

# 琼脂糖微珠法GST pull-down试剂盒

## Agrose Beads GST Pull-down Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP029 (6T)	IPP029M (12T)	IPP029L (40T)	
01	GST-tag Purification Resin	0.3 mL	0.6 mL	2 mL	4°C
02	Lysis Buffer	7.2 mL	15 mL	48 mL	4°C
03	Wash Buffer	21 mL	42 mL	140 mL	4°C
04	Elution Buffer	0.35 mL	0.7 mL	2.5 mL	4°C
05	Protease Inhibitor	0.18 mL	0.36 mL	1.2 mL	-20°C

### 注意:

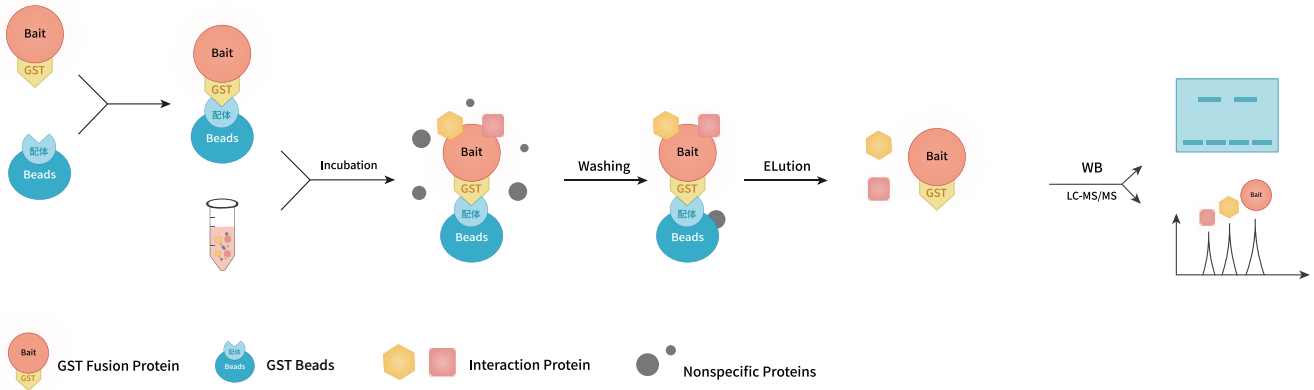
该试剂盒包含足够完成 6、12 或 40 个反应的试剂, 每个反应使用 45  $\mu$ L 树脂。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组, 因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

## 产品简介/Product Description

本试剂盒采用 GST 标签纯化树脂来高效完成 GST 标签融合蛋白的体外 pull-down 实验。实验前先将目标基因连入带有 GST 标签的原核表达载体中, 在大肠杆菌中表达出 GST 融合蛋白。利用 GST 标签纯化树脂与 GST 标签的强亲和性, 纯化 GST 融合蛋白, 再与样本裂解液孵育, 样本中的互作蛋白即可被吸附而分离。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. GST- 诱饵蛋白和 GST 蛋白制备

- ①取已诱导表达可溶性 GST- 诱饵蛋白或 GST 蛋白的大肠杆菌菌液，4°C 5000 g 离心 5 min，收集大约 50  $\mu$ L 菌体沉淀；
- ②加入 1 mL 预冷的 PBS，吹打混匀，4°C 5000 g 离心 5 min，弃上清；
- ③重复上步操作两次，共漂洗三次，尽量吸干液体；
- ④将样本置于冰上，向菌体中加入 500  $\mu$ L 预冷的②裂解缓冲液、5  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂 (按 1% 添加)，吹打混匀，冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- ⑤4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30  $\mu$ L 作为 bait-input，剩余用于 pull-down 实验，置于冰上备用或 -80°C 保存。

注意：如果已经有纯化好的 GST- 诱饵蛋白和 GST 蛋白，则跳过此步骤。

### 2. 待测蛋白制备

待测样本分别按如下方法收集和处理：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	$1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨，再转移动物组织 100~200 mg 粉末至预冷的新离心管中
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨，再转移粉末至预冷的新离心管中
原核表达菌	50 $\mu$ L 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体

