

## 说明书

## His pull-down 试剂盒

货号	描述
<b>FI8807-24T</b>	His pull-down 试剂盒，包含足够完成 24 个反应的试剂，每个反应用 45 $\mu$ L 树脂。由于每次 pull-down 需要设置实验组和对照组，因此本试剂盒可以完成 12 次 pull-down 实验。

## 试剂盒组分

编号	试剂名称	体积 (24 Tests)	储存条件
①	His 标签纯树脂	1.1 mL	4°C, 1 年
②	裂解缓冲液	28 mL	4°C, 1 年
③	漂洗液	90 mL	4°C, 1 年
④	洗脱缓冲液	1.3 mL	4°C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	700 $\mu$ L	-20°C, 1 年

## 目录

I 产品简介 .....	1
II 重要产品信息 .....	1
III 额外所需的主要材料和仪器 .....	2
IV 操作方法 .....	2
V 问题解决 .....	4
VI 使用案例 .....	4

## I 产品简介

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。

## II 重要产品信息

- 请勿干燥或冷冻树脂，这些操作会导致树脂聚集而降低结合能力。
- 由于煮沸会导致树脂聚集并且失去结合能力，经煮沸的树脂不应再次使用。
- 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。

### III 额外所需的主要材料和仪器

- **自备材料：**表达 His-诱饵蛋白的大肠杆菌、PBS。
- **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）。

### IV 操作方法

#### \*注意：

- 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。
- 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，因而可能需要优化才能得到最大产量。
- 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。

#### 4.1 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  $\mu\text{L}$ ，加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀；4 $^{\circ}\text{C}$  5000 g 离心 5 min，去除上清；重复该漂洗操作两次。
- (2) 向菌体中加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加），吹打混匀，超声破碎至溶液基本澄清。
- (3) 4 $^{\circ}\text{C}$  12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30  $\mu\text{L}$  作为 bait-input，剩余用于 pull-down 实验，-80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 4.2. 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，彻底去除培养基成分，4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g 离心 5 min 收集沉淀
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
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨
原核表达菌	50 $\mu\text{L}$ 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 $^{\circ}\text{C}$ 5000 g 离心 5 min 收集沉淀

- (2) 样本加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加），吹打混匀。
- (3) a. 动物细胞：置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）；为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清。  
b. 动物组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）。  
c. 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  $\mu\text{L}$  作为 prey-input，剩余用于 pull-down 实验，-80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

\* **注意：**根据经验，提取的样本蛋白量约 2~3 mg；如果样本中目标蛋白丰度较低，或目标蛋白间结合较弱，也可以增加初始样本量；300  $\mu\text{L}$  为裂解缓冲液的最小使用体积，当样本增加时，裂解液缓冲液可等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3。超声条件因样本类型和超声设备而异，可提前摸索好合适的条件。

### 4.3 漂洗液准备

取出试剂盒中的 10 mL 离心管（空管），加入本次实验 2 组样本（实验组+对照组）所需的 7 mL ③漂洗液、35  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

### 4.4 His-诱饵蛋白纯化

- (1) 每组实验取 45  $\mu$ L ①树脂，加入 200  $\mu$ L 漂洗液（4.3 制备），颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清。
- (2) 再次加入 200  $\mu$ L 漂洗液（4.3 制备），颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清。
- (3) 向树脂中加入含 His-诱饵蛋白的大肠杆菌裂解液（4.1 制备），放混匀仪上 4  $^{\circ}$ C 孵育 1~2 h。
- (4) 4  $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清。
- (5) 加入 500  $\mu$ L 漂洗液（4.3 制备），颠倒混匀 30 次，4  $^{\circ}$ C 500g 离心 5 min，弃上清；重复该漂洗操作两次，得到纯化的 His-诱饵蛋白树脂。

### 4.5 His pull-down

- (1) 向上步树脂中加入待测样本裂解液（4.2 制备），放混匀仪上室温孵育 3 h 或 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- (2) 4  $^{\circ}$ C 500 g 离心 5min，弃上清。
- (3) 加入 500  $\mu$ L 漂洗液（4.3 制备），颠倒混匀 30 次，4  $^{\circ}$ C 500g 离心 5 min，弃上清；重复该漂洗操作两次。
- (4) 加入 50  $\mu$ L 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。
- (5) 4  $^{\circ}$ C 12000 g 离心 5 min，收集上清至新的离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存，或直接用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

\* 注意：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  $\mu$ L 甲醛，加水至 180 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

## V 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

## VI 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。

