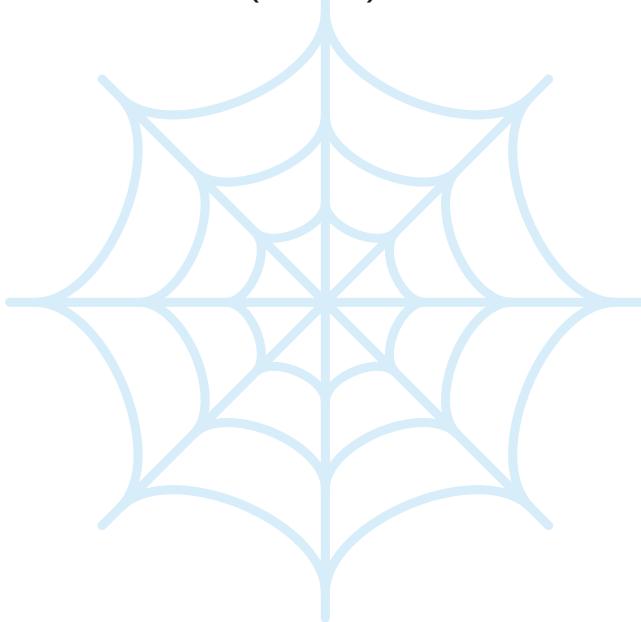


SPIDER™ 邻近标记 小分子 Pull-Down 试剂盒说明书

Cat.No.AC24001-4 (4 rxns)

Cat.No.AC24001-8 (8 rxns)



扫码解锁更多
发表文献解读内容



扫码解锁更多
SPIDER视频操作



CONTENTS

目 录

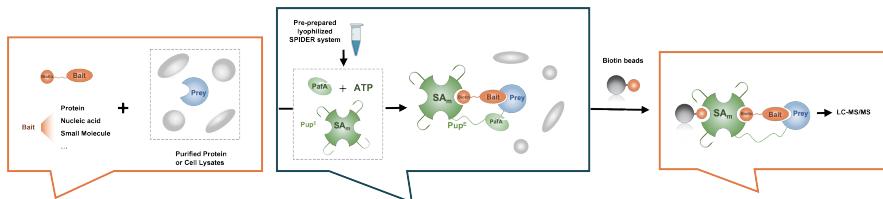
| | |
|----------------------|----|
| 一、产品简介 | 02 |
| 二、产品应用范围 | 03 |
| 三、试剂盒组分 | 03 |
| 四、需要您自行准备的主要试剂、耗材和仪器 | 04 |
| 五、对照组的设置建议 | 05 |
| 六、SPIDER反应体系 | 06 |
| 七、实验操作流程 | 06 |
| 八、反应流程和时间表 | 11 |
| 九、常见问题 | 12 |

一、产品简介

邻近标记技术已被成功应用于鉴定蛋白靶标，相比传统的Pulldown/IP+MS技术，邻近标记技术可以解决鉴定弱或瞬时相互作用、研究膜蛋白等诸多问题。根据结核分枝杆菌类泛素蛋白酶体系统中底物Pup分子在体外能够招募PafA连接酶发挥邻近标记作用的实验原理，来自上海交通大学的科研团队研发了一项基于底物的新型邻近标记技术(专利号ZL202110069353.7)，命名为Specific Pupylation as IDEntity Reporter (SPIDER)。该技术可应用于蛋白-蛋白、核酸-蛋白、小分子-蛋白等相互作用的验证和发现。

本试剂盒基于SPIDER邻近标记技术，仅需准备生物素化标记的诱饵分子，加入待反应样本(纯化蛋白、细胞/组织裂解液)及SPIDER反应体系启动反应，诱饵分子(Bait)和目标蛋白(Prey)之间的非共价结合被转化为目标蛋白和链霉亲和素之间的共价连接，随后目标蛋白可以被生物素琼脂糖亲和富集并进行质谱鉴定。

相比其他互作检测产品，该方法无需提前将标签和诱饵分子进行融合，摆脱对融合蛋白表达准确性的依赖，操作相对简单，应用范围广。此外，该产品后续使用严苛的条件进行清洗，可显著降低非特异蛋白的干扰，富集能力强，结果准确性更高，同时兼具操作简单快捷的优点。



