

Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion (ISD) Kit**Catalog Number: MG04****■ 术语**

1. PPIs (Protein-Protein Interactions): 蛋白质-蛋白质相互作用。
2. PTMs (Protein Translational Modifications): 蛋白质翻译后修饰。
3. 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。
4. Pull-down (PD): 此处指不依赖于抗体的分子捕获/富集技术。如利用 Biotin 与 streptavidin 蛋白质之间的高亲和力, 实现对 RNA-互作蛋白 (RNA pull-down)、DNA-互作蛋白 (DNA pull-down)、小分子-互作蛋白 (SM pull-down) 等的富集。
5. 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。
6. IP-MS (Immunoprecipitation-Mass Spectrometry): 免疫沉淀-质谱, 即利用 IP/Co-IP 技术富集 Bait 蛋白的相互作用复合物 (Protein interaction complex) 后, 再结合 LC-MS 技术实现对富集的相互作用复合物进行鉴定/定量分析, 从而筛选与 Bait 蛋白存在相互作用的蛋白质 (Interactors) 及潜在的蛋白质 PTMs (尤其是 Bait 蛋白)。
7. PD-MS (Pull-down-Mass Spectrometry): 通过 Pull-down 技术实现对 RNA-互作蛋白 (RNA pull-down)、DNA-互作蛋白 (DNA pull-down)、小分子-互作蛋白 (SM pull-down) 等的富集, 再结合 LC-MS 技术实现对富集蛋白质的鉴定/相对定量分析, 从而筛选被显著富集的蛋白质 (潜在的互作/结合蛋白)。
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 IP/Co-IP、Pull-down (如 SM-PD) 每组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 (LFQ intensity) 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 (即潜在互作/结合蛋白)。
9. SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) [2, 3]: 此处指将 SILAC 细胞蛋白质组标记技术与 IP/Co-IP、pull-down (PD) 等技术结合, 通过 SILAC-IP/Co-IP、SILAC-PD (如 SILAC-SM-PD) 流程从不同 SILAC 标记的细胞中富集蛋白质并**合并为1个样品**。基于 SILAC 在蛋白质分子上引入的“质量标签 (Mass Tag)”, 通过质谱可同时对不同组富集的蛋白质的鉴定及相对定量分析, 助力用户快速锁定潜在的互作/结合蛋白。SILAC 技术是在蛋白质层次上引入了“质量标签 (Mass Tag)”, 整体的系统误差小, 质谱定量结果更为精准。

■ MG04: 产品组件

Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion (ISD) Kit Catalog Number: MG04			Part A	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
MG04-1	Resuspension buffer	20mL	1	-80°C
MG04-2	Dilution buffer	50mL	1	-80°C
MG04-3	Reducing reagent	50μL	1	-80°C
MG04-4	Alkylation reagent	100μL	1	-80°C
MG04-5	Trypsin (MS grade)	20μg (0.5μg/μL)	5	-80°C
Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion (ISD) Kit Catalog Number: MG04			Part B	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
MG04-6	C18 desalting column	—	12	RT
MG04-7	Waste liquid tube	2.0mL	12	RT
MG04-8	Peptide collection tube	1.5mL	12	RT

■ 产品简介

- Co-IP (Co-immunoprecipitation, 免疫共沉淀) 和 Pull-down (PD) 技术是经典地进行分子互作研究的实验技术。谱璟科技（上海）有限公司推出了多样化的质谱级 IP-MS 和 PD-MS 的蛋白质富集试剂盒，助力用户实现高质量的、质谱级样品的制备。

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]

- 针对 IP-MS 和 PD-MS 试剂盒富集的蛋白质样品，谱璟科技（上海）有限公司开发了对应的富集蛋白质质谱检测前处理试剂盒：***Co-IP/Pull-down In-solution Trypsin Digestion (ISD) Kit—MG04***，直接对富集的蛋白质进行 in-solution/on-beads 酶解和除盐，制备质谱待检的高质量肽段。
- MG04 亦可用于其他蛋白质样品的制备（如基于 LFQ 或 SILAC 的差异蛋白质组分析）。**
- 本产品仅供科研使用！

