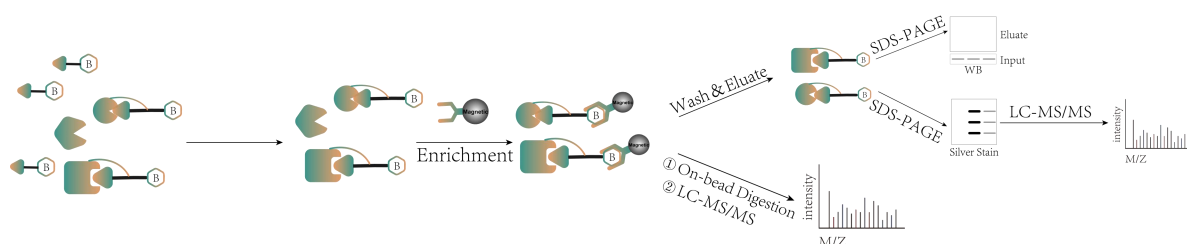


ChomiX®-生物素共价标记 (in vitro) 蛋白质 Extract-Pulldown (链霉亲和素磁珠) 试剂盒

应用场景和实验流程示意图



在蛋白质样品溶液中进行生物素共价标记（例如，使用 Biotin-azide/alkyne/NHS/iodoacetamide/maleimide 等探针）后，使用本试剂盒进行蛋白质沉淀复溶去除游离生物素探针和标记蛋白质富集。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
02030015	10	N/A

产品规格

试剂组成	产品货号	包装	储存条件
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

1. 本试剂盒包括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)。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 的蛋白质溶液体系)。
2. 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。

3. 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。
4. 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。
5. 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

1. 使用该试剂盒之前，需要提前准备：含生物素共价标记蛋白质的溶液。
2. 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。

3. 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）。
4. 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。
5. 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）。
6. 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。
7. 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。

- a) **质量检测**：取生物素共价标记反应后的蛋白质溶液样品 20 μL (总蛋白浓度一般为 2 mg/mL)，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。
- b) **留 Input 样品**。取生物素共价标记反应后的蛋白质溶液 10 μL (总蛋白浓度一般为 2mg/mL)，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。
- c) **蛋白沉淀，去除游离生物素分子**。取生物素共价标记反应后的蛋白质溶液 540 μL (总蛋白浓度一般为 2mg/mL)，将其转移至 15 mL 离心管中，并加入 2700 μL 甲醇-氯仿混合溶剂 (体积比 4:1)，震荡混匀。使用 540 μL 去离子水洗涤原样品管，且将洗涤液合并至 15 mL 离心管中，重复三次，充分震荡混匀。此时溶液体积为 4860 μL 白色浑浊液。高速离心 (4°C, 3000 g, 10 min)，溶液分层，蛋

白质沉淀位于中间夹层，片状固体，小心去除上下层液体，保留蛋白质沉淀。

- d) **洗涤沉淀**。在 15 mL 离心管加入 1 mL 冷甲醇(-80°C预冷)，4°C 超声 10 s 将沉淀打碎，将混合液转移至 1.5 mL 离心管中。4°C, 10000 g, 3 min，离心去上清。再次在 15 mL 离心管加入 1 mL 冷甲醇洗涤，并将洗涤液转移到上述 1.5 mL 离心管中，重复上述超声离心步骤，蛋白溶液均需要保存在冰上。去除上清甲醇后，将蛋白质沉淀在空气中室温开盖晾干约 2 min，完全去除甲醇。

注意：去除甲醇后，晾干至无明显甲醇残留但仍保持湿润状态即可。过于干燥将导致沉淀难以复溶。

- e) **沉淀复溶**。在蛋白质沉淀中加入 750 μL Reconstitution buffer，超声辅助，90°C加热 3 min，使蛋白彻底复溶 (注意密闭，防止盖子受热打开)。冷却至室温后，高速离心 (20000 g, 2 min) 后取上清。

注意：若高速离心后沉淀比较明显，尤其是不同样品之间的沉淀差异明显，将在不同样本间引入较大操作误差。此种情况下，建议重新制样。

- f) 上清转移至 15 mL 离心管中，并加入 PBS 至 3 mL。样品可直接用于第 2 步富集实验。也可以放置于-80°C 冰箱中长期保存，室温融化后再进行第 2 步富集实验。

2. 富集分离生物素共价标记蛋白质

- a) 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。
- b) 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。
- c) 孵育结束后，将样品管置于磁力架，静置 2min，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；
- d) 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 μL Elution buffer, 95 $^{\circ}\text{C}$ 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的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 μL , $\sim 40 \mu\text{g}$ 蛋白质组；Eluate 40 μL （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。