

哺乳动物细胞系 SILAC 标记流程

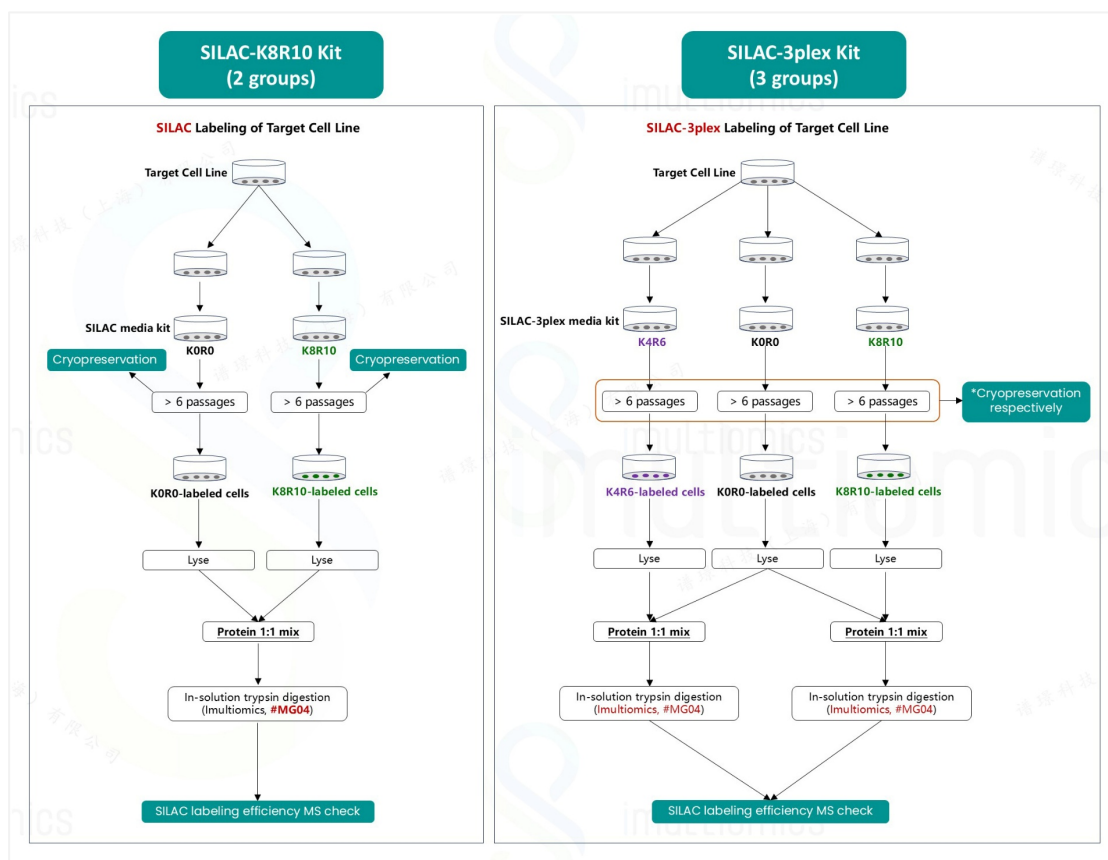
一、试剂及耗材:

1. SILAC 完全培养基 (SILAC medium + dialyzed FBS)。

品牌	名称	货号	产品详情
Imultiomics	SILAC-DMEM (K8R10) Kit	SM202103	More info.
Imultiomics	SILAC-DMEM (3plex) Kit	SM202104	More info.
Imultiomics	SILAC-RPMI (K8R10) Kit	SM202108	More info.
Imultiomics	SILAC-RPMI (3plex) Kit	SM202109	More info.

2. 细胞消化胰蛋白酶溶液。
3. 10cm 培养皿。

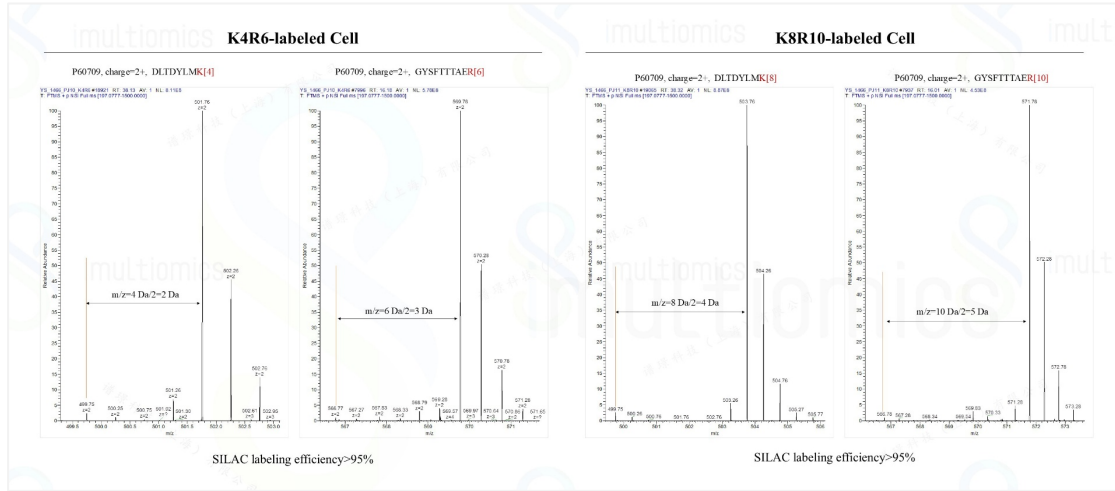
二、细胞 SILAC 标记流程:



