

His-Tag Protein Pull-down Kit

货号：NR3162C

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 试剂盒操作流程.....	2
3. 操作步骤.....	3
4. 产品注意事项	5
5. 常见问题.....	5

1. 产品介绍

His-Tag 蛋白 Pull-down 试剂盒利用组氨酸标签 (His-Tag) 与镍离子 (Ni^{2+}) 的高亲和力作用原理进行蛋白质相互作用研究。将带有 His 标签的目的蛋白 (诱饵蛋白) 通过其 His 标签, 特异性结合到固相化在介质上的镍离子 (Ni^{2+}) 上。当含有潜在相互作用蛋白 (靶蛋白) 的样品溶液 (如细胞裂解液、组织裂解液、分泌上清等) 流经固定有诱饵蛋白的介质时, 能与诱饵蛋白特异性结合的靶蛋白会被捕获并滞留在介质上。通过特定的洗脱条件将捕获的蛋白质复合物 (诱饵蛋白-靶蛋白) 或单独的靶蛋白从介质上洗脱下来。洗脱产物可直接用于后续的 Western blot 检测或质谱分析, 以鉴定和验证与诱饵蛋白相互作用的蛋白。

本试剂盒适用于多种生物样品来源的 Pull-down 实验, 包括但不限于: 细胞裂解液、细胞分泌上清、动物组织裂解液、植物组织裂解液、微生物裂解液等。具体组分见表 1。

表 1. His-Tag Protein Pull-down Kit 组分

名称	20 Tests 规格	40 Tests 规格	储存条件
Ni-NTA His-Tag Purification			
Agarose Resin	950 μ L	1.9 mL	4°C, 1 年
Lysis Buffer	24 mL	48 mL	4°C, 1 年

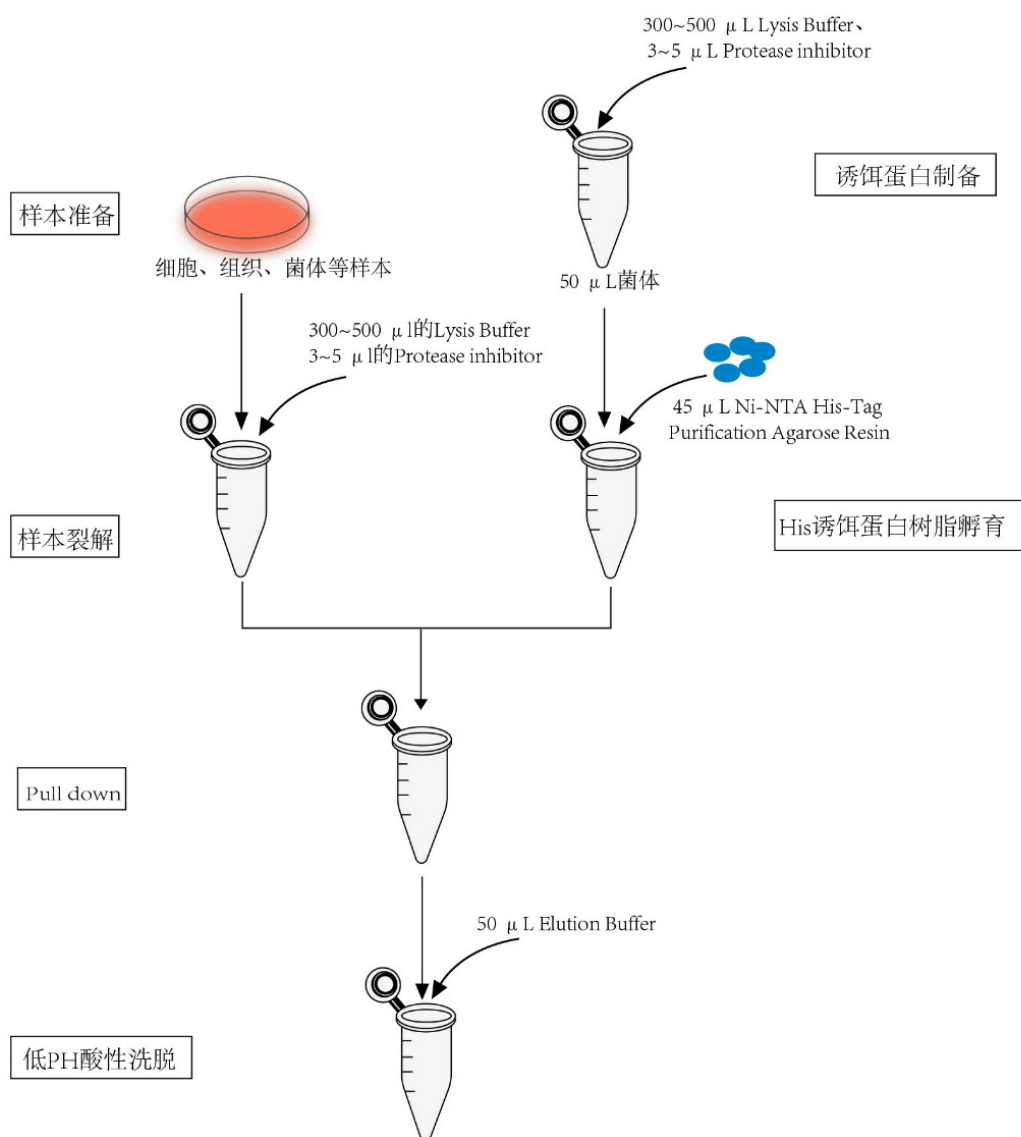
Wash Buffer	70 mL	140 mL	4°C, 1 年
Elution Buffer	1.2mL	2.2 mL	4°C, 1 年
Protease inhibitor	600 μ L	1.2 mL	-20°C, 1 年

