检测系统 (如上海勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope 6000 系列)
14. 旋转混合仪 (如海门市其林贝尔仪器制造有限公司, #BE-1200)
15. Co-IP/Pull-down in-gel trypsin digestion Kit (IGD)—[Imultiomics, #MG03](#)
16. Co-IP/Pull-down in-solution trypsin digestion Kit (ISD)—[Imultiomics, #MG04](#)

■ 术语

1. PPIs (Protein-Protein Interactions): 蛋白质-蛋白质相互作用。
2. PTMs (Protein Translational Modifications): 蛋白质翻译后修饰。
3. Bait Protein: 聚焦研究的靶蛋白。
4. IP/Co-IP (Immunoprecipitation/Co-immunoprecipitation): 免疫沉淀/免疫共沉淀, 即通过抗体 (antibody) 介导的 IP/Co-IP 富集/捕获 Bait 蛋白和与 Bait 互作的蛋白质分子。
5. LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry): 液相色谱-质谱联用技术。是蛋白质组学 (Proteomics) 研究的主要工具。用于鉴定/定量分析未知样品中的蛋白质种类、丰度及表达水平/富集水平的相对变化, 实现对蛋白质大分子的高通量分析。
6. IP-MS (Immunoprecipitation-Mass Spectrometry): 免疫沉淀-质谱, 即利用 IP/Co-IP 技术富集 Bait 蛋白的相互作用复合物 (Protein interaction complex) 后, 再结合质谱技术实现对富集的相互作用复合物进行鉴定/定量分析, 从而筛选与 Bait 蛋白存在相互作用的蛋白质 (Interactors) 及潜在的蛋白质 PTMs (尤其是 Bait 蛋白)。
7. 3×DYKDDDDK tag: 3×FLAG 标签。3×DYKDDDDK、HA、Myc 等标签是 IP/Co-IP 技术中常用的亲和标签[1]。
8. LFQ (Label-free Quantification)[2]: 基于质谱的“非标记 (label-free)”相对定量技术。此处指将 IP-MS 富集的蛋白质样品分别进行 LC-MS 检测, 借助蛋白质的质谱强度 (LFQ intensity) 结合统计分析, 实现对不同组样本中每个蛋白质的相对定量分析, 从而筛选出被显著富集的蛋白质 (即潜在 Bait-互作蛋白)。

■ MG01 产品简介:

- ★ 免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 是研究蛋白质-蛋白质相互作用 (PPIs)/蛋白质翻译后修饰 (PTMs) 的经典技术。使用针对 Bait 蛋白的特异性抗体, 通过 Co-IP 捕获靶蛋白 (Bait)-互作蛋白复合物 (Protein interaction complex) 后, 借助质谱 (Mass Spectrometry, MS) 实现对复合物的鉴定/定量, 从而筛选 Bait 的潜在特异性互作蛋白。
- ★ Co-IP 富集蛋白质复合物过程中, 非特异性的蛋白质粘附不可避免, 且无法有效剔除。质谱级 Co-IP 样品制备与 Co-IP 结合 Western blot 检测的样品制备完全不同, 如何制备满足质谱检测的 Co-IP 样本, 实现对“真的”蛋白质复合物的富集, 是获得优质数据的关键。
- ★ 谱璟科技(上海)有限公司 (Imultiomics) 通过技术研发, 开发了通用型的质谱级 Co-IP 富集试剂盒 (Universal IP-MS Enrichment Kit)—**MG01**。该试剂盒优势:
 - 本试剂盒整理流程包含:
 - (1) 融合 3×DYKDDDDK tag 的 **Bait** 基因设计策略
 - (2) 3×DYKDDDDK-**Bait** 蛋白表达水平 western blot (WB) 检测
 - (3) Bait 蛋白的 IP-WB 预实验流程
 - (4) 质谱级 Co-IP 样品制备借助 MG01 产品的“保姆式”的技术流程, 高效助力用户制备出高质量的质谱级 Co-IP 样品, 筛选和发现 Bait 蛋白的新潜在互作及 PTMs。
 - 提供了完成整体实验的主要试剂及耗材。可满足完成 6 个 IP-MS 的样品制备 (3×2 组或 2×3 组的 IP-MS 比较实验)。
 - 本试剂盒适用于 Bait 蛋白定位于细胞质 (Cytoplasm)、细胞核 (Nucleus)、甚至细胞膜 (single transmembrane protein tested) 的 IP-MS 样品制备, 通用性高。
 - 提供了表达 3×DYKDDDDK tag 融合蛋白的阳性对照细胞样品, 可高效评估 Bait 蛋白的过表达水平, 助力用户完成高质量的 IP-MS 样品制备。
- ★ 本产品目前仅对细胞系样品进行了测试和优化, 未对组织样品进行测试, 请用户知悉。
- ★ 本产品仅供科研使用!

