

Co-IP/Pull-down in-gel Trypsin Digestion Kit (IGD)

Catalog Number: MG03

请用户务必通读并熟悉试剂盒使用说明后，再开展实验

■ 术语

1. PPIs (Protein-Protein Interactions): 蛋白质-蛋白质相互作用。
2. PTMs (Protein Translational Modifications): 蛋白质翻译后修饰。
3. IP/Co-IP (Immunoprecipitation/Co-immunoprecipitation): 免疫沉淀/免疫共沉淀，即通过抗体 (antibody) 介导的 IP/Co-IP 富集/捕获 Bait 蛋白和与 Bait 互作的蛋白质分子。
4. Pull-down (PD): 此处指不依赖于抗体的分子捕获/富集技术。如利用 Biotin 与 streptavidin 蛋白质之间的高亲和力，实现对 RNA-互作蛋白 (RNA pull-down)、DNA-互作蛋白 (DNA pull-down)、小分子-互作蛋白 (SM pull-down) 等的富集。
5. 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。
6. IP-MS (Immunoprecipitation-Mass Spectrometry): 免疫沉淀-质谱，即利用 IP/Co-IP 技术富集 Bait 蛋白的相互作用复合物 (Protein interaction complex) 后，再结合 LC-MS 技术实现对富集的相互作用复合物进行鉴定/定量分析，从而筛选与 Bait 蛋白存在相互作用的蛋白质 (Interactors) 及潜在的蛋白质 PTMs (尤其是 Bait 蛋白)。
7. PD-MS (Pull-down-Mass Spectrometry): 通过 Pull-down 技术实现对 RNA-互作蛋白 (RNA pull-down)、DNA-互作蛋白 (DNA pull-down)、小分子-互作蛋白 (SM pull-down) 等的富集，再结合 LC-MS 技术实现对富集蛋白质的鉴定/相对定量分析，从而筛选被显著富集的蛋白质 (潜在的互作/结合蛋白)。
8. iBAQ [1,2]: IP/Co-IP 和 Pull-down 富集的蛋白质样品，如只对感兴趣的条带 (目的组 vs. 对照组) 进行 LC-MS 检测，则只能获得样品中“有或无”的蛋白质定性信息，即无法区分特异性互作/结合蛋白与非特异性粘附蛋白。对于这种情况，则可通过 iBAQ[3]值衡量鉴定到的所有蛋白质分子在本样品中的相对丰度 (特异性互作/结合蛋白通常会被显著富集)，再结合自身的研究方向，尝试手动筛选潜在的“阳性”互作/结合蛋白质。

■ MG03: 产品组件

Co-IP/Pull-down in-gel Trypsin Digestion Kit (IGD) Catalog Number: MG03			Part A	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
MG03-1	Digestion buffer	100mL	1	-20°C
MG03-2	Trypsin (MS grade)	20µg (0.5µg/µL)	10	-80°C
Co-IP/Pull-down in-gel Trypsin Digestion Kit (IGD) Catalog Number: MG03			Part B	
Item	Content	Size	Quantity	Storage
MG03-3	C18 desalting column	800µl (loading volume)	12	RT
MG03-4	Waste liquid tube	2.0 mL	12	RT
MG03-5	Peptide collection tube	1.5mL	12	RT

■ 产品简介:

- Co-IP (Co-immunoprecipitation, 免疫共沉淀) 和 Pull-down (PD) 技术是经典地进行分子互作研究的实验技术。[谱璟科技（上海）有限公司](#)推出了多样化的质谱级 IP-MS 和 PD-MS 的蛋白质富集试剂盒，助力用户实现高质量的、质谱级样品的制备。

