

货号	名称	规格	存储
F1605-20	His Pull-Down 试剂盒	20T	-20℃
F1605-40	His Pull-Down 试剂盒	40T	-20℃

### 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。

### 试剂盒成分

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

**\*注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 45  $\mu$ 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. 自备材料：表达 His-诱饵蛋白的大肠杆菌（或纯化的 His-诱饵蛋白）、表达 His 空载体的大肠杆菌、PBS。
2. 所需仪器：混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

### 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，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀树脂。
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，请将移液枪枪头尖端剪掉 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 $\times$ 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) 取已诱导表达可溶性 His-诱饵蛋白或 His 空载体的大肠杆菌菌液，4℃ 5000g 离心 5 min，收集大约 50  $\mu$ L 菌体沉淀；
- (2) 加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀，4℃ 5000 g 离心 5 min，弃上清；
- (3) 重复上步操作两次，共漂洗三次，尽量吸干液体；
- (4) 将样本置于冰上，向菌体中加入 500  $\mu$ L 预冷的②裂解缓冲液、5  $\mu$ L 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℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30  $\mu$ L 作为 bait-input，剩余用于 pull-down 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

**\* 注意：**如果已经有纯化好的 His-诱饵蛋白，则跳过此步骤。

## 2. 待测蛋白制备

(1) 待测样本分别按照如下方法收集和处理：

样本类型	样本量	收集方法
动物细胞	$1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4℃ 500g 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	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
原核表达菌	50 $\mu$ L 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4℃ 5000g 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  $\mu$ L 预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）， 吹打混匀；

(3) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；

(4) 4℃ 12000g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30  $\mu$ L 作为 prey-input，剩余上清平分为两份用于 RNA pull-down 实验（记为实验组和对照组），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。

iii. 如果样本中目标蛋白或 RNA 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

为了防止实验过程中的蛋白降解，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  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 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，实验组和对照组各取 45  $\mu$ L①树脂到新的离心管中；

(2) 每组加入 200  $\mu$ L 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) 向实验组树脂中加入表达 His-诱饵蛋白的大肠杆菌裂解液（步骤 1 制备）或 20  $\mu$ g 纯化好的 His-诱饵蛋白，向对照组树脂中加入表达 His 空载体的大肠杆菌裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上 4℃ 孵育 1~2 h；

(5) 4℃ 500 g 离心 5 min，弃上清；

(6) 每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，4℃ 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℃ 孵育过夜；

(2) 4℃ 500 g 离心 5min，弃上清；

(3) 每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，4℃ 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  $\mu$ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 15 min；
- (6) 涡旋震荡 20 s，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 Westernblot、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。

ii. 如果洗脱效率低，可以更换 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法：漂洗后的树脂直接加入 50  $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 3 min，12000 g 离心 30 s，收集上清（即调取产物）至新的离心管中；该洗脱产物可以用于 SDSPAGE 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，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 3.75 g，60  $\mu$ L 甲醛，加水至 150 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub> EDTA 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
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间（如孵育过夜），但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
非特异结合的蛋白多	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。

