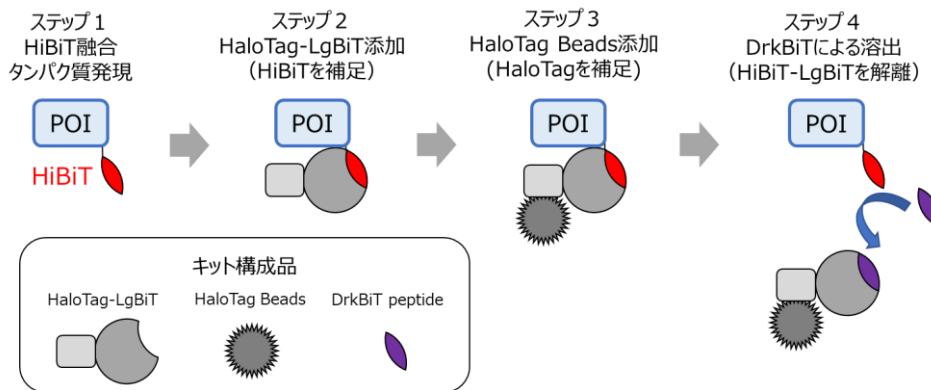


HiBiT Pull-down Kit (CS1967B02)

HiBiT融合タンパク質をLgBiT-HaloTagとHaloTag Beadsで補足することでプルダウンアッセイできるキットです。LgBiTに対してHiBiTよりも高親和性のDrkBiT peptideを用いて非変性条件で溶出することができます。またSDS-PAGEでの解析用にSDSローディングバッファーに直接溶出することもできます。* 正式マニュアルは製品ご購入時にご案内いたします。

A. プルダウン概要



B. キット構成

Part #	Component	Unit Volume	Quantity
CS1967B01	HaloTag®-LgBiT Protein	0.5 ml	1
CS3002A01	DrkBiT Peptide	0.1 ml	1
G7281	Magne® HaloTag® Beads	1 ml	1

C. 必要な試薬類

Lysis Buffer:

Mammalian Lysis Buffer (Promega G9381)

RQ1 RNase-Free DNase I (Promega M6101), diluted 100-fold into the buffer

Protease Inhibitor Cocktail (Promega G6521), diluted 50-fold into the buffer

Wash Buffer:

Tris-buffered saline (TBS) + 0.05% (v/v) IGEPAL CA-630 (Sigma I3021)

D. プロトコール

1. Lysis Bufferを用いてHiBiT融合タンパク質発現細胞を破碎する。
2. 15,000 rpm, 5 min遠心し、上清を新しいチューブに回収する。
3. HaloTag-LgBiTを、サンプル量あたり1/100倍量添加する（例 10 ul HaloTag-LgBiT/1 mlサンプル）。
4. 室温10分間インキュベーションする。

5. Magne HaloTag Beadsを添加する (Beads使用量 4-10 ul Beads/1 mlサンプル推奨)。
6. ローターを用いて室温1-3時間混和する。
7. 1 ml Wash Bufferを用いて、1-4回Beadsを洗浄する。
8. 溶出
 - A. DrkBit peptideによる溶出 (非変性条件)
 - i. HaloTag-LgBiT添加量の1/5倍量のDrkBiT peptideを含むElution bufferを調製する。
(例 HaloTag-LgBiT 10 ulの場合、2 ul DrkBiTをwash bufferに添加し、elution bufferとする)
 - ii. Wash bufferを除いたBeadsにElution bufferを加え、室温30分間インキュベーションする。
 - iii. 上清を回収する。
 - B. SDSローディングバッファーによる溶出
 - i. Wash bufferを除いたBeadsにSDSローディングバッファーを加える。
 - ii. 70℃ 5-10分間加熱する。
 - iii. 上清を回収する。

データ例

HiBiT融合firefly luciferase発現するHEK293細胞からHiBiT Pull-down Kitを用いてプルダウンアッセイし、NanoGlo HiBiT Blotting System (Promega N2410)によりHiBiT融合firefly luciferaseを検出した。

