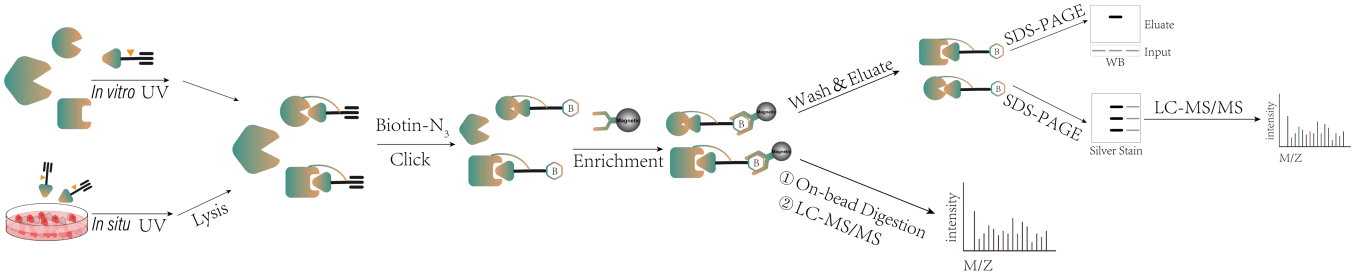
南京科络思生物科技有限公司
ChomiX Biotech Co.,Ltd.
江苏省南京市江北新区药谷大道11号加速器二期08栋6层
6th Floor, Building 08, Accelerator Phase II,
No.11 Yaogu Avenue, Jiangbei New Area, Nanjing, Jiangsu
T. 025-86608859
E. service@chomixbiotech.com / www.chomixbiotech.com

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

应用场景和实验流程示意图



该技术首先通过炔基化学探针（光亲和或共价反应探针）标记目标蛋白，随后利用点击化学反应（click chemistry）偶联生物素报告基团，并借助链霉亲和素磁珠实现特异性富集。富集后的复合物可根据下游分析需求选择不同路径：可将蛋白从磁珠上洗脱，经 SDS-PAGE 分离后进行 Western blot 分析，用于验证富集效果或特定靶蛋白；或同样经 SDS-PAGE 分离后，进行胶内酶切及质谱检测以鉴定结合蛋白。也可对富集后的样品进行 on-bead 酶切，随后通过质谱进行蛋白质组学检测以鉴定小分子结合蛋白。

产品型号

产品货号	规格/样品数	批次
02030011	10	N/A

产品规格

试剂组成	产品货号	包装	储存条件
Lysis buffer A	02030011A	10 mL *1 管	-20℃
Lysis buffer B	02030011B	10 mL *1 管	-20℃
Biotin-azide，50X	02010018	0.15 mL*1 管	-20℃
BTTAA/Cu-Mix，25X	02030001A	0.25 mL*1 管	-20℃
Reducing agent A	02030001B	100 mg*5 管	-20℃，避光
Reconstitution buffer	02030011C	10 mL*2 管	-20℃
Elution buffer	02030011D	0.7 mL*1 管	-20℃
Streptavidin Magbeads	02030002	5 ml*1 管	4℃

产品特点

1. 本试剂盒包括细胞裂解液（Lysis buffer A/B）、点击化学反应试剂（BTTAA/Cu-Mix 和 Reducing agent A）、生物素-叠氮（Biotin-azide）、蛋白重悬溶解缓冲液（Reconstitution buffer）、链霉亲和素磁珠（Streptavidin Magbeads）及蛋白洗脱剂（Elution buffer）。该产品的试剂量可用于不低于 10 个样品的制备（按照说明书推荐方案，总共不低于 5 mL 的蛋白裂解液体系）。
2. 本试剂盒的 Lysis buffer 几乎适用于所有细胞/组织样本。其中，Lysis buffer B 对膜蛋白提取效率更高。Lysis buffer A/B 均根据后续步骤进行了相应优化，采用其他配方的裂解液可能会与后续步骤兼容性不佳，导致实验失败。
3. 该试剂盒匹配的点击化学试剂适用于溶液中炔基探针浓度≤150 μM 的体系。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。
4. 本试剂盒中的链霉亲和素磁珠，能够与生物素修饰分子高度特异性结合（Kd = $10^{-14\sim-15}$ mol/L）。该磁珠具有优良的亲水性、再分散稳定性、磁稳定性，有效确保高的蛋白结合率和低非特异性吸附，以及反应的均一性和检测一致性。
5. 磁珠混悬液（10 mg/mL）对游离生物素分子的结合能力为 > 30 nmol per mg beads（具体产品信息参考该磁珠说明书）。注意：生物素结合能力将因实际的溶液成分和分

子的位阻效应而变化，需根据实验体系自行尝试合适的磁珠用量。

6. 本试剂盒的 Reconstitution buffer 采用升级配方，能充分复溶蛋白沉淀（接近 100%），且稀释后得到的 Wash buffer 为强效洗涤剂，能有效去除非特异性结合蛋白，极大地降低背景蛋白的干扰。