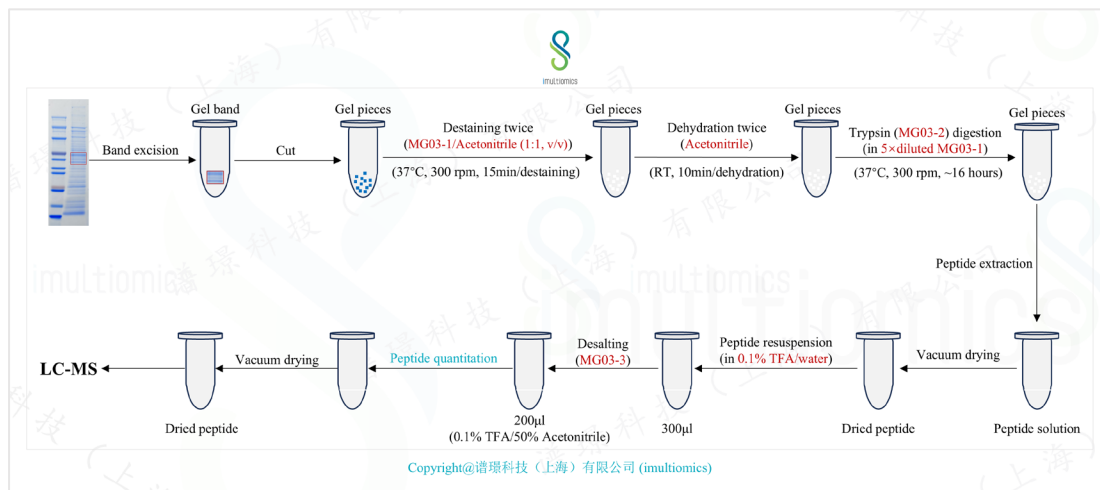
货号	名称	应用领域	质谱定量方式
MG01	IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag)	蛋白质互作/后修饰筛选	LFQ [4]
MG02	SILAC-IP-MS 富集试剂盒 (3×FLAG tag)	蛋白质互作/后修饰筛选	SILAC [5, 6]
MG05	SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [4]
MG08	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Biotin tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [5, 6]
MG06	SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [4]
MG09	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Alkyne tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [5, 6]
MG07	SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	LFQ [4]
MG10	SILAC-SM-PD 富集试剂盒 (Azide tag)	小分子-靶点蛋白筛选	SILAC [5, 6]

- 借助上述质谱级 (MS grade) 的 Co-IP/Pull-down 试剂盒富集的蛋白质样品，可通过 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色 (Coomassie blue staining, 如 [Imultiomics, #MGR01](#))，切割差异/感兴趣的条带 (且的组 vs. 对照组)。再搭配使用 **MG03 试剂盒**，对胶条中的蛋白质进行胶内 trypsin 酶解，制备高质量的质谱 (MS) 待检肽段。最终通过 LC-MS 实现对胶条中的蛋白质种类的鉴定和相对丰度的测定 (iBAQ [1, 2])。
- 选择蛋白质胶内 trypsin 酶解方式的优势体现在：(1) 通过考马斯亮蓝染色法，可直观判断 Co-IP/Pull-down 的样品制备质量，是否有差异一目了然 (有差异才有可能通过 LC-MS 筛选到潜在的互作/结合蛋白)；(2) Co-IP/Pull-down 富集的蛋白质样品，通过 SDS-PAGE 胶分离，能显著降低样品的复杂度，有利于 LC-MS 对富集的低丰度蛋白质的检出率。
- MG03: Co-IP/Pull-down in-gel Trypsin Digestion Kit (IGD)** 试剂盒仅适合考马斯亮蓝染色的蛋白质样品，不适合银染法 (Silver staining) 染色样品。
- MG03** 试剂盒除了提供 digestion buffer 和 trypsin (MS grade) 之外，还配备了 **12 个 C18 除盐柱 (C18 desalting column)**，可实现对 **12** 个胶条酶解样品的快速除盐，制备满足质谱检测级别的高质量酶解肽段样品。
- MG03: Co-IP/Pull-down in-gel Trypsin Digestion Kit (IGD)** 试剂盒匹配[我司 MG 系列产品](#)富集的蛋白质质谱前处理，制备高质量的质谱待检肽段。