■ 用户自备材料

- 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)
- 丙酮, -20°C 保存, 预冷备用
- pH 试纸
- 乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
- 甲酸 (Formic acid, 如 Sigma-Aldrich, #F0507)
- 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, 如 Sigma-Aldrich, #T6508)

7. 真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038)
8. 恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100)
9. 桌面式小型高速离心机 (>16000g, 如 BeckmanCoulter: Microfuge 20R)
10. 肽段浓度定量试剂盒 (如 ThermoFisher Scientific, #23290)、荧光检测酶标仪 (ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1)、荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108)

■ 委托服务

谱璟科技（上海）有限公司拥有《**用户自备材料**》提及的所有仪器、设备和试剂。用户可将 IP-MS 的浓缩液、PD-MS 的 beads 等寄送给我方。我方可 (1) 使用 MG04 试剂盒完成蛋白质酶解、肽段提取、肽段除盐；(2) 肽段定量；(3) 肽段 LC-MS 检测；(4) 质谱数据检索；(5) 蛋白质鉴定数据分析等全部实验和分析服务。

PART 1. 细胞蛋白质组 SILAC 标记效率质谱检测样本制备

- 该步骤适用于以下试剂盒的细胞 SILAC 标记效率质谱检测样本制备：

货号	名称	应用领域	质谱定量方式
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]
MG08	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]
MG09	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]
MG10	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]

- 使用 **MG04 试剂盒**，对不同 SILAC 标记的细胞蛋白质组，进行 in-solution trypsin digestion 和除盐。
- 对除盐肽段进行质谱检测，确认细胞蛋白质组 SILAC 标记效率 (>95%)。

S1: 蛋白质提取、定量与混合	
○ MG02: SILAC-IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag) - 使用 MG01-1 (Cell lysis buffer, in MG01 Kit) 分别对 K0R0 和 K8R10 标记的细胞进行裂解，提取蛋白质。MG01-1 使用量：100μl/孔 (6 孔板)、300μl/6cm 皿、600μl/10cm 皿。 - 对提取的蛋白质进行 Bradford 法 (推荐使用 Imultiomics, #MGR02) 定量后： K0R0 (20 μg) + K8R10 (20 μg) → 混合 → 记为 K8R10_MC，使用 MG01-1 补足体积至 50~100μl。	
○ MG08: SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag) - 使用 MG05-1 (Cell lysis buffer, in MG05 Kit) 分别对 K0R0、K4R6 和 K8R10 标记的细胞进行裂解，提取蛋白质。MG05-1 使用量：100μl/孔 (6 孔板)、300μl/6cm 皿、600μl/10cm 皿。 - 对提取的蛋白质样品进行 Bradford 定量 (推荐使用 Imultiomics, #MGR02) 后： K0R0 (20 μg) + K4R6 (20 μg) → 混合 → 记为 K4R6_MC，使用 MG05-1 补足体积至 50~100μl。 K0R0 (20 μg) + K8R10 (20 μg) → 混合 → 记为 K8R10_MC，使用 MG05-1 补足体积至 50~100μl。	
○ MG09: SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag) - 使用 MG04-1 (Resuspension buffer in MG04 Kit) 分别对 K0R0、K4R6 和 K8R10 标记的细胞进行裂解，提取蛋白质。MG04-1 使用量：100μl/孔 (6 孔板)、300μl/6cm 皿、600μl/10cm 皿。 - 对提取的蛋白质样品进行 Bradford 定量 (推荐使用 Imultiomics, #MGR02) 后： K0R0 (20 μg) + K4R6 (20 μg) → 混合 → 记为 K4R6_MC，使用 MG04-1 补足体积至 50~100μl。 K0R0 (20 μg) + K8R10 (20 μg) → 混合 → 记为 K8R10_MC，使用 MG04-1 补足体积至 50~100μl。	
○ MG10: SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag) - 使用 MG04-1 (Resuspension buffer in MG04 Kit) 分别对 K0R0、K4R6 和 K8R10 标记的细胞进行裂解，提取蛋白质。MG04-1 使用量：100μl/孔 (6 孔板)、300μl/6cm 皿、600μl/10cm 皿。 - 对提取的蛋白质样品进行 Bradford 定量 (推荐使用 Imultiomics, #MGR02) 后： K0R0 (20 μg) + K4R6 (20 μg) → 混合 → 记为 K4R6_MC，使用 MG04-1 补足体积至 50~100μl。 K0R0 (20 μg) + K8R10 (20 μg) → 混合 → 记为 K8R10_MC，使用 MG04-1 补足体积至 50~100μl。	
S2: 蛋白质丙酮沉淀	
- 对混合后的 K4R6_MC、K8R10_MC 等样品 (如体积为 50μl)，加入 4 倍体积 -20℃ 过夜预冷的丙酮 (4×50μl=200μl)，快速混合后，-20℃ 沉淀 2 小时或过夜。 4℃，>16000g，离心 10min，弃去丙酮 (管底可能有可见的沉淀)，将管置于通风橱中干燥 5~10 分钟，使丙酮挥发。	
S3: 溶液酶解 (In-solution digestion) 及酸化	
- 向 S2 的每个样品管中加入 100μl 的 MG04-1 (Resuspension buffer)，混匀。 - 向 1 中加入 1μl 的 MG04-3 (Reducing reagent)，充分混匀后置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-	