7. 本试剂盒的 Elution buffer，是基础 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的升级配方，能大幅提高生物化蛋白的洗脱效率（效率提升效果将因实验体系而有所不同）。

使用说明

1. 在本实验之前，确保已经通过预实验确认探针（Probe）能够标记蛋白。推荐使用 ChomiX®-炔基标记蛋白质 Extract-Click（Biotin 或 TAMRA）试剂盒（对应产品货号 02030012 或 02030013，内容与本试剂盒步骤 1~3 类似，但不包含步骤 4 及后续步骤）进行该预实验测试。相关实验中，如需要使用阳性化学探针作为对照，推荐以下产品：

（A）点击化学反应阳性探针。推荐使用靶向蛋白质半胱氨酸残基的通用型共价标记炔基探针 IA-alkyne （货号 **02010025**）作为标记和点击化学反应的阳性对照 Probe，按使用步骤中“裂解液水平（in vitro）进行 Cmpd 和 Probe 处理”所述方法进行标记处理（无需进行步骤 1 中的光交联）和后续实验。推荐 IA-alkyne 储液浓度为 1 mM（100X，溶于 DMSO 中），工作浓度 10 μM。

（B）光亲和阳性探针。推荐使用脱氧胆酸光亲和探针 CMX-Q-013（货号 **02010152**）作为细胞水平光交联阳性对照 Probe，按使用步骤中“活细胞水平（in situ）进行 Cmpd 和 Probe 处理”所述方法进行标记处理和后续实验。推荐 CMX-Q-013 储液浓度为 2 mM（100X，溶于 DMSO 中），工作浓度 20 μM。

2. 推荐在步骤 3 进行质量检测，即，通过 Western blot 检测样品的生物素信号，确认化学探针能够标记样品中蛋白质，确保实验顺利进行。

3. 对于步骤 6 中获得的样品，建议进行基于 Streptavidin-HRP 的 Western blot 检测（如步骤 7 所示）以确认生物素标记蛋白的 pulldown 效果。不建议采用银染法替代该步骤。这主要是因为高丰度蛋白在 beads 上存在一定程度的非特异性吸附（背景蛋白），尽管吸附比例低，但其绝对丰度仍高于大部分其他蛋白。因此，背景蛋白将掩盖低丰度的探针特异性结合蛋白的银染信号。而由于背景蛋白极少有本底生物素化修饰，因此基于生物素信号的 Western blot 分析能有效避免背景蛋白的干扰。

4. 使用本试剂盒之前，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，40-50W）（自备或购买公司产品，货号：UW365-T1），金属浴，旋转混匀仪等，ChemiDoc MP 凝胶成像仪（或其它品牌可用于 Western blot 检测的凝胶成像仪）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，或其他具有类似去垢剂兼容性的产品），去离子水，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。

5. 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：

注意：默认 Cmpd 和 Probe 均已提前配置好，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。

6. 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。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。

7. Biotin-azide 和 BTTAA/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。

8. Reducing agent A 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 μL 去离子水中，即为 25X 储液。如称取其它质量，可等比例换算。该还原剂一般现用现配，剩余样品直接丢弃。

9. 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。

10. 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）。

11. 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（in vitro）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℃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。（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）

3) 取三份 500 μL 待用裂解液（推荐使用 1 mg 蛋白质组作为起始量，也可以尝试使用其它蛋白量进行实验，等比例放大或缩小体积即可）于样品管中，如下表所示，分别加入 5 μL 空白溶剂（一般为 DMSO 或水）或小分子化合物 Cmpd（100X 储液），震荡轻轻混匀，化合物终浓度为 1X，快速离心，混合溶液在 25℃避光静置孵育 0.5 h。孵育结束后，加入 5 μL 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℃避光震荡 1 h（震荡混匀仪一般设置 1000-1500 rpm）。将样品轻轻混匀，快速离心，进行光照标记。

注意：通常的光照步骤为，样品转移至 24 孔板中，置于冰上，移去孔板盖，在紫外光交联仪下（365 nm）进行照射，细胞表面距灯管距离 5 cm，光照 15 min。光照时间需按实际实验需要进行优化。光照过程会产生热量，务必确保细胞紧贴冰面；如发现融化，可停止照射，更换冰盒，之后按照剩余时间，接着照射；紫外光对人体有害，请远离！

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（in situ）进行 Cmpd 和 Probe 处理。

1) 以 10-cm 细胞培养皿为例。将细胞在 10-cm 皿中培养至密度 90%以上（细胞铺板数目与细胞种类相关，细胞密度达到 90%以上，如密度不够，可延长培养时间），吸去培养基，用 PBS（4 mL）和无血清培养基（4 mL）分别清洗细胞；

2) 预先配制的含 DMSO 或 Cmpd 的无血清培养基中，每皿 4 mL，培养基中 DMSO 含量≤1%。将配制好的培养基加入至细胞中，先处理一段时间（如 0.5h）；再将 20 μL（200x）Probe 补加入含有原药的细胞培养基中（边加 Probe，边混匀，防止局部 DMSO 浓度过大），将细胞置于细胞培养箱中继续孵育一段时间（如 1 h）。