- ②将样本管置于冰上，每组加入 300~500  $\mu$ L 预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂 (按 1% 添加)，吹打混匀；
- ③冰上超声破碎至溶液基本澄清；

④4 °C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μL 作为 prey-input，剩余用于 pull-down 实验，置于冰上备用或 - 80°C 保存。

注意：

1. 如果实验组和对照组所用样本一样，可以先一起裂解，取完 input 后再平分为两管。
2. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5 μg/μL，总量约 2~3 mg。
3. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

### 3. 漂洗液准备

为了防止实验过程的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑥10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 6.8 mL 漂洗液、34 μL 蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

### 4. GST- 诱饵蛋白纯化

- ①将 GST 标签纯化树脂颠倒混匀，实验组和对照组各取 45 μL 树脂到新的离心管中；
- ②每组加入 200 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清；
- ③重复上步操作一次；
- ④向实验组树脂中加入表达 GST- 诱饵蛋白的大肠杆菌裂解液（步骤 1 制备）或 20 μg 纯化好的 GST- 诱饵蛋白，向对照组树脂中加入表达 GST 空载体的大肠杆菌裂解液（步骤 1 制备）或 20 μg 纯化好的 GST 蛋白，放混匀仪上 4 °C 孵育 1~2 h；
- ⑤4 °C 500 g 离心 5 min，弃上清；
- ⑥每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，4 °C 500g 离心 5 min，弃上清；
- ⑦重复上步操作两次，共漂洗三次，得到纯化的 GST- 诱饵蛋白树脂。

### 5. GST pull-down

- ①向上步树脂中加入待测样本裂解液（步骤 2 制备），放混匀仪上室温孵育 3 h 或 4 °C 孵育过夜；
- ②4 °C 500 g 离心 5min，弃上清；
- ③每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，4 °C 500g 离心 5 min，弃上清；
- ④重复上步漂洗操作两次，共漂洗三次；
- ⑤每组加入 50 μL ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 15 min；  
涡旋震荡 20 s，4 °C 12000 g 离心 5 min，收集上清至新的离心管中，- 80°C 保存，或直接用于 westernblot、SDS-PAGE 或质谱实验。

注意：

1. 洗脱缓冲液可以兼容质谱
2. 如果洗脱效率低，可以更换 SDS- PAGE 上样缓冲液洗脱法：漂洗后的树脂直接加入 50 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 3 min，12000 g 离心 30 s，收集上清（即调取产物）至新的离心管中；该洗脱产物可以用于 SDS-PAGE 或 Western-blot 实验，如果需要进行质谱实验，则切胶条后送样。
3. Pull-down 捕获的蛋白量通常较少，SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤参考如下：  
（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）
  - (1) 固定：30 min（乙醇：乙酸：水 = 4：1：5 体积比）；
  - (2) 敏化：30 min（乙酸钠 10.2 g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45 mL，加水至 150 mL）；
  - (3) 水洗：4 次，每次 10 min；
  - (4) 银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150 mL）；
  - (5) 水洗：2 次，每次 40 s；
  - (6) 显色：显影至条带清楚（碳酸钠 3.75 g，60 μL 甲醛，加水至 150 mL）；
  - (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

## 注意事项/Notes

1. 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；
  2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
  3. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋树脂，这些操作会导致树脂聚集而降低结合能力。
  4. 为保证树脂均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀树脂。
  5. 实验前需要先做 western blot 实验确定 GST 融合蛋白和待测互作蛋白是否可溶表达。
  6. 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
  7. 树脂的离心步骤需在低速条件下操作，离心速度大于  $5000 \times g$  可能会导致树脂聚集和再悬浮困难。
  8. 洗脱缓冲液为强酸性，最终的洗脱产物中含有 GST 融合蛋白及其互作蛋白。
- 实验的具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。

