

# 化合物 pull-down 试剂盒（动物）

## Biotin-Labeled Molecule Pull-Down Kit

### 产品信息

货号	产品名称	规格
FI8601-12T	Biotin-Labeled Molecule Pull-Down Kit	12 次
FI8601-24T	Biotin-Labeled Molecule Pull-Down Kit	24 次

### 产品描述

辉骏生物生产的化合物 Pull-Down 试剂盒采用链霉亲和素磁珠来高效调取生物素标记的小分子化合物及其结合蛋白。

本试剂盒利用链霉亲和素磁珠捕获生物素标记的小分子化合物，再与待测动物样本蛋白孵育，洗涤去除未结合的蛋白，即可得到目标化合物的结合蛋白；之后可以采用 Western Blot 技术检测特定蛋白，也可以采用质谱（LC-MS/MS）技术鉴定未知蛋白。

### 试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	链霉亲和素磁珠	500 $\mu$ L	1 mL	4°C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4°C, 1 年
③	漂洗液	45 mL	90 mL	4°C, 1 年
④	洗脱缓冲液	650 $\mu$ L	1.3 mL	-20°C, 1 年
⑤	增强型蛋白酶抑制剂	290 $\mu$ L	580 $\mu$ L	-20°C, 1 年
⑥	10 mL 离心管	1 个	1 个	——

**\*注意：**该试剂盒包含足够完成 12 或 24 个反应的试剂，每个反应使用 40  $\mu$ L 磁珠。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：生物素标记的小分子化合物、单生物素、PBS。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 FI7101）、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、冷冻或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 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。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### II 操作方法

#### 1. 样本总蛋白提取

##### 1.1 动物细胞

- (1) 实验组和对照组一共取  $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$  个细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞 2~3 次，每次  $4^\circ\text{C}$  500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；
- (2) 将样本管置于冰上，加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- (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 input，剩余上清平分为两份用于 pull-down 实验（记为实验组和对照组），置于冰上备用或  $-80^\circ\text{C}$  保存。

##### 1.2 动物组织

- (1) 采集新鲜组织，切为小块，用预冷的 PBS（RNase-free）清洗组织 2~3 次，彻底去除血液等成分，放入液氮中迅速降温， $-80^\circ\text{C}$  冷冻保存或直接进行下步操作；
- (2) 实验组和对照组一共取 0.2~0.4 g 干净的组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的新离心管中；
- (3) 将样本管置于冰上，加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- (5)  $4^\circ\text{C}$  12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余上清平分为两份用于 pull-down 实验（记为实验组和对照组），置于冰上备用或  $-80^\circ\text{C}$  保存。

#### \* 注意：

- i. 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。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 1~3 mg。
- ii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，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。

## 2. 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 6.7 mL ③漂洗液、33.5  $\mu$ 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，按照实际使用量配置。

## 3. 磁珠准备

- (1) 将①链霉亲和素磁珠颠倒混匀，取实验组和对照组总共所需的 80  $\mu$ L 磁珠；
- (2) 加入 600  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次；放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作一次；
- (4) 加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），上下颠倒重悬磁珠；
- (5) 将磁珠平分为两份，每组各约 250  $\mu$ L，记为实验组和对照组。

## 4. 小分子化合物 pull-down

- (1) 将 10~100 $\mu$ g 生物素标记的小分子化合物（实验组）或单生物素（对照组）加入磁珠（步骤 3 准备）中，混匀仪上室温孵育 1 h；
- (2) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (4) 重复上步操作一次；
- (5) 加入样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h；
- (6) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (8) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

## 5. 蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

- (1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50  $\mu$ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s；放磁力架上静置 1 min，收集上清至新离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- (2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50  $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95  $^{\circ}$ C 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

### \* 注意：

- i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱，辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。
- ii. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。

iii. Pull-down 捕获的蛋白量较少，SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤参考如下：

（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）

- (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）。

## 常见问题

问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本或蛋白量不够	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
	小分子化合物的量不够	提高化合物用量
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数，或样本预处理：先与磁珠孵育，去除非特异结合蛋白