合宜生物
Deep PTM Biotechnology Limited

企业微信二维码

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

Serotonylation Probe

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

产品简介：

Serotonylation Probe（Serotonyl-Trace-001）是一种用于研究蛋白质血清素化修饰的化学探针，主要适用于活细胞中新发生的血清素化相关修饰的示踪分析。

该探针是一种带末端炔基的血清素类似物，可通过转谷氨酰胺酶介导的反应连接至蛋白质的谷氨酰胺残基。标记后可通过 Click Chemistry 引入荧光或生物素标签，用于以下应用：

-血清素化候选蛋白的荧光检测和亲和富集
-结合位点突变或修饰肽质谱，验证组蛋白 H3 Q5 等候选修饰位点

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 HeLa 等贴壁细胞接种于 6 孔板，待细胞贴壁、状态稳定后进行标记。各组统一接种密度和培养体积。

（2）设置探针组和等体积溶剂对照组。研究转谷氨酰胺酶依赖性时，可增设 TGM2 干预组。

2. 探针修饰反应

（1）用新鲜培养基配制探针工作液，加入活细胞进行标记。

（2）Farrelly 等[1]使用 500 μM 5-PT 处理 HeLa S2 或 HEK293T 细胞 3 h，并在 HeLa 成像实验中于 37 ℃孵育 3 h。确认本品与文献探针化学身份一致后，可将该条件作为预实验参考，结合细胞活性和信噪比优化剂量及时间。

（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）分析全蛋白标记时，采用含蛋白酶抑制剂、与后续点击反应兼容的裂解液，低温裂解并离心澄清。

（2）检测 H3 时，保留染色质组分。可参考文献[2]进行高盐提取、脱盐和复溶。采用酸提取时，点击反应前应调整样品 pH 并检查缓冲液兼容性。

（3）若另做重组 TGM2 体外标记，应单独建立含活性酶、底物蛋白和适宜 Ca^{2+} 的酶反应体系。

4. 蛋白定量与样品调整

采用与样品缓冲液兼容的蛋白定量方法，统一各组蛋白量和反应体积。检测组蛋白 H3 时，保留输入样品用于核对 H3 丰度。

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。以 37 ℃避光 30 min 作为本说明书的预实验起点。Zheng 等[2]的组蛋白荧光检测采用 Cy5-叠氮 / THPTA / TCEP，在 30 ℃反应 1–2 h。

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×。按目标蛋白和上样缓冲液选择变性条件。

（2）检测组蛋白 H3 时，选用适合低分子量蛋白的分离胶，并控制电泳终点，保留目标条带。

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探针组和各对照组。

（2）扫描后进行总蛋白染色。检测 H3 时，结合输入样品的 H3 丰度判读。探针荧光反映 5-PT 类似物的掺入与保留。验证 H3Q5 可结合 H3 Q5 突变和 TGM2 干预。确认天然 H3Q5 血清素化可采用经验证的位点特异性抗体或天然修饰肽质谱。

结果判读：

1. 荧光反映 5-PT 类探针在蛋白上的掺入与保留。比较各组时结合溶剂对照、总蛋白上样量及目标蛋白丰度。检测 H3 时，以输入样品的 H3 丰度辅助判读，可结合 TGM2 干预和 H3 Q5 突变验证探针标记。

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。定位探针标记位点需采用修饰肽 LC–MS/MS 等独立流程。确认天然 H3Q5 血清素化可采用经验证的位点特异性抗体或针对天然修饰肽的质谱分析。

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. Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, et al. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. Nature. 2019;567:535–539. doi:10.1038/s41586-019-1024-7

2. Zheng Q, Weekley BH, Vinson DA, et al. Bidirectional histone monoaminylation dynamics regulate neural rhythmicity. Nature. 2025. doi:10.1038/s41586-024-08371-3