

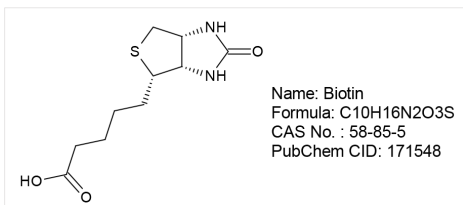
小分子-靶点蛋白富集及质谱筛选 (LFQ)
SM-PD Enrichment Kit (Azide tag, MS grade)
Catalog Number: MG07

■ **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. 叠氮 (Azide) 标记的 SM (Azide-labeled SM) 探针(**Probe**), 需用户自备。
 - (1) 修饰合成的 **Azide-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 Azide, 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 **Azide-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 Azide 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其系统
 - (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) 1.5ml/2ml/5ml/15ml/50ml 离心管 (Axygen、ESCO 等)
 - (7) Bradford 蛋白质定量试剂盒 (推荐使用 **Imultiomics, #MGR02**) 及检测系统 (酶标仪等)
 - (8) 考马斯亮蓝染色液 (推荐使用 **Imultiomics, #MGR01**) 和银染试剂系统
 - (9) 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)
 - (10) 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)
 - (11) SDS-PAGE 电泳系统、western blot 湿法转印系统、**Western blot 使用 MG07-6 (Streptavidin-**HRP**) 检测 pull-down 产物时, 请务必使用超敏 ECL 化学发光试剂 (如 ThermoFisher Scientific, #34577 或 #34095。本产品研发测试可用)** 及 ECL 检测系统 (如上海勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope 6000 系列)
 - (12) 旋转混合仪 (如海门市其林贝尔仪器制造有限公司, #BE-1200)
 - (13) Co-IP/Pull-down in-solution trypsin digestion Kit (ISD)—**Imultiomics, #MG04**

■ 术语

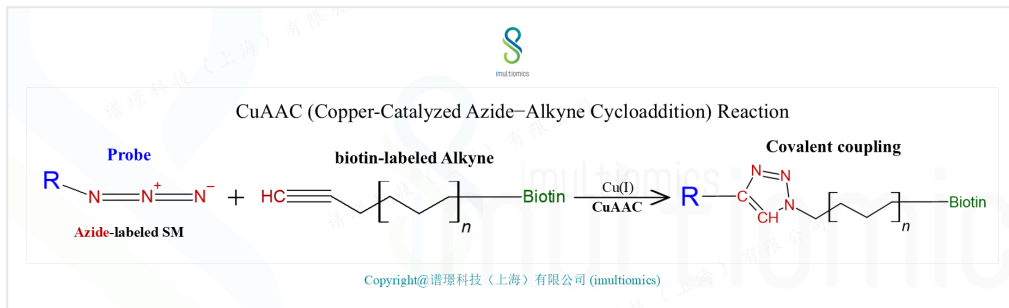
1. Small molecule (SM): 小分子化合物, 如小分子药物、代谢物等
2. SM-targeted Proteins: 小分子在细胞/组织中的结合靶点蛋白
3. Biotin: 生物素



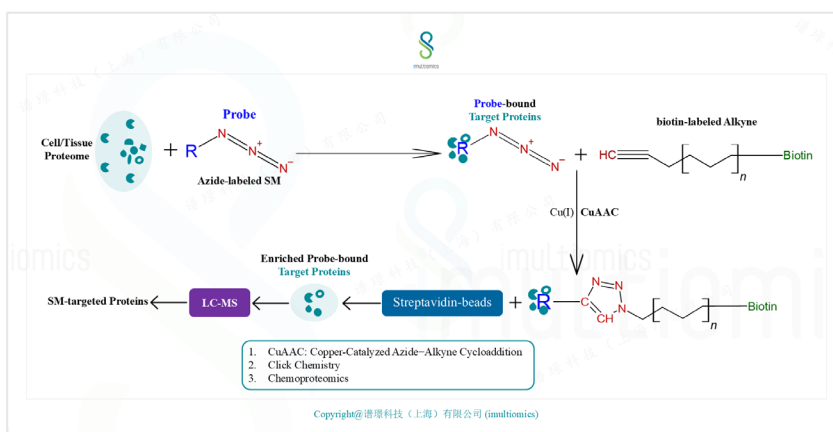
4. Alkyne (炔烃) $R-C\equiv CH$
5. Azide (叠氮) $R-N\equiv N^+N^-$
6. ABPP: Activity-Based Protein Profiling [1]
7. CuAAC: Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition, 一种“Click Chemistry”反应方式 [2]
8. Pull-down (PD): 此处指不依赖于抗体的分子捕获/富集技术
9. Probe (探针): 此处指修饰了 Azide “标签”的 SM (Azide-labeled SM)
10. LC-MS (Liquid 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。
11. SM-PD-MS (Azide tag): 此处指借助 Azide-labeled SM 分子上的 Azide “标签”, 通过 CuAAC 反应结合 Pull-down (PD) 技术捕获/富集 Probe 所结合的蛋白质分子。再结合质谱技术 (Mass Spectrometry, MS) 实现对富集的蛋白质进行鉴定/定量分析, 从而筛选 SM 的特异性结合靶点蛋白。
12. LFQ (Label-free Quantification)[3]: 基于质谱的“非标记 (label-free)”相对定量技术。此处指将 SM-PD-MS (Azide tag) 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 (即潜在的 SM-靶点蛋白)。

