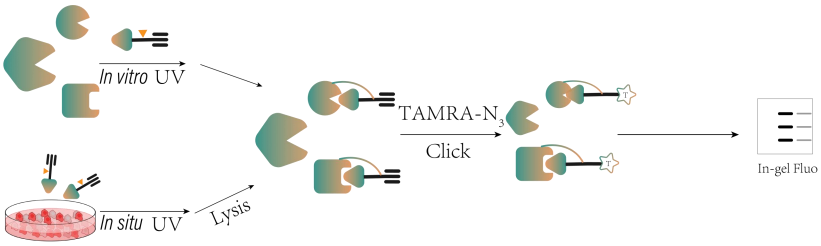
南京科络思生物科技有限公司
ChomiX Biotech Co.,Ltd.
江苏省南京市江北新区药谷大道11号加速器二期08栋6层
6th Floor, Building 08, Accelerator Phase II,
No.11 Yaogu Avenue, Jiangbei New Area, Nanjing, Jiangsu
T. 025-86608859
E. service@chomixbiotech.com / www.chomixbiotech.com

ChomiX®-炔基标记蛋白质 Extract-Click(TAMRA)试剂盒

应用场景和实验流程示意图



检测炔基化学探针(光亲和化学探针或共价反应化学探针)对蛋白质的标记效果。主要流程包括化学探针标记,基于点击化学(click)反应的生物素报告基团偶联，后续可用于胶内荧光成像检测化学探针标记信号，评估化学探针是否能够标记蛋白及标记强度。

产品型号

产品货号	规格/样品数	批次
02030013	100	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℃
TAMRA-azide，50X	02010006	0.15 mL*1 管	-20℃，避光
BTTAA/Cu-Mix，25X	02030001A	0.25 mL*1 管	-20℃
Reducing agent A	02030001B	100 mg*5 管	-20℃，避光

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）、叠氮-四甲基罗丹明（TAMRA-azide）。该产品的试剂量可用于不低于 100 个样品的制备（按照说明书推荐方案，总共不低于 5 mL 的蛋白裂解液反应体系）。

2. 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。

使用说明

1. 本试剂盒主要用于检测炔基化学探针(光亲和化学探针或共价反应化学探针）对蛋白质的标记效果，评估化学探针是否能够标记蛋白及标记强度。点击化学反应后蛋白样品后续可通过胶内荧光成像检测标记信号。若需要将点击化学反应后的样品进行探针标记蛋白富集和后续质谱检测，推荐使用“ChomiX®-炔基标记蛋白质 Extract-Click-Pulldown（链霉亲和素磁珠）试剂盒”（对应产品货号 **02030011**）。

2. 本试剂盒经过多次验证，操作简单稳定，可直接应用于实验。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 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 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。

3. 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，炔基修饰的光亲和化学探针或共价反应化学探针（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（365 nm，40-50W）（自备或购买公司产品，货号：UW365-T1），金属浴，旋转混匀仪，，ChemiDoc MP 凝胶成像仪（或其它品牌可用于荧光检测的凝胶成像仪）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，蛋白上样缓冲液，β-巯基乙醇等；

耗材：1.5 mL、15 mL 离心管等。

4. 该试剂盒以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 Probe 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 TAMRA-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。

5. 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℃（一个月以内），如需长期保存，建议分装后保存在-20℃。

6. 如使用其它溶液体系，可以自行测试比较。请注意，反应体系中应避免高浓度的 EDTA 等金属螯合剂，建议使用 PBS、Tris、Hepes 等溶液。

7. TAMRA-azide 和 BTTAA/Cu-Mix 使用时室温融化涡旋。建议分装后保存在-20℃，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℃，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. 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 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 2 mg/ml（如使用其它浓度，需自行尝试），置于冰上待用。

3) 取 50 μL 待用裂解液（推荐使用 0.1 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，加入 0.5 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，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：通常的光照步骤为，样品转移至 96 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 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。

（B）活细胞水平（in situ）进行 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 Probe 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，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”相关内容。

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，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 50 μL 待用裂解液（推荐使用 0.1 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. 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 1 μL 50X TAMRA-azide，2 μL 25X BTTAA/Cu-Mix，2 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）。

3. 胶内荧光成像分析

加入 13.75 μL 5X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（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℃待用。后续进行 SDS-PAGE 分离，推荐上样量 20-30 μL，电泳结束后，将胶取出，将胶前沿含溴酚蓝和游离 TAMRA-azide 的部分截除，置于盛有去离子水的干净盒子中，使用 ChemiDoc MP 凝胶成像仪进行胶内荧光成像分析（TAMRA 的激发波长为 520-545 nm，发射波长为 577-627 nm）。荧光检测后进行考马斯亮蓝染色。

注意：胶在荧光成像之前可在去离子水中短暂保存（< 1 h），时间过长易导致蛋白扩散。不可泡在含醋酸的凝胶固定液中，否则影响成像效果。

注意事项

(1) 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；

(2) 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。