

药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit)

产品编号	产品名称	包装
S3206S	药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit)	100次
S3206M	药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit)	500次

产品简介:

- 碧云天的药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(Drug Affinity Responsive Target Stability Assay Kit, 简称DARTS Assay Kit), 也称药物靶标蛋白鉴定试剂盒、无标记药物-蛋白结合鉴定试剂盒、药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒、无标记药物靶蛋白发现试剂盒、药物靶标发现试剂盒、靶蛋白药物发现试剂盒, 是一种基于药物亲和反应靶向稳定性技术, 药物无须任何标记, 可简单、快速地用于检测候选药物对于已知靶蛋白或特定药物对于未知靶蛋白稳定性影响的试剂盒。本试剂盒一方面可以借助Western、ELISA、酶活性检测等用于筛选能提高已知靶蛋白稳定性的候选药物, 另一方面也能通过LC-MS/MS筛选特定药物能提高其稳定性的靶蛋白。
- DARTS (Drug Affinity Responsive Target Stability)技术是一种用于药物靶点发现的实验方法, 通过检测药物与靶蛋白结合后引起的蛋白稳定性变化来识别相互作用, 其特点是可以相对快速、直接地识别小分子潜在蛋白质靶点, 也可用于验证通过其它方法预测或鉴定的潜在蛋白质-配体相互作用, 并评估蛋白-配体的结合亲和力[1]。自2009年以来, DARTS技术已经广泛应用于小分子药物的靶标研究。目前, 靶标鉴定方法主要分为两大类, 一类是通过基于亲和力的方法检测药物与其靶标的直接结合情况, 如亲和层析、活性位点定向探针和蛋白质微阵列等技术。然而, 亲和力技术以化学修饰为基础, 存在一定局限性, 这些方法通常需要对小分子药物或蛋白质库进行标记或衍生处理, 而在某些情况下, 小分子药物可能缺乏用于共价交联的位点, 或者化学修饰可能影响药物与靶标蛋白的结合。另一类是基于表型的方法, 通过药物引发机体产生的生理反应或生化特征, 推断药物的靶点和作用途径, 如基因组学和蛋白质组学等技术, 这类方法依赖于药物对细胞或生物体产生的特定反应[2]。相比较而言, DARTS技术的优势在于它使用天然的药物分子与靶标相互作用, 不依赖于化学修饰。此外, DARTS技术不受合成化学限制、不依赖于药物产生的生物学效应同时并保持与靶蛋白的结合, 因此可以适用于任何作用机制的小分子药物靶标的鉴定。DARTS技术还可以应用于任何生物体的任何细胞或组织样本, 且不受模式生物敲除文库的限制。
- 细胞内蛋白质的降解主要通过泛素-蛋白酶体系统(Ubiquitin-Proteasome System, UPS)、自噬-溶酶体途径(Autophagy-Lysosome Pathway)、溶酶体直接降解途径等, 蛋白质在体内的稳定性是比较难预测的, 但某些药物/配体(如小分子药物)高度特异地结合靶蛋白, 可以提高或降低靶蛋白的蛋白酶的敏感性。一些小分子药物可与特定的靶标蛋白结合, 通过特定构象或简单地隐藏蛋白质酶识别位点, 降低了靶蛋白对蛋白酶的敏感性, 从而增强了蛋白质的稳定性(图1) [3]。

