

说明书

His pull-down 试剂盒

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8805-20T	His pull-down 试剂盒	20 次
FI8805-40T	His pull-down 试剂盒	40 次

产品描述

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。

试剂盒组分

编号	名称	20T 规格	40T 规格	储存条件
①	His 标签纯化树脂	950 μ L	1.9 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	24 mL	48 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	70 mL	140 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	1.1 mL	2.2 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	600 μ L	1.2 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	10 mL 离心管	1 个	1 个	——

***注意：**该试剂盒包含足够完成 20 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。

额外所需材料

1. 自备试剂：表达 His-诱饵蛋白的大肠杆菌、PBS。
2. 所需仪器：低温离心机、混匀仪、超声仪（动物组织、植物和微生物样本裂解需要）。

使用说明

I 注意事项

1. 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。
2. 为保证树脂均匀分布，请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中树脂。
3. 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。
4. 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
5. 树脂的离心步骤需在低速条件下操作，离心速度大于 5000×g 可能会导致树脂聚集和再悬浮困难。
6. 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。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 操作步骤

1. His-诱饵蛋白制备

- (1) 离心收集已诱导表达可溶诱饵蛋白的大肠杆菌菌体沉淀约 50 μL ；
- (2) 加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 5000 g 离心 5 min，弃上清；
- (3) 重复上步操作两次，共漂洗三次；
- (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；
- (5) 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 待测蛋白制备

- (1) 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 $\times 10^7$ ~ 2 $\times 10^7$ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4 $^{\circ}\text{C}$ 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，用液氮充分研磨，再转移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，用液氮充分研磨，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 $^{\circ}\text{C}$ 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) a. 动物细胞或组织：为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清，若无超声条件，也可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀；
b. 动物组织、植物、原核表达菌：冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- (4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 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℃保存。

- * 注意:** i. 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。
- ii. 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。
- iii. 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 ③漂洗液、34 μL ⑤蛋白酶抑制剂 (按照 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①His 标签纯化树脂颠倒混匀, 每组取 45 μL ①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) 向树脂中加入表达 His-诱饵蛋白或 His 空载体的大肠杆菌裂解液 (步骤 1 制备), 混匀仪上 4 °C 孵育 1~2 h;
- (5) 4 °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;
- (2) 4 °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;
- (6) 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℃保存, 或直接用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

- * 注意:** i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱, 辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。
- ii. 洗脱后的树脂暂时不要丢弃, 如果洗脱效率低, 可以更换 SDS- PAGE 上样缓冲液洗脱法: 树脂直接加入 20 μL 2×上样缓冲液 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝) 煮沸 3 min, 12000 g 离心 30 s, 收集上清 (即调取产物); 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。
- iii. Pull-down 捕获的蛋白量通常较少, 因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色, 硝酸银染色步骤参考如下:

- (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 4.5 g, 72 μ L 甲醛, 加水至 180 mL);
- (7) 终止: 5 min (Na₂EDTA 2.19 g, 加水至 150 mL)。

问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的 His 重组蛋白含量低	蛋白质降解	裂解液中应加入足量的蛋白酶抑制剂
	His 重组蛋白无法结合树脂	重新提取蛋白
获得的复合物少	样本量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间 (如 4℃ 孵育过夜)
多条非特异条带	非特异性的蛋白结合在树脂上	增加漂洗时间和次数
		在裂解缓冲液和洗脱缓冲液中加入 50-350 mM NaCl

使用案例

实验目标: 检测样本中的诱饵蛋白与猎物蛋白之间是否有相互作用。

- (1) 实验组: His-诱饵蛋白 (His-Bait) 与待测样本蛋白孵育;
- (2) 对照组: His 蛋白与待测样本蛋白孵育。