100) 上, 37°C, 300rpm, 处理 1 小时。

- 1 小时后, 向 2 中加入 3 μ l 的 **MG04-4 (Alkylation reagent)**, 混匀, 室温, **避光**, 45 分钟。
- 45 分钟后, 向 3 中加入 300 μ l 的 **MG04-2 (Dilution buffer)**, 混匀。
- 从 -80°C 取出 **MG04-5 (Trypsin (MS grade))** 置于冰上完全化冻后, 快速离心将 Trypsin 收集到管底。取 3 μ l 的 **MG04-5** 加入到 4 的管中, 充分混匀并快速离心后, 将管置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100) 上, 37°C, 300rpm, 过夜酶解 (~16 小时)。
- *第二天, 向 5 的管中加入甲酸 (Formic acid, 如 Sigma-Aldrich, #F0507, ~30 μ l/反应), 使溶液的 **pH<3** (用 pH 试纸测定)。

S4: 酶解肽段除盐

○ 试剂及配制:

- 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, **TFA**, 如 Sigma-Aldrich, #T6508)
- 乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
- 0.1% TFA 水溶液: 每样品需 **600 μ l**。如配制 1ml, 则取 1 μ l TFA 稀释于 999 μ l 的超纯水中。
- 0.1%TFA/50% Acetonitrile 水溶液: 每样品需 **300 μ l**。如配制 1ml, 则取 499 μ l 超纯水、1 μ l TFA 和 500 μ l Acetonitrile 混合即可。

○ 肽段除盐:

- 按样品数目取对应数量的 **MG04-6 (C18 desalting column)** 和 **MG04-7 (Waste liquid tube)**, 并将 **MG04-6** 置于 **MG04-7** 中。向上层的 **MG04-6** 中加入 **100 μ l** 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile 溶液, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
- 再向 1 的 **MG04-6** 中加入 **300 μ l** 的 0.1% TFA 水溶液, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
- 弃去 **MG04-7** 中的废液后并重新与 **MG04-6** 组装。将 **S3** 的酸化酶解肽段溶液转入 **MG04-6** 中, 室温, 静置 2-3 分钟。开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
- 再向 **MG04-6** 中加入 **300 μ l** 的 0.1% TFA 水溶液, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
- 弃去 **MG04-7** 及废液。将 **MG04-6** 与 **MG04-8 (Peptide collection tube)** 组装。再向上层的 **MG04-6** 中加入 **200 μ l** 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。最终每个 **MG04-8** 管中的液体即为除盐后的肽段溶液 (200 μ l), 即可进行后续肽段定量。

