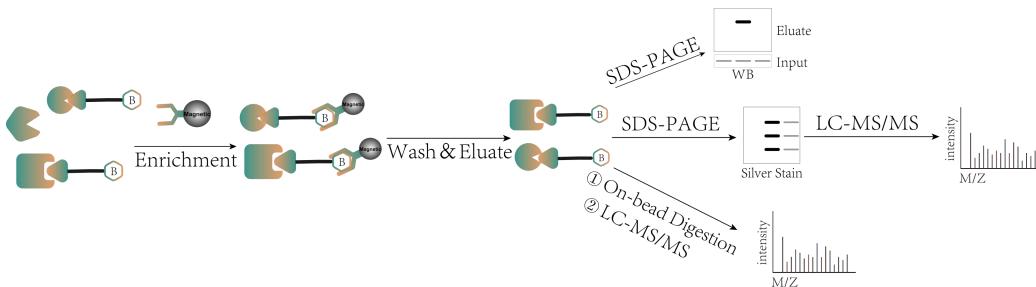


Chomix[®]-生物素探针非共价结合蛋白质 Pulldown (链霉亲和素磁珠) 试剂盒

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”探针的非共价互作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

- 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 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

- 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。
- 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。
- 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 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。

- 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 μL 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 2 mg/ml,置于冰上待用。
- 准备磁珠:** 取 300 μL 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 μL 含“活性分子-生物素”探针(30 μM, 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,室温振摇 10~30 min。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。