



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.....	3
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产品组、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	25ml	125ml
Balance/Wash Buffer	100ml	500ml
Elution Buffer	6ml	30ml
Pull-down Column Accessory	10套	50套

注：表格中标注的为填料实际体积(填料:保护液=1:1)，如0.15ml填料的混悬液体积为0.3ml。

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。所有缓冲液在使用前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤，缓冲液建议 4°C 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) 蛋白互作所用诱饵蛋白、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 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) 按菌体悬液总体积加入 1/1000 体积的 Lysis Buffer B(如 10ml 已裂解菌液加入 10μl Lysis Buffer B),混合均匀后,消化核酸反应 5-10min,反应后菌液应不粘稠。
- 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。

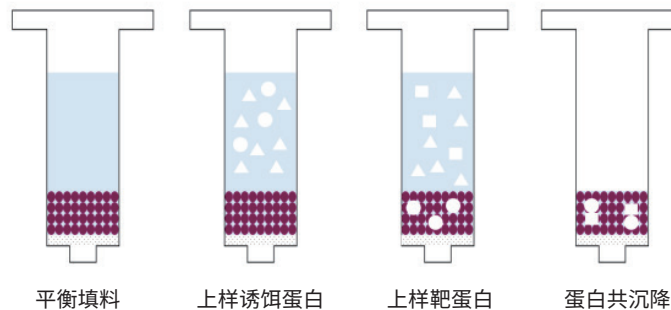
注: 如裂解终产物较为浑浊,或样品中目的蛋白丰度较低,可调整 Lysis Buffer A 的使用量。

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) 用预冷的 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 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,13000×g 离心 10min,去除细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中,准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 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 加入到装有垫片的 Pull-down Column Accessory 内管中(填料实际体积占悬液一半,即实际填料为 25μl)。
- 2) 取下红色堵头,可用掌上离心机或其他微量离心机 6000rpm 瞬时离心,去除填料保存液。
- 3) 堵住下堵头,每次取 500μl 的 Balance/Wash Buffer 加入到填料中,充分混匀填料与液体后,取下堵头瞬时离心,甩去管内液体并将液体丢弃,填料重复平衡 3-5 次后待用。

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

堵住下堵头,向上述平衡好的填料(步骤 2.3.1)中加入诱饵蛋白,如诱饵蛋白为纯样,根据填料载量推荐上样量为 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 Balance/Wash Buffer 稀释补充体积至 500μl,离心柱管最大装载体积为 800μl,室温混旋孵育 30min 以上。

注: 非离心时,离心柱管应用堵头封闭下出水口。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) 诱饵蛋白孵育完成后,取下堵头,将孵育完成的填料(步骤 2.3.2)瞬时离心甩干液体(上清留样,用于后续检测)。



- 2) 每次取 500μl 的 Balance/Wash Buffer 加入到孵育完成的填料中,充分混匀填料与液体后,进行瞬时离心,填料重复清洗 3-5 次后待用。
- 3) 如洗杂效果不佳,可加入 Wash Buffer Enhanced 进行增强洗杂,后续步骤清洗时,同样需要使用 Wash Buffer Enhanced。如果上一步清洗满足需求,可跳过此步骤。
- 4) 堵住下堵头,将带有靶蛋白的裂解液或离心后上清加入到清洗后的填料中,如需进行稀释,可用 Balance/Wash Buffer 将样本稀释至 500ul,室温孵育 1h 以上。
注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、1h-2h,或者 4°C、1h-16h,根据实际的蛋白互作效果进行调整。
- 5) 孵育完成后离心甩去液体(上清留样,用于后续检测),每次取 500μl 的 Balance/Wash Buffer 加入到孵育完成的填料中,充分混匀填料与液体后,进行瞬时离心,填料重复清洗 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 外管中进行。

2.4 洗脱

方案 I: 竞争 \ 酸 \ 变性洗脱

- 1) 本试剂盒提供 Elution Buffer, 其中含有 250mM 咪唑, 吸取 150μl-250μl Elution Buffer 加入到清洗好后的填料中,充分混匀填料与洗脱液后,进行离心,收集洗脱液。若洗脱不充分,则可进行多次洗脱。
- 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, pH 8.5 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。会使蛋白失活, 无法维持三维结构。

方案 II: 煮球

用 150μl-250μl Balance/Wash Buffer 或 Wash Buffer Enhanced 重悬填料, 直接将填料混合物取出添加 SDS Loading Buffer, 95-100°C 煮样 10min, 12000rpm 离心 10min 后取上清进行跑胶。

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, 请选择纯度较高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)。

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 标签表达无活性	优化表达条件
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在填料上	用 Wash Buffer Enhanced 进行增强洗杂
	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 对温度敏感的蛋白, 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