

蛋白质互作/后修饰质谱筛选 (SILAC)**SILAC-IP-MS Enrichment Kit (3×DYKDDDDK tag, MS grade)****Catalog Number: MG02****■ 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: 细胞系要求易于增殖和培养, 便于实现 SILAC 标记 (更多注意事项参见 SILAC Media Kit 及《哺乳动物细胞系 SILAC 标记流程》)
3. 用户亦可使用高效的工具细胞系—[SILAC-标记 293T 细胞系 \(Ready-to-Use\)](#)
4. 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)
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. SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture), 高精度定量蛋白质组学技术[1, 2]。
2. PPIs (Protein-Protein Interactions): 蛋白质-蛋白质相互作用。
3. PTMs (Protein Translational Modifications): 蛋白质翻译后修饰。
4. Bait Protein: 聚焦研究的靶蛋白。
5. 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。
6. 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。
7. **SILAC-IP-MS (SILAC-Immunoprecipitation-Mass Spectrometry)**, 即将 SILAC 细胞蛋白质组标记技术、免疫沉淀技术和质谱技术多学科整合, 实现对 PPIs/PTMs 高通量定量筛选的技术解决方案。借助 SILAC 技术在蛋白质分子上引入的质量标签 (mass tag), 通过质谱技术实现对 IP/Co-IP 富集的 Bait 蛋白的相互作用复合物 (Protein interaction complex) 的相对精确定量, 再结合 Significance B 统计算法 [3, 4], 可快速实现 (1) 特异性 PPIs 的精准锁定, (2) PTMs 的相对变化的精准定量。
8. 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[5]。

■ 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。将 Co-IP 和质谱技术结合 (IP-MS) 是高通量筛选和发现新的 PPIs 和 PTMs 的有力技术解决方案。
- 然而, 质谱级 (MS grade) Co-IP 样本的制备: (1) 技术要求和制备难度均比较高; (2) 非特异性粘附蛋白不可避免, 且无法有效“剔除”。因此, 如何制备出高质量的 Co-IP 样品, 同时又能高效“甄别” Co-IP 富集样品中的特异性和非特异性蛋白, 是 PPIs/PTMs 筛选的难点和痛点。
- 谱璟科技(上海)有限公司 (Imultiomics) 通过技术研发, 将 SILAC 细胞标记技术与我司的 **MG01** (Universal IP-MS Enrichment Kit (3×DYKDDDDK tag, MS grade) 产品无缝整合, 开发了 **SILAC-IP-MS Enrichment Kit (3×DYKDDDDK tag) — MG02**, 借助 SILAC 技术的质谱高精度定量能力, **助力用户快速锁定 Bait 蛋白的特异性互作分子**。
- 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!

SILAC 培养基产品类型与组件

SILAC-DMEM (K8R10) Kit Catalog Number: SM202103			Part A	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
SCD01	1×500mL (K0R0)	500mL	1	4°C
SD03	1×500mL (K8R10)	500mL	1	4°C
SILAC-DMEM (K8R10) Kit Catalog Number: SM202103			Part B	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
DF-50	Dialyzed FBS	50mL	2	-20°C

SILAC-RPMI-1640 (K8R10) Kit Catalog Number: SM202108			Part A	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
SCR01	1×500mL (K0R0)	500mL	1	4°C
SR03	1×500mL (K8R10)	500mL	1	4°C
SILAC-RPMI-1640 (K8R10) Kit Catalog Number: SM202108			Part B	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
DF-50	Dialyzed FBS	50mL	2	-20°C