1. 将培养于普通培养基 (如 DMEM、RPMI-1640 等) 中的贴壁目的细胞用胰蛋白酶溶液消化并用普通培养基中和。按照要进行 SILAC 标记的细胞组数 (2 组或 3 组) 等分并离心 (如 1000g, 室温, 3 分钟)。
2. 离心后, 弃去培养基, 分别用适量的 SILAC 完全培养基重悬细胞。取适量接种于 10cm 培养皿中。分别补加 SILAC 完全培养基至 10~12ml 后, 置于细胞培养箱中进行平行培养。

3. 待步骤 2 的细胞汇合度至 90-100%后，消化，用对应的 SILAC 完全培养基中和后，取总量的 10~20%接种于新的 10cm 皿中，补加 SILAC 完全培养基，直至细胞汇合度再次达到 90-100%。
4. 重复步骤 3 约 4-6 次 (取决于目的细胞倍增速度)，即能完成对细胞的 SILAC 标记。
5. 步骤 4 完成后，分盘扩大培养：
 - (1) 对不同 SILAC 标记的细胞进行冻存保种 ([SILAC 完全培养基](#)+10% DMSO (如 Sigma-Aldrich, #D2650))。
 - (2) 对一部分细胞，裂解提取蛋白质并定量，不同标记组的蛋白质等量混合后，参照 [MG04: Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion \(ISD\) Kit](#) 制备质谱待检的肽段，进行质谱检测，确认细胞 SILAC 标记效率。
 - (3) 亦可使用 [MG04: Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion \(ISD\) Kit](#) 只对 K4R6 或 K8R10 标记的细胞蛋白质进行酶解，制备质谱待检肽段和质谱检测。后续手动查看质谱原始数据，通过对 β -actin 蛋白质的代表性肽段的质谱强度，确认细胞 SILAC 标记效率。

三、细胞 SILAC 标记效率质谱检测:



SILAC labeling efficiency MS check. Human cell line was labeled with *SILAC-DMEM (3plex) Kit* ([Imultiomics, SM202104](#)) for 5 passages. Protein samples of K4R6- and K8R10-labeled cells were extracted and digested using *Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion (ISD) Kit* ([Imultiomics, MG04](#)). Desalted peptides were measured by Orbitrap Fusion (ThermoFisher Scientific). The representative peptides of β -actin showed that SILAC labeling efficiency were more than 95%, suitable for downstream applications.

四、问题与解决方案:

问题	原因	解决办法
1. 细胞活力降低或生长缓慢。 2. 细胞形态的改变。	SILAC 所用的 dialyzed FBS 营养要比普通 FBS 缺乏一些, 可能会对一些 FBS 敏感的细胞生长和增殖产生负面影响。	1. 更换易增殖的细胞株进行实验。 2. 增加 dialyzed FBS 的量, 如增至 15-20%。
3. 细胞 SILAC 标记效率低	1. 标记代数不够。 2. 标记过程中发生过污染。 3. 某些类型的细胞, 会在极少出情况下出现 Arg 转变成 Pro 的情况, 导致标记效率降低。	1. 增加标记代数。 2. 更换细胞系。

五、SILAC 产品及应用:

SILAC 培养基产品搭配以下试剂盒, 可高精度的进行蛋白质-蛋白质互作、蛋白质翻译后修饰、小分子靶点蛋白的筛选和发现。

货号	名称	应用领域	质谱定量方式
MG01	IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag)	蛋白质互作/后修饰筛选	LFQ [1]
MG02	SILAC-IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag)	蛋白质互作/后修饰筛选	SILAC [2, 3]
MG05	SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [1]
MG08	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]
MG06	SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [1]
MG09	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]

MG07	SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [1]
MG10	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]

六、参考文献:

1. Cox J, Hein MY, Luber 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.
2. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**(5):376-386.
3. Hoedt E, Zhang G, Neubert TA: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for quantitative proteomics.** *Advancements of mass spectrometry in biomedical research* 2019:531-539.