



His Protein Pull Down Kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	1
3. 注意事项.....	3
4. 问题及解决方案.....	4
5. 订购信息及相关产品.....	4

1. 产品介绍

His Protein Pull Down Kit 是一款能够高效完成标签诱饵蛋白与靶蛋白共沉降的试剂盒。其包含高性能 Co Smart Beads 6FF, 能够高特异性的捕获带有 6×、9×、12×His 标签的诱饵蛋白。另外试剂盒内经过优化的缓冲液, 为蛋白互作实验提供了最佳的反应条件, 增强了蛋白互作实验的稳定性, 更有效的去除实验背景。Co Smart Beads 6FF 是一种新型 IMAC 填料, 螯合有非常牢固的 Co 离子, 拥有更为广泛的适配性, 试剂耐受情况见表 1。

表1: Co Smart Beads 6FF试剂耐受情况

试剂种类	耐受时间
0.01M HCl, 0.01M NaOH	1 week
10mM EDTA, 1M NaOH, 5mM DTT, 5mM TCEP, 20mM β-mercaptoethanol, 6M Gu-HCl	24h
500mM imidazole, 100mM EDTA	2h
30% isopropanol	20min

本产品可广泛应用于大肠杆菌裂解物、细胞裂解物、细胞分泌上清等样品中的蛋白互作验证, 具体组分见表 2。

表2. His Protein Pull Down Kit产品组分

组分名称	规格(5T)	规格(25T)
Co Smart Beads 6FF	0.15ml	0.75ml
Lysis Buffer A	5ml	25ml
Lysis Buffer B(1000×)	0.1ml	0.5ml
Wash Buffer Enhanced	2.5ml	12.5ml
Balance/Wash Buffer(10×)	10ml	50ml
Elution Buffer	0.4ml	2ml
Pull-down Column Accessory	10套	50套

2. 使用方法

2.1 缓冲液的准备

可使用试剂盒准备的缓冲液, 也可根据实际情况配制不同的缓冲液体系。Balance/Wash Buffer(10×) 请在使用前用纯水稀释至 1×。所有缓冲液在使用前建议用 0.22μm 或者 0.45μm 滤膜过滤, 稀释后的缓冲液建议 4℃保存, 若试剂浑浊, 请立即丢弃。



下列可能用到的试剂及材料未提供,需额外准备:

- 1) 电泳上样缓冲液 (SDS Loading Buffer), 非还原性 (5×): 0.3M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 50% 甘油, 0.5% 溴酚蓝;
- 2) 二硫苏糖醇 (DTT)
- 3) 蛋白酶抑制剂
- 4) 免疫互作所用诱饵蛋白、靶蛋白。

2.2 样品准备

方案 I: 大肠杆菌细胞的裂解

- 1) 按照适当方法进行细菌培养、诱导、离心收菌, 先加入 1×Balance/Wash Buffer (添加比例: 1g 菌体加入 9ml), 震荡完全分散菌体, 加入 Lysis Buffer A (添加比例: 1g 菌体加 1ml)。混合均匀后室温裂解 5-10min, 菌体悬液渐渐变清亮透明。
- 2) 加入 1/1000 体积的 Lysis Buffer B (1000×)。混合均匀后反应 5-10min。
- 3) 按照适当方法离心 (例如: 12000×g, 5-10min), 分离上清与沉淀。如果是可溶蛋白, 直接取上清进行使用, 如果是包涵体, 则取沉淀, 对包涵体进行洗涤以及变性复性。

注: 如裂解终产物较为浑浊, 或样品中目的蛋白丰度较低, 可调整 Lysis Buffer A 的使用量。

方案 II: 哺乳动物细胞的裂解

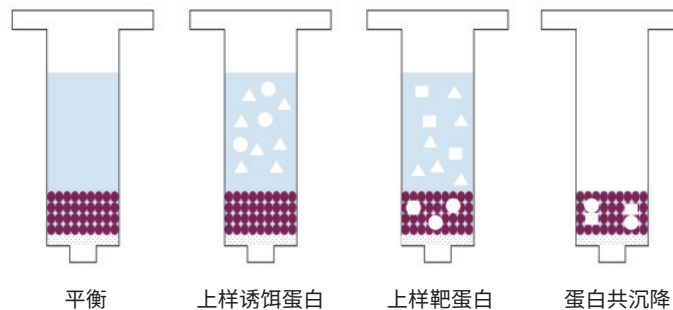
- 1) 将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 收集细胞, 弃上清。

注: 如果是贴壁细胞, 通过胰蛋白酶消化将其从培养容器表面释放。

- 2) 用预冷 1×Balance/Wash Buffer 将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 收集细胞, 弃上清。同时配制裂解液, 配方为 1×Balance/Wash Buffer: Lysis Buffer A=7: 3, 配制好后置于冰上预冷。
- 3) 向细胞团块中加入上述步骤 2) 的预冷裂解液。每 50mg 细胞团块使用 500μl。
- 4) 将上述的样品在冰上孵育 30min, 期间混匀几次。12000×g 离心 10min, 去除细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 备蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

注: 如果互作蛋白与核酸存在相互作用, 可加入 1/1000 (V/V) Lysis Buffer B (1000×) 进行样本处理。

2.3 蛋白互作



蛋白互作操作流程

2.3.1 填料平衡

- 1) 将 Co Smart Beads 6FF 充分混匀, 取 50μl 加入 Pull-down Column Accessory 内管中。
 - 2) 可用掌上离心机或其他微量离心机 6000rpm 瞬时离心, 去除外管保存液。
 - 3) 用 1×Balance/Wash Buffer 清洗填料 3-5 次, 推荐用量为 500μl, 每次加入后充分混匀填料与液体, 瞬离甩去, 平衡完待用。
- 注: 填料不可长时间干涸, 且每次清洗、上样、洗脱均需吹打混匀填料与样品。

