

SPIDER Protein-Membrane Protein Pull-Down Kit

{SPIDER 膜蛋白 Pull-Down 试剂盒}

货号：BRK0063

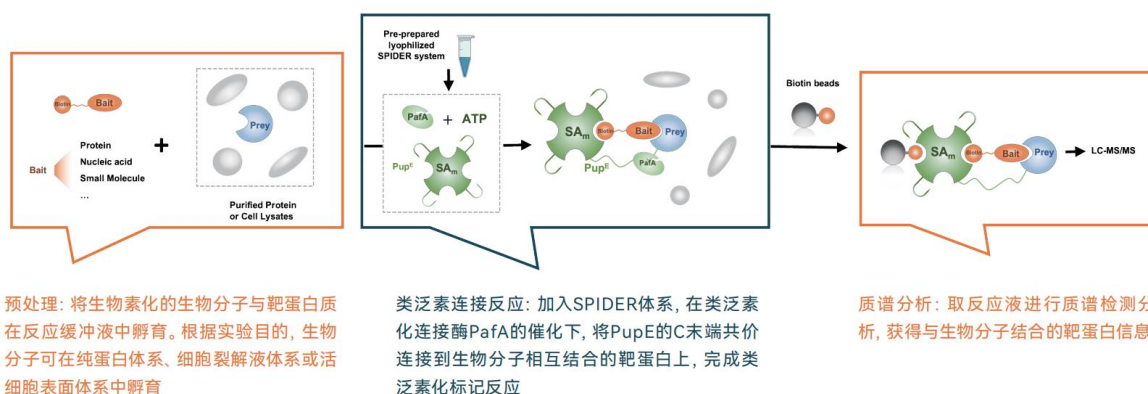
规格：4 T

◆ 产品简介

邻近标记技术已被成功应用于鉴定蛋白靶标，相比传统的 Pulldown/IP+MS 技术，邻近标记技术可以解决鉴定弱或瞬时相互作用、研究膜蛋白等诸多问题。根据结核分枝杆菌类泛素蛋白酶体系统中底物 Pup 分子在体外能够招募 PafA 连接酶发挥邻近标记作用的实验原理，来自上海交通大学的科研团队研发了一项基于底物的新型邻近标记技术 (专利号 ZL202110069353.7)，命名为 Specific Pupylation as IDentity Reporter (SPIDER)。该技术可应用于蛋白-蛋白、核酸-蛋白、小分子-蛋白等相互作用的验证和发现。

本试剂盒基于 SPIDER 邻近标记技术，仅需准备生物素化标记的诱饵分子，加入待反应样本（纯化蛋白、细胞/组织裂解液）及 SPIDER 反应体系启动反应，诱饵分子 (Bait) 和目标蛋白 (Prey) 之间的非共价结合被转化为目标蛋白和链霉菌素之间的共价连接，随后目标蛋白可以被生物素琼脂糖亲和富集并进行质谱鉴定。

相比其他互作检测产品，该方法无需提前将标签和诱饵分子进行融合，摆脱对融合蛋白表达准确性的依赖，操作相对简单，应用范围广。此外，该产品后续使用严苛的条件进行清洗，可显著降低非特异蛋白的干扰，富集能力强，结果准确性更高，同时兼具操作简单快捷的优点。



本试剂盒适用于完整细胞检测，适用于活细胞表面结合蛋白/靶标蛋白的筛选与发现。

◆ 保存条件

Part I 于 2~8°C 保存, Part II 于 -75~-80°C 保存, 有效期 6 个月。

◆ 产品组成

组分类别	产品编号	名称	规格 (4 T)	保存条件
Part I	BRK0063-1	Buffer R	100 mL	2~8°C
	BRK0063-2	Urea	4×4.8 g	2~8°C
	BRK0063-3	Biotin-beads	450 µL	2~8°C
	BRK0063-4	Wash buffer I	10 mL	2~8°C
	BRK0063-5	Wash buffer II	5 mL	2~8°C
	BRK0063-6	Wash buffer III	10 mL	2~8°C
Part II	BRK0063-7	Component I	4 T	-75~-80°C
	BRK0063-8	Component II	4 T	-75~-80°C
	BRK0063-9	PC	20 µL	-75~-80°C

