

GST pull-down 试剂盒(凝胶法)

Cat#: K0077

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

1. 背景信息

本产品由高品质的还原型谷胱甘肽 (GSH) 与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (约可进行 25 次常规 pull-down 操作), 每毫升基质可承载 >10 mg GST 融合蛋白; 操作迅速便捷 (最短可在 40 分钟内完成一个流程); 特异性强, 非特异性吸附低; 可特异性地与细胞或微生物裂解液等中含有 GST 标签的蛋白结合等特点。

2. 性能指标

- 应用范围:** 来源于细胞或微生物裂解液中含有 GST 标签融合蛋白的 pull-down 实验。
- 偶联物属性:** 以 4%琼脂糖凝胶为基质, 通过 12 个原子的间隔臂, 用化学方法共价结合还原型谷胱甘肽制作而成。
- 凝胶属性:** 琼脂糖凝胶颗粒, 平均粒径 50um。
- 成分:** 2mL PBS (含 0.02% 叠氮钠和 50%甘油) 悬液中, 含有 1mL 共价偶联 GSH 的凝胶。
- 保存方法:** 在含 0.02% 叠氮钠和 50%甘油的缓冲液中, -20°C可保存 1 年。

3. 试剂盒组成

产品编号	组分	规格	保存
L1	细胞裂解液	30ml	4°C—一年
/	离心柱	27 个	室温
G1	GSH 谷胱甘肽琼脂糖树脂	2ml	4°C—一年
A1	GST 小鼠单抗	50ul	-20°C—一年
E3	谷胱甘肽	1g	4°C—一年
P10	10xPBS (清洗液/储存液)	50ml	4°C—一年
P10T	10xPBST (清洗液)	50ml	4°C—一年

注意事项 (开箱前必读)

- 3.1 本试剂盒冷藏条件下运输。收货后请将离心柱取出, 室温保存, 请将抗体取出, -20°C保存; 试剂盒及其它成分保存于 4°C。请勿干燥或冷冻树脂, 这些操作会导致树脂聚集而降低结合能力。
- 3.2 **P10** (10xPBS) 及 **P10T** (10xPBST) 使用之前需用蒸馏水稀释至 1x 使用。
- 3.3 洗脱缓冲液每次使用前配置, 成分见说明书 5。
- 3.4 本试剂盒提供的细胞裂解液 **L1** 为温和裂解液, 成分见说明书 5, 可根据需要自行配制或另行购买裂解液。
- 3.5 勿冷冻、干燥凝胶, 勿使用超声处理凝胶。勿使酸处理凝胶时间超过 10min。

- 3.6 以下操作步骤，使用凝胶悬液用量为 80 μ l (含 40 μ l 凝胶)，可从细胞上清中结合 100-150 μ g GST-融合蛋白，请根据待结合蛋白量，调节凝胶使用量。

4. 使用方法 (所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。)

4.1 细胞上清中 GST 标签融合蛋白制备

如果目标蛋白质含量较高，建议用 1xPBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 500 μ g/mL，-20 $^{\circ}$ C 保存使用。

4.2 细胞裂解液中 GST 标签融合蛋白制备

- 4.2.1 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 4.2.2 预冷的 1xPBST 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 4.2.3 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，(例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约 0.5-1x10⁷ 细胞，需要加入 1ml 细胞裂解液 L1)。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4.2.4 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 10min。取上清于新的 EP 管中 (标记为诱饵蛋白)。

4.3 细菌中 GST 标签融合蛋白制备

GST 标签蛋白的纯化应始终保持在非变性条件下，如果融合蛋白以包涵体形式表达，在使用 8M 尿素或 6M 盐酸胍溶解包涵体后，需要通过透析去除尿素和盐酸胍并使蛋白复性后才能使用本产品进行纯化。

- 4.3.1 将构建好的质粒转化合适的感受态细胞，接种抗性 LB 平板培养基，生长过夜；
- 4.3.2 挑选转化平板的 6 个单克隆，分别接种 3ml 抗性液体培养基；
- 4.3.3 37 $^{\circ}$ C，220 rpm 培养至 OD_{600nm} 0.5-0.6，加入 0.5mM IPTG 20 $^{\circ}$ C 诱导表达 3.5 小时，SDS-PAGE 鉴定表达情况，选择小样表达良好的菌株进行大样表达。
- 4.3.4 接种 60 μ l 菌种至 200ml 抗性培养基中，37 $^{\circ}$ C，220RPM 培养过夜
- 4.3.5 次日加入新鲜抗性培养基至 800ml，培养 1-2h 至 OD_{600nm} 0.5-0.6。
- 4.3.6 加入 200 μ l 的 1M IPTG(28 $^{\circ}$ C，220RPM)诱导表达 3.5h。
- 4.3.7 4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体(66 转/秒 \times 15min)，弃上清，加入 30ml PBST 悬浮菌体，加入终浓度 1mM PMSF，冰浴条件下超声波 200W 破碎 6min。
- 4.3.8 4 $^{\circ}$ C 高速离心，133 转/秒 \times 15min，取上清于新的 EP 管中 (标记为诱饵蛋白)。