3) 孵育结束后，进行光照标记。吸除培养基，用冷 PBS（2 mL）清洗细胞两次；

注意：通常的光照步骤为，将细胞培养皿置于冰上，移去培养皿盖，在紫外光交联仪下（365 nm）进行照射，细胞表面距灯管距离 5 cm，光照 15 min。光照时间需按实际实验需要进行优化。光照过程会产生热量，务必确保细胞紧贴冰面；如发现融化，可停止照射，更换冰盒，之后按照剩余时间，接着照射；紫外光对人体有害，请远离！

4) 加入 2 mL 冷 PBS，用细胞刮将细胞轻轻刮下，最终收集至 1.5 mL 离心管中，并用冷 PBS 清洗 2 次（3000 rpm，3 min，去除上层 PBS），所得细胞用液氮速冻后可保存于 -80 度冰箱。

注意：(1)-(4)步需要避光，光照结束后，可在常规条件下进行实验。具体步骤可参考相关文献或手机端进入科络思生物视频号“科学实验室系列”第 2 条“完整收样流程详细示范”内容。

5) 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℃条件下均匀破碎即可）。将细胞裂解液离心（4℃，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 2 mg/mL（如蛋白浓度较低，1 mg/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 μL 待用裂解液（推荐使用 1 mg 蛋白质组作为起始量，也可以尝试使用其它蛋白量进行实验，等比例放大或缩小体积即可）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 μL，加入 2.5 μL 蛋白上样缓冲液（5X，含有β-巯基乙醇，终浓度为 1%（体积比）），95°C加热煮 5 min，冷却后离心，样品保存于-20°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 μL 50X Biotin-azide，20 μL 25X BTTAA/Cu-Mix，20 μL 25X Reducing agent A，每个试剂加入后均立即震荡混匀。混合溶液在 25°C，震荡反应 1 h（震荡混匀仪一般设置 1000-1500 rpm）。

步骤 3 质量检测：取 40 μL 反应液，加入 10 μL SDS-PAGE 上样缓冲液（5X，含β-巯基乙醇，终浓度为 1%（体积比）），95°C 加热 5 min，冷却后离心，样品保存于-20°C待用。或者直接进行 Western blot 分析，用 Streptavidin-HRP（推荐碧云天产 A0305 或同类型产品）检测蛋白质组生物素化信号，以确认点击化学反应正常进行。（Western blot 步骤均为常规步骤，可参考相关文献或视频）

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 500 μL，将其转移至 15 mL 离心管中，并加入 2500 μL 甲醇-氯仿混合溶剂（体积比 4:1），震荡混匀。使用 500 μL 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 4500 μL，白色浑浊液，离心（4°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°C预冷），4°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°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约 2 min，完全去除甲醇。

   注意：去除甲醇后，晾干至无明显甲醇残留但仍保持湿润状态即可。过于干燥将导致沉淀难以复溶。

3) 在蛋白质沉淀中加入 750 μL Reconstitution buffer，超声辅助。90°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）后取上清。

   注意：若高速离心后沉淀比较明显，尤其是不同样品之间的沉淀差异明显，将在不同样本间引入较大操作误差。此种情况下，建议重新制样。

4) 上清转移至 15 mL 离心管中，并加入 PBS 至 3 mL。样品可直接用于下述富集分离步骤，也可以放置于-80°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 μL 链霉亲和素磁珠悬浊液于 15 mL 离心管中(每个样品建议 400 μL)，加入 5 mL PBS，上下颠倒震荡 30s，置于磁力架，静置 2 min，去上清，重复清洗两次。小心去除上清后，加入 900 μL PBS 重悬。

2) 分别在每个样品中，每隔 1 h 分批次加入 100 μL 链霉亲和素磁珠悬浊液，置于 25℃，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 μL，孵育 3h。

3) 孵育结束后，将样品管置于磁力架，静置 2 min，磁分离，吸去上清，上清可以暂时保存于-20°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。样品可以“on-bead 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蛋白质组学检测机构），或继续进行一下步实验。

6. Eluate 样品制备

1) 将磁珠中的上清尽可能去除干净，加入 50 μL Elution buffer，95 °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）。注意：该方法可能会影响部分对膜蛋白（尤其是多次跨膜蛋白）的最终检测效率，需要根据实际情况优化洗脱温度。

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°C待用。

Eluate 样品可继续第 7 步操作，或进行银染（具体方法请参考相关文献或商业化试剂盒）后以“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蛋白质组学检测机构）

7. Western blot 检测目标蛋白

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 μL，~20 μg 蛋白质组；Eluate 40 μL（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：可使用 Streptavidin-HRP（推荐碧云天产品 A0305 或同类型产品）检测以确认生物素标记蛋白的 pulldown 效果，或使用目的蛋白抗体检测和内参蛋白抗体（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℃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。