◆ 相关产品

货号	名称	规格
BRK0060	SPIDER Protein-Small Molecule Pull-Down Kit {SPIDER 小分子 Pull-Down 试剂盒}	4 T
BRK0061	SPIDER Protein-DNA Pull-Down Kit {SPIDER DNA Pull-Down 试剂盒}	4 T
BRK0062	SPIDER Protein-RNA Pull-Down Kit {SPIDER RNA Pull-Down 试剂盒}	4 T
BRK0063	SPIDER Protein-Membrane Protein Pull-Down Kit {SPIDER 膜蛋白 Pull-Down 试剂盒}	4 T

◆ 产品特点

1. 高富集: 一次实验捕获所有靶蛋白;
2. 可重复: 实验结果重复效果好;
3. 操作简单: 一站式完成实验操作。

◆ 需要您自行准备的主要试剂

1. 生物素标记的小分子/重组蛋白

①生物素标记的重组蛋白/小分子(Biotin-Bait):4T 共需 4 nmol,建议最小浓度为 10 μ M, 例如蛋白大小为 50 kDa, 最小摩尔浓度为 10 μ M, 最小质量浓度为 0.5mg/mL; 生物素标记位点尽量在最低程度上影响蛋白活性/小分子。

特别提示: 生物素与重组蛋白/小分子之间需要柔性 Linker, 建议 2~3 个 PEG, 防止重组蛋白影响生物素与链霉亲和素的结合, 或者生物素影响重组蛋白/小分子表面构象与活性。

②非标记小分子(重组蛋白无需准备):2T 共需 200 nmol, 建议最小浓度为 1mM。

2. 细胞样本

①贴壁细胞: 准备 4 份待测细胞样本, 将细胞培养与 15cm 平皿中, 长至 90%以上, 约 2×10^7 个细胞。

②悬浮细胞, 4 T 共需要 8×10^7 个细胞。

3. 其他试剂

①Cell Lysate Buffer: 贴壁细胞进行反应 4T 共需 12 mL, 悬浮细胞进行反应 4T 共需 4 mL。

②酶抑制剂: 如 PMSF, 添加至 Cell Lysate Buffer 中, 防止蛋白降解。

特别提示: 建议使用 RIPA (强)等作为细胞裂解液, 有效成分为离子型去污剂如 SDS, 并在使用时加入终浓度为 0.5mM 的酶抑制剂如 PMSF, 即加即用。酶抑制剂应避免使用 AEBSF 或带有 AEBSF 组分的 Cocktail,AEBSF 会抑制 SPIDER 反应。

◆ 对照组的设置建议

样品类型		实验组	竞争对照组	空白对照组
小分子	生物素标记小分子	√	√	×
	非标记小分子(过量)	×	√	×
	细胞	√	√	√
	SPIDER	√	√	√
重组蛋白	生物素标记蛋白	√	-	×
	细胞	√	-	√
	SPIDER	√	-	√

特别提示: ① 必需设置对照组, 可选择竞争对照或空白对照, 或两种对照同步设置; ② 优先考虑采用竞争对照, 前提是可获得高浓度的非标记小分子, 浓度为生物素标记小分子 100 倍; 通常情况下, 重组蛋白的浓度难以达到要求, 一般采用空白对照。

◆ SPIDER 反应体系

贴壁细胞 SPIDER 反应体系

名称	实验组		竞争对照组		空白对照组	
	体积	终浓度	体积	终浓度	体积	终浓度
Biotin-bait	100μL	0.1μM	100μL	0.1μM	–	–
非标记 Bait	–	–	100 μL	10μM–	–	–
Cell	2×10 ⁷	–	2×10 ⁷	–	2×10 ⁷	–
Component I	100μL	–	100μL	–	100 μL	–
Component II	250 μL	–	250μL	–	250μL	–
Buffer R	9.55mL	–	9.45mL	–	9.65mL	–
总计	10 mL	–	10 mL	–	10 mL	–

悬浮细胞 SPIDER 反应体系

名称	实验组		竞争对照组		空白对照组	
	体积	终浓度	体积	终浓度	体积	终浓度
Biotin-bait	100μL	0.1μM	100 μL	0.1μM	–	–
非标记 Bait	–	–	100μL	10 μM–	–	–
Cell	2×10 ⁷	–	2×10 ⁷	–	2×10 ⁷	–
Component I	100μL	–	100μL	–	100μL	–
Component II	250μL	–	250μL	–	250μL	–
Buffer R	10 mL	–	10 mL	–	10 mL	–
总计	10.45mL	–	10.55mL	–	10.35mL	–

