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

Itaconation probe

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

产品简介：

Itaconation Probe（Itaconation-Trace-001）是一种用于研究蛋白质衣康酸化相关共价修饰的化学探针，主要适用于活细胞中衣康酸化候选靶蛋白的标记分析。

本品为带末端炔基的衣康酸衍生物，主要通过 Michael 加成标记蛋白质的半胱氨酸残基。标记后可通过点击化学引入荧光或亲和标签，用于以下应用：

- 衣康酸化候选靶蛋白的荧光检测和亲和富集
- 候选靶蛋白及其潜在半胱氨酸反应位点的验证

保存条件：

-20/-80℃避光保存，避免反复冻融。

注意事项：

-本说明书以活细胞标记为主。细胞裂解液体外标记需另行优化。

-按批次资料配制母液，工作液现配。各组保持相同的溶剂终浓度。

-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 RAW264.7 等贴壁细胞接种于 6 孔板，培养至细胞状态稳定。各组采用相同接种密度和培养体积。

（2）如研究炎症刺激对标记谱的影响，按实验设计设置刺激组及匹配对照。各组统一探针处理和收样时间。

2. 探针修饰反应

（1）用新鲜培养基配制探针工作液。探针组加入衣康酸化探针，溶剂对照组加入等体积母液溶剂。

（2）Qin 等报道，ITalk 在 RAW264.7 活细胞中的参考条件为 100 μM、12 h。确认本品与文献探针的化学身份一致后，可参考该条件，设置 25、50、100 μM 梯度，比较标记信号、细胞活性及相关表型。

（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）加入含蛋白酶抑制剂、与后续点击反应兼容的裂解液，低温裂解并离心澄清，取上清。

（2）若另做**裂解液体外标记**，应在加探针前避免加入 DTT、β-巯基乙醇、GSH 等可能消耗探针的试剂，以及 IAA、NEM 等会封闭待测巯基的试剂。体外标记条件另行优化。

4. 蛋白定量与样品调整

（1）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。

（2）如背景偏高，可先检查细胞洗涤是否充分，再评估是否需要去除游离探针或进行蛋白沉淀。处理后重新确认蛋白回收量和缓冲液兼容性。

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 新鲜配制的混合液加入 35 μL 蛋白样品，总体积为 40 μL。若样品不足 35 μL，先以兼容缓冲液补至 35 μL。混匀后以 37 ℃避光反应 30 min 作为预实验起点。

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）按目标蛋白分子量选择分离胶，各组按相同蛋白量上样。

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溶剂对照组。

（2）扫描后进行考马斯亮蓝染色或其他总蛋白染色，记录上样量。若要确认天然衣康酸化位点，可进一步检测相应的天然修饰肽。

结果判读：

1. 荧光反映探针与蛋白形成的加合物信号。比较各组时结合溶剂对照、总蛋白上样量和目标蛋白丰度。炎症刺激可改变内源衣康酸水平，并影响其与探针的竞争。确认天然衣康酸化位点需进一步检测天然修饰肽。
2. 亲和富集与位点分析：亲和富集另用叠氮生物素标签。位点鉴定可参考文献[2]，使用酸可裂解叠氮生物素标签富集并释放修饰肽，再进行 LC‑MS/MS。

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. Mills EL, Ryan DG, Prag HA, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. **Nature**. **2018**;555(7695):113–117. DOI

2. Qin W, Zhang Y, Tang H, et al. Chemoproteomic Profiling of Itaconation by Bioorthogonal Probes in Inflammatory Macrophages. **J Am Chem Soc**. **2020**;142:10894–10898. DOI