预处理：将生物素化的生物分子与靶蛋白在反应缓冲液中孵育。根据实验目的，生物分子可在纯蛋白体系、细胞裂解液体系或活细胞表面体系中孵育

类泛素连接反应：加入SPIDER体系，在类泛素化连接酶PafA的催化下，将PupE的C末端共价连接到生物分子相互结合的靶蛋白上，完成类泛素化标记反应

质谱分析：取反应液进行质谱检测分析，获得与生物分子结合的靶蛋白信息

图1 | SPIDER

- [1] Jiang HW, Chen H, Zheng YX, et al. Specific pupylation as IDEntity reporter (SPIDER) for the identification of protein-biomolecule interactions. *Sci China Life Sci.* 2023 Apr 14:1-19.
- [2] Li WJ, Mei WY, Jiang HW, et al. Blocking the PD-1 signal transduction by occupying the phosphorylated ITSM recognition site of SHP-2. *Science China Life Sciences.* 2024.

二、产品应用范围

- 用于小分子、重组蛋白的结合蛋白/靶标蛋白的筛选和发现
- 仅适用于体外反应
- 仅用于科学研究

三、试剂盒组分

Box A

| 编号 | 名称 | 规格 (4 rxns) | 规格 (8 rxns) | 保存条件 |
|----|-----------------|-------------|-------------|-------|
| 1 | Buffer R | 30 mL | 60 mL | 2-8°C |
| 2 | Urea | 4*4.8 g | 8*4.8 g | 2-8°C |
| 3 | Biotin-beads | 450 μL | 900 μL | 2-8°C |
| 4 | Wash buffer I | 10 mL | 20 mL | 2-8°C |
| 5 | Wash buffer II | 5 mL | 10 mL | 2-8°C |
| 6 | Wash buffer III | 10 mL | 15 mL | 2-8°C |

Box B

| 编号 | 名称 | 规格 (4 rxns) | 规格 (8 rxns) | 保存条件 |
|----|--------------|-------------|-------------|-------|
| 1 | Component I | 4 rxns | 2*4 rxns | -80°C |
| 2 | Component II | 4 rxns | 2*4 rxns | -80°C |
| 3 | PC | 20 μL | 20 μL | -80°C |

特别提示:



实验组与对照组所需试剂量相同, 建议每组实验做一次技术重复, 一次实验消耗4 rxns 试剂量。

四、需要您自行准备的主要试剂、耗材和仪器

1. 生物素标记的小分子/重组蛋白

1) 生物素标记的小分子/重组蛋白: 4 rxns共需2.4 nmol, 建议最小浓度为10 μ M; 生物素标记位点尽量在最低程度上影响小分子/蛋白活性。

特别提示:



生物素与小分子/重组蛋白之间需要柔性Linker, 建议2~3个PEG, 防止重组蛋白影响生物素与链霉亲和素的结合, 或者生物素影响重组蛋白/小分子表面构象与活性。

2) 非标记小分子 (重组蛋白无需准备) : 2 rxns共需120 nmol, 建议最小浓度为1 mM。

2. 细胞/组织裂解液

4 rxns共需细胞/组织裂解液中总蛋白12 mg, 建议最小浓度为1 mg/mL。

特别提示:



细胞裂解时, Cell Lysate Buffer的有效成分建议使用非离子型去污剂, 如1%NP-40, 其作用温和, 能够保留蛋白的天然构象以及相互作用; 酶抑制剂应避免使用AEBSF或带有AEBSF组分的Cocktail, AEBSF会抑制SPIDER反应。

3. 其它需要的主要试剂

Tween 20: 共需40 μ L, 可完成4 rxns。

4. 耗材

15 mL离心管, 1.5 mL EP管, 一次性吸头。

5. 仪器

可用于500 \times g 的微量离心机, 以及15 mL离心管, 500 \times g 的水平离心机;
涡旋振荡器, 旋转混匀器 (水平混匀器、三维混匀器可作为备选);
37°C水浴锅, 4°C冰箱。

五、对照组的设置建议

| | | 实验组 | 竞争对照组 | 空白对照组 |
|------|-------------|-----|-------|-------|
| 小分子 | 生物素标记小分子 | √ | √ | ✗ |
| | 非标记小分子 (过量) | ✗ | √ | ✗ |
| | 细胞裂解液 | √ | √ | √ |
| 重组蛋白 | SPIDER | √ | √ | √ |
| | 生物素标记蛋白 | √ | - | ✗ |
| | 细胞裂解液 | √ | - | √ |
| | SPIDER | √ | - | √ |

特别提示:



- ① 必需设置对照组, 可选择竞争对照或空白对照, 或两种对照同步设置;
- ② 优先考虑采用竞争对照, 前提是可获得高浓度的非标记小分子, 浓度为生物素标记小分子100倍; 通常情况下, 重组蛋白的浓度难以达到要求, 一般采用空白对照。