请注意，本试剂盒不包含所有必需试剂/耗材，请参照清单另行准备：

自备试剂：① 表达 GST-诱饵蛋白的大肠杆菌；② PBS 缓冲液；③ 上样缓冲液；

自备仪器：① 超声仪；② 低温离心机；③ 混匀仪；

2. 试剂盒操作流程图



3. 操作步骤

3.1 样本准备

3.1.1 诱饵蛋白制备

- (1) 取已诱导可溶表达诱饵蛋白的大肠杆菌菌液，4000g 离心 10min，去除上清培养基，菌液沉淀要求量约 50 μL ；
- (2) 加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀；4°C 5000 g 离心 5 min，去除上清；重复该漂洗操作两次；
- (3) 向菌体加入 300~500 μL 预冷的 Lysis Buffer、3~5 μL Protease inhibitor（Lysis Buffer 和 Protease inhibitor 按 1:100 添加），吹打混匀，超声破碎至溶液基本澄清。
- (4) 4°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，-80°C 保存。

3.1.2 样本准备

(1) 贴壁细胞样本

吸净培养容器中的培养基，并加入 PBS 后用细胞铲将细胞刮入离心管中（或加入适量 PBS 清洗 1 次细胞后用胰酶消化细胞，加入血清终止反应后收集于离心管中），离心去掉上清，再加入 PBS 清洗细胞 2 次，离心后去除上清收集沉淀样本，细胞总量不低于 10^7 个。

(2) 悬浮细胞样本

将细胞悬液转移至样品管中，离心弃掉上清。去除上清后用 PBS 清洗细胞 2-3 次，直至把所有的培养基去除干净，细胞总量不低于 10^7 个。

(3) 动物组织样本

组织离体 15 分钟内，立即将其用消毒过的刀具切成黄豆大小（直径约 0.5cm）的小块，用 PBS 或生理盐水洗血液、体液等影响实验结果的残留成分，于液氮中进行充分研磨，样本量为 100~200 mg。