- 用户根据**目的细胞的培养基类型**选择上述 DMEM 或 RPMI-1640 的 SILAC 培养基试剂盒进行细胞 SILAC 标记及后续的 **SILAC-IP-MS** 样品制备。
- 常规的 SILAC 技术可同时实现对 3 组样品的定量比较分析 (K0R0 vs. K4R6 vs. K8R10), 我方建议常规的互作筛选做两组比较即可, 组学筛选方案尽量简洁。后续的互作验证 (IP-WB) 可以增加样本 (如药物处理、突变、干扰等等)。
- 参见《哺乳动物细胞系 SILAC 标记流程》进行目的细胞系的蛋白质组 SILAC 标记。
- 可使用我司的 **Co-IP/Pull-down In-solution Digestion Kit (ISD) (Imultiomics, #MG04)** 实现对 SILAC 标记细胞系的质谱待检肽段样品的制备, 通过 LC-MS 完成细胞 SILAC 标记效率的质谱检测。

MG01: 产品组件

Universal IP-MS Enrichment Kit (3×DYKDDDDK tag, MS grade) Catalog Number: MG01			Part A	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
MG01-1	Cell lysis buffer	100mL	1	-20°C
MG01-2	Wash buffer A	100mL	1	-20°C
MG01-3	Wash buffer B	50mL	1	-20°C
MG01-5	Anti-DYKDDDDK tag magnetic beads	1.0mL (50% settled beads)	1	-20°C
MG01-6	Elute solution (E.S.)	25µl	3	-80°C
		65µl	3	
MG01-7	E.S. dilution buffer	20mL	1	-20°C
MG01-8	PC cell lysate	50µl (2µg/µl)	1	-80°C
MG01-9	Anti-DYKDDDDK-HRP	20µl	1	-20°C
MG01-11	5×sample loading buffer	1.0mL	1	-20°C
Universal IP-MS Enrichment Kit (3×DYKDDDDK tag, MS grade) Catalog Number: MG01			Part B	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
MG01-4	Magnetic Control beads	5mL (20% settled beads)	1	4°C
MG01-10	Sample concentration filter	0.5mL (loading volume)	12	RT
MG01-12	Magnetic Separation Stand	(1.5/2mL tube) ×8 (5/15mL tube) ×2	1	RT

■ 问题与解决方案:

Q: SILAC-IP-MS 和 IP-MS 技术上有什么区别?

A: (1) IP-MS 流程制备的样品尽管可以通过 LFQ (label-free quantification)[6]对富集的蛋白质进行相对定量,筛选潜在的互作蛋白。但 LFQ 是在肽段水平上,分别进行质谱检测,数据的质量与 LC-MS 的稳定性密切相关。而 SILAC-IP-MS 是通过细胞培养,通过 SILAC 标记将质量标签 (mass tag) 直接引入到细胞的所有蛋白质分子上 (Proteome),整体的系统误差小,质谱定量更为精准。(2) SILAC-IP-MS 是引入了 SILAC 的标记定量技术,LFQ 是非标记定量技术,标记定量技术通常要比非标记技术的定量准确度高。(3) SILAC-IP-MS 可不做技术或生物学重复,而 IP-MS 结合 LFQ 是需要做技术或生物学重复的。(4) SILAC-IP-MS 流程上比 IP-MS 稍显复杂。因此,两种技术各有优缺点,用户根据自身情况选择相应的技术流程完成实验项目。

Q: 为什么不使用直接针对 Bait 蛋白的抗体进行 SILAC-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/SILAC-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/SILAC-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和定量;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 SILAC-IP-MS/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 SILAC-IP-MS 实现互作筛选?

A: 可利用模式细胞—(SILAC-标记 293T 细胞系 (Ready-to-Use)), 借助我司的 **MG02** 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,可实现高效瞬转 (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些许差异,可以尝试通过电转、腺病毒等方式尝试 SILAC-IP-MS。此外,原代细胞不适合完成 SILAC 细胞标记。

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. 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.
2. 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.
3. Cox J, Mann M: **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**(12):1367-1372.
4. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J: **The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data.** *Nat Methods* 2016, **13**(9):731-740.
5. Mishra V: **Affinity Tags for Protein Purification.** *Curr Protein Pept Sci* 2020, **21**(8):821-830.
6. 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.