7. **MG03: Co-IP/Pull-down in-gel Trypsin Digestion Kit (IGD)** 试剂盒亦可用于考马斯亮蓝染色的其他蛋白质样品的质谱前处理。

★ 本产品仅供科研使用！

■ 产品整体流程图：



■ 用户自备材料：

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. SDS-PAGE 电泳起胶器 (用于切割胶条) 或手术刀片
3. 乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
4. 甲酸 (Formic acid, 如 Sigma-Aldrich, #F0507)
5. 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, 如 Sigma-Aldrich, #T6508)
6. 真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038)
7. 漩涡混合仪 (如 Miulab, #MIX-30S)
8. 恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100)
9. 桌面小型掌式离心机 (如 Miulab, #mini-6K)
10. 桌面式小型高速离心机 (>16000g, 如 BeckmanCoulter: Microfuge 20R)
11. 肽段浓度定量试剂盒 (如 ThermoFisher Scientific, #23290)、荧光检测酶标仪 (ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1)、荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108)

■ 委托服务：

谱璟科技 (上海) 有限公司拥有《用户自备材料》提及的所有仪器、设备和试剂。用户可将切割的考马斯亮蓝染色胶条寄送给我方。我方可 (1) 使用 MG03 试剂盒完成蛋白质胶内酶解、肽段提取、肽段除盐、肽段冻干；(2) 肽段定量；(3) 肽段 LC-MS 检测；(4) 质谱数据检索；(5) 蛋白质鉴定数据分析等全部实验和分析服务。

PART 1. 切胶、酶解与提肽

一. 切胶:

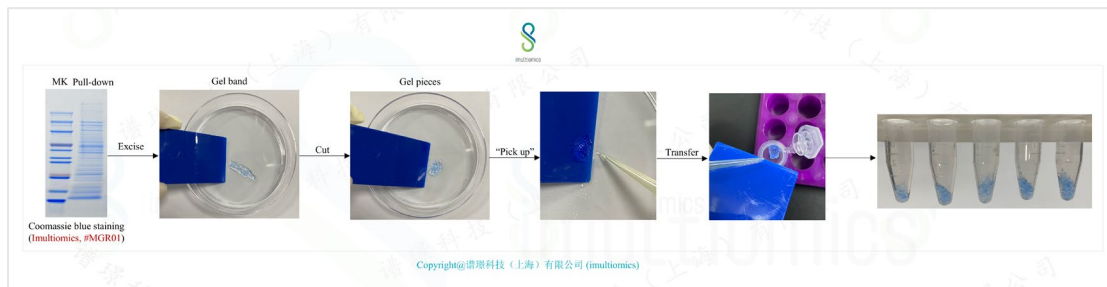


图 1. 考马斯亮蓝染色胶条切胶流程

1. SDS-PAGE 胶染色和脱色，请务必使用玻璃培养皿 (如直径 150mm 的玻璃培养皿)，请勿使用塑料培养皿。玻璃培养皿染色前，务必用大量超纯水洗涤干净后再使用。
2. 如使用我司的考马斯亮蓝染色 (Imultiomics, #MGR01)，其脱色过程是直接超纯水。则脱色达到满意效果后，弃去超纯水，即可直接切割胶条。如用户使用乙醇/乙酸/水配方的脱色液，则脱色达到满意效果后，用足量超纯水洗涤 SDS-PAGE 胶 2 遍，5 分钟/次。再切胶。
3. 如图 1 所示，使用 SDS-PAGE 电泳系统配备的起胶器或手术刀片 (务必用超纯水清洗干净)，切割相应的差异条带 (胶条) 并转移到洁净的玻璃培养皿中。向胶条上滴加适量超纯水，减少/避免切胶时胶粒“弹飞”。用起胶器将胶条“剃”成小颗粒后，转入 1.5ml 的离心管 (请务必使用高质量的离心管，避免后续试剂溶解塑料组分，污染样品和质谱系统)。
4. *Tips: (1) 切割胶条时，只切割染色位置即可。胶条不要切得过大 (上下宽度<10mm 为佳)，否则会导致后续酶解效率低下。(2) 如要切割目的条带范围比较大，则可分割成几块，分别进行后续的脱色、脱水干燥、酶解和肽段溶液提取。最后可将提取的肽段溶液合并后进行除盐和质谱检测。