S5: 肽段定量与冻干

- 推荐使用 ThermoFisher Scientific 公司的荧光肽段定量试剂盒 (Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay, #23290) 搭配荧光检测酶标仪 (ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1) 和荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108) 对 **S4** 除盐后的肽段溶液进行定量, 计算肽段总量。
- 肽段定量完成后, 使用真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038), 真空旋转冻干定量后的肽段样品, 送样质谱检测。

S6: 肽段质谱检测建议

- 推荐使用 ThermoFisher Scientific 公司的 Orbitrap 系列 (如 Q-Exactive HF、Orbitrap Fusion 等) 质谱对 **S5** 的肽段进行质谱测试。建议测试时间 1 小时/样品。
- 使用如 Maxquant [4] 进行质谱数据检索, 完成蛋白质鉴定与定量 (SILAC ratio)。
- 使用如 Perseus [5] 对定量的蛋白质进行统计分析, 确认细胞蛋白质组标记效率 (>95%)。

PART 2. IP-MS/SILAC-IP-MS 富集蛋白质质谱检测样本制备

- 该步骤适用于以下试剂盒富集的蛋白质质谱检测样本制备：

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]

- 使用 **MG04 试剂盒**，对 IP/SILAC-IP 富集的蛋白质（浓缩洗脱液）进行 in-solution trypsin digestion 和除盐。
- 对除盐的肽段，进行质谱检测。通过质谱的 LFQ 方式 (MG01) 或 SILAC (MG02) 方式进行相对定量，筛选 Bait 蛋白的特异性互作蛋白。

S1: 富集蛋白质准备	
○ MG01: IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag)	
1.	将 NC-IP 和 OE-IP 富集的蛋白质溶液分别浓缩至 50μl 或用 MG01-7 (E.S. dilution buffer) 补足体积至 50μl。
○ MG02: SILAC-IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag)	
1.	将 NC-IP (K0R0) 和 OE-IP (K8R10) 富集的蛋白质合并溶液 浓缩至 50μl 或用 MG01-7 (E.S. dilution buffer) 补足体积至 50μl。
S2: 蛋白质丙酮沉淀	
1.	向 S1 的样品中加入 4 倍体积 -20℃ 过夜预冷的丙酮 (4×50μl=200μl)，快速混合后，-20℃ 沉淀 2 小时或过夜。
2.	4℃，>16000g，离心 10min，弃去丙酮（管底可能有可见的沉淀），将管置于通风橱中干燥 5~10 分钟，使丙酮挥发。
S3: 溶液酶解 (In-solution digestion) 及酸化	
1.	向 S2 的每个样品管中加入 100μl 的 MG04-1 (Resuspension buffer) ，混匀。
2.	向 1 中加入 1μl 的 MG04-3 (Reducing reagent) ，充分混匀后置于恒温混匀仪（如 Miulab, #MTC-100）上，37℃，300rpm，处理 1 小时。
3.	1 小时后，向 2 中加入 3μl 的 MG04-4 (Alkylation reagent) ，混匀，室温， 避光 ，45 分钟。
4.	45 分钟后，向 3 中加入 300μl 的 MG04-2 (Dilution buffer) ，混匀。
5.	从 -80℃ 取出 MG04-5 (Trypsin (MS grade)) 置于冰上完全化冻后，快速离心将 Trypsin 收集到管底。取 3μl 的 MG04-5 于 4 的管中，充分混匀并快速离心后，将管置于恒温混匀仪（如 Miulab, #MTC-100）上，37℃，300rpm，过夜酶解（~16 小时）。
6.	*第二天 ，向 5 的管中加入甲酸 (Formic acid, 如 Sigma-Aldrich, #F0507, ~30μl/反应)，使溶液的 pH<3 (用 pH 试纸测定)。
S4: 酶解肽段除盐	
○ 试剂及配制：	
5.	三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA , 如 Sigma-Aldrich, #T6508)
6.	乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
7.	0.1% TFA 水溶液：每样品需 600μl 。如配制 1ml，则取 1μl TFA 稀释于 999μl 的超纯水中。
8.	0.1%TFA/50% Acetonitrile 水溶液：每样品需 300μl 。如配制 1ml，则取 499μl 超纯水、1μl TFA 和 500μl Acetonitrile 混合即可。
○ 肽段除盐：	
6.	按样品数目取对应数量的 MG04-6 (C18 desalting column) 和 MG04-7 (Waste liquid tube) ，并将 MG04-6 置于 MG04-7 中。向上层的 MG04-6 中加入 100μl 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile 溶液，开

盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。	
7. 再向 1 的 MG04-6 中加入 300μl 的 0.1% TFA 水溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。	
8. 弃去 MG04-7 中的废液后并重新与 MG04-6 组装。将 S3 中的酸化酶解肽段溶液转入 MG04-6 中，室温，静置 2-3 分钟。开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。	
9. 再向 MG04-6 中加入 300μl 的 0.1% TFA 水溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。	
10. 弃去 MG04-7 及废液。将 MG04-6 与 MG04-8 (Peptide collection tube) 分别组装。再向上层的 MG04-6 中加入 200μl 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。最终每个 MG04-8 管中的液体即为除盐后的肽段溶液 (200 μ l)，即可进行后续肽段定量。	
S5: 肽段定量与冻干	
1. 推荐使用 ThermoFisher Scientific 公司的荧光肽段定量试剂盒 (Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay, #23290) 搭配荧光检测酶标仪 (ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1) 和荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108) 对 S4 除盐后的肽段溶液进行定量，计算肽段总量。	
2. 肽段定量完成后，使用真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038)，真空旋转冻干定量后的肽段样品，送样质谱检测。	
S6: 肽段质谱检测建议	
质谱类型	推荐 Bruker 的 TimsTOF 质谱系列 (4D 质谱)。
检测方式	1. DDA-PASEF 质谱检测方式。 2. 肽段上样量: 200 ng/injection。 3. 质谱测试时间: 1 小时/injection
分析软件	1. 使用如 Maxquant [4]进行质谱数据检索，完成蛋白质鉴定与定量 2. 使用如 Perseus [5]对鉴定/定量的蛋白质进行统计分析，筛选特异性互作蛋白。 3. 使用如 R script/Python 进行数据深度汇总分析和制图。

PART 3. SM-PD 富集蛋白质质谱检测样本制备 (LFQ)

- 该步骤适用于以下试剂盒富集的蛋白质质谱检测样本制备：

货号	名称	应用领域	质谱定量方式
MG05	SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [1]
MG06	SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [1]
MG07	SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [1]

- 使用 **MG04 试剂盒**，对 Pull-down (PD) 富集蛋白质的三组 beads (NC、Probe、SM)，分别进行 on-beads trypsin digestion 和除盐。
- 对除盐的肽段样品，进行质谱检测。通过质谱的 LFQ 方式对蛋白质进行相对定量，筛选显著富集的蛋白质 (SM-靶点蛋白)。

S1: 酶解 (On-beads digestion) 及酸化

- 按照相应试剂盒的流程，向 **NC**、**Probe** 和 **SM** 三组质谱级 Pull-down 的 beads 中分别加入 **100μl** 的 **MG04-1 (Resuspension buffer)**。
- 向 1 中加入 **1μl** 的 **MG04-3 (Reducing reagent)**，混匀后置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100) 上，37°C，300rpm，处理 1 小时。
- 1 小时后，向 2 中加入 **3μl** 的 **MG04-4 (Alkylation reagent)**，混匀，室温，**避光**，45 分钟。
- 45 分钟后，向 3 中加入 **300μl** 的 **MG04-2 (Dilution buffer)**，混匀。
- 从 -80°C 取出 **MG04-5 (Trypsin (MS grade))** 置于冰上完全化冻后，快速离心将 Trypsin 收集到管底。取 **3μl** 的 **MG04-5** 于 4 的管中，充分混匀并快速离心后，将管置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100) 上，37°C，300rpm，过夜酶解 (~16 小时)。
- *第二天，快速离心后：**
 - 将上清分别转移到新的 1.5ml 离心管中，加入甲酸 (Formic acid, 如 Sigma-Aldrich, #F0507, ~30μl/反应)，使溶液的 **pH<3** (用 pH 试纸测定)。
 - 保留 beads 于 -80°C。

