

磁珠法His pull-down试剂盒

Magnetic 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
		IPP032 (6T)	IPP032M (12T)	IPP032L (40T)	
01	Lysis buffer	9 mL	18 mL	60 mL	4°C
02	Ni ²⁺ -NTA MagBeads	0.2 mL	0.4 mL	1.5mL	4°C
03	Incubation buffer	12 mL	24 mL	80 mL	4°C
04	Washing buffer	30 mL	60 mL	200 mL	4°C
05	Elution buffer	0.8 mL	1.6 mL	5.5mL	4°C避光
06	Protease inhibitor (100X)	35 μL	70 μL	0.24mL	-20°C

注意:

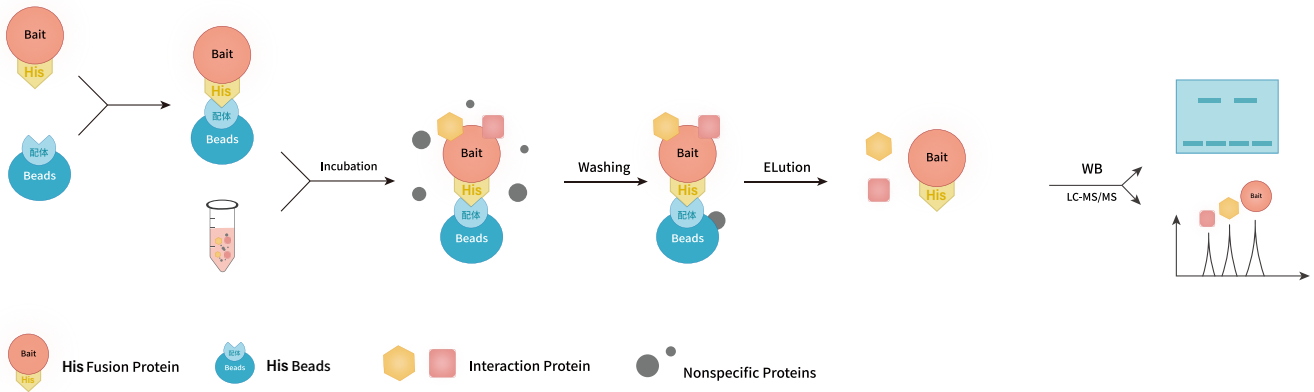
1. 需自备重组蛋白、PBS、6XLoading buffer、磁力架等试剂耗材。
2. 6T 为 6 次单组 (1 组对照或 1 组实验) pull-down 实验, 后面的操作步骤中包含了对照和实验各 1 组, 需消耗 2T 试剂。

产品简介/Product Description

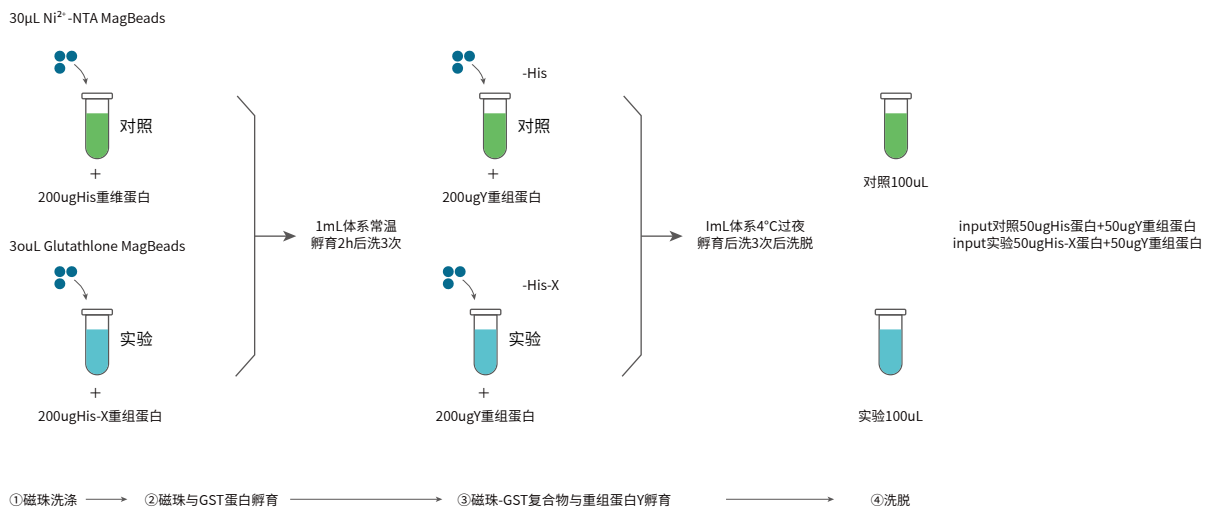
His Pull-Down 实验基于组氨酸 (His) 标签可与镍离子 (Ni²⁺) 特异性螯合结合的特性, 将 Ni²⁺ 通过 NTA 配体固定于磁珠上, 形成 Ni²⁺-NTA 磁珠, 将已知蛋白 X 与 His 标签融合表达, 获得的 His-X 蛋白可与 Ni²⁺-NTA 磁珠特异性结合, 若体系中存在与 X 蛋白相互作用的蛋白 Y, 则会形成磁珠 - Ni²⁺-His-X-Y 复合物, 与 X 蛋白互作的蛋白即可被分离并检测。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 技术流程图