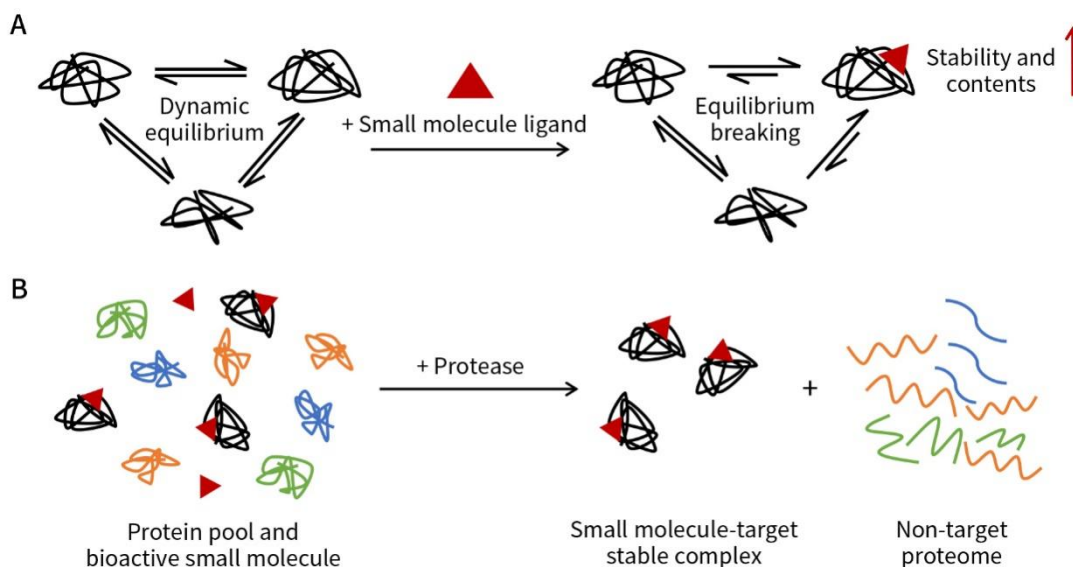


图1. 碧云天药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit) (S3206)的工作原理图。图A为蛋白质在生物体内处于不同折叠状态下的动态平衡的示意图。当某种折叠状态的蛋白质与小分子特异性结合时, 降低了靶蛋白的蛋白酶敏感性, 从而增强了该蛋白质的稳定性。图B为在经生物活性小分子处理的蛋白池中, 小分子特异识别靶蛋白并结合形成小分子-靶标复合物, 该复合物的稳定性明显增强, 并表现出对蛋白酶解的抗性, 而未结合小分子的靶蛋白被蛋白酶(Protease)酶解。

- 本试剂盒主要基于DARTS技术, 主要的步骤和原理如图2所示。将小分子药物与蛋白样品共孵育一定时间后, 加入蛋白酶进行消

化，由于小分子药物结合靶蛋白后可以改变靶蛋白对蛋白酶的敏感性，通过SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色、Western检测可以鉴定靶蛋白的含量，也可以通过蛋白二维电泳(2D-PAGE)、LC-MS和亲和色谱等技术鉴定未知的药物靶蛋白。

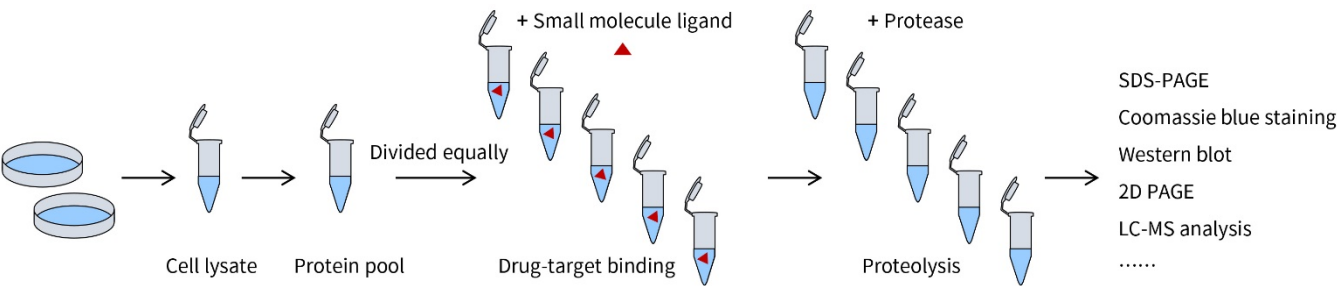


图2. 碧云天药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit) (S3206)检测流程图。

- 在DARTS反应体系中加入合适浓度的蛋白酶是本技术的关键点之一。本试剂盒提供的蛋白酶(Protease)可特异性地切割折叠和非折叠态蛋白和多肽链中天冬氨酸和谷氨酸的羧基侧肽键。经验证，本蛋白酶在中性pH条件下有较强的活性且可以确保DARTS体系中蛋白酶消化过程的高效性和准确性。
- **本试剂盒使用简单，药物无须标记即可检测，可重复性佳。**使用本试剂盒检测时可直接使用小分子药物的天然状态，无需进行任何化学修饰或标记，大大简化了实验操作步骤，节省了时间和成本，避免了化学修饰可能导致的药物活性丧失或靶标特异性变化。由于不需要对药物进行修饰，检测结果能更真实地反映药物在生理条件下的作用效果，确保实验结果的可靠性和可重复性。
- **本试剂盒适用范围广。**本试剂盒适用于多种细胞类型，包括哺乳动物细胞、组织提取物和其它复杂的蛋白质样本，展现出极高的实验适用性。
- **本试剂盒检测灵敏度高。**由于实验流程中无洗涤步骤，本试剂盒可高灵敏地识别低丰度和低亲和力的小分子药物靶标。即使在复杂蛋白质背景下，本试剂盒仍能准确检测到靶蛋白的存在，有效帮助研究人员发现和确认潜在药物靶标，推进药物研发进程。
- **本试剂盒兼容性好。**使用本试剂盒制备的蛋白样品兼容后续的多种分析方法，可以用于SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色、Western检测、酶活性检测，也适用于蛋白二维电泳(2D-PAGE)、LC-MS等。多种分析方法的兼容性使得研究人员可以根据实验需求选择最合适的检测方法，以获得更加全面和深入的实验数据，提高了实验的灵活性和结果的可信度，确保了数据的多样性和准确性。
- **本试剂盒使用便捷。**不同于其它依赖于复杂设备和高成本试剂的药物靶标鉴定方法，本试剂盒简洁易用，提供了一个经过验证的完整方案。本试剂盒用于检测野黄芩苷(Scutellarin, SG)对于PDK2蛋白稳定性的效果请参考图3。