注意：体积的微量差异不影响实验结果。若细胞较小建议适当增加细胞量。

◆ 实验操作流程

一、贴壁细胞 SPIDER 反应

1. 预孵育

根据实验需求确定竞争法与非竞争法。二者实验对照组设置不同，竞争法以添加 100 倍非标记小分子作为竞争对照，非竞争法以不添加生物素标记的小分子/重组蛋白作为空白对照。

1.1 对照组为竞争对照

1.1.1 样品稀释

生物素标记小分子：使用保存溶剂稀释至 10μM,4T 共需 400μL

非标记小分子：使用保存溶剂稀释至 1mM,2T 共需 200μL。

贴壁细胞：4 个 15cm 培养皿的细胞，长至 90%以上，每皿约 2×10^7 个细胞。使用 3 mL Buffer R 清洗细胞两次，进行标记，用于区分实验组与对照组。

1.1.2 取 200 μ L Biotin-Bait (总量为 2 nmol)加入到 19.1mL 的 Buffer R 中，混匀后取 9.65 mL 轻柔地加入两个实验组培养皿中。

1.1.3 取 200 μ L Biotin-Bait (总量为 2 nmol)以及 200 μ L 非标记小分子(总量为 200 nmol) 加入到 18.9 mL 的 Buffer R 中，混匀后取 9.65mL 轻柔地加入两个对照组培养皿中。

1.1.4 将实验组与对照组培养皿同时 4 $^{\circ}$ C 孵育 2h (或室温孵育 1h 或 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min)，静置，每 15min 晃动混匀。

1.2 对照组为空白对照

1.2.1 样品稀释。

Biotin-Bait: 使用保存溶剂稀释至 10 μ M,4T 共需 200 μ L。

贴壁细胞：4 个 15cm 培养皿的细胞，长至 90%以上，每皿约 2×10^7 个细胞。使用 3 mL Buffer R 清洗细胞两次，进行标记，用于区分实验组与对照组。

1.2.2 取 200 μ L Biotin-Bait (总量为 2 nmol) 加入到 19.1mL 的 Buffer R 中，混匀后取 9.65 mL 轻柔地加入两个实验组培养皿中。

1.2.3 取 9.65mL Buffer R 轻柔地加入两个对照组培养皿中。

1.2.4 将实验组与对照组培养皿同时 4 $^{\circ}$ C 孵育 2h (或室温孵育 1h 或 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min)，静置，每 15min 晃动混匀。

特别提示：以下步骤实验组与对照组操作一致，注意区分实验组与对照组。

2、SPIDER

2.1 将 Component I、Component II 放置于冰上，取 420 μ L Buffer R 加入 Component I，取 1100 μ L Buffer R 加入 Component II，静置 15 min 后，温柔吹吸使其复溶，切勿剧烈混匀。

2.2 各管分别加入 100 μ L Component I，加入后立即颠倒混匀，4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 30 min。

2.3 各管分别加入 250 μ L Component I，混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅，孵育 30 min，每 10 min 进行颠倒混匀。

特别提示：Component I、Component II 请使用当天复溶，保持活性成分稳定。Component II 复溶后如果出现微量絮状物质属正常状况，不影响使用。SPIDER 后请妥善保存 Component I、Component II, Buffer R, 用于后续质控检测。

3. 细胞裂解

3.1 弃反应液，加入 3mL Cell Lysis Buffer (含 0.5 mM PMSF) 裂解细胞，晃动细胞至完全脱落。

3.2 将实验组与对照组中的细胞裂解液分别转移至 4 个 15mL 离心管，并做好标记。

3.3 将细胞裂解液置于冰上继续裂解 40 min，并且每 10 min 上下颠倒进行混匀。

3.4 裂解完成后，向实验组与对照组中均加入 3mL Buffer R。

4、目标蛋白富集

4.1 将各管反应体系转移至对应 Urea 管，室温旋转混匀，使粉末完全溶解，所需时间约 10 min。

4.2 室温 12000×g 离心 10 min，收集上清，转移至新的 15 mL 离心管，做好标记。

4.3 向各管加入 100 μ L Biotin-beads，10 μ L Tween 20，室温旋转孵育 2 h。

特别提示：① Biotin-beads，无需清洗，可直接使用。② Biotin-beads 使用时请务必混匀，并且使用 1 mL 移液器添加 Biotin-beads，以防止各管 Biotin-beads 添加不均匀。