六、SPIDER反应体系

| | | 实验组 | | 竞争对照组 | | 空白对照组 | |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|--|
| 名称 | 体积 | 终浓度 | 体积 | 终浓度 | 体积 | 终浓度 | |
| Biotin-bait | 60 μ L | 0.1 μ M | 60 μ L | 0.1 μ M | - | - | |
| 非标记Bait | - | - | 60 μ L | 10 μ M | - | - | |
| 细胞裂解液 | 3 mL | 0.5 mg/mL | 3 mL | 0.5 mg/mL | 3 mL | 0.5 mg/mL | |
| Component I | 50 μ L | - | 50 μ L | - | 50 μ L | - | |
| Component II | 200 μ L | - | 200 μ L | - | 200 μ L | - | |
| Buffer R | 2.69 mL | - | 2.63 mL | - | 2.75 mL | - | |
| All | 6 mL | - | 6 mL | - | 6 mL | - | |

七、实验操作流程

(一) SPIDER反应

1、预孵育

根据实验需求确定竞争法与非竞争法。二者实验对照组设置不同, 竞争法以添加100倍非标记小分子作为竞争对照, 非竞争法以不添加生物素标记的小分子/重组蛋白作为空白对照。

1.1 对照组为竞争对照

1.1.1 样品稀释。

生物素标记小分子: 使用保存溶剂稀释至10 μ M, 4 rxns共需240 μ L;

非标记小分子: 使用保存溶剂稀释至1 mM, 2 rxns共需120 μ L;

细胞/组织裂解液: 原浓度不低于1 mg/mL, 使用Buffer R稀释至1 mg/mL, 4 rxns共需12 mL。

1.1.2 取4个15 mL离心管, 进行标记, 用于区分实验组与对照组。

1.1.3 向实验组各管中依次加入3 mL细胞裂解液 (蛋白总量为3 mg) , 2.69 mL Buffer R, 60 μ L 生物素标记小分子 (总量为0.6 nmol) 。

1.1.4 向对照组各管中依次加入3 mL细胞裂解液 (蛋白总量为3 mg) , 2.63 mL Buffer R, 60 μ L 非标记小分子 (总量为60 nmol) , 60 μ L生物素标记小分子 (总量为0.6 nmol) 。



特别提示:

对照组与实验组中细胞裂解液应预先混匀, 保持一致。

1.1.5 将实验组与对照组各管同时放置于4°C, 旋转孵育, 过夜 (16 h) 。

1.2 对照组为空白对照

1.2.1 样品稀释。

生物素标记小分子/重组蛋白: 使用保存溶剂稀释至10 μ M, 2 rxns共需120 μ L;

细胞/组织裂解液: 原浓度不低于1 mg/mL, 使用Buffer R稀释至1 mg/mL, 4 rxns共需12 mL。

1.2.2 取4个15 mL离心管, 进行标记, 用于区分实验组与对照组。

1.2.3 向实验组各管中加入3 mL细胞裂解液 (蛋白总量为3 mg) , 2.69 mL Buffer R, 60 μ L 生物素标记小分子/重组蛋白 (总量为0.6 nmol) 。

1.2.4 向对照组各管中加入3 mL细胞裂解液 (蛋白总量为3 mg) , 2.75 mL Buffer R。



特别提示:

对照组与实验组中细胞裂解液应预先混匀, 保持一致。

1.2.5 将实验组与对照组各管同时放置于4°C, 旋转孵育, 过夜 (16 h) 。



特别提示:

以下步骤实验组与对照组操作一致, 注意区分实验组与对照组。

2. SPIDER

- 2.1 将Component I, Component II放置于冰上, 取220 μ L Buffer R加入Component I, 取850 μ L Buffer R加入Component II, 静置15 min后, 温柔吹吸使其复溶, 切勿剧烈混匀。
- 2.2 各管分别加入50 μ L Component I, 加入后立即颠倒混匀, 4°C旋转孵育30 min。
- 2.3 各管分别加入200 μ L Component II, 混匀后置于37°C水浴锅, 孵育30 min, 每10 min进行颠倒混匀。

特别提示:



- ① Component I, Component II 请使用当天复溶, 保持活性成分稳定。
- ② Component II 复溶后如果出现微量絮状物质属正常状况, 不影响使用。
- ③ SPIDER 后请妥善保存Component I, Component II, Buffer R, 用于后续质控检测。

