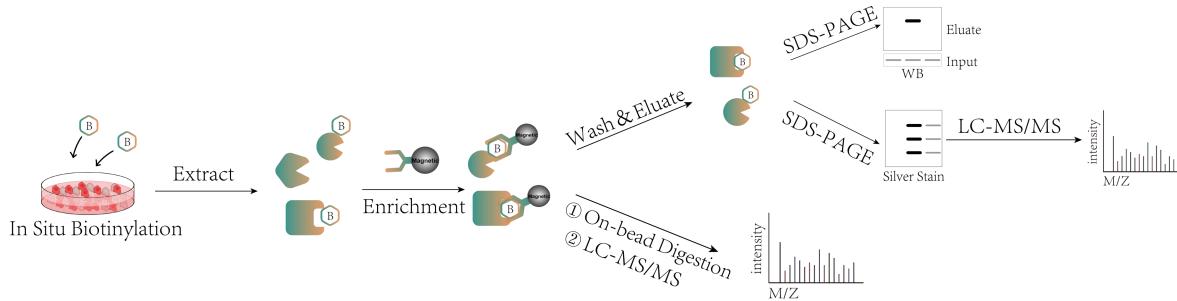


# ChomiX<sup>®</sup>-生物素共价标记 (in situ) 蛋白质 Extract-Pulldown (链霉亲和素磁珠) 试剂盒

## 应用场景和实验流程示意图



适用的场景为，在活细胞中进行生物素共价标记（例如，通过 TurboID/APEX2 等酶或生物素-共价小分子探针进行生物素标记）后，使用本试剂盒进行细胞裂解、标记蛋白质富集。富集后的复合物可根据下游分析需求选择不同路径：可将蛋白从磁珠上洗脱，经 SDS-PAGE 分离后进行 Western blot 分析，用于验证富集效果或特定靶蛋白；或同样经 SDS-PAGE 分离后，进行胶内酶切及质谱检测以鉴定结合蛋白。也可对富集后的样品进行 on-bead 酶切，随后通过质谱进行蛋白质组学检测以鉴定小分子结合蛋白。

## 产品型号

产品货号	规格/样品数	批次
02030014	10 次	N/A

## 产品规格

试剂组成	产品货号	包装	储存条件
Lysis buffer B	02030011B	10 mL *1 管	-20°C
Streptavidin Magbeads	02030002	5 mL*1 管	4°C
Reconstitution buffer	02030011C	10 mL*2 管	-20°C
Elution buffer	02030011D	0.7 mL*1 管	-20°C

## 产品特点

- 本试剂盒包括细胞裂解液 (Lysis buffer B)、蛋白重悬溶解缓冲液 (Reconstitution buffer)、链霉亲和素磁珠 (Streptavidin Magbeads) 及蛋白洗脱剂 (Elution buffer)，

适用于在活细胞中进行生物素共价标记后，进行细胞裂解、蛋白质富集和洗脱。该产品的试剂量可用于不低于 10 个样品的制备（按照说明书推荐方案，总共不低于 5 mL 的蛋白裂解液体系）。

- 本试剂盒的 Lysis buffer 几乎适用于所有哺乳动物细胞/组织样本，对膜蛋白和胞质蛋白均有较高的提取效率。Lysis buffer 根据后续步骤进行了相应优化，采用其他配方的裂解液可能会与后续步骤兼容性不佳，导致实验失败。
- 本试剂盒中的链霉亲和素磁珠，能够与生物素修饰分子高度特异性结合 ( $K_d = 10^{-14} \sim 10^{-15}$  mol/L)。该磁珠具有优良的亲水性、再分散稳定性、磁稳定性，有效确保高的蛋白结合率和低非特异性吸附，以及反应的均一性和检测一致性。
- 磁珠混悬液 (1 mg beads per 0.1 mL) 对游离生物素分子的结合能力为  $> 30$  nmol per mg beads (具体产品信息参考该磁珠说明书)。注意：生物素结合能力将因实际的溶液成分和分子的位阻效应而变化，需根据实验体系自行尝试合适的磁珠用量。
- 本试剂盒的 Reconstitution buffer 采用升级配方，能最大程度地复溶蛋白沉淀 (接近 100%)，且稀释后得到的 Wash buffer 为强效洗涤剂，能有效地去除非特异性结合蛋白，