二. 脱色:

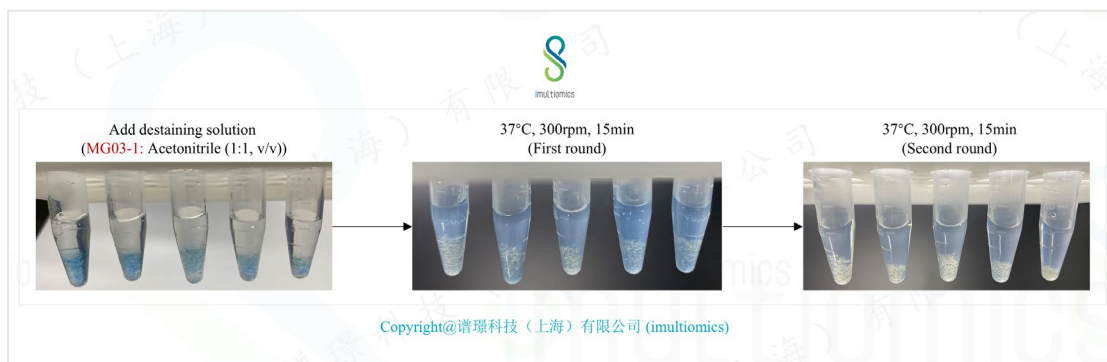


图 2. 考马斯亮蓝染色胶粒脱色流程

1. 完全化冻 MG03-1 (可适量分装保存。化冻的 MG03-1 可在 4°C 冰箱中保存~2 周)，取适量 MG03-1 与乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851) 1:1 混合，配制成脱色液 (destaining solution) (可按照 1.5~2.0ml/胶条 制备脱色液)。
2. 如图 2 所示，向每管“切碎”的胶粒中 (Gel pieces) 加入 500~800μl 的脱色液 (>3 倍胶粒体积，过量更能促进脱色)，漩涡混合后，置于恒温混匀仪 (如 Miulab, #MTC-100) 上，37°C，300rpm，孵育 15 分钟。掌上离心机快速离心，弃去上清。重复脱色步骤 1 次。最终完全脱去考马斯亮蓝染料，胶粒呈现淡黄色/白色。
3. *Tips: (1) 如染色很深，可增加脱色次数。(2) 如增加脱色次数，胶粒仍不能完全脱色，则继续后续实验步骤即可。

三. 脱水干燥:

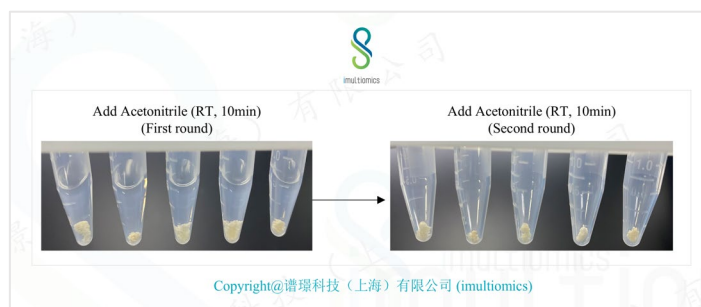


图 3. 胶粒脱水干燥流程

1. 如图 3 所示, 向脱色后的胶粒中加入 500~800 μ l 纯乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851), 漩涡混旋离心管, 置于室温 10 分钟。桌面掌式离心机快速离心, 弃去乙腈。重复乙腈脱水 1 次。胶粒皱缩变硬, 颜色呈淡黄色/白色。
2. 将离心管置于通风橱中 10~15 分钟, 除去残留的乙腈。

四. Trypsin 酶解:



