脱硫生物素标记和 Pull-Down 试剂盒(Agarose Resin)

产品货号：BA2987

产品规格：5T

产品简介：

脱硫生物素标记和 Pull-Down 试剂盒(Agarose Resin)，即 Desthiobiotinylation and Pull-Down Kit (Agarose Resin)，是一种新型、高效的基于对感兴趣的蛋白、抗体或其它活性生物分子进行脱硫生物素标记，随后与链霉亲和素琼脂糖树脂结合，并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。本试剂盒可以在温和的条件下进行高效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。

脱硫生物素(Desthiobiotin)是一种单环无硫的生物素类似物，和生物素相比，与链霉亲和素结合的特异性几乎相等，但亲和力较低(分别为 Kd =10^{-11} vs. 10^{-15}M)。因此在温和的条件下，可以使用生物素洗脱液竞争性置换与链霉亲和素结合的脱硫生物素标记物。脱硫生物素的这种释放特点有助于减少内源性生物素分子的共纯化，也无需使用严苛的分离条件解离复合物，也可以避免破坏与目标蛋白等分子的结合。当天然蛋白或重组蛋白不适合表达融合标签或需尽可能在天然条件下分离目标蛋白时，脱硫生物素标记和 Pull-down 就是非常理想的选择。

本试剂盒提供了脱硫生物素标记试剂(Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin)、用于纯化脱硫生物素标记蛋白的脱盐柱(Desalting Column)，用于结合标记蛋白等生物分子上的脱硫生物素标签的链霉亲和素琼脂糖树脂(Streptavidin Agarose Resin)，以及生物素洗脱液(Elution Buffer)等试剂。Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 是一种胺反应活性的 NHS 酯试剂，可以有效地标记已纯化的蛋白样品(Bait)，然后可以使用脱盐柱对脱硫生物素标记的蛋白样品进行纯化。蛋白样品的脱硫生物素标签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，最后使用含游离生物素的洗脱液竞争性洗脱，即可获得脱硫生物素标记蛋白与目标蛋白或其它生物分子的复合物，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。本产品以蛋白与蛋白相互作用为示例的实验流程和原理图如 1 所示。

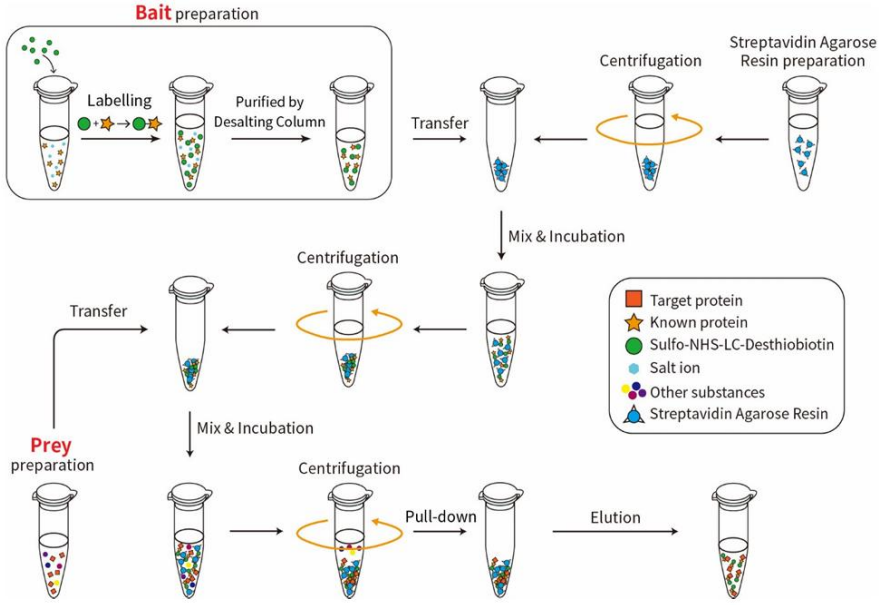


图 1. 脱硫生物素标记和 Pull-Down 试剂盒(Agarose Resin)以蛋白与蛋白相互作用为示例的实验流程和原理示意图。

本试剂盒标记效率高、标记速度快、操作简单。本试剂盒提供的 Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 可高效标记各

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

种带氨基的蛋白、抗体或其它生物分子；使用配套的脱盐柱即 Desalting Column (5K MWCO, 5ml)可轻松去除过量的标记试剂并获得大分子量的脱硫生物素标记的生物大分子，而不需要进行透析或者凝胶过滤。

本试剂盒特异性强、洗脱效率高。本试剂盒提供的 Streptavidin Agarose Resin 结合量高，可对脱硫生物素标记的样品快速进行分离纯化，且可以使用温和的生物素洗脱液进行竞争性洗脱，洗脱效率高。使用本试剂盒的结合和洗脱效果请参考图 2。

