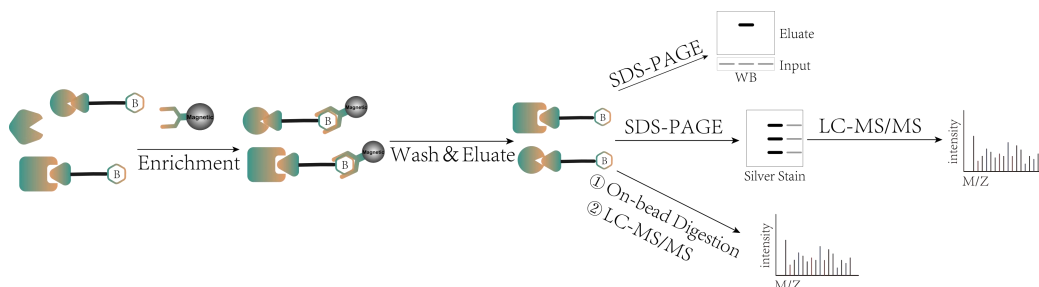


# ChomiX®-生物素探针非共价结合蛋白质 Pulldown (链霉亲和素磁珠) 试剂盒

## 应用场景和实验流程示



本试剂盒包括链霉亲和素磁珠 (Streptavidin Magbeads) 和洗涤液 (Wash buffer), 适用于将“活性分子-生物素”探针的非共价相互作用蛋白质从细胞裂解液中富集分离和洗脱。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
02030016	10 次	N/A

## 产品规格

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

## 产品特点

1. 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。
2. 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。

3. 本试剂盒的 Lysis buffer A 中添加温和表面活性剂, 可在不影响蛋白质天然活性结构的同时去除大量非特异性吸附, 降低背景蛋白的干扰。

## 使用说明

1. 使用该试剂盒之前, 需要提前准备: “活性分子-生物素”探针以及细胞裂解液。
2. 为防止蛋白变性, 细胞裂解液体系中禁止使用 SDS、尿素、盐酸胍等蛋白变性剂, 且实验全程细胞裂解液尽量保持在冰上或 4°C 操作。
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. Lysis buffer A 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。

5. 在步骤 7 的银染过程中，实验组与对照组之间可能难以观察到明显的条带差异。这主要是由于高丰度蛋白在 beads 表面存在一定程度的非特异性吸附（即背景蛋白），尽管其吸附比例较低，但其绝对丰度仍显著高于大部分其他蛋白。因此，当探针特异性结合的靶蛋白丰度较低时，背景蛋白会干扰并掩盖该低丰度靶蛋白在银染中的信号表现。

## 使用步骤

**案例：**将“活性分子-生物素”探针负载至磁珠，从 500  $\mu$ L 细胞裂解液（含总蛋白 2 mg/mL）中富集分离互作蛋白质。

- 细胞裂解：**将细胞沉淀置于冰上，融化后加入冰上预冷的裂解液 Lysis buffer A（提前添加蛋白酶抑制剂），超声破碎。  
**注意：**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。
- 蛋白定量：**将细胞裂解液离心，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 2mg/ml，置于冰上待用。
- 准备磁珠：**取 300  $\mu$ L 磁珠（约含链霉亲和素 10 nmol，可负载约 10 nmol 的生物素探针，实际应用中需根据具体实验体系酌情调整用量）混悬液至离心管中。随后，对离心管进行磁分离并弃去上清，加入 1 mL PBS 缓冲液，用移液枪轻轻吹打使磁珠重悬。以上洗涤步骤重复两次。
- 将探针负载于磁珠：**将清洗后的磁珠进行磁分离去除上清，重悬于 500  $\mu$ L 含“活性分子-生物素”探针（30  $\mu$ M, 15 nmol）水溶液（该用量旨在使生物素探针微过量，以使得探针对磁

珠上的链霉亲和素的结合趋于饱和），室温翻转混匀孵育 1 h，磁分离后去除上清。加入 500  $\mu$ L PBS 洗去游离探针分子（加入 PBS 后，用移液枪轻轻吹打重悬磁珠，磁分离后去除上清），重复 3 次。

- 富集探针的互作蛋白质：**将探针负载后磁珠与 500  $\mu$ L 细胞裂解液（总蛋白浓度 2 mg/mL）混合，4°C 翻转混匀，孵育 2~18 h（需要根据实验情况优化条件）。
- 洗涤除杂：**将孵育完的样品进行磁分离，去除上清。磁珠中加入 500  $\mu$ L Lysis buffer A，4°C 翻转混匀 3-5 min，磁分离，去上清。重复洗涤 3 次（洗涤次数可根据实际情况调整）。加入 0.5 mL PBS，4°C 翻转混匀 3-5 min，磁分离，去上清。重复洗涤 2-3 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。
- 洗脱样品：**将磁珠中的上清尽可能去除干净，加入 50  $\mu$ L SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，室温振摇 10-30min。离心 2 min，磁分离取上清，该样品为洗脱样品，保存于 -20°C 待用。洗脱样品可直接 95°C 煮 5 min，进行 SDS-PAGE 分离。所得胶块可继续进行 Western blot 分析。或银染（具体方法请参考相关文献或商业化试剂盒）后以“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）。

## 注意事项

- 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；
- 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；
- 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；
- 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。