极大地降低背景蛋白的干扰。

- 本试剂盒中的 Elution buffer, 是基础 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的升级改良, 能大幅提高生物化蛋白的洗脱效率 (效率提升效果将因实验体系而有所不同)。

## 使用说明

- 使用该试剂盒之前, 需要提前准备: 含生物素共价标记蛋白的细胞。
- 请注意, 如生物素探针与蛋白质结合是非共价亲和力, 则不适用于本试剂盒。
- 准备磁珠: 重悬混匀磁珠后, 取一定量磁珠混悬液至离心管, 磁分离 (将离心管置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠充分吸附至磁力架一侧) 后进行洗涤 (具体过程见使用步骤案例)。
- Lysis buffer B 可短期保存于 4°C (一个月以内), 如需长期保存, 建议分装后保存在-20°C。使用时室温融化, 冰上预冷后, 加入蛋白酶抑制剂 (100X 储液, 推荐产品 Roche 04693132001), 直接使用。
- 步骤 2 中 Wash buffer 配置: 将 Reconstitution buffer 使用 PBS 稀释四倍体积即可, 例如取 2.5 mL Reconstitution buffer, 加入 7.5 mL PBS, 即得 10 mL Wash buffer。
- Elution buffer 使用时室温融化, 注意观察不要留有不溶物, 可适当加热帮助融化 (~40°C)。使用时, 取出所需要的体积, 加入对应体积的β-巯基乙醇, β-巯基乙醇终浓度为 1% (体积比)。
- 该试剂盒中的试剂比例及步骤均经过优化, 如果实验内容有所不同, 需自行调整测试。
- 使用步骤中所示磁珠用量适用于大部分 500μL (2 mg/mL) 细胞裂解液体系。可根据实际情况, 自行尝试其他磁珠用量。

## 使用步骤

### 1. 富集前样品准备。

- 细胞裂解:** 将生物素标记后的细胞收集至 1.5 mL 离心管中, 并用冷 PBS 清洗 2 次 (3000 rpm, 3 min, 去除上层 PBS), 细胞沉淀置于冰上, 融化后加入冰上预冷的裂解液 Lysis buffer (提前添加蛋白酶抑制剂), 超声破碎 (超声仪器及条件均可参考仪器或文献推荐条件, 使细胞在

4°C 条件下均匀破碎即可)。将细胞裂解液离心 (4°C, 20000 g, 30 min), 取上清于新的样品管中, 使用蛋白浓度定量试剂盒 (推荐产品碧云天 P0006C, 或其他具有类似去垢剂兼容性的产品) 进行蛋白浓度定量, 将上清细胞裂解液稀释至 2 mg/mL (如蛋白浓度较低, 1 mg/mL 也可以使用。如使用其它浓度, 需自行尝试), 置于冰上待用。

