



# 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	3
6. 相关产品	3

## 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 NTA 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 NTA 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 NTA Beads 6FF 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	10 mM $\beta$ -mercaptoethanol <sup>1</sup>
变性剂	8 M urea
	6 M Gua-HCl
去污剂	1% Triton™ X-100 (nonionic)
	1% NP-40 (nonionic)
	1% CHAPS (zwitterionic), SDS, sarcosyl
其他类	500 mM imidazole <sup>2</sup>
	30% ethanol <sup>3</sup>
	20% glycerol
	500 mM KCl
	1 M NaCl

### Note:

1. 不要将介质保存在含有  $\beta$ -mercaptoethanol 的缓冲液中;
2. 过高浓度的咪唑可能会降低蛋白回收率;
3. 乙醇有可能造成蛋白沉淀，降低蛋白回收率和堵柱子。

本产品可广泛应用于大肠杆菌裂解物、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 组分

组分名称	规格 (5 T)	规格 (25 T)
Co NTA Beads 6FF	0.15 ml	0.75 ml
铁锤超级裂菌液	5 ml	25 ml
Wash Buffer Enhanced	25 ml	125 ml
Balance/Wash Buffer	100 ml	500 ml
Elution Buffer	6 ml	30 ml
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。所有缓冲液在使用前建议用 0.22  $\mu$ m 或 0.45  $\mu$ m 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×): 0.3 M 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。

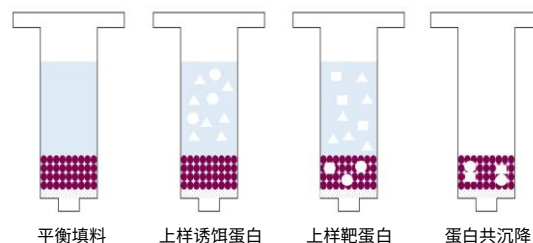
## 2.2 样品准备

### 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: 1 g 菌体加入 9 ml), 震荡完全分散菌体, 加入铁锤超级裂菌液(添加比例: 1 g 菌体加 1 ml)。混合均匀后室温裂解 5-10 min, 菌体悬液反应后菌液应不粘稠, 呈稀水状。
- 2) 按照适当方法离心(例如: 12000 rpm, 5-10 min), 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粘稠, 或样品中目的蛋白丰度较低, 可调整铁锤超级裂菌液的使用量和裂解时间。

## 2.3 蛋白互作



蛋白互作操作流程

### 2.3.1 填料平衡

- 1) 将 Co NTA Beads 6FF 充分混匀, 取 50  $\mu$ l 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 25  $\mu$ l)。
- 2) 取下红色堵头, 可用掌上离心机或其他微量离心机 6000 rpm 瞬时离心, 去除填料保存液。
- 3) 堵住下堵头, 每次取 500  $\mu$ l 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 250  $\mu$ g, 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 500  $\mu$ l, 离心柱管最大装载体积为 800  $\mu$ l, 室温混旋孵育 30 min 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、30 min-2 h, 或者 4 °C、1-16 h, 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 500  $\mu$ l 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 500  $\mu$ l, 室温孵育 1 h 以上。

注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、1-2 h, 或者 4 °C、1-16 h, 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 500  $\mu$ l 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

### 方案一 竞争/酸/变性洗脱

- 1) 本试剂盒提供 Elution Buffer, 其中含有 250 mM 咪唑, 吸取 150-250  $\mu$ l 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 1 M 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。

**方案二 煮球**

用 150-250 µl 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 10 min, 12000 rpm 离心 10 min 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 10-20 mM)。
- 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	优化裂菌液 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**

名称	货号	规格
His Protein Pull Down Kit	BK0055-t	5 T
	BK0055-01	25 T

**6. 相关产品**

类型	名称	货号
GST Protein Pull Down Kit	BK0054-t	5 T
	BK0054-01	25 T