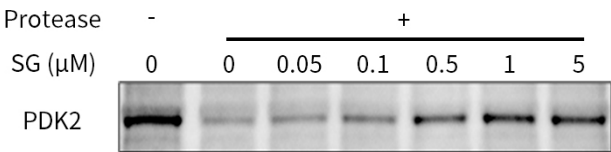


图3. 碧云天药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit) (S3206)用于检测野黄芩苷(Scutellarin, SG)对于PDK2蛋白稳定性的效果图。A-431细胞(人表皮癌细胞)裂解后，取2μl浓度为0、2.5、5、25、50、250μM的SG溶液加入至每组体积为100μl、蛋白量为100μg总蛋白中，使最终药物浓度为0、0.05、0.1、0.5、1、5μM，室温摇床孵育60分钟。然后，加入2μl稀释好的Protease (0.05μg/μl) (即Protease:Protein=1:1000)，混匀，40℃孵育30分钟。接着加入1μl蛋白酶抑制剂(100X)终止消化反应，并加入20μl Loading Buffer (6X)，95℃加热10分钟使蛋白变性。最后，通过Western检测PDK2蛋白的酶解情况，一抗为PDK2/PDHK2 Rabbit Monoclonal Antibody (AG2846)。结果显示，SG呈浓度依赖性地增强了PDK2蛋白的稳定性，这表明SG可能与PDK2蛋白有结合并增强了其对于蛋白酶的耐受性。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 按照使用说明操作，本试剂盒小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S3206S-1	Lysis Buffer	10ml
S3206S-2	Protease	2mg
S3206S-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	0.1ml
S3206S-4	Loading Buffer (6X)	2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S3206M-1	Lysis Buffer	50ml
S3206M-2	Protease	10mg
S3206M-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	0.5ml
S3206M-4	Loading Buffer (6X)	10ml

—	说明书	1份
---	-----	----

保存条件：

-20℃保存，一年有效。

注意事项：

- 需酌情自备待测药物，推荐使用碧云天的上市药物库(2818个, 10mM×10μl) (S3303)、天然化合物、抑制剂或激活剂等。
- 需酌情自备目标蛋白的一抗，推荐使用碧云天的抗体库以选择合适的一抗。
- 经测试，配制好的Protease溶液反复冻融3次对使用效果无显著影响，但仍需尽量避免反复冻融。
- Protease Inhibitor Cocktail (100X)和Loading Buffer (6X)对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的制备。

- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每20-100万细胞加入100-200μl的比例加入Lysis Buffer，适当吹打。对于贴壁细胞适当吹打使细胞脱离培养器皿并转移至离心管中。对于组织样品，按照每10-20mg组织加入100-200μl的比例加入Lysis Buffer。对于培养的细胞和组织，推荐把体积控制在100-200μl使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4℃或冰浴等低温条件下进行匀浆；也可以考虑把体积放大到400-500μl左右，采用瓷珠机械震荡的方式进行匀浆；或者也可以使用常规的玻璃匀浆器进行匀浆(建议尽量使用较小的玻璃匀浆器，以便于把样品的体积控制在较小体积范围内)。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后继检测。
- 收集离心后的上清液，测定蛋白浓度。推荐使用BCA法或Bradford法进行蛋白定量。根据蛋白浓度测定结果调整蛋白浓度，确保蛋白浓度在1-5mg/ml。如果蛋白浓度过低或者过高，可能会影响后续Western等检测结果的清晰度和可判读性。
- 样品保存。样品制备完成后，建议尽快进行后续实验步骤。如果样品需要保存，可将其分装至适当的体积后，存放于-80℃冻存。长期存放时，应避免反复冻融，以防蛋白质降解。