■ 问题与解决方案:

Q: 为什么不使用直接针对 Bait 蛋白的抗体进行 IP-MS 样品制备, 以获得“更真实”的、内源性的互作蛋白 (endogenous interaction complex) 数据?

A: (1) 内源性的 Bait 蛋白质的表达水平不易评估和衡量; (2) 针对 Bait 蛋白的抗体 (antibody) 的特异性和亲和力高低不易评估和衡量; (3) IP-MS 和 IP-WB 的检测方式不同。IP/Co-IP 样本制备过程中, 非特异性粘附蛋白是不可避免, 也无法有效剔除。IP-MS 的样品是质谱 (MS) 检测, 非特异性粘附蛋白含量高, 则会抑制 Bait 蛋白质及互作蛋白质的检出; 而 IP-WB 的样品是通过 western blot 检测的, western blot 基于抗体的特异性, 即使 IP/Co-IP 样品中有大量的非特异性粘附蛋白, 它们对 Bait 和 Bait 的互作蛋白的检出干扰很小。

Q: 过表达方式的 IP-MS, 会不会导致假阳性互作结果?

A: (1) 绝大部分蛋白质分子量很大, 蛋白质互作基于蛋白质的空间结构。蛋白质的空间折叠有“柔性”, 通常而言, 融合的亲和标签不大会对 Bait 蛋白的空间结构造成巨大影响。(2) 亲和标签 (affinity tag) 与其对应的抗体亲和力高, 通过 Co-IP 可高效富集 Bait 蛋白的互作复合物, 从而提高后续质谱的检出率。(3) 大量学术文献及我司的研究/服务数据 (后续的生物验证及功能/机制深入解析实验) 显示, “真的”就是“真的”, “假的”就是“假的”。

Q: 我的目的细胞, 难以实现过表达, 如何通过 IP-MS 实现互作筛选鉴定?

A: 可利用模式细胞系 (如 HEK-293T, [imultiomics, #C01](#)), 结合 MG01 试剂盒进行筛选。绝大部分细胞系的蛋白质组表达谱 (Proteome Expression Profile) 是高度相似的, 蛋白质相互作用模式亦存在高度共性。如 HEK-293T 细胞, 可实现高效顺转 (Transient transfection) 和稳转株构建 (Stable cell line), 是筛选蛋白质互作的良好工具细胞。后续的生物互作验证可以通过 direct Co-IP 结合 western blot 在您的目的细胞系中进行验证 (要先在 HEK-293T 细胞系中通过 IP-WB 确认了阳性互作)。当然, 如神经细胞、生殖细胞和原代细胞等, 其蛋白质组表达谱可能与绝大多数细胞系有差异, 可以尝试通过电转、腺病毒等方式尝试 IP-MS。

Q: 我构建的过表达质粒在细胞中的表达水平很低, 怎么办?

A: 基因表达受多种因素调控。(1) 用户构建的过表达质粒完全正确, 但是转染细胞后, 不表达或者表达水平很低, 是有一定概率出现的情况 (我司的技术服务项目确实观察到几起这类低概率事件)。对于这类现象, 建议 a) 更换表达质粒载体; b) 尝试用 293T 和您的目的细胞同时转染, 排除目的细胞转染效率低下的可能。(2) 对于慢病毒构建稳定细胞株, 同样会出现 Bait 蛋白表达水平低的情况。因为慢病毒转导 (transduction) 目的细胞, Bait 基因整合到染色体上是随机事件, 其表达水平高低自然受多种调控因素影响。此外, 随着稳定细胞株传代次数的增加, 也观察到 Bait 蛋白表达水平降低的现象。

Q: Bait 蛋白过表达水平比 MG01 kit 中的 PC 还高, 将来的 MS 筛选的假阳性是否也会增高?

A: 还是前面那句话, “真的”就是“真的”, “假的”就是“假的”。

■ 参考文献:

1. Mishra V: **Affinity Tags for Protein Purification**. *Curr Protein Pept Sci* 2020, **21**(8):821-830.
2. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M: **Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ**. *Mol Cell Proteomics* 2014, **13**(9):2513-2526.