



GST pull-down Kit

Catalog#JKR23011

Instruction Manual (For Two Groups)

Sufficient reagents for 6 GST pull-down assays per kit.

Store at -20 & 4°C

目录

1. 实验原理	02
2. 实验流程	03
3. 试剂盒组分	04
4. 操作步骤	04
5. 常见问题	07



1. 实验原理

GST Pull-Down实验基于GST (glutathione-S-transferase), 即谷胱甘肽-S-转移酶蛋白, 可以与谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 结合, 将GSH固定于磁珠上, 形成GSH-磁珠, 将已知蛋白X与GST融合表达, 获得的GST-X蛋白可与GSH-磁珠结合, 若体系中存在与X蛋白互作的蛋白Y, 则会形成“磁珠-GSH-GST-X-Y”复合物, 与X蛋白互作的蛋白即可被分离并检测。

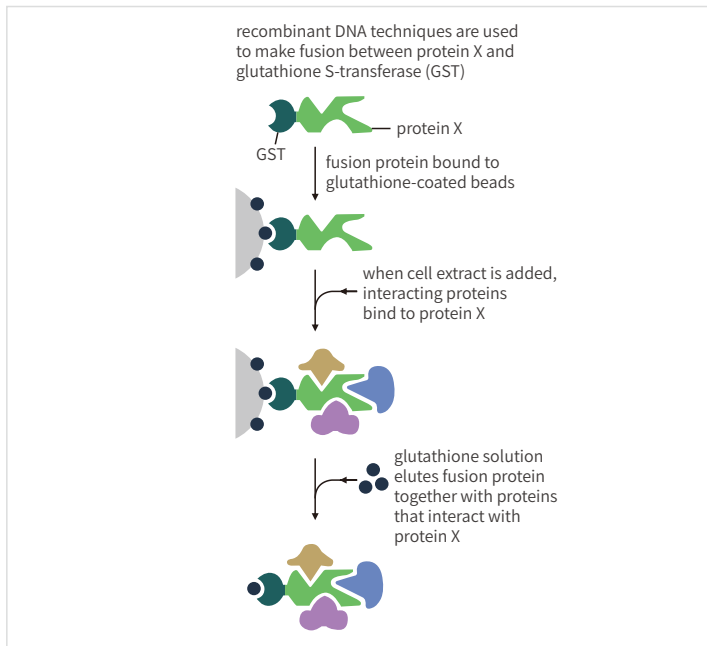


图1: GST pull down 实验原理图

2. 实验流程

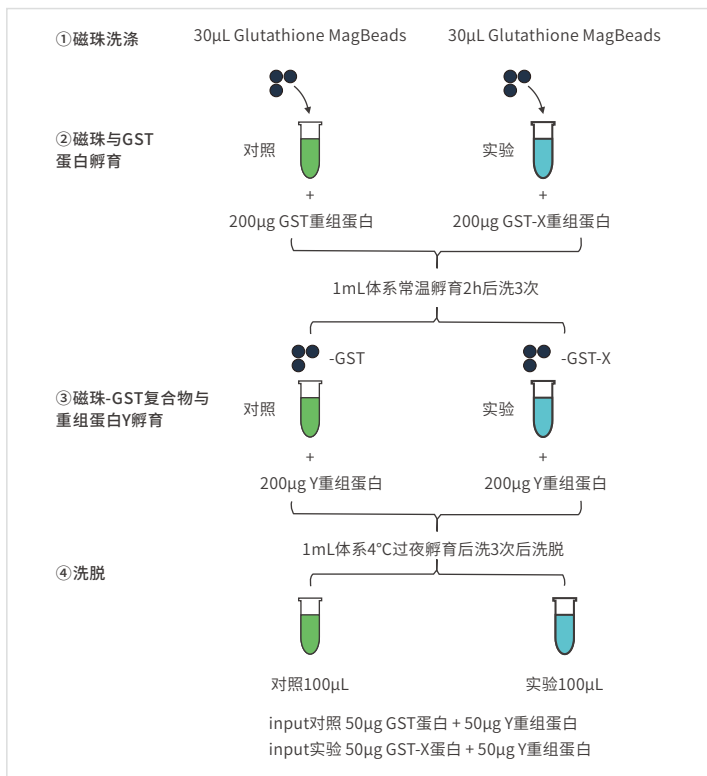


图2: 验证2个已知蛋白间的互作

3. 试剂盒组分

组分	容量 (6T)	保存温度
Lysis buffer	9 mL	4°C
Glutathione MagBeads	200 μ L	4°C
Incubation buffer	12 mL	4°C
Washing buffer	30 mL	4°C
Elution buffer	800 μ L	4°C避光
Protease inhibitor (100X)	35 μ L	-20°C

特别提醒1:需自备重组蛋白、PBS、6X Loading buffer、磁力架等试剂耗材。

特别提醒2:6T为6次单组(1组对照或1组实验) pull-down实验,后面的操作步骤中包含了对照和实验各1组,需消耗2T试剂。

4. 操作步骤

4.1 蛋白提取(选做,若为2个重组蛋白验证互作则不做蛋白提取步骤,从4.2步骤开始)

4.1.1 细胞样本

- 1) 洗涤:预冷的 1 mL PBS 洗涤样品(约 2×10^7 个细胞) 2次,最后一次尽量吸干 PBS;
- 2) 裂解:根据细胞量加入 990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100X),冰上充分裂解 20~30 min,每隔5min上下颠倒混匀 1次;
- 3) 超声:用超声波细胞破碎仪超声5min,功率20%,超声3s,间歇3s,冰浴超声;
- 4) 离心:4°C 12000 rpm, 10min,收集上清。

