

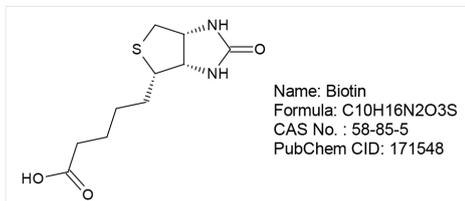
小分子-靶点蛋白富集及质谱筛选 (LFQ)
SM-PD Enrichment Kit (Biotin-tag, MS grade)
Catalog Number: MG05

■ **用户自备材料:**

1. 目的 **SM** (原型化合物, parent compound), 用于竞争组实验, 需用户自备。
2. Biotin 标记的 SM (Biotin-SM) 探针 (**Probe**), 需用户自备。
 - (1) Biotin 的分子式为 C₁₀H₁₆N₂O₃S, CAS 号为 58-85-5。请用户使用该 Biotin 分子实现对目的 SM 的修饰标记, 以匹配 **MG05 试剂盒** 的使用。
 - (2) 修饰合成的 Biotin-SM, 需 a) 氢谱数据报告; b) 质谱检测报告, 确定分子量; c) HPLC 纯度检测报告, 纯度要求 >95%。
 - (3) 因 SM 修饰了 Biotin, 可能会影响 SM 的活性。故而建议用户在开展本实验前, 进行相应的生物学实验, 比较检测和验证 Biotin-SM 和 SM (原型化合物) 的生物活性是否相当。
3. 用户亦可委托我司对目的 SM 进行 Biotin 修饰合成服务。请将您的目的 SM 的 CAS 号、分子结构、分子式等完整信息发送至 market@imultiomics.com, 以便我司进行评估和报价。
4. 其它设备、试剂与耗材:
 - (1) 超纯水 (18.2MΩ·cm@25°C) 或超纯水系统 (如厦门锐思捷水纯化技术有限公司, #RODI-220B1)
 - (2) 目的细胞株、细胞培养试剂与耗材、生物安全柜、细胞培养箱等设备及系统
 - (3) 蛋白酶和磷酸酶抑制剂
 - (4) 0.45μm 针头式过滤器 (如 Millipore, #SLHV033RB)、一次性无菌针头注射器 (5ml/10ml 等)
 - (5) 1.5ml/2ml/5ml/15ml/50ml 离心管 (Axygen、ESCO 等)
 - (6) Bradford 蛋白质定量试剂盒 (推荐使用 **Imultiomics, #MGR02**) 及检测系统 (酶标仪等)
 - (7) 考马斯亮蓝染色液 (推荐使用 **Imultiomics, #MGR01**) 和银染试剂系统
 - (8) 带制冷的台式高速离心机 (>16000g, 如 BeckmanCoulter: Microfuge 20R)、5~15ml 的低速落地式离心机 (3000~10000g, 如 BeckmanCoulter: Allegra X-30R)、桌面小型掌式离心机 (如 Miulab: mini-6K)。
 - (9) SDS-PAGE 电泳系统
 - (10) 旋转混合仪 (如海门市其林贝尔仪器制造有限公司, #BE-1200)
 - (11) Co-IP/Pull-down in-gel trypsin digestion Kit (IGD)—**Imultiomics, #MG03**
 - (12) Co-IP/Pull-down in-solution trypsin digestion Kit (ISD)—**Imultiomics, #MG04**

■ 术语

1. Small molecule (SM): 小分子化合物, 如小分子药物、代谢物等。
2. SM-targeted Proteins: 小分子在细胞/组织中的结合靶点蛋白。
3. Biotin: 生物素。



4. Pull-down (PD): 此处指不依赖于抗体的分子捕获/富集技术。
5. Probe (探针): 此处指修饰了 Biotin “标签”的 SM, 借助 Biotin “标签”, 通过 Pull-down (PD) 技术捕获/富集 Probe 所结合的蛋白质分子。
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. SM-PD-MS: 此处指利用 Pull-down (PD) 技术捕获/富集 biotin-labeled SM-蛋白质复合物 (SM-targeted protein complex), 再结合质谱技术 (Mass Spectrometry) 实现对富集的 SM-targeted protein complex 进行鉴定/定量分析, 从而筛选 SM 的特异性结合靶点蛋白。
8. LFQ (Label-free Quantification)[1]: 基于质谱的“非标记 (label-free)”相对定量技术。此处指将 SM-PD 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 (即潜在的 SM-靶点蛋白)。

■ 产品简介:

