合宜生物科技/DeepPTMBiotechnology
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

# Vitcylation probe

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---|---|---|
| Vitcyl-002 | Vitcylation Probe | 500mM；10 μL/100 μL |

**产品简介：**

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，主要适用于体外蛋白体系（cell lysate）的标记分析。

该探针通过与蛋白反应后，结合 Click Chemistry 进行荧光标记，可用于：

-维C化蛋白和修饰位点的验证

-体外维C化修饰的验证

**保存条件：**

-80℃避光保存，避免反复冻融。

**注意事项：**

-适用于体外反应体系

-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**

（1）将细胞接种于 6 孔板中，每孔铺板至约 70–80 %融合度；

（2）采用以下任一方式收集细胞：

-胰酶消化后收集

-或 PBS 清洗后直接刮取

（3）PBS 洗涤 3 次后，将细胞转移至 EP 管中。

**2. 蛋白提取**

（1）加入 100 μL 2% SDS 裂解液（含蛋白酶抑制剂）裂解细胞；

（2）裂解条件：

-振荡 1 min

-冰上孵育 10 min

-重复 3 次

**3. 核酸降解**

（1）由于裂解过程中 DNA 释放会导致样品粘稠，加入：0.1 μL 全能核酸酶；

（2）37°C 孵育 30 min；

（3）随后以 12, 000 rpm 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. SDS 稀释**

（1）加入 400 μL PBS 进行稀释，使最终 SDS 浓度降至≤0.4%。

（关键点：高于 0.4 %的 SDS 会显著抑制 Click 反应效率）

**6. 探针修饰反应**

（1）将样品分为两组，每组 100 μL：

-Case 组：加入 Vitcylation probe，使终浓度为 500 μM

-NC 组：加入等体积 DMSO

（2）在 37°C、1000 rpm 震荡条件下孵育 3 h。

（若蛋白量充足，可与 Click 反应合并进行（一步法），全程避光孵育）

**7. 低蛋白量样品处理（可选）**

当蛋白浓度较低或背景较高时，建议进行沉淀纯化：

（1）蛋白沉淀：

1）按以下比例加入试剂：

蛋白 ： 甲醇 ： 氯仿 ： 水 = 1 : 4 : 1 : 3

依次加入：

-400 μL 甲醇

-100 μL 氯仿

-300 μL 水

2）混匀后 13, 000 rpm 离心 1 min；

3）弃去上层液体，保留中间白色蛋白层。

（2）蛋白洗涤

1）加入 1 mL 甲醇，混匀后 13,000 rpm 离心 1 min，弃上清；

2）重复洗涤 2 次；

3）室温静置，使残余甲醇完全挥发。

（3）蛋白复溶

1）加入 50 μL 2% SDS，37°C 震荡 5 min 促进溶解；

2）随后加入 200 μL PBS，将 SDS 稀释至 0.4 %。

**8. Click Chemistry 标记**（配制母液和体积详见附表）

（关键点：反应体系中 SDS 浓度必须 ≤0.4%）

（1）Click 反应体系（现配）

1）依次加入：

-1 μL 40 mM $CuSO_4$

-1 μL 80 mM BTTAA

2）充分混匀形成络合物后，加入：

-1 μL 3 mM 5-TAMRA-$N_3$

-2 μL 40 mM 抗坏血酸钠

3）混匀备用。

（2）Click 反应

1）取 5 μL 上述 Mix 加入 35 μL 蛋白样品中，混匀；

2）于 37° C 避光反应 30 min。

**9. 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。

**10. 荧光检测和蛋白染色**

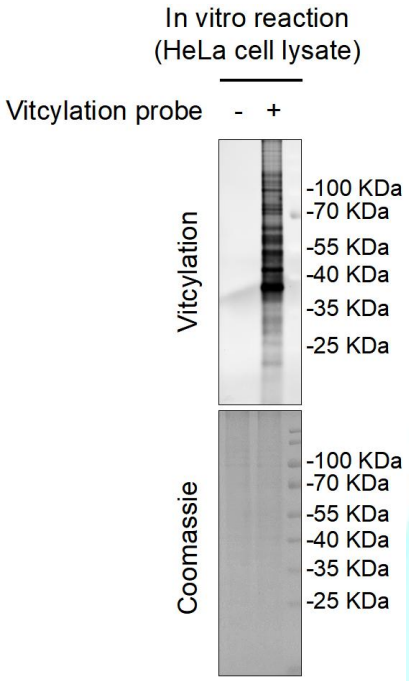
（1）扫描：电泳结束后用 $ddH_2O$ 漂洗凝胶；使用荧光扫描仪（如 Amersham Typhoon™）在 532nm/cy3 通道进行荧光信号检测。

（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：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 | 2.0235 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：Vitcylation 探针在 HeLa 细胞裂解液中的蛋白修饰检测效果。

HeLa 细胞裂解液经 Vitcylation probe（0.5 mM）处理 3 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，Vitcylation Probe 可稳定标记蛋白修饰信号。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.