

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 μL	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 μL	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 μL 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

- 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。
- 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

- 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。
- 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。
- 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。
- 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
- 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。
- 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。
- 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

- 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 μL 菌体沉淀；
- 加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀，4℃ 5000 g 离心 5 min，弃上清；
- 重复上步操作两次，共漂洗三次，尽量吸干液体；
- 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；
- 4 ℃ 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℃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	1×10 ⁷ ~2×10 ⁷ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 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 μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 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 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) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；

(4) 4°C 12000g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μL 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°C 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 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多个样本，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 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 μg 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 °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 5 min，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 μ 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 °C 12000 g 离心 5 min，收集上清至新的离心管中，-80°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 μ L 1×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 μ L 甲醛，加水至 150 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na₂ 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。

