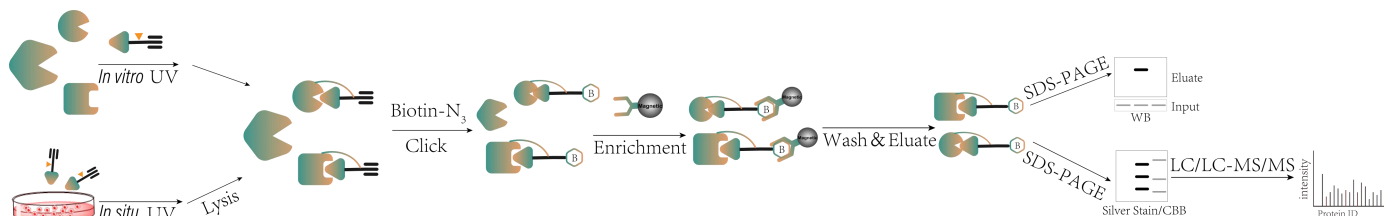


ChomiX®-炔基标记蛋白质 Extract-Click-Pulldown (链霉亲和素磁珠) 试剂盒

实验流程示意图



应用场景：

炔基化学探针（光亲和化学探针或共价反应化学探针）标记的蛋白质富集，主要流程包括化学探针标记，基于点击化学反应的生物素偶联，链霉亲和素磁珠辅助的蛋白质富集，洗脱，Western blot 验证或基于胶内酶切的蛋白质组学检测。

产品型号

产品货号	规格/样品数	批次
02030011	10	N/A

产品特点

本试剂盒包括点击化学反应试剂，叠氮-生物素，链霉亲和素磁珠及蛋白洗脱剂，适用于将化学探针（带有炔基报告基团）标记的蛋白质从蛋白质组中富集分离并洗脱，从而用于 Western blot 实验，使用对应的抗体检测目的蛋白。该产品的试剂量可用于不低于 10 个样品的制备（按照说明书做法，不低于 10 mL 的蛋白裂解液反应体系）。

注意：该试剂盒匹配的点击化学试剂适用于炔基探针浓度不超过 150 μM 。如实验中，使用的炔基探针浓度超过 150 μM ，则可能会造成蛋白质上标记的炔基探针偶联效率低，该试剂盒不适用。

产品规格

试剂组成	产品货号	包装	储存条件
Lysis buffer A	02030014A	10 mL *1 管	-20°C
Lysis buffer B	02030014B	10 mL *1 管	-20°C
Biotin-azide, 50X	02010018	0.25 mL*1 管	-20°C
BTAA/Cu-Mix, 25X	02030001 (Component A)	0.5 mL*1 管	-20°C
Reducing agent	02030001 (Component B)	100 mg*1 管	-20°C, 避光
Reconstitution buffer	02030015	10 mL*2 管	-20°C
Elution buffer	02030016	0.7 mL*1 管	-20°C
Streptavidin Magbeads	02030002	5 mL*1 管	4°C

使用说明

1. 使用该试剂盒之前，需要提前准备：

实验材料：细胞沉淀或活细胞，非共价小分子 (Cmpd) 和对应的炔基修饰的光亲和探针 (Probe) (根据实验需求，选择不同细胞样品和探针，详见使用步骤)；

仪器：超声破碎仪，磁力架，恒温震荡仪，酶标仪，冷冻离心机(分别适用于 1.5 mL 和 15 mL 离心管)，紫外光交联仪(365nm, 48W) (自备或购买公司产品，货号：UW365-T1)，金属浴，

旋转混匀仪等;

试剂: 无水二甲基亚砜 (DMSO) 溶剂 (纯度 > 99%), PBS 缓冲溶液 (pH 7.4, 磷酸盐缓冲溶液), 蛋白酶抑制剂 (推荐产品 Roche 04693132001), 蛋白浓度定量试剂盒 (推荐产品碧云天 P0006C), 高纯水, 无水甲醇 (纯度 > 99.9%), 氯仿 (纯度 > 99%), 蛋白上样缓冲液, β -巯基乙醇等;

耗材: 1.5 mL、15 mL 离心管等。

2. 该试剂盒以非共价小分子 (Cmpd) 和对应的炔基修饰的光亲和探针 (Probe) 为例进行实验步骤说明:

Cmpd 和 Probe 均已提前配置在 DMSO 溶剂中, 储液浓度为 100X, 使用时在室温融化, Probe 需要避光保存; 若 Probe 带有叠氮修饰, 则需使用包含 biotin-alkyne 的同类型试剂盒; 若 Probe 为共价反应探针 (即能够直接和蛋白质中某些氨基酸直接发生共价反应), 则不需要进行下述步骤 1 中的光交联步骤, 其它步骤可保持一致。

3. Lysis buffer A 和 B 使用时室温融化, 冰上预冷后, 加入蛋白酶抑制剂 (100X 储液, 配置方法参考推荐产品说明书), 直接使用。Lysis buffer A 和 B 可短期保存于 4°C (一个月以内), 如需长期保存, 建议分装后保存在 -20°C。

