

生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)

产品编号	产品名称	包装
P0654S	生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)	25次

产品简介:

- 碧云天研发生产的生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Agarose Resin), 即Biotinylated Protein Pull-Down Kit (Agarose Resin), 是一种新型、高效的先将感兴趣的带有生物素标记的蛋白、抗体或其它活性生物分子, 与链霉亲和素琼脂糖树脂结合, 然后用于捕获与感兴趣的蛋白、抗体或其它活性生物分子相互作用的靶蛋白或其它结合分子的试剂盒。本试剂盒也可以用于生物素标记蛋白复合物的Pull-down和洗脱。本试剂盒可以在酸性条件下洗脱结合的靶蛋白或其它结合分子。本试剂盒可用于研究已知蛋白(也称诱饵蛋白/Known protein/Bait)与拟发现的目标蛋白(也称猎物蛋白/Target protein/Prey)或已知蛋白与DNA、RNA或其它分子之间的相互作用, 或用于确认已知的蛋白与蛋白等生物分子间的相互作用。
- 生物素(Biotin)是一种天然存在的小分子, 它的存在很多情况下不会影响大分子的生物学功能。生物素广泛应用于生物素-(链霉)亲和素系统(Biotin-(strept)avidin system), 同时生物素也是羧化酶的重要辅因子, 存在于各种代谢途径中[1-2]。生物素与亲和素(Avidin)或链霉亲和素(Streptavidin)的结合有助于将目标分子(抗体、核苷酸、蛋白A等)与标记系统(酶、荧光探针等)连接起来。这种复合物可以用于多种检测体系, 例如免疫沉淀、免疫组织化学、流式细胞分析、Southern和Northern等。同时, 这种方法也适用于各种目标分子的纯化和表征。
- 本试剂盒提供了用于结合标记蛋白等生物分子上的生物素标签的链霉亲和素琼脂糖树脂(Streptavidin Agarose Resin), 封闭液(Biotin Blocking Solution)、洗涤液(Wash Buffer)以及洗脱液(Elution Buffer)等试剂。生物分子的生物素标记推荐使用碧云天生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS) (P0632)或Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法) (P0630), 标记后的生物分子与链霉亲和素琼脂糖树脂具有亲和力, 在二者高特异性结合后, 加入目标蛋白样品(Prey)进行孵育。洗涤去除未结合的组分后, 最后使用酸性洗脱液进行洗脱, 即可获得包含生物素标记蛋白与目标蛋白或其它生物分子的洗脱液, 从而后续就可以通过Western、质谱分析、PCR、DNA测序等分析鉴定结合的目标蛋白或其它生物分子。本产品以体外标记的生物素蛋白与目标蛋白相互作用为示例的实验流程和原理图如1所示。本试剂盒如果用于生物素标记蛋白复合物的Pull down和洗脱, 实验流程会更加简单便捷。