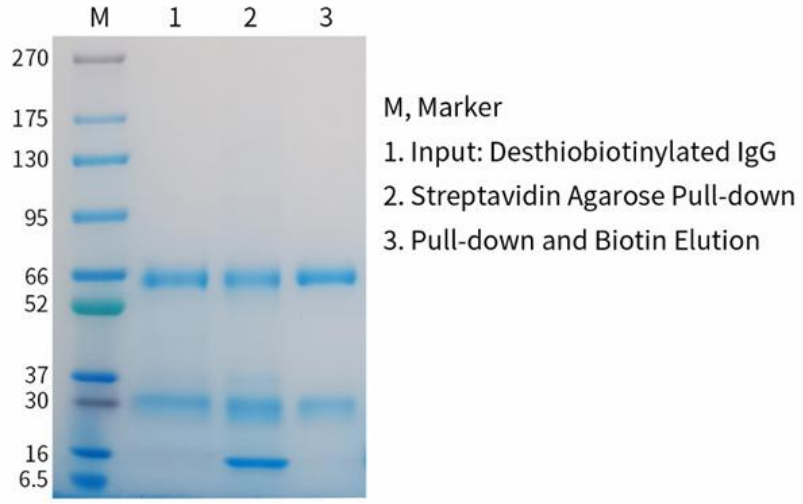


图 2. 脱硫生物素标记和 Pull-Down 试剂盒(Agarose Resin)结合和洗脱脱硫生物素标记 Mouse IgG 的效果图。20μg 标记的 Mouse IgG 与 50μl Streptavidin Agarose Resin 孵育 1 小时，然后直接 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸的样品(样品 2)，以及洗涤后使用生物素洗脱液在 37ºC 摇动洗脱 30 分钟后获得的样品(样品 3)的 SDS-PAGE 电泳考马斯亮蓝染色效果图。图中可见 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸的样品中含有 Streptavidin 单体条带(15kD)。Pull-down 后洗脱获得的蛋白量非常接近 Input 的量了，说明洗脱非常充分。实际纯化效果会因实验条件、操作等而存在一定差异，本图仅供参考。

本试剂盒小包装可进行 5 次标记反应(每次约 5mg 蛋白)和 40 次沉降(Pull-down)实验(每次 50μl)。

试剂盒的组成和配制：

试剂组分	5T	存放温度
Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin	1.5mg	-20℃
Desalting Column (5K MWCO, 5ml)	5 个	2-8℃
Streptavidin Agarose Resin	2ml	-20℃
Elution Buffer	8ml	-20℃

使用说明：

1. 准备工作。

a. 将要标记的已知蛋白溶解在 1× 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，推荐使用脱盐柱进行脱盐处理。

b. 10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的配制：1.5mg Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 用 280μl 的无水 DMSO 进行溶解，即得 10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin。如不立即使用，可分装后-20ºC 保存，两个月内有效。

2. 脱硫生物素标记反应。

a. 将需要标记的蛋白样品转移到洁净的 1.5ml 离心管。

b. 根据样品质量，参照下表计算加入 10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的体积。一般情况下，Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的用量是蛋白样品摩尔量的 5-25 倍，即过量倍数为 5-25 倍。实际反应时，推荐 Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的过量倍数为 15 倍。

Step	Formula
(a) 确定样品的质量	样品体积(ml)×样品浓度(mg/ml)=样品质量(mg)
(b) 把样品质量换算成摩尔数	样品质量(mg)/样品摩尔分子量(g/mol)=样品摩尔数(mmol)
(c) 确定反应中 Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 摩尔数	样品摩尔数(mmol)×过量倍数=Sulfo-NHS-LC-Desthiobioti 的摩尔数(mmol)
(d) 确定需要 10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的体积	(Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的摩尔数(mmol)/10mM) × 10^6µl/L =10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的体积(µl)

注 1：如果已知蛋白样品为 IgG，体积为 1ml，浓度为 1mg/ml，摩尔分子量 150,000，摩尔过量倍数为 15。那么所需要的 10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的体积=[(1ml × 1mg/ml/150,000) × 15/10mmol] × 10^6µl/L = 10µl。

注 2：标记反应的总体积(已知蛋白样品与 10mM Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 的体积总和)需控制在 500-1500µl 之间，方便使用脱盐柱有效去除未反应的 Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 和其它盐离子。

c. 在室温反应 30-60 分钟或者 4ºC 反应 2 小时，反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用数字式翘板摇床。也可以使用 LCD 数控型长轴旋转混匀仪，推荐的速度为 25rpm 上下翻转。

3. 脱盐柱(Desalting Column)对标记的已知蛋白样品的纯化。

a. 脱盐柱的准备：首先移除脱盐柱的下堵头，然后将脱盐柱的下端浸没到柱内的超纯水中，再移除脱盐柱的上堵头，然后可从上口倾斜倒出脱盐柱内的保存溶液。使用重力柱支架或铁架台固定脱盐柱，并将脱盐柱置于烧杯或试管上方。

