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@heyi-biotech.com
技术咨询 e-mail：tech@heyi-biotech.com

Ethyl-Vitcylation probe

Cat No.	产品名称	包装
Vitcyl-Trace-002（Vitcyl-002）	Vitcylation Probe	500 mM 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：

-20/-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，随后以 12, 000 rpm 离心 10 min，收集上清至新 EP 管。

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

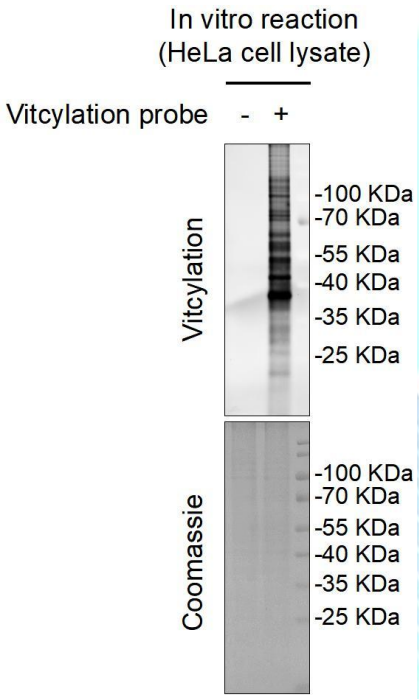
Typhoon™）在 532nm/cy3 通道进行荧光信号检测。

（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**.