4.1.2 组织样本

- 1) 研磨:取新鲜组织或低温组织(约0.3g),置于灭菌后预冷的研钵中,用液氮研磨至粉状;
- 2) 裂解:取990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100X),混匀作为裂解液,吸取

800 μ L裂解液加入研钵,在冰上继续研磨5-10min至样品成细腻的匀浆状,转移至新的1.5mL EP管中,再向研钵中加入剩余的200 μ L裂解液收集残留的样品,同样转移至该EP管;

- 3) 装有样品匀浆的EP管在冰上充分裂解30min,每隔5min上下颠倒混匀1次;
- 4) 超声:用超声波细胞破碎仪超声8-10min,功率20%,超声3s,间歇3s,冰浴超声;
- 5) 离心:4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心10min,收集上清,再向上清中加入Lysis buffer补充体积至1mL,混匀。

备注:蛋白提取整个过程都在冰上操作,减少高温造成的蛋白降解,超声过程中最好不要有气泡产生,减少蛋白降解。总蛋白放在-20 $^{\circ}$ C保存。

4.2 GST pull-down

4.2.1 磁珠准备

- 1) 将Glutathione MagBeads从4 $^{\circ}$ C冰箱取出,上下颠倒混匀数次,使磁珠和溶液混合均匀,分别取30 μ L到2个干净的1.5mL Ep管中,记为对照和实验;
- 2) 加入0.5mL预冷的Washing buffer重悬磁珠,置于磁力架上静置1min,分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清;
- 3) 重复步骤2) 2次,共洗涤3次。

4.2.2 磁珠结合GST-X蛋白

- 1) 往实验组加入200ug GST-X重组蛋白,对照管不加蛋白或加入200ug GST重组蛋白;用Incubation buffer补足体积至1mL,室温静音混合孵育2h;
- 2) 将2管置于磁力架上静置1min,分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清;
- 3) 加入0.5mL预冷的Washing buffer,置于磁力架上静置1min,分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清;
- 4) 重复步骤3) 2次,共洗涤3次。

4.2.3 诱饵蛋白结合互作蛋白Y(除GST标签外的其他重组蛋白或总蛋白)

- 1) 2管分别加入200ug Y重组蛋白或500-1000ug总蛋白,加Incubation buffer将体积补至1mL,4 $^{\circ}$ C静音混合孵育过夜(约16h);

- 2) 将2管置于磁力架上静置1min, 分离磁珠和溶液, 用移液枪小心吸弃上清;
- 3) 加入0.5mL预冷的Washing buffer, 置于磁力架上静置1min, 分离磁珠和溶液, 用移液枪小心吸弃上清;
- 4) 重复步骤3) 2次, 共洗涤3次。

4.2.4 洗脱

- 1) 2管均加入100 μ L洗脱液, 沸水浴10min, 12000rpm离心5min, 取上清, 加入20 μ L 6X Loading buffer, 沸水浴8-10min, 记为对照组和实验组;
- 2) 另取2支干净的1.5mL EP管, 分别记为Input对照组, Input实验组, 向Input对照组中加入GST重组蛋白和Y重组蛋白各50 μ g, 向Input实验组中加入GST-X蛋白和Y重组蛋白各50 μ g(若为总蛋白则加入100 μ L), 加入1/5体积6X Loading buffer, 沸水浴8-10min。
- 3) 对照组、实验组、Input对照、Input实验置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

4.3 WB

各取30 μ L对照、实验、Input对照、Input实验, 开展SDS-PAGE和Western blot 检测。

4.4 银染(选做)

- 1) 取30 μ L对照、30 μ L实验、2 μ L Input对照、2 μ L Input实验, 开展PAGE凝胶电泳。
- 2) 固定: 将电泳后的凝胶从玻璃板上剥离下来, 清水冲洗干净, 放入干净的直径12cm玻璃皿中, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃5min, 弃掉去离子水, 加入固定液没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃30min。
- 3) 致敏: 弃掉固定液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃5min, 重复水洗一次, 共2次, 加入致敏液没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃30min。
- 4) 染色: 弃掉致敏液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃2min, 重复水洗一次, 共2次, 加入染色液没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃20min。
- 5) 显色: 弃掉染色液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃1min, 重复水洗一次, 共2次, 加入显色液没过胶, 在脱色摇床上室温摇晃2min左右, 溶液变浑浊, 弃掉液体, 加入新的显色液继续显色至目的条带清晰, 拍照。

4.5 质谱(选做)

取30 μ L对照和实验组蛋白样品开展LC-MS检测。

5. 常见问题

通过pull-down后WB验证发现,虽然可见目的条带,但是背景很高:

多方面原因造成:

- 1) 实验仪器或试剂被污染,使用洁净的仪器及试剂。
- 2) 转移膜上的目特异吸附导致背景高,实验操作过程中戴手套,使用镊子来取,不要接触膜转移面。
- 3) 制备样品中可能有不完全溶释的大的蛋白复合体,则在制备样品后进行短暂超声处理(3次,每次5秒钟),然后离心,取上清后进行后续试验。
- 4) 洗涤不彻底,则需要多次洗涤,并设新增加洗涤液中的NaCl和去垢剂浓度。
- 5) 使用了过多的细胞或组织进行裂解导致背景高,则须减少样本量,推荐100-500 μ g细胞裂解物。
- 6) 蛋白降解也可能出现高背景的情况,尽量使用新鲜制备的样品。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