注 1：如果不先移除脱盐柱的下堵头，脱盐柱的上堵头会因为负压而难以取出。

注 2：如果移除脱盐柱的上堵头时，脱盐柱的下端没有浸没到超纯水中，负压气泡可能会进入脱盐柱中。

b. 脱盐柱的预平衡：向脱盐柱中加入 1×PBS，每次约 2.5ml，待柱管中的 PBS 全部进入脱盐柱后，再次倒入 1×PBS 充满柱管，重复此步骤 5-6 次。用镊子取出上垫片，再次倒入 1×PBS 充满柱管，将脱盐柱通过 6ml 层析柱转 50ml 离心管适配器放入 50ml 收集管中，无需盖盖子，1,000×g 离心 2 分钟。

注：使用非水平转头的情况下，由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面，该斜面的方向宜在后续步骤中保持，所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记，在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向，确保离心后斜面的方向和位置不会改变。

c. 上样：用移液器贴近树脂的中心位置缓慢加入步骤 2c 的样品，使脱盐柱中的树脂吸入样品。

注 1：样品体积不能超过 1ml，否则会降低样品回收率，并且会导致脱盐不充分。

注 2：样品注入方式会直接影响样品回收率，需要将移液器吸头伸入脱盐柱空管中，在贴近树脂的中心位置加入样品。

注 3：如果样品体积<1000µl，在树脂吸入样品后再加入 100µl 超纯水以增加样品回收率。

d. 洗脱：将脱盐柱通过 6ml 层析柱转 50ml 离心管适配器放入新的 50ml 离心管中，1,000×g 离心 2 分钟，流穿液含有纯化的脱硫生物素标记的已知蛋白样品，可以直接用于后续的结合和洗脱实验。如需保存，请保存在合适的条件。

注：Desalting Column 不适合重复使用。

4. Streptavidin Agarose Resin 和标记的已知蛋白样品的结合。

a. 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，一般每个样品加入 50µl 混悬的 Streptavidin Agarose Resin，其中含有 25µl 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。

b. 500×g 离心 5 分钟，小心移去上清，不要触到底部沉淀。

c. 样品结合：加入 50-200µl 步骤 3d 中的样品，一般 50µl Streptavidin Agarose Resin (悬浊液)的结合量为 10-100µg 蛋白，不宜超过 100µg，颠倒混匀并翘板摇床摇动孵育 30 分钟。

d. 孵育结束后，500×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。

e. 洗涤：使用 500µl 1× PBS 重悬 Streptavidin Agarose Resin，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 1 次。洗涤后的 Streptavidin Agarose Resin 可以用于后续的实验。

5. **目标蛋白等的 Pull-Down 和复合物的洗脱。**

a. 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 4e 的 Streptavidin Agarose Resin 中，轻轻吹打混合均匀。

注 1：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 Western 及 IP 细胞裂解液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 RIPA 裂解液(强) 、RIPA 裂解液(中) 或 RIPA 裂解液(弱) 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。

注 2：对于裂解液如果预期含有天然生物素，可以使用新的 Streptavidin Agarose Resin 来去掉其中的生物素或者含有生物素的蛋白，以降低 Pull-Down 实验的非特异吸附和背景值。

b. 4ºC 翘板摇床摇动孵育至少 1 小时，不可涡旋。

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，孵育可以在室温进行。

c. 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。

d. 使用 100µl 1× PBS 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。

e. 加入 50µl 的 Elution Buffer 重悬 Streptavidin Agarose Resin 沉淀，在 37ºC 摇床缓慢摇动洗脱 30 分钟，以洗脱脱硫生物素标记的已知蛋白与目标蛋白等形成的复合物。

注：温度(37ºC)对于样品的洗脱非常关键。可以使用实验室里常用的用于细菌培养的 37ºC 摇床，缓慢摇动即可。

f. 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，获得的洗脱液即为标记的已知蛋白与目标蛋白的复合物。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。

注意事项：

1. 需自备 PBS 、DMSO，需自备 6ml 层析柱转 50ml 离心管适配器。
2. 请勿冷冻保存 Desalting Column，冻融会导致脱盐柱的基质碎裂。
3. 标记已知蛋白的溶液里不能含有伯胺基团或胺基离子，推荐使用 PBS 溶解蛋白。为提升标记效果，需脱硫生物素标记的蛋白的浓度不能太低。
4. Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 很容易受潮水解失活，保存时一定要注意保持干燥；使用 DMSO 配制成母液后，可分装后-20ºC 保存，两个月内有效。
5. 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。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

Desalting Column 4ºC 保存，一年有效；其余-20ºC 保存，一年有效。Elution Buffer 4ºC 保存，一年有效；Streptavidin Agarose Resin 4ºC 保存，至少半年有效；Sulfo-NHS-LC-Desthiobiotin 4ºC 保存，至少一个月有效。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com