S2: 酶解肽段除盐

○ 试剂及配制：

- 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, **TFA**, 如 Sigma-Aldrich, #T6508)
- 乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
- 0.1% TFA 水溶液：每样品需 **600μl**。如配制 1ml，则取 1μl TFA 稀释于 999μl 的超纯水中。
- 0.1%TFA/50% Acetonitrile 水溶液：每样品需 **300μl**。如配制 1ml，则取 499μl 超纯水、1μl TFA 和 500μl Acetonitrile 混合即可。

○ 肽段除盐：

- 按样品数目取对应数量的 **MG04-6 (C18 desalting column)** 和 **MG04-7 (Waste liquid tube)**，并将 **MG04-6** 置于 **MG04-7** 中。向上层的 **MG04-6** 中加入 **100μl** 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile 溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 再向 1 的 **MG04-6** 中加入 **300μl** 的 0.1% TFA 水溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 弃去 **MG04-7** 中的废液后并重新与 **MG04-6** 组装。将 **S1** 中的酸化酶解肽段溶液转入 **MG04-6** 中，室温，静置 2-3 分钟。开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 再向 **MG04-6** 中加入 **300μl** 的 0.1% TFA 水溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 弃去 **MG04-7** 及废液。将 **MG04-6** 与 **MG04-8 (Peptide collection tube)** 分别组装。再向上层的 **MG04-6** 中加入 **200μl** 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。最终每个 **MG04-**

8管中的液体即为除盐后的肽段溶液 (200 μ l)，即可进行后续肽段定量。

S3: 肽段定量与冻干

1. 推荐使用 ThermoFisher Scientific 公司的荧光肽段定量试剂盒 (Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay, #23290) 搭配荧光检测酶标仪 (ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1) 和荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108) 对 **S2** 除盐后的肽段溶液进行定量, 计算肽段总量。
2. 肽段定量完成后, 使用真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038), 真空旋转冻干定量后的肽段样品, 送样质谱检测。

S4: 肽段质谱检测建议

质谱类型	推荐 Bruker 的 TimsTOF 质谱系列 (4D 质谱)。
检测方式	1. DDA-PASEF 质谱检测方式。 2. 肽段上样量: 200 ng/injection。 3. 质谱测试时间: 1 小时/injection。
分析软件	1. 使用如 Maxquant [4]进行质谱数据检索, 完成蛋白质鉴定与定量 2. 使用如 Perseus [5]对鉴定/定量的蛋白质进行统计分析, 筛选特异性互作蛋白。 3. 使用如 R script/Python 进行数据深度汇总分析和制图。

PART 4. SILAC-SM-PD 富集蛋白质质谱检测样本制备 (SILAC)

- 该步骤适用于以下试剂盒富集的蛋白质质谱检测样本制备：

货号	名称	应用领域	质谱定量方式
MG08	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]
MG09	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]
MG10	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [2, 3]

- 使用 **MG04 试剂盒**，对 Pull-down (PD) 富集的三组 SILAC 标记蛋白质 (**NC-K0R0**、**SM-K4R6**、**Probe-K8R10**) 的**合并 beads**，直接进行 on-beads trypsin digestion 和除盐。
- 对除盐肽段样品，进行质谱检测。通过质谱的 SILAC 方式进行相对定量，筛选显著富集的蛋白质 (SM-靶点蛋白)。

