合宜生物科技/Deep PTM Biotechnology
订货咨询 e-mail：order@deep-ptm.com
技术咨询 e-mail：tech@deep-ptm.com

企业微信二维码

Palmitoylation Probe

Cat No.	产品名称	包装
Palmitoyl-Trace-001	Palmitoylation Probe	500 mM 10 μL/100 μL

产品简介：

Palmitoylation Probe（Palmitoyl-Trace-001）是一种用于研究蛋白质棕榈酰化及相关脂肪酰化修饰的化学探针，主要适用于活细胞中的代谢标记分析。

该探针为带末端炔基的脂肪酸类似物，可在活细胞中经脂肪酸代谢和酰基转移途径掺入蛋白。标记后可通过点击化学连接荧光或亲和标签，用于以下应用：

-脂肪酰化候选蛋白的荧光检测和亲和富集

-结合羟胺敏感性分析或半胱氨酸位点突变，验证目标蛋白的 S-酰化

保存条件：

-20/-80℃避光保存，避免反复冻融。

注意事项：

-本说明书以活细胞代谢标记为主。细胞裂解液用于标记后的点击反应。

-工作液现配。各组使用相同培养条件和溶剂终浓度。

-Click 反应需现配催化体系

-避光操作以防荧光淬灭

-仅限科研用途

使用说明：

1. 细胞处理

（1）将贴壁细胞接种于 6 孔板，待细胞贴壁、状态稳定后进行标记。各组保持相同接种密度、培养基及血清条件。

（2）设置探针组和等体积溶剂对照组。如需验证特定蛋白的 S-酰化，可同步设置目标 Cys 突变组。

2. 探针修饰反应

（1）用新鲜培养基配制探针工作液，加入活细胞进行代谢标记。加样前确认探针工作液无可见析出。

（2）Zhang 等[1]使用 Alk14 以 50 μM 标记活细胞 5 h。确认本品与文献探针的化学身份一致后，可参考该条件。首次使用可比较 10、25、50 μM 与 2、5 h，结合细胞活性和标记信噪比选定条件。

（3）处理结束后弃去培养基，用预冷 PBS 洗涤 2–3 次，刮取细胞并转移至离心管。

3. 蛋白提取

（1）用含蛋白酶抑制剂的兼容裂解液低温裂解并离心澄清，取上清。文献[1]使用 1% NP-40 裂解液（25 mM Tris-HCl，pH 8.0，150 mM NaCl，10% 甘油），以 16,000 × g、4 ℃离心 20 min。

（2）需要保留 S-酰化硫酯键时，裂解和常规样品制备应避开强碱、羟胺及高浓度硫醇。若需做羟胺敏感性分析，应另取等量样品，设置中性羟胺处理与匹配缓冲液对照。

4. 蛋白定量与样品调整

采用与裂解液兼容的蛋白定量方法，统一各组蛋白量和反应体积，并保留输入蛋白。研究特定蛋白时，可结合目标蛋白免疫沉淀与点击检测。

5. Click Chemistry 荧光标记

（1）先混合 1 μL 40 mM $CuSO_4$ 和 1 μL 80 mM BTTAA，再加入 1 μL 3 mM 5-TAMRA-N_3，最后加入 2 μL 新鲜配制的 40 mM 抗坏血酸钠。

（2）将 5 μL 混合液加入 35 μL 蛋白样品。样品不足 35 μL 时先用兼容缓冲液补足，反应总体积为 40 μL。混匀后以 37 ℃避光反应 30 min 作为预实验起点。文献[1]的免疫沉淀后点击反应采用 TBTA / TCEP，室温避光 30 min。

6. 蛋白变性和 SDS-PAGE 电泳

（1）若 40 μL 点击反应液直接用于上样，加入 10 μL 5× SDS-PAGE 上样缓冲液，使其终浓度为 1×。

（2）以保留硫酯键信号为目标时，先用小样比较上样缓冲液和加热条件，再确定变性方案。按目标蛋白分子量选胶，并统一各组上样量。

7. 荧光检测和蛋白染色

（1）用纯水漂洗凝胶，在与 5-TAMRA 匹配的通道扫描。采用相同扫描设置比较各组。

（2）扫描后进行总蛋白染色。分析单个目标时，以输入和免疫沉淀中的目标蛋白量辅助判读。羟胺敏感性支持硫酯型 S-酰化，结合 Cys 突变可验证候选位点。天然酰基链的身份需另行确认。文献[2]也用 Alk14 研究了 TNF-α 的赖氨酸长链脂肪酰化。

结果判读：

1. 荧光反映脂肪酸探针掺入蛋白后的标记信号。比较各组时结合溶剂对照、总蛋白上样量及目标蛋白丰度。羟胺敏感性支持硫酯型 S-酰化，可结合目标 Cys 位点突变验证。天然酰基链的身份需另行确认。

2. 亲和富集与位点分析：另设叠氮生物素标记分支，去除游离标签后用链霉亲和素介质捕获。定位探针标记位点时，可另行建立可裂解标签和修饰肽 LC–MS/MS 流程，并验证硫酯键在样品制备和释放过程中的保留。

附：点击反应催化剂配比和添加体系：

成分	分子量	浓度	称取	溶剂	稀释体积	加入体积	终浓度
样品（蛋白裂解液）	/	/	/	/	/	35 μL	/
5-TAMRA-N_3	554.64	3 mM	3 mg	DMSO	1.803 mL	1 μL	75 μM
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.7	40 mM	20 mg	水	2.0024 mL	1 μL	1 mM
BTTAA	430.51	80 mM	70 mg	DMSO	2.0325 mL	1 μL	2 mM
抗坏血酸钠	198.11	40 mM	16 mg	水	2.0191 mL	2 μL	2 mM
缓冲液补足				水		补齐至 40 μL	

参考文献：

1. Zhang M, Zhou L, Xu Y, et al. A STAT3 palmitoylation cycle promotes TH17 differentiation and colitis. Nature. 2020;586:434–439. doi:10.1038/s41586-020-2799-2.

2. Jiang H, Khan S, Wang Y, et al. SIRT6 regulates TNF-α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. Nature. 2013;496:110–113. doi:10.1038/nature12038.