4.4 孵育完成后，室温 500×g，水平离心 5 min，去除上清。

5、清洗

5.1 各管分别加入 1 mL 的 Wash buffer I，混匀 Biotin-beads，并转移至 1.5 mL EP 管中，室温旋转清洗 5 min 后，500 × g 离心 5 min，去除上清。

5.2 各管分别加入 1 mL Wash buffer I，室温旋转清洗 5 min 后，500 × g 离心 5 min，去除上清。

5.3 各管分别加入 1 mL Wash buffer II，室温旋转清洗 5 min 后，500 × g 离心 5 min，去除上清。

5.4 各管分别加入 1 mL Wash buffer III，室温旋转清洗 5 min 后，500 × g 离心 5 min，去除上清，

添加 500 μ L Wash buffer III 重悬 Biotin-beads，暂存于 4°C。

特别提示：①转移以及清洗 Biotin-beads 过程，尽可能避免 Biotin-beads 损失。②清洗完成后，Biotin-beads 请尽快进行质谱鉴定与分析。

二、悬浮细胞 SPIDER 反应

1. 预孵育

根据实验需求确定竞争法与非竞争法。二者实验对照组设置不同，竞争法以添加 100 倍非标记小分子作为竞争对照，非竞争法以不添加生物素标记的小分子/重组蛋白作为空白对照。

1.1 对照组为竞争对照

1.1.1 样品稀释

生物素标记小分子：使用保存溶剂稀释至 10 μ M, 4T 共需 400 μ L

非标记小分子：使用保存溶剂稀释至 1mM, 2T 共需 200 μ L。

悬浮细胞：用 15mL 离心管收集 4 份待测细胞样本，室温 300× g，离心 5min，去除培养液，每份约 2×10⁷ 个细胞。

分别加入 3mL BufferR 轻轻清洗 2 次，同条件离心去上清后，使用 10 mL Buffer R 重悬细胞，进行标记，用于区分

实验组与对照组。

1.1.2 向实验组与对照组各管中加入 100 μL Biotin-Bait(总量为 1nmol), 向对照组各管加入 100 μL 非标记小分子(总量为 100 nmol)。

1.1.3 将实验组与对照组培养皿同时 4°C 孵育 2h (或室温孵育 1h 或 37°C 孵育 30 min), 静置。

1.2 对照组为空白对照

1.2.1 样品稀释。

Biotin-Bait: 使用保存溶剂稀释至 10 μM , 4T 共需 200 μL 。

悬浮细胞: 使用 15mL 离心管收集 4 份待测细胞样本, 室温 300 $\times$ g, 离心 5min, 去除培养液, 每份约 2×10^7 个细胞。

分别加入 3mL Buffer R 轻轻清洗 2 次, 同条件离心去上清后, 使用 10mL Buffer R 重悬细胞, 进行标记, 用于区分实验组与对照组。

1.2.2 向实验组各管加入 100 μL Biotin-Bait (总量为 1nmol)。对照组不做处理。

1.2.3 将实验组与对照组同时 4°C 旋转孵育 2h (或室温孵育 1h 或 37°C 孵育 30 min)。

特别提示: 以下步骤实验组与对照组操作一致, 注意区分实验组与对照组。

2、SPIDER

2.1 将 Component I、Component II 放置于冰上, 取 420 μL Buffer R 加入 Component I, 取 1100 μL Buffer R 加入 Component II, 静置 15 min 后, 温柔吹吸使其复溶, 切勿剧烈混匀。

2.2 各管分别加入 100 μL Component I, 加入后立即颠倒混匀, 4°C 旋转孵育 30 min。

2.3 各管分别加入 250 μL Component I, 混匀后置于 37°C 水浴锅, 孵育 30 min, 每 10 min 进行颠倒混匀。

特别提示: Component I、Component II 请使用当天复溶, 保持活性成分稳定。Component II 复溶后如果出现微量絮状物质属正常状况, 不影响使用。SPIDER 后请妥善保存 Component I、Component II, Buffer R, 用于后续质控检测。