4. Biotin-azide 和 BTAA/Cu-Mix 使用时室温融化涡旋。建议分装后保存在 -20°C, 单个分装样品反复冻融不超过 3 次。

5. Reducing agent 以固体形式长期避光保存于 -20°C, 拿出使用时, 待试剂恢复室温后, 开盖称取 10 mg, 直接溶解于 800 μ L 高纯水中, 即为 25X 储液, 现配现用, 剩余溶液直接丢弃。如称取其它质量, 可等比例换算。

6. 步骤 5 中 Wash buffer 配置: 将 Reconstitution buffer 使用 PBS 稀释四倍体积即可, 例如取 2.5 mL Reconstitution buffer, 加入 7.5 mL PBS, 即得 10 mL Wash buffer。

7. Elution buffer 使用时室温融化, 注意观察不要留有不溶物, 可适当加热帮助融化 (~40°C)。使用时, 取出所需要的体积, 加入对应体积的 β -巯基乙醇, β -巯基乙醇终浓度为 1% (体积比)。

8. 该试剂盒中的试剂比例及步骤均经过优化, 如果实验内容有所不同, 需自行调整测试。

使用步骤

1. Probe 标记蛋白质组准备

(A) 裂解液水平进行 Cmpd 和 Probe 处理。

①将细胞沉淀置于冰上, 融化后加入冰上预冷的裂解液 Lysis buffer A (提前添加蛋白酶抑制剂), 超声破碎。

注意: 超声仪器及条件均可参考仪器或文献推荐条件, 使细胞在 4°C 条件下均匀破碎即可。

②将细胞裂解液离心, 取上清于新的样品管中, 使用蛋白浓度定量试剂盒进行蛋白浓度定量, 将上清细胞裂解液稀释至 2mg/ml (如使用其它浓度, 需自行尝试), 置于冰上待用。

③取三份 500 μ L 待用裂解液 (一般使用 1mg 蛋白质组作为起始量, 如靶点蛋白丰度较低, 也可以尝试使用更高蛋白量进行实验, 等比例放大体积即可) 于样品管中, 如下表所示, 分别加入 5 μ L 空白溶剂 Solvent (一般为 DMSO 或水) 或小分子化合物 Cmpd (100X 储液), 震荡轻轻混匀, 快速离心, 混合溶液在 25°C 避光静置孵育 0.5 h。孵育结束后, 加入 5 μ L DMSO 或 Probe (100X 储液), Probe 终浓度为 1X。震荡轻轻混匀, 快速离心, 最终控制三个样品中 DMSO 含量一致且低于 2%。混合溶液在 25°C 避光静置孵育 1 h。将样品轻轻混匀, 快速离心, 放置于冰上, 进行光照标记。(具体步骤可参考相关文献或科络思生物视频号“科学实验室系列”第 2 条相关内容)。

注意: 加入的 Cmpd 及 Probe 储液体积可根据储液浓度调整, 最终混合溶液中 DMSO 浓度不超过 2% 即可。

组别	Blank (Solvent)	Labeling (Probe)	Competition (Cmpd+Probe)
DMSO	+	/	/
Cmpd	/	/	+
Probe	/	+	+

(B) 活细胞水平进行 Cmpd 和 Probe 处理。

①以上述同样的组别设置, 在活细胞水平分别处理 DMSO、Cmpd 和 Probe (具体步骤可参考相关文献或科络思生物视频号“科学实验室系列”第 2 条相关内容)。

②将细胞收集后, 细胞沉淀置于冰上, 融化后加入冰上预冷的裂解液 Lysis buffer B (提前添加蛋白酶抑制剂), 超声破碎 (超声仪器及条件均可参考仪器或文献推荐条件, 使细胞在 4°C 条件下均匀破碎即可)。将细胞裂解液离心 (4°C, 20000 g, 30 min), 取上清于新的样品管中, 使用蛋白浓度定量试剂盒进行蛋白浓度定量, 将上清细胞裂解液稀释至 2mg/ml (如蛋白浓度较低, 1mg/ml 也可以使用。如使用其它浓度, 需自行尝试), 置于冰上待用。取三份 500 μ L 待用裂解液 (一般使用 1mg 蛋白质组作为起始量, 如靶点蛋白丰度较低, 也可以尝试使用更高蛋

白量进行实验，等比例放大体积即可)于样品管中，用于后续实验。

2. Input 样品制备(用于 WB 中检测全蛋白质组水平目标蛋白的丰度)

从步骤 1 蛋白质组样品中分别取出 10 μ L，加入 2.5 μ L 蛋白上样缓冲液 (5X，含有 β -巯基乙醇)，95 $^{\circ}$ C加热煮 5 min，冷却后离心，样品保存于-20 $^{\circ}$ C待用。

