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

Ethyl-Vitcylation probe

产品编号	产品名称	包装
Vitcyl-001	Ethyl-Vitcylation Probe	500mM；10 μL/100 μL

产品简介：

Ethyl-Vitcylation Probe 是一种用于检测蛋白质 Vitcylation 修饰（维 C 相关共价修饰）的化学探针，适用于细胞水平的标记与检测。

该探针可在细胞内与目标蛋白发生共价修饰，通过后续 Click Chemistry 反应引入荧光标记，实现对 Vitcylation 修饰蛋白的检测与分析。

本产品适用于：
-细胞内 Vitcylation 调控酶筛选
-蛋白翻译后修饰分析
-荧光扫描（SDS-PAGE）
-活细胞状态下Vitcylation 修饰检测

保存条件：

-80℃避光保存，避免反复冻融。

注意事项：

-探针需现配或少量分装
-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

将细胞接种于 12 孔板中，每孔铺板至约 70–80 %融合度。

2. 探针修饰反应

（1）弃去培养基，用 PBS 轻柔清洗细胞 1 次；

（2）每孔加入 500 μL 新鲜培养基，并加入 Ethyl-Vitcylation probe（Cat No. Vitcyl-001），使终浓度为 500 μM；

（3）于 37° C 孵育 2 h 进行探针标记。

3. 蛋白提取

（1）弃去培养基，用 PBS 清洗细胞 2 次；

（2）加入 100 μL 1% NP-40 裂解液（含蛋白酶抑制剂）进行裂解，裂解条件：

-振荡 1 min

-冰上孵育 10 min

-重复上述步骤共 3 次

（3）裂解后于 12, 000 rpm，4℃，离心 10 min，收集上清至新的 EP 管中。

4. 蛋白定量（可选）

可采用 BCA 法测定蛋白浓度，并根据需要进行统一归一化处理。

5. Click Chemistry 标记反应

（1）Click 反应体系配制（配制母液和体积详见附表）

1）Mix 配制：将 1 μL 40 mM 硫酸铜（Solarbio, Cat No. 7758-99-8）和 1 μL 80 mM 的 BTTAA（Adamas, Cat No. 906328）预混充分形成淡蓝色络合物（现配催化剂）；

2）向 Mix 内添加 1 μL 3 mM 的 5-TAMRA-N_3（TargetMol, Cat No. T67840）并吹匀；加入 2 μL 40 mM 抗坏血酸钠（Solarbio, Cat No. 134-03-2）并吹匀；

（2）Click 反应：

1）5 μL 上述 Mix 加入 35 μL 蛋白样品中，充分混匀；

2）37 ℃避光反应 30 分钟；

6. 蛋白变性和 SDS-PAGE 电泳

（1）变性:加 10 uL 5 × protein loading buffer（SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液），95 ℃加热 10 min；

（2）跑胶：取 10 μL 样品上样，使用 8–10%分离胶进行电泳；切掉或跑出溴酚蓝及以下部分；

7. 荧光检测和蛋白染色

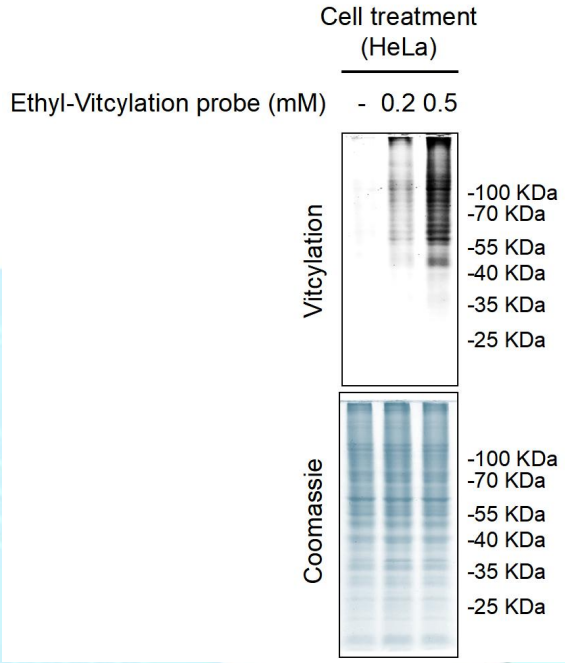
（1）扫描：电泳结束后用 ddH_2O 漂洗凝胶；使用荧光扫描仪（如 Amersham Typhoon™）在 532nm/cy3 通道进行荧光信号检测。

（2）蛋白染色：荧光扫描后对凝胶进行考马斯亮蓝染色，并拍照记录，用于蛋白上样量对照。

附：单个点击反应催化剂配比和反应体系：

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	2.0235 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	

实验结果示例：



图注：Ethyl-Vitcylation 探针在 HeLa 细胞中的蛋白修饰检测效果。

HeLa 细胞经不同浓度 Ethyl-Vitcylation probe（0、0.2、0.5 mM）处理 2 小时后，进行 Click 反应标记并通过 SDS-PAGE 分离，随后进行凝胶内荧光扫描（上图）。结果显示，随着探针浓度升高，Vitcylation 修饰信号逐渐增强。下图为对应的考马斯亮蓝染色结果，显示各组蛋白上样量基本一致。

HeLa 细胞经不同浓度 Ethyl-Vitcylation probe（0、0.2、0.5 mM）处理 2 小时后，进行 Click 反应标记并通过 SDS-PAGE 分离，随后进行凝胶内荧光扫描（上图）。结果显示，随着探针浓度升高，Vitcylation 修饰信号逐渐增强。下图为对应的考马斯亮蓝染色结果，显示各组蛋白上样量基本一致。

参考文献：

1.He X, Wang Q, Cheng X, et al. Lysine vitcylation is a vitamin C-derived protein modification that enhances STAT1-mediated immune response. ***Cell***. 2025;188(7): 1858-1877.e21.

2. Wang W, Ding B, Yang S, et al. Bioorthogonal Vitamin C Probes Enable Cellular Profiling and Investigation of Lysine Vitcylation. ***Angew Chem Int Ed Engl***. Published online October 12, 2026.