图 4. 胶粒 Trypsin 酶解流程

1. Digestion buffer 配制:

使用超纯水将 **MG03-1** 稀释 5 倍 (如取 100 μ l 的 MG03-1, 加入 400 μ l 超纯水), 制备成酶解缓冲液 (Digestion buffer)。

2. Trypsin solution 配制:

从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出 **MG03-2 (Trypsin (MS grade))** 置于冰上完全化冻后, 桌面掌式离心机快速离心, 将酶收集到管底。MG03-2 的浓度为 0.5 μ g/ μ l。取适量 MG03-2 加入 1 中制备的 Digestion buffer 中, 使其终浓度为 12.5 μ g/ml。如配制 1ml 的 trypsin solution, 则取 25 μ l 的 MG03-2, 稀释于 975 μ l 的 Digestion buffer 中。通常每个样品所需的 Trypsin solution 体积为 200~400 μ l (因胶条大小而异), 用户根据胶条大小和胶条数目, 制备足量的 Trypsin solution 进行酶解。

3. 胶粒“吸胀”:

- (1) 根据《三、脱水干燥》胶粒体积情况, 将 2 中制备的 Trypsin solution 加入胶粒中 (100~300 μ l/样品)。干燥的胶粒会快速吸收 Trypsin solution “膨胀” (如图 4 所示), 室温放置并观察 10 分钟。如加入的 Trypsin solution 被胶粒全部吸收, 则补加 Trypsin solution, 直至完全覆盖胶粒。
- (2) 将 (1) 中加入 Trypsin solution 的胶粒置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 分钟, 使胶粒进一步“吸胀”。

4. 胶粒酶解:

- (1) 30 分钟后, 观察 3 中的离心管, 弃去过量的 Trypsin solution, 使 Trypsin solution 略微覆盖胶粒即可 (如 Trypsin solution 不够, 则补加)。
- (2) 将离心管置于恒温混匀仪中, 37 $^{\circ}$ C, 300rpm, 过夜酶解~16 小时 (图 4)。

五. 肽段提取与冻干:

1. 胶粒过夜酶解后, 桌面掌式离心机快速离心, 吸出上清 (**蛋白质酶解肽段**) 并分别转移到洁净的 1.5ml 离心管。
2. 向管中剩余的胶粒中加入~2 倍胶粒体积的肽段抽提液 (**Extraction buffer, 5%甲酸水溶液:乙腈=1:2 (v/v)**), 37°C, 300rpm, 15 分钟。
3. 15 分钟后, 桌面掌式离心机快速离心, 吸出上清并对应与 1 中的溶液合并, 即为**胶内蛋白质的酶解肽段样品**。使用真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038), 真空旋转冻干酶解肽段样品。
4. ***剩余的胶粒请勿丢弃**, -20°C。以防实验流程有误, 可再次对胶粒进行酶解提取肽段。

PART 2. 肽段除盐与定量

一. 试剂及配制:

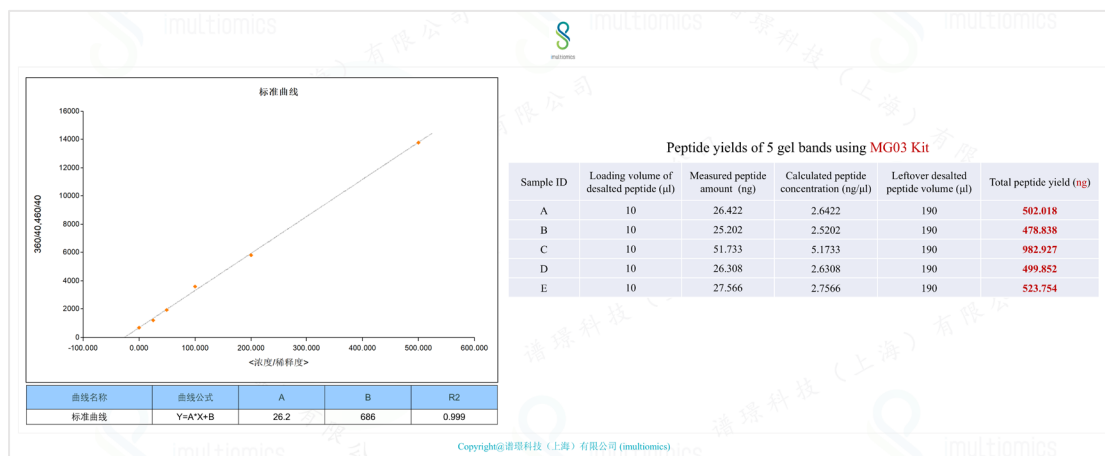
1. 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA, 如 Sigma-Aldrich, #T6508)
2. 乙腈 (Acetonitrile, 如 Sigma-Aldrich, #34851)
3. 0.1% TFA 水溶液: 每样品需 900μl。如配制 1ml, 则取 1μl TFA 稀释于 999μl 的超纯水中。
4. 0.1%TFA/50% Acetonitrile 水溶液: 每样品需 300μl。如配制 1ml, 则取 499μl 超纯水、1μl TFA 和 500μl Acetonitrile 混合即可。