■ 产品简介:

- Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Cycloaddition (CuAAC) 是典型的 Click Chemistry Reaction[2]。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。



如上图所示：(1) 将目的 SM 用叠氮 (Azide) 标记，制备成“钓取”靶点蛋白的“探针 (Probe)”，(2) 将 Probe 与细胞/组织的提取蛋白质进行孵育，使 Probe 与其靶点蛋白结合；(3) 向 (2) 的反应体系中加入包含 biotin 标记的炔烃 (Biotin-Alkyne) 的 CuAAC mix，使得 Biotin-Alkyne 通过 CuAAC 反应，与 Probe 上的叠氮 (Azide) 共价结合。(4) 再向 (3) 的反应体系中加入 streptavidin-beads，去捕获/富集“靶点蛋白-Probe-Alkyne-Biotin”复合物，(5) 最后对捕获/富集的蛋白复合物进行质谱鉴定和定量分析，筛选 Probe 的潜在特异性靶点蛋白。

- 谱璟科技(上海)有限公司 (Imultiomics) 通过技术研发，开发了针对叠氮 (Azide) 标记的 SM，借助 CuAAC 反应、pull-down (PD) 和质谱 (MS) 技术进行叠氮 (Azide) 标记的 SM 靶点蛋白筛选试剂盒—MG07: SM-PD Enrichment Kit (Azide-tag, MS grade)，该试剂盒的优势：
 - (1) 包含从细胞蛋白质提取、CuAAC 反应和 pull-down 的主要试剂；
 - (2) 优化的预实验流程，助力用户制备高质量的、满足质谱鉴定/定量级别的 pull-down (PD) 样品。
 - (3) 提供了 Azide-labeled SM 阳性对照分子，可高效监控 CuAAC 反应及 Pull-down 流程。
 - (4) 该试剂盒可满足 **25** 次的 4mg 蛋白质、1.0ml 反应体系的 CuAAC 及 pull-down 实验。
- 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 (逻辑上可用，只要能从组织提取足量、合格的蛋白质即可)。
- ★ 本产品仅供科研使用！

■ 问题与解决方案:

Q1: 在 PART 1 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 MG07-1 (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。

Q2: 在 PART 2 的阶段, 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。

Q3: 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 (Azide-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。

Q4: 在 PART 4 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: (1) 有些 Azide-labeled SM 可能会在 MG07-7 (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。(2) [请务必使用超敏 ECL 化学发光试剂 \(如 ThermoFisher Scientific, #34577 或 #34095, 本产品研发测试可用\)](#)。

Q5: 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。[基于此, 建议用户在开始实验前, 使用 MG07-1 \(Cell lysis buffer\) 对 Probe 和 SM 进行溶解性测试。如溶解性较差, 可用 DMSO 对 Probe 和 SM 进行梯度稀释, 再进行溶解性尝试, 直至 Probe 和 SM 能完全溶解为宜。](#)

Q6: MG07 产品是否适用于组织样品的检测?

A: 本产品未测试过组织样本。但逻辑上是可以应用在组织样本的检测。只要能从组织样本中提取足量的蛋白质即可。建议流程如下:

- 动物组织样本: (1) 取下组织后, 立即用大量的预冷的 PBS 缓冲液洗涤, 去除血液污染。(2) 用干净的剪刀快速将组织块尽可能剪碎后, 使用研钵搭配液氮, 进一步将剪碎的组织块研磨成粉末后, 适当分装。(3) 取一定量研磨后的组织粉末, 使用 MG07-1 搭配细胞/组织破碎机进行蛋白质提取。(4) 对提取的蛋白质进行定量和 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色质检。
- 植物组织样本: (1) 如植物叶片、幼苗等, 使用研钵搭配液氮, 将组织研磨成粉末后, 适当分装。(2) 取一定量研磨后的植物组织粉末, 使用 MG07-1 搭配细胞/组织破碎机进行蛋白质提取。(3) 对提取的蛋白质进行定量和 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色质检。

■ 参考文献:

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