

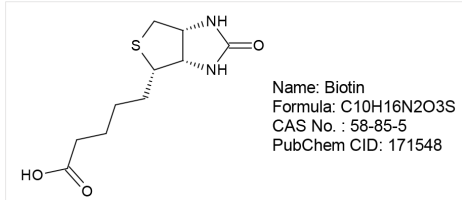
小分子-靶点蛋白富集及质谱筛选 (SILAC)
SILAC-SM-PD Enrichment Kit (Biotin-tag, MS grade)
Catalog Number: MG08

■ **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, #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/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 (ISD)—**Imultiomics, #MG03**
 - (12) 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. **Small molecule (SM):** 小分子化合物, 如小分子药物、代谢物等。
3. **SM-targeted Proteins:** 小分子在细胞/组织中的结合靶点蛋白。
4. **Biotin:** 生物素。



5. **Pull-down (PD):** 此处指不依赖于抗体的分子捕获/富集技术。
6. **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。
7. **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。
8. **SILAC-SM-PD-MS:** 将 SILAC 细胞蛋白质组标记技术、Pull-down (PD) 技术和质谱技术 (MS) 多学科整合, 实现对 SM-targeted Proteins 高通量 **定量筛选** 技术解决方案。助力用户精准锁定 SM-targeted Proteins。

■ 问题与解决方案:

Q: SILAC-SM-PD (#MG08) 和 SM-PD (#MG05) 技术上有什么区别?

A: (1) 常规的 SM-PD 流程制备的样品尽管可以通过 LFQ (label-free quantification)[3]对富集的蛋白质进行相对定量, 筛选潜在的 SM-靶点蛋白。因每个样品要分别进行质谱检测, 数据的质量与 LC-MS 的稳定性密切相关。而 SILAC-SM-PD 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-SM-PD 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-SM-PD 可不做技术或生物学重复, 而 SM-PD 结合 LFQ 是需要做技术或生物学重复的。(4) SILAC-SM-PD 流程上要比常规的 SM-PD 更为复杂, 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: 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 PART 3 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 4 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. 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, 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.