二. 肽段重悬与除盐:

1. 向 **PART 1** 每个冻干的肽段样品中加入 300μl 的 0.1% TFA 水溶液, 充分漩涡混合, 桌面掌式离心机快速离心后, 置于离心管架上待用。
2. 按样品数目取对应数量的 MG03-3 (C18 desalting column) 和 MG03-4 (Waste liquid tube), 并将 MG03-3 置于 MG03-4 中。向上层的 MG03-3 中加入 100μl 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile 溶液, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
3. 再向 2 的 MG03-3 中加入 300μl 的 0.1% TFA 水溶液, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
4. 弃去 MG03-4 中的废液后并重新与 MG03-3 组装。将 1 中的重悬肽段分别转入 MG03-3 中, 室温, 静置 2-3 分钟, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
5. 再向 MG03-3 中加入 300μl 的 0.1% TFA 水溶液, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。
6. 弃去 MG03-4 及废液。将 MG03-3 与 MG03-5 (Peptide collection tube) 分别组装。再向上层的 MG03-3 中加入 200μl 的 0.1%TFA/50% Acetonitrile, 开盖, 室温, 5000rpm, 离心 2 分钟。最终每个 MG03-5 管中的液体即为除盐后的肽段溶液 (200μl), 即可进行后续肽段定量。

三. 除盐肽段定量:

1. 此处以 ThermoFisher Scientific 公司的荧光肽段定量试剂盒 (Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay, #23290) 搭配荧光检测酶标仪 ((ex390/em475, 如 BioTek Synergy H1) 和荧光 96 孔酶标板 (如 ThermoFisher Scientific, #237108) 对除盐后的肽段溶液进行定量。
2. (1) 按照试剂盒说明书稀释肽段标准品 (Peptide Standard) 制备标准曲线样品, (2) 每个除盐的肽段样品取 10μl 进行测定。代表性的肽段定量数据如下:



3. 肽段定量完成后, 使用真空离心冻干机 (如 Labconco, #7811037 & #7310038), 真空旋转冻干定量后的肽段样品, 送样质谱检测。
4. 推荐使用 Bruker 公司的 TimsTOF 质谱系列 (4D 质谱), 质谱检测肽段上样量 200ng/样品, LC-MS 测试时间建议 1 小时/样品。

■ 参考文献:

1. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M: **Global quantification of mammalian gene expression control.** *Nature* 2011, **473**(7347):337-342.
2. Krey JF, Wilmarth PA, Shin J-B, Klimek J, Sherman NE, Jeffery ED, Choi D, David LL, Barr-Gillespie PG: **Accurate Label-Free Protein Quantitation with High- and Low-Resolution Mass Spectrometers.** *J Proteome Res* 2014, **13**(2):1034-1044.
3. 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.
4. 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.
5. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**(5):376-386.
6. Hoedt E, Zhang G, Neubert TA: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for quantitative proteomics.** *Advancements of mass spectrometry in biomedical research* 2019:531-539.