3. 细胞裂解

3.1 反应完成后, 室温 300 $\times$ g, 离心 5 min, 弃反应液。

3.2 加入 1mL Cell Lysis Buffer 裂解细胞, 使用移液枪温柔吹吸, 细胞悬浮后将 15 mL 离心管置于冰上继续裂解 40 min, 并且每 10min 进行颠倒混匀。

3.3 裂解完成后, 向实验组与对照组中均加入 5mL Buffer R, 混匀。

4、目标蛋白富集

4.1 将各管反应体系转移至对应 Urea 管, 室温旋转混匀, 使粉末完全溶解, 所需时间约 10 min。

4.2 室温 12000 $\times$ g 离心 10 min, 收集上清, 转移至新的 15 mL 离心管, 做好标记。

4.3 向各管加入 100 μ L Biotin-beads, 10 μ L Tween 20, 室温旋转孵育 2 h。

特别提示: ① Biotin-beads, 无需清洗, 可直接使用。② Biotin-beads 使用时请务必混匀, 并且使用 1 mL 移液器添加 Biotin-beads, 以防止各管 Biotin-beads 添加不均匀。

4.4 孵育完成后, 室温 500 $\times$ g, 水平离心 5 min, 去除上清。

5、清洗

5.1 各管分别加入 1 mL 的 Wash buffer I, 混匀 Biotin-beads, 并转移至 1.5 mL EP 管中, 室温旋转清洗 5 min 后, 500 $\times$ g 离心 5 min, 去除上清。

5.2 各管分别加入 1 mL Wash buffer I, 室温旋转清洗 5 min 后, 500 $\times$ g 离心 5 min, 去除上清。

5.3 各管分别加入 1 mL Wash buffer II, 室温旋转清洗 5 min 后, 500 $\times$ g 离心 5 min, 去除上清。

5.4 各管分别加入 1 mL Wash buffer III, 室温旋转清洗 5 min 后, 500 $\times$ g 离心 5 min, 去除上清,

添加 500 μ L Wash buffer III 重悬 Biotin-beads, 暂存于 4 $^{\circ}$ C。

特别提示: ①转移以及清洗 Biotin-beads 过程, 尽可能避免 Biotin-beads 损失。②清洗完成后, Biotin-beads 请尽快进行质谱鉴定与分析。

三、质谱鉴定

使用 Trypsin 进行样本 On-bead-digestion 质谱前处理, 用于互作蛋白鉴定。On-bead-digestion 质谱前处理:

1 溶液配置

1.1 50 mM NH_4HCO_3 溶液: 浓度为 3.548 mg/mL, 使用 ddH₂O 进行溶解。

1.2 10 mM DTT 溶液(二硫苏糖醇):浓度为 1.5425 mg/mL, 使用 50 mM NH_4HCO_3 溶液溶解。

1.3 25mM IAM 溶液(碘乙酰胺):浓度为 4.62mg/mL, 使用 50 mM NH_4HCO_3 溶解, 避光, 现配现用。

1.4 Trypsin 酶液(质谱级):按照说明书将酶液配置为 0.2 mg/mL, 储存于-80 $^{\circ}$ C。

1.5 0.1%FA:0.1%甲酸水, 使用 ddH₂O 将甲酸稀释至浓度为 0.1%。

2 操作步骤

2.1 SPIDER 清洗完成后, 室温, 500 $\times$ g 离心 5 min, 去上清。向管中加入 1mL 50 mM NH_4HCO_3 , 室温旋转洗涤 10 min。同条件离心去上清。

2.2 加入 1mL 10 mM DTT 溶液, 37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 1h。同条件离心去上清。

2.3 加入 1mL 25mM IAM 溶液(现配现用), 避光室温旋转孵育 15 min。同条件离心去上清。

2.4 加入 500 μ L 的 50 mM NH_4HCO_3 溶液, 室温旋转孵育 15 min。同条件离心去上清。

2.5 向 EP 管中加入 500 μL 的 50 mM NH_4HCO_3 溶液, 以及 10 μL Trypsin 酶液(质谱级), 即总量为 2 μg 。

2.6 37°C 旋转孵育过夜(16 h)。

2.7 预热真空旋转干燥仪。

2.8 将 EP 管 12000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清, 转入新的 EP 管中, 暂存于 4°C。