3. 目标蛋白富集

- 3.1 将各管反应体系转移至对应Urea管, 室温旋转混匀, 使粉末完全溶解, 所需时间约10 min。
- 3.2 向各管加入100 μ L Biotin-beads, 10 μ L Tween 20, 室温旋转孵育2 h。

特别提示:



- ① Biotin-beads, 无需清洗, 可直接使用。
- ② Biotin-beads使用时请务必混匀, 并且使用1 mL移液器添加Biotin-beads, 以防止各管Biotin-beads添加不均匀。

- 3.3 孵育完成后, 室温500 \times g, 水平离心5 min, 去除上清。

4. 清洗

- 4.1 各管分别加入1 mL的Wash buffer I, 混匀Biotin-beads, 并转移至1.5 mL EP管中, 室温旋转清洗5 min后, 500 \times g 离心5 min, 去除上清。
- 4.2 各管分别加入1 mL Wash buffer I, 室温旋转清洗5 min后, 500 \times g 离心5 min, 去除上清。
- 4.3 各管分别加入1 mL Wash buffer II, 室温旋转清洗5 min后, 500 \times g 离心5 min, 去除上清。
- 4.4 各管分别加入1 mL Wash buffer III, 室温旋转清洗5 min后, 500 \times g 离心5 min, 去除上清, 添加500 μ L Wash buffer III 重悬Biotin-beads, 暂存于4°C。

特别提示:



- ①转移以及清洗Biotin-beads过程, 尽可能避免Biotin-beads损失。
- ②清洗完成后, Biotin-beads请尽快进行质谱鉴定与分析。

5. 质谱鉴定

使用Trypsin进行样本On-bead-digestion质谱前处理, 用于互作蛋白鉴定。具体方案可前往抗码芯瑞官方网站下载或联系相关人员。



特别提示:

抗码芯瑞可提供质谱分析服务。

(二) 质控 (选做)

本试剂盒所提供的质控 (PC) 用于定性评估SPIDER关键组分 (Component I, II) 的活性, 反应完成后使用SDS-PAGE电泳检测。操作时长约2 h。

- 1) 取20 μ L Buffer R加入PC, 放置于冰上, 温柔吹吸使其溶解。
- 2) 取2个PCR管, 标记为实验组与对照组, 按下表依次加入反应组分, 混匀, 并瞬时离心使试剂置于PCR管底部。

反应体系如下表:

| | 实验组 | 对照组 |
|--------------|---------------|---------------|
| 名称 | 体积 (μ L) | 体积 (μ L) |
| Bfffer R | 32 | 41 |
| PC | 1.5 | 1.5 |
| Component I | 7.5 | 7.5 |
| Component II | 9.0 | - |
| 总体积 | 50 | 50 |

- 3) 将反应体系置于37°C培养箱, 孵育30 min-2 h。
- 4) 反应完成后保存于-20°C冰箱, 或立即进行SDS-PAGE检测。



特别提示:

- ① 建议质控与SPIDER反应同时进行。
- ② 若质控未能及时进行, 请将Component I、Component II立即保存于-80°C冰箱, 请勿反复冻融; Buffer R保存于4°C。

