

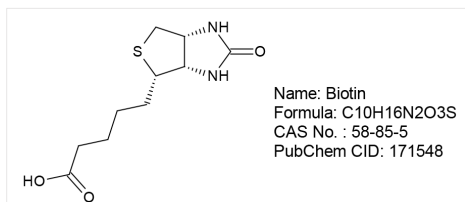
小分子-靶点蛋白富集及质谱筛选 (SILAC)
SILAC-SM-PD Enrichment Kit (Alkyne tag, MS grade)
Catalog Number: MG09

■ **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. 炔烃 (Alkyne) 标记的 SM (alkyne-labeled SM) 探针(**Probe**), 需用户自备。
 - (1) 修饰合成的 Alkyne-labeled 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%。
 - (2) 因 SM 修饰了 alkyne, 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 Alkyne-labeled 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 alkyne 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、细胞培养箱等设备与系统
 - (3) 蛋白酶和磷酸酶抑制剂
 - (4) 丙酮, -20°C 保存, 预冷备用
 - (5) 甲醇, -20°C 保存, 预冷备用
 - (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) Bradford 蛋白质定量试剂盒 (推荐使用 **Imultiomics, #MGR02**) 及检测系统 (酶标仪等)
 - (9) 考马斯亮蓝染色液 (推荐使用 **Imultiomics, #MGR01**) 和银染试剂系统
 - (10) [细胞/组织研磨器 \(如宁波新芝, SCIENT-48 高通量组织研磨器。使用钢珠在离心管中对细胞/组织样品破碎, 避免/减少样品损失\)](#)
 - (11) 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)、恒温混匀仪 (如 Miulab: MTC-100)
 - (12) SDS-PAGE 电泳系统、western blot 湿法转印系统、ECL 化学发光试剂 (如 ThermoFisher Scientific, #34577) 及 ECL 检测系统 (如上海勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope 6000 系列)
 - (13) 旋转混合仪 (如海门市其林贝尔仪器制造有限公司, #BE-1200)
 - (14) Co-IP/Pull-down in-gel trypsin digestion Kit (IGD)—**Imultiomics, #MG03**
 - (15) Co-IP/Pull-down in-solution trypsin digestion Kit (ISD)—**Imultiomics, #MG04**

■ 术语

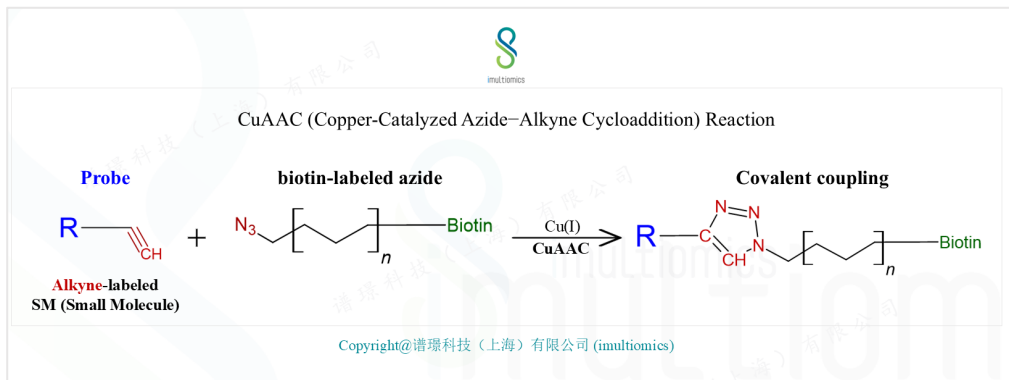
1. SILAC: Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture, 高精度定量蛋白质组学技术[1, 2]。
2. Small molecule (SM): 小分子化合物, 如小分子药物、代谢物等
3. SM-targeted Proteins: 小分子在细胞/组织中的结合靶点蛋白
4. Biotin: 生物素