S1: 酶解 (On-beads digestion) 及酸化

- 按照相应试剂盒的流程，向三组 pull-down (**NC-K0R0**、**Probe-K8R10**、**SM-K4R6**) **合并的 beads** 中，加入 **200μl** 的 **MG04-1 (Resuspension buffer)**。
- 向 1 中加入 **2μl** 的 **MG04-3 (Reducing reagent)**，混匀后置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100) 上，37°C，300rpm，处理 1 小时。
- 1 小时后，向 2 中加入 **6μl** 的 **MG04-4 (Alkylation reagent)**，混匀，室温，**避光**，45 分钟。
- 45 分钟后，向 3 中加入 **600μl** 的 **MG04-2 (Dilution buffer)**，混匀。
- 从 -80°C 取出 **MG04-5 (Trypsin (MS grade))** 置于冰上完全化冻后，快速离心将 Trypsin 收集到管底。取 **4μl** 的 **MG04-5** 于 4 的管中，充分混匀并快速离心后，将管置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100) 上，37°C，300rpm，过夜酶解 (~16 小时)。
- *第二天，快速离心后：**
 - 将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，加入甲酸 (Formic acid, 如 Sigma-Aldrich, #F0507, ~50μl)，使溶液的 **pH<3** (用 pH 试纸测定)。
 - 保留 beads 于 -80°C。

S2: 酶解肽段除盐

○ 试剂及配制：

- 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, **TFA**, 如 Sigma-Aldrich, #T6508)
- 乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
- 0.1% TFA 水溶液：配制 1.4ml。取 1.5μl TFA 稀释于 1.4mL 的超纯水中。
- 0.1%TFA/50% Acetonitrile 水溶液：配制 1ml。取 499μl 超纯水、1μl TFA 和 500μl Acetonitrile 混合即可。

○ 肽段除盐：

- 每个样品使用 **2** 个脱盐柱套件 (MG04-6、MG04-7、MG04-8) 进行除盐。
- 取 2 个 **MG04-6 (C18 desalting column)** 和 **MG04-7 (Waste liquid tube)**，并将 **MG04-6** 置于 **MG04-7** 中。向上层的 **MG04-6** 中加入 **100μl** 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile 溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 再向 2 的 **MG04-6** 中加入 **300μl** 的 0.1% TFA 水溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 弃去 **MG04-7** 中的废液后并重新与 **MG04-6** 组装。将 **S1** 中的酸化酶解肽段溶液 (**~800μl**) 平均分配到 2 个 **MG04-6** 中，室温，静置 2-3 分钟。开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 再向 **MG04-6** 中加入 **300μl** 的 0.1% TFA 水溶液，开盖，室温，5000rpm，离心 2 分钟。
- 弃去 **MG04-7** 及废液。将 **MG04-6** 与 **2** 支 **MG04-8 (Peptide collection tube)** 分别组装。再向上层的

MG04-6 中加入 **200 μ l** 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。将 2 支 MG04-8 管中收集的溶液合并为 1 管 (**400 μ l**), 即为最终的除盐肽段溶液, 即可进行后续肽段定量。

S3: 肽段定量与冻干

3. 推荐使用 ThermoFisher Scientific 公司的荧光肽段定量试剂盒 (Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay, #23290) 搭配荧光检测酶标仪 (ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1) 和荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108) 对 **S2** 除盐后的肽段溶液进行定量, 计算肽段总量。
4. 肽段定量完成后, 使用真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038), 真空旋转冻干定量后的肽段样品, 送样质谱检测。

S4: 肽段质谱检测建议

质谱类型	推荐 Bruker 的 TimsTOF 质谱系列 (4D 质谱)。
检测方式	4. DDA-PASEF 质谱检测方式。 5. 肽段上样量: 200 ng/injection。 6. 质谱测试时间: 1 小时/injection。
分析软件	4. 使用如 Maxquant [4]进行质谱数据检索, 完成蛋白质鉴定与定量 5. 使用如 Perseus [5]对鉴定/定量的蛋白质进行统计分析, 筛选特异性互作蛋白。 6. 使用如 R script/Python 进行数据深度汇总分析和制图。

■ 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. 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.
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.