示例结果如下：

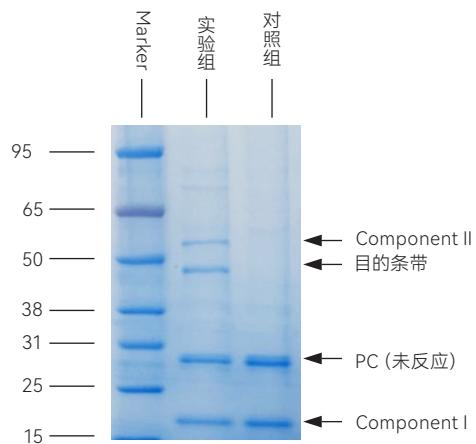


图2 | 质控示例结果

如图所示, 当实验组出现目的条带时, 说明试剂组分中Component I, Component II活性较好, 可用于完成SPIDER反应。

八、反应流程和时间表

1、对照设置流程图

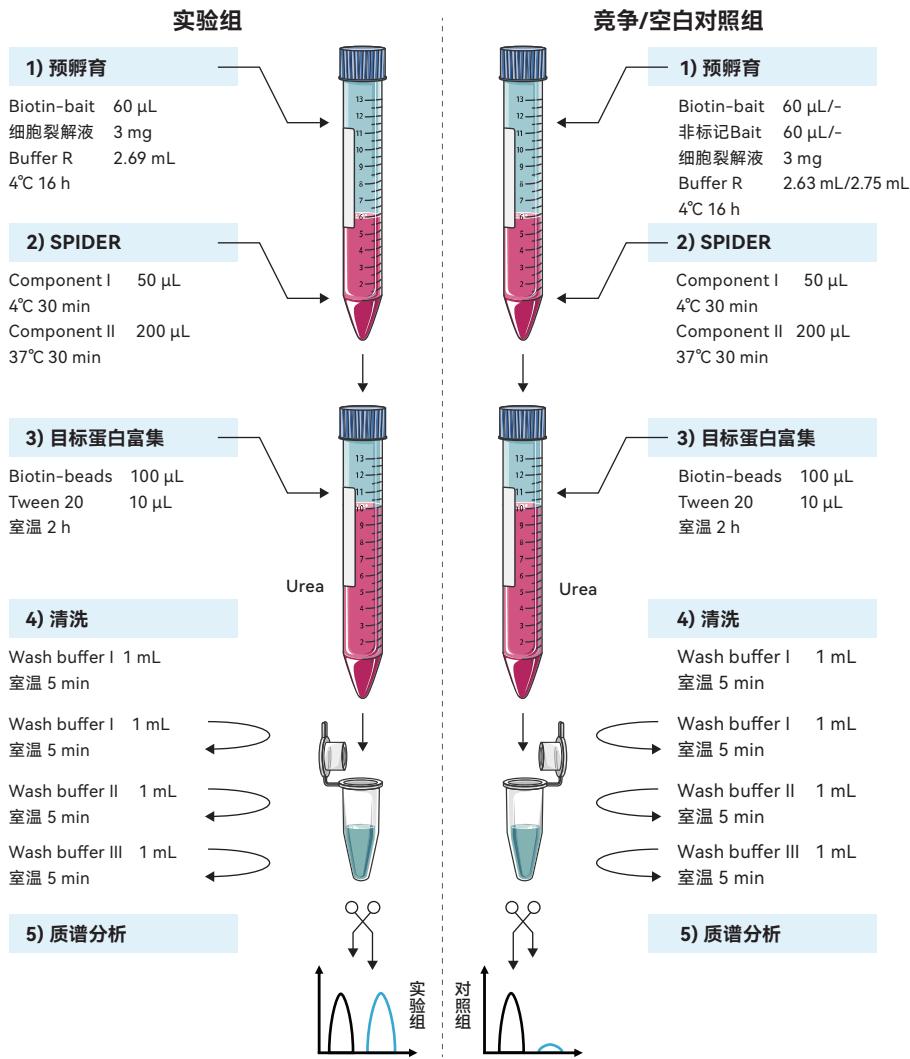


图3 | 对照设置流程图

2. 反应流程时间表

| | 操作 | 消耗时间 | 实际操作时间 |
|---|--------|------------|--------|
| 1 | 预孵育 | 17 h | 10 min |
| 2 | SPIDER | 1 h 10 min | 10 min |
| 3 | 目标蛋白富集 | 2 h 30 min | 10 min |
| 4 | 清洗 | 1 h | 20 min |

九、常见问题

Q1: 如何确定使用竞争法或非竞争法？

① 推荐使用竞争法，因为使用生物素化小分子会引入生物素或linker结合蛋白的非特异性干扰，因此可以通过竞争法，添加过量非生物素标记的分子竞争结合目的蛋白，可以极大提高互作蛋白发现的真阳性率。

② 如果无非标记小分子，或非标记小分子的水溶性不能达到竞争对照要求 ($> 10 \mu\text{M}$)，则推荐选择空白对照。

③ 对于引入的生物素或Linker所带来的非特异性结合的蛋白已有明确的预期，可选择空白对照。

Q2: 通过该试剂盒获得的目标蛋白有什么特征吗？

由于PafA连接酶的特性，目标蛋白需要带有可及的赖氨酸才能够被捕获。



了解更多产品讯息及操作说明，
请关注抗码芯瑞微信公众号

上海抗码芯瑞生物科技有限公司

-
- 地址: 上海市闵行区园美路58号1号楼702
 - 电话: 021-62202128 / 400-8868-750
 - 邮箱: info@abcodebio.com
 - 官网: www.abcodearray.com
-

版权所有©2024 上海抗码芯瑞生物科技有限公司保留所有权利。

本手册仅限科研目的使用, 未经上海抗码芯瑞生物科技有限公司书面同意, 任何单位或个人不得擅自摘抄、复制本资料内容的全部或部分, 并不得以任何形式转播。