(4) 植物组织样本

组织样本用无菌双蒸水清洗干净，于液氮中进行充分研磨，样本量为 200~300 mg。

(5) 微生物样本

将微生物样本悬液转移至样品管中离心，去除上清培养基，再用 PBS 清洗三次，清洗干净后，4°C 5000 g 离

心 5 min 收集沉淀，将微生物沉淀转移至 1.5ml 的 EP 管中，样本量不低于 50 μ L 菌体沉淀。

3.2 样本裂解

(1) 样本加入 300~500 μ L 预冷的裂解缓冲液、3~5 μ L 蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加），吹打混匀。

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、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(2) 于 4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；-80 $^{\circ}$ C 保存。收集得到的样本可取 30 μ L 作为 Prey-input，剩余用于 Pull down 实验。

* 注意：当样本不能完全裂解时，可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。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 μ 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，可提前摸索合适的条件。

3.3 漂洗液准备

取出 10 mL 离心管，加入 36mL Wash Buffer、18 μ L Protease inhibitor（蛋白酶抑制剂与漂洗液按 1:200 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

* 注意：本次实验为 1 组用量，如设计多组样本，请按照实际使用量配置。

3.4 HIS 诱饵蛋白制备

(1) 每组实验取 45 μ L HIS 标签树脂，加入**步骤 3.3 制备的** 200 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清。

(2) 再次加入**步骤 3.3 制备的** 200 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清。

(3) 向 HIS 标签树脂中加入含**步骤 3.1 制备的** HIS-诱饵蛋白裂解液，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**步骤 3.3 制备的** 500 μ L 漂洗液，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。

3.4 HIS Pull-down

(1) 向**3.4 制备的**树脂中加入**步骤 3.2 制备的**样本裂解液，放混匀仪上室温孵育 3 h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

(2) 4 °C 500 g 离心 5min, 弃上清。

(3) 加入**步骤 3.3 制备**的 500 μ L 漂洗液 (4.3 制备), 颠倒混匀 30 次, 4 °C 500g 离心 5 min, 弃上清; 重复该漂洗操作两次。

(4) 加入 50 μ L Elution Buffer, 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 °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 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

4. 产品注意事项

- 在进行实验设计时, 建议加入对照组, 方便后续实验结果分析;
- 请勿使磁珠干燥、冷冻或剧烈涡旋, 会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 经煮沸后会导致树脂聚集并且失去抗体结合能力, 经煮沸的树脂不应再次使用。
- 为保证最佳的实验结果, 请选择特异性较强的抗体进行实验。
- 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。

5. 常见问题

Q: 获得的诱饵蛋白量少, 怎么解决?

- (1) HIS 重组蛋白无法结合树脂, 建议重新提取蛋白。
- (2) 样品中的诱饵蛋白含量低, 提高样本用量。
- (3) 蛋白被降解, 建议针对温度敏感的抗原, 尽量在 4°C或冰浴条件下进行实验操作

Q: 获得的复合产物少的原因有哪些? 怎么解决?

- (1) 样本量较少, 可通过提高样本用量或增加样本量与抗体磁珠的比例来解决;
- (2) 孵育时间较短, 可延长孵育时间, 但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多;
- (3) 蛋白质降解, 裂解液中应加入足量的蛋白酶抑制剂;
- (4) 洗脱条件过于温和, 建议延长洗脱液孵育时间至 15 min 或直接采用 SDS- PAGE 上样缓冲液洗脱。

Q: 诱饵蛋白条带大小与抗体非特异性条带重叠了, 怎么解决?

诱饵蛋白的分子量大约是 50kDa 或 25Kd, Western blot 选择特异性抗重链或轻链的二抗, 或 Western blot 选择与 RIP 实验不同种属的抗体。

问题	原因分析	解决方案
获得的 HIS 重组蛋白	蛋白质降解	裂解液中应加入足量的蛋白酶抑制剂
含量低	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	抗原的分子量大约是 50kDa	Western blot 选择特异性抗重链或轻链的二抗
	或 25kD	Western blot 选择与 IP 实验不同种属的抗体
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	孵育时间不足	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磁珠	增加漂洗时间和次数
	上	在裂解缓冲液和洗脱缓冲液中加入 50-350 mM NaCl