2.9 向 EP 管中再次加入 200 μL 的 50 mM NH_4HCO_3 溶液, 室温旋转洗涤 20 min。

2.10 将 EP 管 12000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清, 与先前取出的上清混合。

2.11 55°C, 真空旋转干燥 1h, 观察是否完全干燥, 若未干燥则继续进行干燥直至完全干燥。

2.12 干燥后的样品中添加 100 μL 的 0.1% 甲酸水(0.1%FA), 于震荡混合仪上震荡 5–10 min, 充分溶解沉淀。

2.13 使用 C18 Tips 脱盐, 收集肽段溶液, 旋干。

2.14 向管中加入 11 μL 的 0.1% 甲酸水, 涡旋震荡 10 min 使得肽段充分溶解。瞬时离心, 使得液体沉于管底。

2.15 取 1 μL 样本溶液, 使用 nanodrop, 对样品的蛋白浓度进行测定。通常, 样品浓度在 0.1 ng/ μL 以上。

2.16 将剩余样品取 5 μL 加入内插管底部, 注意不要留有空气或气泡。将内插管插入进样瓶中, 盖上盖子。

2.17 放置于 4°C 或直接放进仪器上样。

3 质谱检测

3.1 质谱检测方法: 首先使用 A 溶液(含有 0.1% 甲酸与 2% 乙腈)将肽段溶解, 并使用 C18 反相色谱柱将肽段分离, 使用梯度洗脱, 梯度为 5%–80% 溶液 B (含有 0.1% 甲酸与 90% 乙腈)。使用高碰撞解离技术将强度为 5,000 以上离子分离并连续破碎, 并检测完整肽段(荷质比为 300–1400)。

3.2 质谱结果筛选: 根据 Ratio、Unique peptide、污染蛋白三个指标进行初步筛选, 一般认为 Ratio ≥ 1.5 (也可提高)、Unique peptide > 1 、污染蛋白(数据库: CRAPOME) 去除排名前 20% 的质谱常见污染蛋白为显著差异的蛋白。

四、质控 (选做)

本试剂盒所提供的质控 (PC) 用于定性评估 SPIDER 关键组分 (Component I, II) 的活性, 反应完成后使用 SDS-PAGE 电泳检测。操作时长约 2 h。

1 取 20 μL Buffer R 加入 PC, 放置于冰上, 温柔吹吸使其溶解。

2 取 2 个 PCR 管, 标记为实验组与对照组, 按下表依次加入反应组分, 混匀, 并瞬时离心使试剂置于 PCR 管底部。

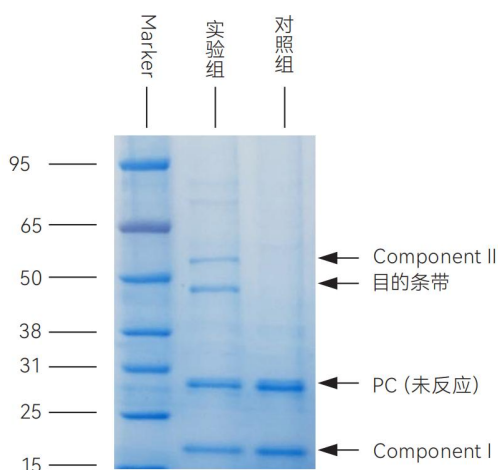
反应体系如下表:

名称	实验组	对照组
	体积(μL)	体积(μL)
Buffer R	32	41
PC	1.5	1.5
Component I	7.5	7.5
ComponentII	9.0	–
总体积	50	50

3 将反应体系置于 37°C 培养箱，孵育 30 min–2h。

4 反应完成后保存于–20°C 冰箱，或立即进行 SDS–PAGE 检测。

特别提示：建议质控与 SPIDER 反应同时进行。若质控未能及时进行，请将 Component1、ComponentII 立即保存于–80°C 冰箱，请勿反复冻融；Buffer R 保存于 4°C。示例结果如下：



如图所示，当实验组出现目的条带时，说明试剂组分中 Component I，Component II 活性较好，可用于完成 SPIDER 反应。

◆ 注意事项

1. 实验组与对照组所需试剂量相同，建议每组实验做一次技术重复，一次实验消耗 4 T 试剂量。
2. 为了您的安全健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅作科研用途！