- ①磁珠洗涤：取 30µL Ni²⁺-NTA MagBeads，经 Washing buffer 反复洗涤平衡；
- ②磁珠与 His 蛋白孵育：对照组加入 200µg 空白对照蛋白，实验组加入 200µg His-X 重组蛋白，1mL 体系常温孵育 2h 后洗涤 3 次；
- ③磁珠 - His 复合物与重组蛋白 Y 孵育：两组均加入 200µg Y 重组蛋白，1mL 体系 4°C 过夜孵育后洗涤 3 次；
- ④洗脱：对照组和实验组各加入 100µL Elution buffer 洗脱，同时设置 Input 对照（50µg His-X 蛋白 + 50µg 重组蛋白）、Input 实验（50µg 空白对照蛋白 + 50µg Y 重组蛋白），后续用于检测分析。

使用流程/Procedure

1. 提取（选做，若为 2 个重组蛋白验证互作则不做蛋白提取步骤，从 2 步骤开始）

(1) 细胞样本

- ①洗涤：预冷的 1mLPBS 洗涤样品（约 2X10⁷ 个细胞）2 次，最后一次尽量吸干PBS；
- ②裂解：根据细胞量加入 990 µL Lysis buffer、10 µL Protease inhibitor（100×）冰上充分裂解 20~30min，每隔 5min 上下颠倒混匀 1 次；
- ③超声：用超声波细胞破碎仪超声 5min，功率 20%，超声 3s，间歇 3s，冰浴超声；
- ④离心：4°C12000rpm，10min，收集上清。

(2) 组织样本

- ①研磨：取新鲜组织或低温组织（约 0.3g），置于灭菌后预冷的研钵中，用液氮研磨至粉状；
 - ②裂解：取 990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor（r100X），混匀作为裂解液，吸取 800 μ L 裂解液加入研钵，在冰上继续研磨 5-10min至样品成细腻的匀浆状，转移至新的 1.5mL EP 管中，再向研钵中加入剩余的 200 μ L 裂解液收集残留的样品，同样转移至该 EP 管；
 - ③装有样品匀浆的 EP 管在冰上充分裂解 30min，每隔 5min 上下颠倒混匀 1 次；
 - ④超声：用超声波细胞破碎仪超声 8-10min，功率 20%，超声 3s，间歇 3s，冰浴超声；
 - ⑤离心：4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心10min，收集上清，再向上清中加入Lysis buffer 补充体积至1mL，混匀。
- 注意：蛋白提取整个过程都在冰上操作，减少高温造成的蛋白降解，超声过程中最好不要有气泡产生，减少蛋白降解。总蛋白放在 -20 $^{\circ}$ C 保存。**

2.His pull-down

磁珠准备

- ①将 Ni²⁺-NTA MagBeads 从 4 $^{\circ}$ C 冰箱取出，上下颠倒混匀数次，使磁珠和溶液混合均匀，分别取 30 μ L 到 2 个干净的 1.5mLEP 管中，记为对照和实验；
- ②加入0.5mL 预冷的 Washing buffer 重悬磁珠，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- ③重复步骤②2 次，共洗涤 3 次。

磁珠结合 His-X 蛋白

- ①往实验组加入200 μ g His-X 重组蛋白，对照管不加蛋白或加入200 μ g His 重组蛋白；用Incubation buffer 补足体积至1mL，室温静音混合孵育 2h；
- ②将 2 管置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- ③加入0.5mL 预冷的 Washing buffer，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- ④重复步骤③2 次，共洗涤 3 次。

诱饵蛋白结合互作蛋白 Y（除 His 标签外的其他重组蛋白或总蛋白）

- ①2 管分别加入200 μ g Y 重组蛋白或 500-1000 μ g 总蛋白，加 Incubation buffer 将体积补至1mL，4 $^{\circ}$ C 静音混合孵育过夜（约 16h）
- ②将 2 管置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- ③加入0.5mL 预冷的 Washing buffer，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- ④重复步骤 3) 2 次，共洗涤 3 次。

洗脱

- ①2 管均加入100 μ L Elution buffer，沸水浴 10min，12000rpm 离心5min，取上清，加入20 μ L 6X Loading buffer，沸水浴 8-10min，记为对照组和实验组；
- ②另取 2支干净的 1.5mL EP 管，分别记为 Input 对照组，Input 实验组，向 Input 对照组中加入GST 重组蛋白和 Y 重组蛋白各 50 μ g，向 Input 实验组中加入His-X 蛋白和 Y 重组蛋白各 50 μ g（若为总蛋白则加入100 μ L），加入1/5 体积 6X Loading buffer，沸水浴 8-10min。
- ③对照组、实验组、Input 对照、Input 实验置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.WB

各取 30 μ L 对照、实验、Input 对照、Input 实验，开展 SDS-PAGE 和 Westernblot 检测。

4. 银染（选做）

- ①取 30 μ L 对照、30 μ L 实验、2 μ L Input 对照、2 μ L Input 实验，开展 PAGE 凝胶电泳。
- ②固定：将电泳后的凝胶从玻璃板上剥离下来，清水冲洗干净，放入干净的直径 12cm 玻璃皿中，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，弃掉去离子水，加入固定液没过胶，盖上盖子，在脱

- 2) 色摇床上室温摇晃 5min, 弃掉去离子水, 加入固定液没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- 3) 致敏: 弃掉固定液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 5min, 重复水洗一次, 共 2 次, 加入致敏液没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- 4) 染色: 弃掉致敏液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 2min, 重复水洗一次, 共 2 次, 加入染色液没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 20min。
- 5) 显色: 弃掉染色液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 1min, 重复水洗一次, 共 2 次, 加入显色液没过胶, 在脱色摇床上室温摇晃 2min 左右, 溶液变浑浊, 弃掉液体, 加入新的显色液继续显色至目的条带清晰, 拍照。

5. 质谱 (选做)

取 30 μ L 对照和实验组蛋白样品开展 LC-MS 检测。

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。