- 质量检测:** 从细胞裂解液蛋白质组样品 (总蛋白浓度一般为 2 mg/mL) 中分别取出 20 μL 反应液, 加入 5 μL SDS-PAGE 上样缓冲液 (5X, 含β-巯基乙醇, 终浓度为 1% (体积比)), 95°C 加热 5 min, 冷却后离心, 样品保存于-20°C 待用。或者直接进行 Western blot 分析, 用 Streptavidin-HRP (推荐碧云天产品 A0305 或同类型产品) 检测生物素化信号 (Western blot 步骤均为常规步骤, 可参考相关文献或视频)。确认生物素信号符合预期后进行后续操作。
  - 留 Input 样品。** 从细胞裂解液蛋白质组样品 (总蛋白浓度一般为 2 mg/mL) 中分别取出 10 μL, 加入 2.5 μL 蛋白上样缓冲液 (5X, 含有β-巯基乙醇, 终浓度为 1% (体积比)), 95°C 加热煮 5 min, 冷却后离心, 样品保存于-20°C, 作为 Input 样品用于 WB 中检测全蛋白质组水平目标蛋白的丰度。剩余溶液与含生物素的共价标记探针进行偶联标记。
  - 稀释样品溶液。** 取细胞裂解液蛋白质组样品 500 μL (总蛋白浓度一般为 2 mg/mL), 加入 PBS 将溶液稀释至 3 mL (若细胞裂解液中含 SDS, 确保稀释后 SDS 浓度 < 0.05%), 后接第 2 步富集实验。
- ### 2. 富集分离生物素共价标记蛋白质
- 取 400 μL 链霉亲和素磁珠悬浊液于离心管中, 加入 1 mL PBS, 上下颠倒震荡 30s, 置于磁力架, 静置 1 min, 去上清, 重复清洗两次。小心去除上清后, 加入 300 μL PBS 重悬。
  - 分别在每个样品中, 每隔 1 h 分批次加入 100 μL 链霉亲和素磁珠悬浊液, 加入后将样品置于 25°C, 于旋转混匀仪上旋转孵育。每个样品累计加入磁珠悬浊液 300 μL, 孵育 3h。
  - 孵育结束后, 将样品管置于磁力架, 静置 2 min, 磁分离, 吸去上清, 上清可以暂时保存于-20°C, 也可直接弃去。磁珠中加入 3 mL Wash buffer, 室温旋转混匀 10 min, 磁分离, 去上清;
  - 加入 1 mL PBS, 将磁珠混匀转移至 1.5 mL 离心管中, 室

温旋转混匀 2 min, 磁分离, 去上清; 重复洗涤 6 次。样品可以“on-bead 酶切”方式进行蛋白质组学样品制备(具体制备过程和要求请咨询相关蛋白质组学检测机构), 或继续进行下一步实验。

### 3. Eluate 样品制备

- a) 将磁珠中的上清尽可能去除干净, 加入 50  $\mu$ L Elution buffer, 95 °C 加热 20 min, 每 5 min 震荡混匀一次。注意密闭, 防止盖子受热打开。注意: 该方法可能会影响部分对膜蛋白(尤其是多次跨膜蛋白)的最终检测效率, 需要根据实际情况优化洗脱温度。
- b) 冷却至室温后, 室温高速离心, 20000 g, 2 min, 立即磁分离取上清, 该样品为 Eluate 样品, 即含有生物素共价标记蛋白质, 保存于-20°C待用。

Eluate 样品可继续进行第 4 步操作, 或以“胶内酶切”方式进行蛋白质组学样品制备(具体制备过程和要求请咨询相关蛋白质组学检测机构)

### 4. Western blot 检测

- a) 将上述 Input 和 Eluate 样品, 放置室温融化并离心, 20000

g, 2 min, 取上清样品进行 Western blot 检测分析。(Western blot 步骤均为常规步骤, 可参考相关文献或视频。)

**推荐上样量:** Input 10  $\mu$ L, ~40  $\mu$ g 蛋白质组; Eluate 40  $\mu$ L (确保目标蛋白信号丰度足够, 便于抗体检测)。其它上样量也可尝试, 取决于目标蛋白的丰度。

**抗体孵育:** 可使用 Streptavidin-HRP (推荐碧云天产品 A0305 或同类型产品) 检测以确认生物素标记效果, 或使用目的蛋白抗体检测和内参蛋白抗体(例如 GAPDH, ACTIN 等文献常用内参蛋白)进行信号检测。抗体孵育步骤请参考对应抗体的说明书。

### 注意事项

- (1) 磁珠取用前应充分上下混匀, 防止取用改变磁珠浓度, 避免长时间超声对磁珠表面破坏;
- (2) 磁珠储存液中含有低浓度小分子抑菌剂, 使用前请按照说明书步骤清洗, 并尽快使用, 避免长时间保存;
- (3) 本产品为 4°C 冰袋运输, 产品收到后, 按照说明书中每个试剂的储存条件, 长期密封保存, 有效期见标签;
- (4) 本产品仅限于专业人员的科学研究使用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。