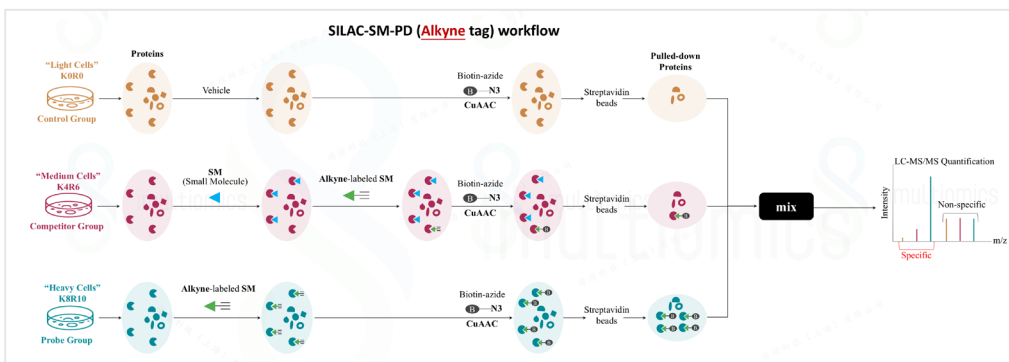
5. Alkyne (炔烃) $R-C\equiv CH$
6. Azide (叠氮) $R-N\equiv N^+N^-$
7. ABPP: Activity-Based Protein Profiling [3]
8. CuAAC: Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, 一种 “Click Chemistry” 反应方式 [4]
9. Pull-down (PD): 此处指不依赖于抗体的分子捕获/富集技术
10. Probe (探针): 此处指修饰了 Alkyne “标签” 的 SM (Alkyne-labeled SM)
11. LC-MS (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。
12. **SILAC-SM-PD-MS (Alkyne tag)**: 将 **SILAC** 细胞蛋白质组标记技术、CuAAC 反应、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。**助力用户快速、精准锁定 SM-targeted Proteins。**

■ 产品简介:

- Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) 是典型的 Click Chemistry Reaction[4]。CuAAC 是在温和的反应条件下，通过 Cu (I) 离子催化，实现炔烃 (Alkyne) 和叠氮 (Azide) 化合物的共价反应。



- 鉴于 CuAAC 技术所涉及到的炔烃 (Alkyne) 和叠氮 (Azide) “标签” 都很小，故而被广泛使用于小分子化合物 (Small Molecule, SM) 在细胞/组织中的靶点蛋白质的发现和筛选。
- 谱璟科技(上海)有限公司 (Imultiomics) 通过技术研发，将 **SILAC** 哺乳动物细胞系标记技术、SM-PD Enrichment Kit (Alkyne-tag, MS grade)—MG06 技术流程和质谱 (MS) 技术无缝整合，开发了 **SILAC-SM-PD Enrichment Kit (Alkyne-tag, MS grade)—#MG09**，借助 **SILAC** 的高精度质谱定量能力，助力用户快速、精准锁定 SM-targeted Proteins。



- 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:

Q1: SILAC-SM-PD (#MG09) 和 SM-PD (#MG06) 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) [5] 对富集的蛋白质进行相对定量, 筛选潜在的 SM-靶点蛋白。因 LFQ 是每个样品分别进行质谱检测, 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。

Q2: 在 PART 2 阶段, 用户使用自有的细胞/组织研磨器提取目的细胞蛋白质的浓度偏低, 如何解决?

A: (1) 提高细胞培养密度, 增加细胞量; (2) 降低 MG06-1 (Cell lysis buffer) 的用量, 如 300 μ l/10cm 皿; (3) 多制备几管细胞, 进行实验条件优化。

Q3: 在 PART 3 阶段, 用户的考马斯亮蓝染色条带很弱, 如何解决?

A: 原因应是 SM 的靶点蛋白在样品中的含量较低所致。建议用户 (1) 充分脱色后, 使用 银染法 染色观察。(2) 每组可重复~3 管样品进行 CuAAC 反应后, 将重悬的蛋白质合并进行 Pull-down 尝试。

Q4: 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 (alkyne-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。

Q5: 在 PART 5 的阶段, 用户的 Pull-down 样品通过 western blot 检测不到条带, 如何解决?

A: 有些 alkyne-labeled SM 可能会在 MG06-7 (Sample loading buffer) 处理后发生了降解/分解, 导致无法被 streptavidin-HRP 检测到。用户可通过考马斯亮蓝染色评估, 如有差异, 则继续后续实验。

Q6: 在 Probe 和 SM 与细胞蛋白质孵育过程后, 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。

Q7: MG09 产品是否适用于组织样品的检测?

A: SILAC 技术适合细胞系的标记, 不适合组织样本的标记。故而 MG09 不适合组织样本。如用户要进行组织样本的检测, 请使用 MG06, 通过 LFQ 方式进行质谱检测和分析。

■ 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. Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW: **Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry.** *Annu Rev Biochem* 2008, **77**:383-414.
4. Meldal M, Tornøe CW: **Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition.** *Chem Rev* 2008, **108**(8):2952-3015.
5. 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.