- Biotin (生物素) 是分子生物学研究系统中常用的亲和标签 (affinity tag), 其能与 streptavidin 蛋白质高亲和力结合[2]。故而, biotin 被广泛用于标记 DNA、RNA、蛋白质和小分子, 借助 pull-down 技术, 通过 streptavidin-beads 富集 biotin 标记的分子及其互作分子 (如蛋白质)。
- 筛选和发现小分子 (Small Molecule, **SM**, 如小分子药物、代谢物等) 的特异性结合蛋白, 是解析 SM 作用分子机理的核心内容。目前有效的技术方案是通过化学反应, 对 SM “添加” Biotin、叠氮 (Azide) 或炔烃 (Alkyne) 等 “手柄”, 后续通过 pull-down 技术 (PD) 从细胞/组织提取蛋白质中捕获 SM 的结合蛋白, 再借助质谱 (LC-MS, 液相色谱-质谱联用) 实现对 pull-down 富集蛋白质的鉴定和相对定量分析 (如 LFQ[1]、SILAC[3]), 最终筛选和发现 SM 的特异性结合靶点蛋白。
- 谱璟科技 (上海) 有限公司 (Imultiomics) 通过技术研发, 开发了针对 biotin 标记的 SM, 借助 pull-down 技术结合质谱进行 SM-结合蛋白筛选的质谱级试剂盒—**SM-PD Enrichment Kit (Biotin-tag, MS grade)—MG05**, 为用户提供一站式的 SM pull-down 预实验条件优化及质谱级 SM pull-down 样品制备。该试剂盒包含:
 - (1) 提供从细胞培养、蛋白质样品制备、Probe 浓度优化、SM 浓度优化和质谱级 SM-PD 样品制备的整体实验流程方案;
 - (2) 优化的细胞裂解液 (MG05-1), 高效提取有活性的细胞蛋白质;
 - (3) 优化的 pull-down 洗涤缓冲液 (MG05-2 & MG05-3), 用于去除/降低 pull-down 过程中的非特异性结合;
 - (4) SM pull-down 正对照分子 (MG05-4), 高效监控 SM pull-down 流程;
 - (5) 高亲和力的 streptavidin 偶联 agarose beads (MG05-5), 高效富集 SM 结合的靶点蛋白;
 - (6) 5×SDS-PAGE 上样缓冲液 (MG05-6) 等试剂, 便于快速完成蛋白质样品的前处理;
 - (7) 配备特制的 Sample loading tips (MG05-7), 最大程度收获 pull-down 样品, 避免/减少样品损失。
- 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: Pull-down 样品, SDS-PAGE 胶的考马斯亮蓝染色条带很浅或者银染才能染出条带。

A: (1) 请提高 preclear 蛋白质和 MG05-5 (streptavidin-beads)的投入量, 调整 Probe 的浓度, 再次尝试进行实验优化。(2) 提高实验的环境温度 (~25°C), 促进 pull-down。

Q: 在 PART2 阶段, Probe 富集的条带与 NC 组没有明显差异。

A: (1) 请确认 Biotin 修饰的 SM 是否正确。(2) 调整 Probe 的浓度梯度设置, 再次尝试实验优化。

Q: 在 PART 3 阶段, SM 的竞争浓度梯度的染色条带与 Probe 相比没有明显的差异。

A: (1) 调整 SM 的浓度梯度设置, 再次进行实验优化。(2) 因 Probe (biotin-labeled SM) 是修饰了的 SM, 有可能修饰之后其活性/结合的靶点蛋白与 SM 完全不同, 导致 SM 没有竞争作用。故而, 在开展 SM pull-down 实验前, 建议先通过相应的实验确认 Probe 的活性是否与 SM 相当。

Q: 在 pull-down 实验过程中, 观察到溶液有浑浊现象。

A: 可能是由于 Probe 和 SM 在蛋白质溶液中的溶解度较低或出现了析出。可尝试通过离心, 弃掉可能的不溶物, 再进行后续实验。

Q: NC 和 PC 的染色条带观察不到差异。

A: 试剂盒发货前已做过测试, 二者的 pull-down 产物会有较为明显的条带差异。如用户未观察到差异, 请确认和排除您的实验流程是否正确。

■ 参考文献:

1. 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.
2. González M, Bagatolli LA, Echabe I, Arrondo JL, Argaraña CE, Cantor CR, Fidelio GD: **Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding.** *J Biol Chem* 1997, **272**(17):11288-11294.
3. 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.
4. 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.
5. 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.