3. 点击化学偶联反应

在步骤 1 剩余蛋白质组样品中，依次加入 10 μ L 50X Biotin-azide，20 μ L 25X BTAA/Cu-Mix，20 μ L 25X Reducing agent，每个试剂加入后均立即震荡混匀。混合溶液在 25 $^{\circ}$ C，震荡反应 1 h (震荡混匀仪一般设置 1000-1500 rpm)。

4. 蛋白质沉淀及复溶

①上述偶联反应后的蛋白质溶液体积约为 540 μ L，将其转移至 15 mL 离心管中，并加入 2700 μ L 甲醇-氯仿混合溶剂 (体积比 4:1)，震荡混匀。使用 540 μ L 水洗涤原样品管，且将洗涤液合并至 15 mL 离心管中，重复三次，充分震荡混匀。此时溶液体积为 4860 μ L，白色浑浊液，高速离心 (4 $^{\circ}$ C，3000 g，10 min)，溶液分层，蛋白质沉淀位于中间夹层，片状固体，小心去除上下层液体，保留蛋白质沉淀。

②在 15 mL 离心管加入 1 mL 冷甲醇(-80 $^{\circ}$ C预冷)，4 $^{\circ}$ C 超声 10 s 将沉淀打碎，将混合液转移至 1.5 mL 离心管中。4 $^{\circ}$ C，10000 g，3 min，离心去上清。再次在 15 mL 离心管加入 1 mL 冷甲醇洗涤，并将洗涤液转移到上述 1.5 mL 离心管中，重复上述超声离心步骤，蛋白溶液均需要保存在冰上。去除上清甲醇后，将蛋白质沉淀在空气中室温开盖晾干 2 min，完全去除甲醇。

③在蛋白质沉淀中加入 750 μ L Reconstitution buffer，超声辅助。90 $^{\circ}$ C加热 3 min，使蛋白彻底复溶 (注意密闭，防止盖子受热打开)。冷却至室温后，高速离心 (20000 g，2 min) 去除可能的沉淀杂质，将上清全部转移至 15 mL 离心管中，并加入 2250 μ L PBS。样品可直接用于下述富集分离步骤，也可以放置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中长期保存，室温融化后再进行下述步骤。

5. 富集分离 Probe 标记蛋白质

①取 1200 μ L 链霉亲和素磁珠悬浊液于 15 mL 离心管中 (每个样品建议 400 μ L)，加入 5 mL PBS，上下颠倒震荡 30s，置于磁力架，静置 2min，去上清，重复清洗两次。小心去除上清后，加入 900 μ L PBS 重悬。

②分别在每个样品中，每隔 1h 分批次加入 100 μ L 链霉亲和素磁珠悬浊液，加入后将样品置于 25 $^{\circ}$ C，于旋转混匀仪上旋转孵育。每个样品累计加入磁珠悬浊液 300 μ L，孵育 3h。

③孵育结束后，将样品管置于磁力架，静置 2min，磁分离，吸去上清，上清可以暂时保存于-20 $^{\circ}$ C，也可直接弃去。磁珠中加入 3 mL Wash buffer，室温旋转混匀 10 min，磁分离，去上清；

④加入 1 mL PBS，将磁珠混匀转移至 1.5 mL 离心管中，室温旋转混匀 2 min，磁分离，去上清；重复洗涤 6 次。

6. Eluate 样品制备

①将磁珠中的上清尽可能去除干净，加入 50 μ L Elution buffer，95 $^{\circ}$ C 加热 20 min，每 5 min 震荡混匀一次 (注意密闭，防止盖子受热打开)。

②冷却至室温后，室温高速离心，20000 g，2 min，立即磁分离取上清，该样品为 Eluate 样品，即含有 Probe 标记蛋白质，保存于-20 $^{\circ}$ C待用。Eluate 样品可进行第 7 步操作，或以“胶内酶切”方式进行蛋白质组学样品制备 (具体制备过程和要求请咨询相关的相关蛋白质组学检测机构)

7. Western blot 检测

将上述 Input 和 Eluate 样品，放置室温融化并离心，20000 g，2 min，取上清样品进行 Western blot 检测分析。(Western blot 步骤均为常规步骤，可参考相关文献或视频。)

推荐上样量：Input 10 μ L，~40 μ g 蛋白质组；Eluate 40 μ L (确保目标蛋白信号丰度足够，便于抗体检测)。其它上样量也可尝试，取决于目标蛋白的丰度。

抗体孵育：分别使用目的蛋白抗体和内参蛋白抗体 (例如 GAPDH, ACTIN 等文献常用内参蛋白) 进行信号检测。抗体孵育步骤请参考对应抗体的说明书。

注意事项

- (1) 磁珠取用前应充分上下混匀，防止取用改变磁珠浓度，避免长时间超声对磁珠表面破坏；
- (2) 磁珠储存液中含有低浓度小分子抑菌剂，使用前请按照说明书步骤清洗，并尽快使用，避免长时间保存；
- (3) 本产品为 4 $^{\circ}$ C冰袋运输，产品收到后，按照说明书中每个试剂的储存条件，长期密封保存，有效期见标签；
- (4) 本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。