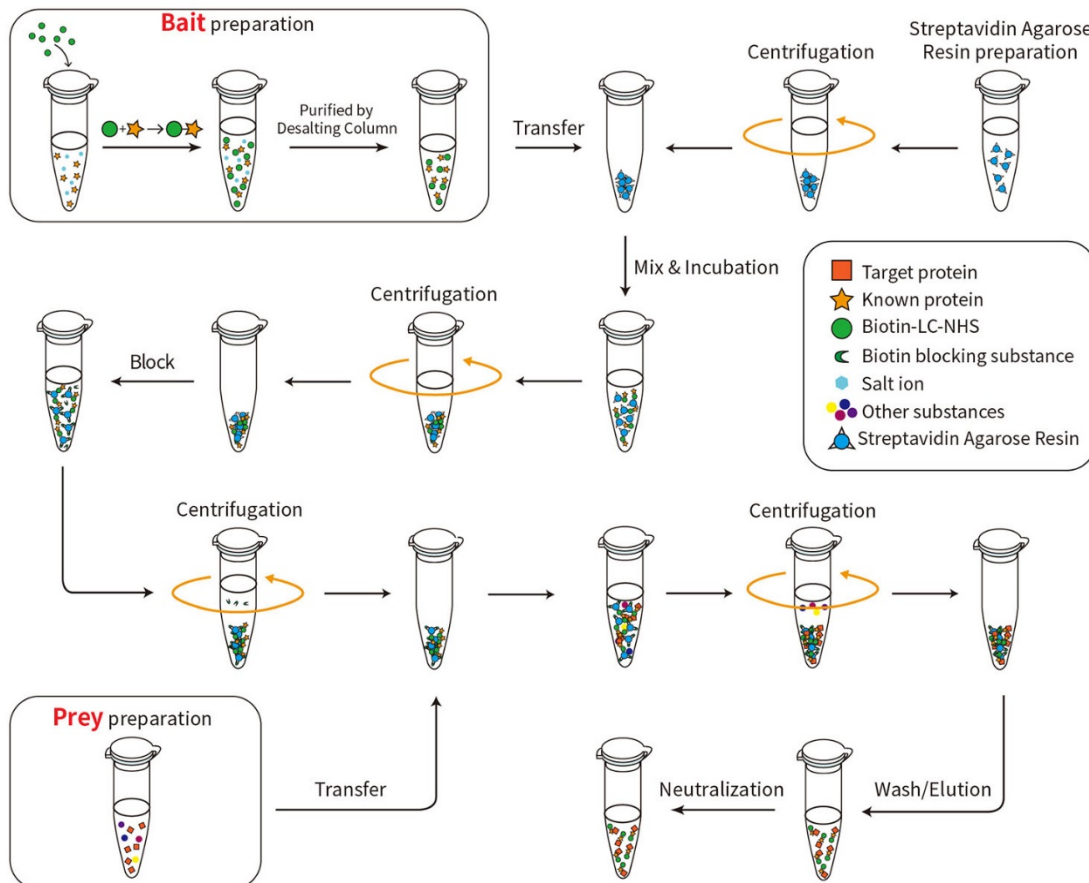


图1. 碧云天生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Agarose Resin) (P0654)以蛋白与蛋白相互作用为示例的简易实验流程和原理示意图。本试剂盒如果用于生物素标记蛋白复合物的Pull down和洗脱, 实验流程会更加简单便捷。

- **本试剂盒结合速度快、操作简单。**本试剂盒提供的Streptavidin Agarose Resin可以快速结合生物素标记的生物分子, 结合量高; 提供结合、洗涤和洗脱生物素标记生物分子及其结合的目标蛋白或其它生物分子所需的所有试剂, 操作简单。
- **本试剂盒特异性强、洗脱效率高。**本试剂盒提供的Streptavidin Agarose Resin可对生物素标记的样品快速进行高特异性分离纯化, 并通过酸性洗脱液实现高效洗脱。
- 本试剂盒小包装可进行25次Pull-down实验(每次50 μ l Streptavidin Agarose Resin)。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0654S-1	Streptavidin Agarose Resin	1.5ml
P0654S-2	Binding Buffer	50ml
P0654S-3	Biotin Blocking Solution	10ml
P0654S-4	Wash Buffer	50ml
P0654S-5	Elution Buffer	10ml
P0654S-6	Neutralization Buffer	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。Streptavidin Agarose Resin如果4 $^{\circ}$ C保存, 至少半年有效。

注意事项:

- Streptavidin Agarose Resin使用前要适当充分重悬, 即颠倒若干次使琼脂糖凝胶混合均匀, 混匀操作须轻柔, 不宜剧烈涡旋震荡等, 避免蛋白变性、琼脂糖凝胶破碎等。
- 建议设置阴性和阳性对照组, 以排除Streptavidin Agarose Resin非特异性吸附的干扰。
- 蛋白的生物素化标记推荐使用碧云天生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS) (P0632)或Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法) (P0630), 也可以通过Avi标签和BirA体系等技术方法进行细胞或动物的活体内标记。
- 待结合分子的类型、大小及生物素标记方式和程度等都会影响结合效率, 建议通过梯度稀释法来确定每种具体应用的琼脂糖凝胶用量, 同时可以考虑加大琼脂糖凝胶用量至待结合分子2-3倍摩尔数量以确保结合充分。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 准备工作。

- 将待标记的已知蛋白溶解在1X PBS里, 使蛋白终浓度为0.2-2mg/ml。如果溶液里有伯胺(如Tris或Glycine)或者铵离子, 推荐使用碧云天脱盐柱(P2603/P2605)进行脱盐处理。
- 已经标记好的蛋白确保去除游离生物素后可以直接使用, 建议标记后蛋白浓度0.5-2mg/ml, 如果浓度过高或者为冻干粉末状态可以用Binding Buffer进行稀释。

2. 生物素标记反应和纯化。

生物的标记和纯化推荐参考碧云天生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS) (P0632)的使用说明。

注: 如果使用Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法) (P0630), 请按照该试剂盒的说明进行。

3. Streptavidin Agarose Resin和生物素标记蛋白等样品的结合。

- Streptavidin Agarose Resin的准备: 充分颠倒混匀Streptavidin Agarose Resin, 转移所需的体积到新的1.5ml离心管中, 通常每个样品需50 μ l Streptavidin Agarose Resin (悬浊液), 其中含有25 μ l Streptavidin Agarose Resin (沉淀物)。注1: 每1ml Streptavidin Agarose Resin溶液含有0.5ml Streptavidin Agarose Resin沉淀。注2: 转移时所使用的吸头需剪去顶端以便顺利吸取Streptavidin Agarose Resin。
- 500 \times g离心5分钟, 小心移去上清, 不要触到底部沉淀。
- 使用500 μ l Binding Buffer重悬Streptavidin Agarose Resin, 500 \times g离心5分钟, 小心移去上清, 吸头不要触到底部沉淀。重复本步骤1次。
- 样品结合: 加入50-200 μ l已生物素标记并纯化的样品(步骤2), 通常50 μ l Streptavidin Agarose Resin (悬浊液)的结合量为10-100 μ g蛋白, 不宜超过100 μ g, 颠倒混匀并翘板摇床摇动孵育30分钟。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。
- 孵育结束后, 500 \times g离心5分钟, 保留Streptavidin Agarose Resin并收集上清。可通过测定上清中蛋白浓度或者进行SDS-PAGE分析来大致确定Streptavidin Agarose Resin结合标记的已知蛋白样品的量。
- 洗涤: 使用500 μ l Wash Buffer重悬Streptavidin Agarose Resin, 500 \times g离心5分钟, 小心移去上清, 吸头不要触到底部沉淀。重复本步骤1次。洗涤后可以用于后续的封闭实验。如果是对于生物素标记复合物的Pull down, 可以直接进入到后续的洗脱步骤5。