2. Protease用量测试(选做)。

为确定适合实验体系的Protease用量，建议首先进行预实验，通过设置不同的Protease与总蛋白比例，观察不同浓度的Protease对蛋白稳定性的影响。在选择Protease的浓度时，以蛋白条带发生明显变化为标准，条带过浅或过深时均不易观察到蛋白稳定性的改变。因此需选择合适的Protease用量，以便正式实验时能更好地观察药物影响靶蛋白稳定性的变化，同时可参考相关文献中推荐的Protease与蛋白比例。

- Protease (10μg/μl)的配制。2mg的Protease溶于200μl超纯水配制成10μg/μl的Protease，分装后于-20℃保存，避免反复冻融，并于6个月内使用完毕。
- 根据设置的Protease与蛋白样品中总蛋白质的比例稀释Protease (10μg/μl)，制备所需浓度的Protease工作液。取10μl Protease (10μg/μl)加入240μl超纯水，即得0.4μg/μl的Protease，随后按照下表进行倍比稀释(以每组蛋白样品中加入2μl一定浓度的Protease工作液、总蛋白量为100μg为例)。也可以根据预实验和实验需要调整Protease与总蛋白的用量。

Vial Number	Volume of Ultrapure water	Volume of Protease	Concentration of Protease	Protease	Protease: Total Protein
A	240μl	10μl Protease (10μg/μl)	0.4μg/μl	0.8μg	1:125
B	125μl	125μl of Vial A	0.2μg/μl	0.4μg	1:250
C	125μl	125μl of Vial B	0.1μg/μl	0.2μg	1:500
D	125μl	125μl of Vial C	0.05μg/μl	0.1μg	1:1000
E	125μl	125μl of Vial D	0.025μg/μl	0.05μg	1:2000
F	125μl	125μl of Vial E	0.0125μg/μl	0.025μg	1:4000
G	125μl	125μl of Vial F	0.00625μg/μl	0.0125μg	1:8000
H	125μl	125μl of Vial G	0.003125μg/μl	0.00625μg	1:16000

注1：配制好的Protease溶液使用前置于冰上或4℃，Vortex充分混匀后使用。

注2：每次稀释时应注意充分混匀。

- 每组蛋白样品加入2μl稀释好的Protease工作液并混匀，以便Protease充分接触并作用于目标蛋白。将混匀的样品离心后，40℃孵育30分钟。推荐碧云天的BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm) (E6686)、BeyoBath™干式恒温金属浴(1.5/2ml×40) (E6662)。

注：酶解前的蛋白样品应置于冰上或4℃。

- 孵育结束后，立即加入相应比例的Protease Inhibitor Cocktail (100X)终止酶解反应，例如100μl的反应体系可以加入1μl Protease Inhibitor Cocktail (100X)。此操作应迅速且准确，避免过度酶解影响实验结果。
- 根据样品体积加入相应比例的Loading Buffer (6X)，例如100μl的反应体系加入20μl的Loading Buffer (6X)。

- f. 95°C加热10分钟，以充分变性蛋白质。
- g. 进行Western检测PDK2蛋白的酶解情况。检测结果请参考图4。

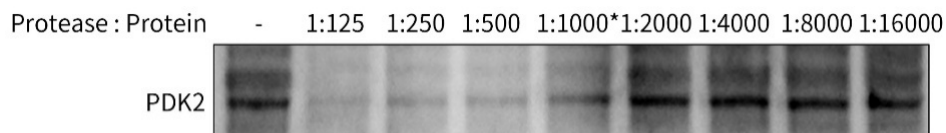


图4. 碧云天药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit) (S3206)用于不同Protease与总蛋白比例筛选的检测效果图。每组100μl 100μg的A-431细胞总蛋白，加入2μl稀释好的Protease工作液。混匀，40°C孵育30分钟进行蛋白消化。孵育结束后加入1μl Protease Inhibitor Cocktail (100X)终止反应，并加入20μl Loading Buffer (6X)，混匀后95°C加热10分钟。随后通过Western检测PDK2蛋白的酶解情况，一抗为PDK2/PDHK2 Rabbit Monoclonal Antibody (AG2846)。结果显示Protease和蛋白比例约为1:1000时，蛋白条带变化明显，便于后续实验观察小分子药物是否能影响蛋白的稳定性。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