2.3.2 上样诱饵蛋白

向上述准备好的填料 (步骤 2.3.1) 中加入诱饵蛋白, 如诱饵蛋白为纯样, 推荐上样量为 250μg, 如是裂解产物, 可根据跑胶条带或者直接上样。建议上样前用 1×Balance/Wash Buffer 稀释补充体积至 500μl, 离心柱管最大上样量为 800μl, 室温混旋孵育 30min。

注: 非离心时, 离心柱管应用堵头封闭下水口。孵育温度和时间范围推荐为: 室温、30min-2h, 或者 4°C、1h-16h, 根据实际的结合效果进行调整。

2.3.3 上样靶蛋白

- 1) 将上述孵育完成的填料 (步骤 2.3.2) 离心甩干液体。
- 2) 用 1×Balance/Wash Buffer 清洗填料 3-5 次, 推荐用量为 500μl, 每次重悬清洗后, 离心去除外管中清洗液。



- 3) 如洗杂效果不佳,可加入终浓度 1-10% 的 Wash Buffer Enhanced,增强洗杂能力,后续步骤清洗时,同样需要使用添加 Enhanced 的 1×Balance/Wash Buffer。如果上一步清洗满足需求,可跳过此步骤。
- 4) 将带有靶蛋白的裂解液或上清进行上样,如需进行稀释,可用 1×Balance/Wash Buffer 稀释,室温孵育 30min。
- 5) 离心甩去液体,使用 1×Balance/Wash Buffer 清洗填料 3-5 次,最后一次清洗可以将介质 - 诱饵蛋白 - 靶蛋白复合物转移至一个新的 Pull-down Column Accessory 中进行。

2.4 洗脱

方案 I: 竞争 \ 酸 \ 变性洗脱

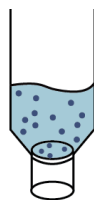
- 1) 本试剂盒提供 Elution Buffer, 其为 4M 咪唑, 可用 1×Balance/Wash Buffer 稀释成终浓度 250mM 咪唑进行洗脱, 如无法洗脱, 则可提高咪唑浓度或多次洗脱。
- 2) 使用甘氨酸 (pH 3.0) 同样可以洗脱蛋白, 此方案需要自备试剂, 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱可能会损伤蛋白, 并且使用后需要用 1M Tris 进行中和。
- 3) 使用 SDS Loading Buffer 亦可进行洗脱, SDS Loading Buffer 洗脱能力较强, 可以洗脱填料上的绝大部分蛋白 (包括非特异性吸附), 但是会使蛋白失活, 无法维持三维结构。

方案 II: 煮球

用 250 μ l 1×Balance/Wash Buffer 重悬填料, 直接将填料混合物取出添加 SDS Loading Buffer 进行跑胶。

3. 注意事项

- 1) 在进行蛋白互作操作之前, 请务必认真阅读此说明书。
- 2) 除非另有说明, 所有操作建议于 4°C 下进行。
- 3) 填料应保存在储存溶液中, 防止干燥, 使用前请充分混匀。
- 4) 如果需要在还原条件下洗脱, 向 1× 电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 10-20mM)。
- 5) 经煮沸后的填料失去结合能力, 经煮沸的填料不应再次使用。
- 6) 为保证最佳的实验结果, 请选择较纯的诱饵蛋白进行蛋白互作。
- 7) 对于蛋白互作实验, 不同类的诱饵蛋白与靶蛋白结合的亲和性是有区别的, 因此若本试剂盒提供的缓冲体系不能获得很好的实验结果, 可自行优化缓冲液进行实验。
- 8) 实验设计时, 建议加入对照组, 以备后续实验结果分析。
- 9) 在确定实验结果前, 建议保留各步骤的样品以备验证 (如 input、流穿、洗杂、洗脱、煮球)。
- 10) 配套的 Pull-down Column Accessory 附有两个规格的垫片, 当使用微量介质 (10-50 μ l) 进行实验时, 请按图一装入垫片, 当使用大量介质 (>100 μ l) 进行实验时, 请按图二装入垫片。



图一



图二



4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
洗脱组分中没有诱饵蛋白	蛋白可能是包涵体, 没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式
	表达量太低	优化表达条件
	His标签断裂	通过SDS-PAGE确认后重新进行表达
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在填料上	优化漂洗液组分, 例如补加1-10% Wash Buffer Enhanced
	进行蛋白免疫印迹时, 清洗不充分	增加清洗次数
靶蛋白没有被捕获	样品中靶蛋白量过少	通过SDS-PAGE或Western Bolt验证蛋白表达或裂解效率, 将靶蛋白量提高至推荐用量
	蛋白互作力太弱或无法结合	优化Lysis/Wash Buffer 添加蛋白互作的辅助因子
	蛋白降解	加入蛋白酶抑制剂 对温度敏感的抗原, 尽量在4°C或冰浴条件下进行实验操作

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
His Protein Pull Down Kit	BK0055-t	5T
	BK0055-01	25T
GST Protein Pull Down Kit	BK0054-t	5T
	BK0054-01	25T
BCA Protein Assay Kit	BK0001-01	250T
	BK0001-02	1250T