

GST Pulldown Kit

GST Pulldown 试剂盒

目录号

DLI301

产品简介

GST pulldown 融合蛋白捕获技术，利用基因重组将诱饵蛋白与 GST 标签融合表达，GSH 包裹的磁珠与融合表达的诱饵蛋白结合，经过裂解、结合、洗涤及洗脱后，可以捕获到诱饵蛋白及可与诱饵蛋白结合的蛋白（捕获蛋白），本试剂盒洗脱样品可以用于质谱分析鉴定蛋白，或用于 western blot、ELISA 等技术进行验证蛋白间互作。

产品组成

组分	规格 (20 T)	储存
GST Pulldown buffer A	32 mL	4 °C
Protease inhibitor	0.6 mL	-20 °C
Clean beads	200 μL	4 °C
GSH beads	0.8 mL	4 °C
Binding enhancer PD	6 mL	4 °C
GST Pulldown WB	30 mL	4 °C
WB elution buffer	2 mL	4 °C
MS elution buffer	2 mL	4 °C

产品应用

- ◆ 蛋白质互作功能结构域鉴定；
- ◆ 蛋白质直接互作分析；
- ◆ 蛋白质互作位点鉴定；
- ◆ 蛋白质结合的代谢物、金属离子鉴定。

产品特点

- ◆ 蛋白质互作功能结构域或互作位点鉴定；
- ◆ 在蛋白质互作网络的前提下，明确蛋白质是否直接互作分析；
- ◆ 限制在蛋白质需要融合表达 GST 标签的体系使用；
- ◆ GST 融合表达可以增强目标蛋白的丰度，有利于本底表达丰度低的目标蛋白研究。

使用方法

1. 蛋白提取 (时间 30 min)

- 根据样本类型，使用不同的离心力收集诱饵蛋白及捕获蛋白对应的细胞样品；
- 诱饵及捕获的蛋白细胞样本，分别加入 700 μL 的 GST Pulldown buffer A 和 15 μL Protease inhibitor，充分吹打混匀，合并样本至一管；
- 使用 2~3 mm 探头，600~800 W 功率，5 s on、5 s off 冰浴超声破碎细胞（诱饵及捕获）15~30 min；
- 4 °C 12000 rpm 离心 10 min，转移上清至新离心管中；
- 加入 10 μL Clean beads，室温结合孵育 10 min；
- 在磁力架上转移 100 μL 上清（标示为 Input，直接保存于 -20 °C 待用），转移 1.2 mL 上清至 1.5 mL 离心管中（标示为 pulldown）；

2. 准备磁珠 (时间 10 min)

- 取 40 μL GSH 磁珠，加入 200 μL GST Pulldown buffer A，轻弹混匀 5 次；

b. 磁力架上去除 200 μ L 上清；

3. Pulldown (时间 60 min)

a. 转移 40 μ L GSH 磁珠至 pulldown 样品中，并继续加入 300 μ L Binding enhancer PD 并吹打混匀；

b. 在垂直混匀器上，室温摇动孵育 1 h 后，在磁力架上收集磁珠并去除上清；

c. 磁珠中加入 500 μ L GST Pulldown WB，转移至磁珠悬液至 1.5 mL 离心管中，在垂直混匀器上，室温摇动洗涤 5 min，在磁力架上收集磁珠并去除上清，重复本步 2 次（共洗涤 3 次）；

4. 洗脱 (时间 10 min)

a. 选择 1: Western blot 或蛋白染色: pulldown 样品加入 100 μ L WB elution buffer，吹打混匀后 65 $^{\circ}$ C；金属浴洗脱 10 min，在磁力架上收集上清即为洗脱蛋白溶液；

b. 选择 2: 质谱检测: pulldown 样品加入 100 μ L MS elution buffer，95 $^{\circ}$ C 金属浴孵育洗脱 10 min，在磁力架上收集上清即为洗脱蛋白溶液。

注意事项

- ◆ 本次实验前，诱饵及捕获蛋白需要采用 Western-blot 预先判断是否表达；
- ◆ 大肠杆菌：1000 g 离心 5 min 收集 100~500 μ L 菌液，哺乳动物细胞 300 rpm 离心 5 min 收集 $10e^7$ 转染细胞；
- ◆ 根据实验需要，设置阴性对照组，例如：非融合表达的 GST 蛋白作为诱导蛋白；
- ◆ 根据实验需要，设置诱饵蛋白或捕获蛋白的截短组；
- ◆ 超声破碎过程中，如果出现声音不刺耳的情况，可以将程序修改为 3 s on 及 3 s off；或者暂停 10 min 后重新超声的方式，保证超声破碎效果；
- ◆ 长时间静置 GSH 磁珠会沉降，吸取 GSH 前需要轻轻吹打混匀；
- ◆ GSH 磁珠在第 2 部分实验准备完成；
- ◆ 每次洗涤需充分去除洗涤液，充分降低背景；

◆ 室温是指 20~37 $^{\circ}$ C，如超出此范围建议在恒温摇床中孵育；

◆ MS elution buffer 不含去污剂可以用于下游质谱分析；

◆ 洗脱液中加入 1/4 体积的蛋白质上样缓冲液经高温变性后可以开展银染或 Western blot 检测。

保存条件

保存条件见产品组成，保质期 12 个月。4~8 $^{\circ}$ C 运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议，欢迎随时与我们联系：

product@tsingke.com.cn。

说明书版本号

1.1.1.I301.2509