4. Streptavidin Agarose Resin复合物的封闭。

- 封闭：加入250µl Biotin Blocking Solution到步骤3f管子里，室温颠倒混匀并翘板摇床摇动孵育5-10分钟。
- 500×g离心5分钟，小心移去上清，不要触到底部沉淀。
- 洗涤：使用250µl Binding Buffer重悬Streptavidin Agarose Resin复合物，500×g离心5分钟，小心移去上清，吸头不要触到底部沉淀。重复本步骤2次，即共洗涤3次。

5. 目标蛋白等的Pull-Down和复合物的洗脱。

- 加入50-400µl样品裂解液(或其它含有目标蛋白等的样品)到步骤4c的Streptavidin Agarose Resin中，轻轻吹打混合均匀。
注：选择合适的裂解液，用于制备细胞或组织的裂解液。优先推荐碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)用于细胞或组织样品的裂解。根据特定的实验目的，如有必要，也可以使用碧云天生产的RIPA裂解液(强) (P0013B)、RIPA裂解液(中) (P0013C)或RIPA裂解液(弱) (P0013D)用于样品的制备。如果使用自行配制的或其它公司生产的裂解液，需要确保裂解液的pH为6-8。细胞或组织裂解时，请注意添加适当的蛋白酶抑制剂以避免蛋白降解。
- 4°C翘板摇床摇动孵育至少1小时，不可涡旋混合。
注：更高的结合量需要更长的孵育时间，每种蛋白的孵育时间需要自行摸索。如果目的蛋白比较稳定并且裂解液稳定，孵育也可以在室温进行，但室温的孵育时间不宜过长。
- 孵育结束后，500×g离心5分钟收集上清用于后续分析。吸取上清时，吸头不要触到底部沉淀。
- 使用250µl Wash Buffer重悬Streptavidin Agarose Resin，500×g离心5分钟，小心收集上清，用于后续使用。吸头不要触到底部沉淀。重复本步骤2次，即共洗涤3次。
- 加入50µl的Elution Buffer重悬Streptavidin Agarose Resin沉淀，摇床缓慢摇动洗脱5-10分钟，以洗脱所捕获的目标蛋白等。
- 500×g离心5分钟，收集洗脱液，吸头不要触到底部沉淀。重复步骤5e-f 2次，即共洗脱3次，获得的洗脱液即为目标蛋白。第一次洗脱得到的复合物浓度最高，最后一次的最低，可根据实验需求取单次或混合后的洗脱样品进行后续的实验。
- 洗脱液中立即加入Neutralization Buffer，推荐体积比例为Elution Buffer : Neutralization Buffer = 10:1。洗脱获得的样品置于4°C待用，或者-20°C长期保存。
注1：Elution Buffer进行洗脱，就有可能发生链霉亲和素脱落，需注意孵育时间不要超过10分钟。
注2：Elution Buffer能破坏绝大部分的抗体与抗原的相互作用。但为了确保更好的洗脱效果，可预先用300µl 0.1% Tween-20的水溶液洗涤琼脂糖凝胶1次。如果对洗脱效率的要求比较高，可用酸性洗脱液(8M Guanidine·HCl (pH1.5))进行洗脱，相应的中和液的pH值或量也要进行一定的调整，例如100µl酸性洗脱液(8M Guanidine·HCl (pH1.5))和15µl中和液(1M Tris-HCl, pH9.5)。

参考文献：

- Wilchek M, Bayer EA. Methods Enzymol. 1990. 184:467-9.
- Waqas B, Wu A, Yim E, Lipner SR. J Dermatolog Treat. 2022. 33(1):573-574.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
E6673	BeyoShaker™数字式翘板摇床	1套
E6800	BeyoVortex™基础型旋转混匀仪	1套
P0632S	生物素标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	5次
P0635S	脱硫生物素标记和Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)	5次
P0637S	脱硫生物素标记和Pull-Down试剂盒(Magnetic Beads)	5次
P0654S	生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)	25次
ST661-500ml	TBS (10X)	500ml
ST663-500ml	TBS (20X)	500ml
P0013	Western及IP细胞裂解液	100ml
P0013B	RIPA裂解液(强)	100ml
P0013C	RIPA裂解液(中)	100ml
P0013D	RIPA裂解液(弱)	100ml

Version 2024.02.18