

琼脂糖微珠法His pull-down试剂盒

Agrose Beads His Pull-down Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP031 (6T)	IPP031M (12T)	IPP031L (40T)	
01	His-tag Purification Resin	0.3 mL	0.6 mL	2 mL	4°C
02	Lysis Buffer	7.2 mL	15 mL	48 mL	4°C
03	Wash Buffer	21 mL	42 mL	140 mL	4°C
04	Elution Buffer	0.35 mL	0.7 mL	2.5 mL	4°C
05	Protease Inhibitor	0.18 mL	0.36 mL	1.2 mL	-20°C

注意:

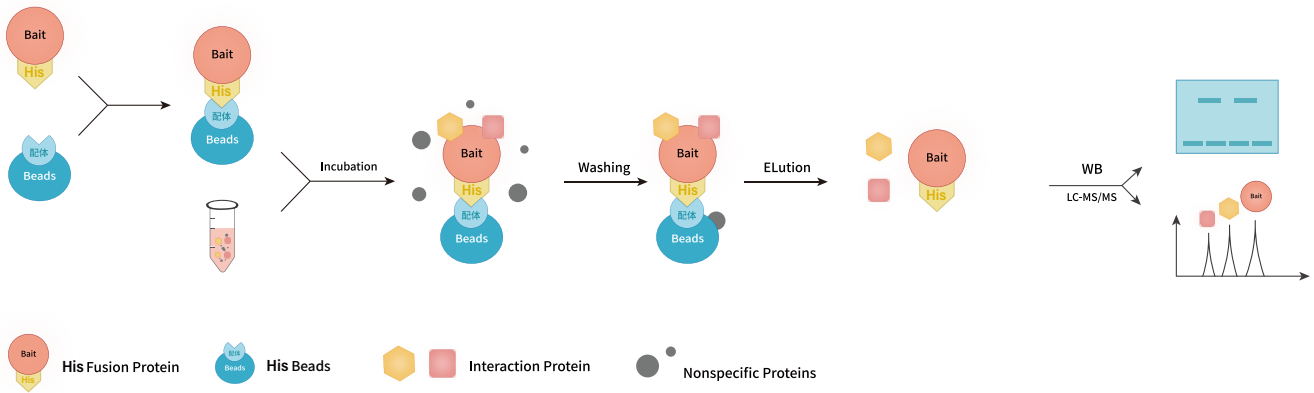
该试剂盒包含足够完成 6、12 或 40 个反应的试剂,每个反应使用 45 μ L 树脂。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组,因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

产品简介/Product Description

本试剂盒采用 His 标签纯化树脂来高效完成 His 标签融合蛋白的体外 pull-down 实验。实验前先将目标基因连入带有 His 标签的原核表达载体中,在大肠杆菌中表达出 His 融合蛋白。利用 His 标签纯化树脂与 His 标签的强亲和性,纯化 His 融合蛋白,再与样本裂解液孵育,样本中的互作蛋白即可被吸附而分离。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



使用流程/Procedure

1. His- 诱饵蛋白和 His 蛋白制备

- ①取已诱导表达可溶性 His- 诱饵蛋白或 His 蛋白的大肠杆菌菌液，4°C 5000 g 离心 5 min，收集大约 50 μL 菌体沉淀；
- ②加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀，4°C 5000 g 离心 5 min，弃上清；
- ③重复上步操作两次，共漂洗三次，尽量吸干液体；
- ④将样本置于冰上，向菌体中加入 500 μL 预冷的②裂解缓冲液、5 μL ⑤蛋白酶抑制剂 (按 1% 添加)，吹打混匀，冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- ⑤4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30 μL 作为 bait-input，剩余用于 pull-down 实验，置于冰上备用或 -80°C 保存。

注意：如果已经有纯化好的 GST- 诱饵蛋白和 GST 蛋白，则跳过此步骤。

2. 待测蛋白制备

待测样本分别按如下方法收集和处理：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	$1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨，再转移动物组织 100~200 mg 粉末至预冷的新离心管中
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨，再转移粉末至预冷的新离心管中
原核表达菌	50 μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体

②将样本管置于冰上，每组加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑤蛋白酶抑制剂 (按 1% 添加)，吹打混匀；

③冰上超声破碎至溶液基本澄清；

④4 °C 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中; 取 30 μL 作为 prey-input, 剩余用于 pull-down 实验, 置于冰上备用或 -80°C 保存。

注意:

1. 如果实验组和对照组所用样本一样, 可以先一起裂解, 取完 input 后再平分为两管。
2. 当样本不能完全裂解时 (溶液很浑浊), 可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异, 应提前摸索好合适的条件。根据经验, 样本蛋白浓度通常不低于 5 μg/μL, 总量约 2~3 mg。
3. 如果样本中目标蛋白丰度较低, 或结合物间的结合较弱, 可以增加初始样本量, 同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量, 但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3, 体积过大可以更换大规格离心管。

3. 漂洗液准备

为了防止实验过程的蛋白降解, 需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑥10 mL 离心管, 加入实验组和对照组总共所需的 6.8 mL 漂洗液、34 μL 蛋白酶抑制剂 (按 0.5% 添加), 混合均匀, 冰上保存, 现配现用。如果有多组样本, 请按照实际使用量配置。

4. His- 诱饵蛋白纯化

- ①将 His 标签纯化树脂颠倒混匀, 实验组和对照组各取 45 μL 树脂到新的离心管中;
- ②每组加入 200 μL 漂洗液 (步骤 3 准备), 颠倒混匀 30 次, 500 g 离心 5 min, 弃上清;
- ③重复上步操作一次;
- ④向实验组树脂中加入表达 His- 诱饵蛋白的大肠杆菌裂解液 (步骤 1 制备) 或 20 μg 纯化好的 His- 诱饵蛋白, 向对照组树脂中加入表达 His 空载体的大肠杆菌裂解液 (步骤 1 制备) 或 20 μg 纯化好的 His 蛋白, 放混匀仪上 4 °C 孵育 1~2 h;
- ⑤4 °C 500 g 离心 5 min, 弃上清;
- ⑥每组加入 500 μL 漂洗液 (步骤 3 准备), 颠倒混匀 30 次, 4 °C 500g 离心 5 min, 弃上清;
- ⑦重复上步操作两次, 共漂洗三次, 得到纯化的 His- 诱饵蛋白树脂。

5. His pull-down

- ①向上步树脂中加入待测样本裂解液 (步骤 2 制备), 放混匀仪上室温孵育 3 h 或 4 °C 孵育过夜;
 - ②4 °C 500 g 离心 5min, 弃上清;
 - ③每组加入 500 μL 漂洗液 (步骤 3 准备), 颠倒混匀 30 次, 4 °C 500g 离心 5 min, 弃上清;
 - ④重复上步漂洗操作两次, 共漂洗三次;
 - ⑤每组加入 50 μL ④洗脱缓冲液, 涡旋震荡 20 s, 放混匀仪上室温洗脱 15 min;
- 涡旋震荡 20 s, 4 °C 12000 g 离心 5 min, 收集上清至新的离心管中, -80°C 保存, 或直接用于 westernblot、SDS-PAGE 或质谱实验。

注意:

1. 洗脱缓冲液可以兼容质谱
2. 如果洗脱效率低, 可以更换 SDS- PAGE 上样缓冲液洗脱法: 漂洗后的树脂直接加入 50 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 3 min, 12000 g 离心 30 s, 收集上清 (即调取产物) 至新的离心管中; 该洗脱产物可以用于 SDS-PAGE 或 Western-blot 实验, 如果需要进行质谱实验, 则切胶条后送样。
3. Pull-down 捕获的蛋白量通常较少, SDS-PAGE 建议用硝酸银染色, 染色步骤参考如下:
(为了便于称量, 每步配置的溶液体积较大, 实际操作时取适量溶液浸泡胶即可)
 - (1) 固定: 30 min (乙醇: 乙酸: 水 =4: 1: 5 体积比);
 - (2) 敏化: 30 min (乙酸钠 10.2 g, 硫代硫酸钠 0.471 g, 乙醇 45 mL, 加水至 150 mL);
 - (3) 水洗: 4 次, 每次 10 min;
 - (4) 银染: 30 min (硝酸银 0.375 g, 加水至 150 mL);
 - (5) 水洗: 2 次, 每次 40 s;
 - (6) 显色: 显影至条带清楚 (碳酸钠 3.75 g, 60 μL 甲醛, 加水至 150 mL);
 - (7) 终止: 5 min (Na₂EDTA 2.19 g, 加水至 150 mL)。

注意事项/Notes

1. 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；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋树脂，这些操作会导致树脂聚集而降低结合能力。
4. 为保证树脂均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀树脂。
5. 实验前需要先做 western blot 实验确定 His 融合蛋白和待测互作蛋白是否可溶表达。
6. 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
7. 树脂的离心步骤需在低速条件下操作，离心速度大于 $5000 \times g$ 可能会导致树脂聚集和再悬浮困难。
8. 洗脱缓冲液为强酸性，最终的洗脱产物中含有 GST 融合蛋白及其互作蛋白。
实验的具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。