3. 药物处理。

- a. 药物工作液的配制。根据参考文献资料设置药物浓度梯度，稀释母液并制备所需浓度的药物工作液。例如，可制备0.05、0.1、0.5、1、5μM不同浓度的药物工作液。
注：每次实验须分别设置未加Protease的阴性对照(Negative Control)组和未加Protease和药物的空白对照(Blank Control)。推荐每管加入100μl 1mg/ml蛋白样品(总蛋白量为100μg)，蛋白浓度和体积须同步步骤2b保持一致。
- b. 每管分别加入2μl不同浓度的药物工作液。空白对照组中加入2μl所用药物所对应的溶剂(如纯水、DMSO等)。轻轻混匀后，置于室温摇床孵育60分钟，或4°C孵育过夜。孵育温度和时间可根据药物的性质及参考文献或相关经验调整。

4. 酶解处理。

- a. Protease (10μg/μl)的配制。2mg的Protease溶于200μl超纯水配制成10μg/μl的Protease，分装后于-20°C保存，避免反复冻融，并于6个月内使用完毕。
- b. 根据步骤2确定的Protease与蛋白样品中总蛋白质的比例稀释母液，制备所需浓度的Protease工作液。稀释步骤应在冰上进行，以确保酶活性稳定。
- c. 向各实验组中加入2μl稀释好的Protease工作液，阴性对照组中使用相同体积的超纯水替代。
注：酶解前的蛋白样品应置于冰上或4°C。
- d. 混匀后离心数秒以沉淀液体，40°C孵育30分钟。推荐碧云天的BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm) (E6686)、BeyoBath™干式恒温金属浴(1.5/2ml×40) (E6662)、BeyoBath™ DB100干式恒温金属浴(1.5/2ml×35) (E6663)。
- e. 孵育结束后，立即加入相应比例的Protease Inhibitor Cocktail (100X)终止酶解反应，例如100μl的反应体系加入1μl Protease Inhibitor Cocktail (100X)。此操作应迅速且准确，避免过度酶解影响实验结果。

5. 样品处理和保存。

通常可以通过Western检测，明确目的蛋白的对于蛋白酶稳定性的耐受是否因相应药物而发生改变，也可以通过LC-MS/MS检测特定药物对于未知的靶标蛋白稳定性的影响。如果靶标蛋白是一个已知的酶，并且有合适的酶活性检测方法，也可以通过适当的酶活性检测方法，进行高通量的药物筛选。靶标蛋白已知的情况下，也可以酌情采用ELISA等适当方法检测目的蛋白的稳定性。如下仅以Western检测和LC-MS/MS检测为例进行说明。

- a. 根据样品体积，加入相应比例的Loading Buffer (6X)，例如100μl的反应体系加入20μl的Loading Buffer (6X)。
- b. 95°C加热10分钟，以充分变性蛋白。
- c. 处理后的样品可立即用于后续分析(如果是验证药物的已知靶点可以直接进行Western检测，如果是探索特定药物的未知靶点或全新靶点，可以采用LC-MS/MS等分析)。如需保存样品，应立即置于-80°C冻存，以防止蛋白质降解。

注：详细的Western实验步骤可以参考碧云天的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/western.htm>。

常见问题：

1. 假阳性结果的出现与鉴别方法。

鉴别假阳性结果的方法：(1)可以设置多个不同的Protease浓度组，观察DARTS结果是否表现出剂量依赖性。(2)可以使用其它药物靶蛋白鉴定技术，如表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)、细胞热位移分析(Cellular Thermal Shift Assay, CETSA)、蛋白质氧化速率稳定性(Stability of Proteins from Rates of Oxidation, SPROX)等，验证蛋白质是否与药物结合。

2. 已知药物靶点蛋白DARTS结果为阴性原因分析。

当已知的药物靶点DARTS结果为阴性时，可能由以下几种原因导致。药物含量可能不足以产生效应，建议适当增加药物剂量、扩大药物剂量梯度进行重新检测；当DARTS技术通过凝胶染色可视化分析DARTS结果时，针对低丰度靶蛋白的鉴定需谨慎优化实验条件以提高其检测灵敏度。

参考文献：

1. Ren YS, Li HL, Piao XH, Yang ZY, Wang SM, et al. Biochem Pharmacol. 2021. 194:114798.
2. Lomenick B, Hao R, Jonai N, Chin RM, Aghajani M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(51):21984-9.
3. Huang L, Wang D, Zhang C. Methods Mol Biol. 2021. 2213:175-182.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
S3206	药物亲和反应靶蛋白稳定性检测试剂盒(DARTS Assay Kit)	100次/500次
S3211S	平行人工膜血脑屏障通透性检测试剂盒(PAMPA-BBB)	96次
S3303S	上市药物库(2818个, 10mM×10μl)	36个96孔板

Version 2025.05.20