4.4 已经纯化好的 GST 标签重组蛋白

- 4.4.1 对 PBS 缓冲液透析换液，去除之前纯化的蛋白样品中的还原型谷胱甘肽。
- 4.4.2 使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定 GST-融合蛋白样品的蛋白浓度 (标记为诱饵蛋白)。

4.5 装柱及诱饵蛋白固定

- 4.5.1 将凝胶充分混悬，取 80 μ L 凝胶悬液 (含 40 μ L 凝胶)，置于 1.5ml 离心管中，加入 600 μ L 1xPBS，充分混悬，1000rpm \times 30sec，离心弃上清；重复以上洗涤步骤 2 次。
- 4.5.2 将上述步骤得到的诱饵蛋白加入预洗好的凝胶中，轻柔混匀，在 4 $^{\circ}$ C 摇床上室温孵育 3h (保留部分样品，作为诱饵蛋白 input)。

4.5.3 将 1.5ml 离心管中的复合物转移到离心柱中，1000rpm x 30sec，离心 5min，保存离心液至新的 EP 管中，（标记为诱饵蛋白流穿液）以备后续检测使用。

注：对于细胞或细菌裂解液，加入至少 500 μ L gst 标记的融合蛋白裂解液。

对于之前纯化的 gst 标签融合蛋白，使用足够的体积以确保添加约 100-150 μ g 的诱饵蛋白。（离心柱最大容量为~500 μ l）

40 μ L 谷胱甘肽琼脂糖树脂可结合最多 200 μ g 的 gst 标记蛋白。然而，GST-tagged 由于构象的差异，融合蛋白可能表现出较低的结合能力。此外，大融合蛋白质可能引起空间位阻，阻止某些固定的谷胱甘肽位点与 GST 标签的结合。

4.5.4 加入 500 μ L 1xPBS 至凝胶，倒置几次温和混匀，清洗凝胶，1000rpm x 30sec，弃离心液。重复四次。此步得到的是诱饵蛋白-凝胶复合物。

4.6 猎物蛋白捕获

4.6.1 在含有固定的 gst 标签诱饵蛋白的离心柱中，加入 800 μ L 的准备好的猎物蛋白样品（保留部分样品作为猎物蛋白 input）。

4.6.2 在 4 $^{\circ}$ C 的摇床上轻轻摇晃至少 3 小时或孵育过夜。为保证诱饵蛋白和猎物蛋白充分结合，可能需要更长的孵育时间，可根据实验情况调整。

4.6.3 1000rpm x 30sec，保存离心液至新的 EP 管中（标记为猎物蛋白流穿液，以备后续检测使用）。

4.6.4 加入 500 μ L 1xPBST，倒置几次温和混匀，清洗凝胶，1000rpm x 30sec，离心弃上清。重复四次。此步得到的是诱饵-猎物蛋白复合物。

4.7 诱饵-捕获蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，请根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

4.7.1 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

步骤：将凝胶移至 1.5ml 离心管，离心，弃上清，向凝胶中加入 50 μ L 2x 上样缓冲液，按体积调整至 1x，混合均匀，95 $^{\circ}$ C 煮样 5 mins。分离凝胶，收集上清，进行 SDS-PAGE 或 western blot 分析。

4.7.2 非变性洗脱法：此方法洗脱的蛋白，可用于后期功能分析。

步骤：向凝胶中加入 250-500 μ L 洗脱液，室温孵育 10 min；换新的收集管，1000rpm x 30sec，收集流穿液至新的收集管，透析后样品可用于后期功能分析。

5. 本试剂盒各试剂成分如下

组分	内容物/配方
细胞裂解液 L1	50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-
洗脱液 E3	50 mM Tris-HCl, 100mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0
10xPBS (结合液/储存液) P10	1.5M PBS buffer, with 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
10xPBST (清洗液) P10T	1.5M PBS buffer, 1% Tween-20 pH7.5, with 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)