



# GST Protein Pull Down Kit

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	1
3. 注意事项.....	3
4. 问题及解决方案.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	4

## 1. 产品介绍

Glutathione Beads 4FF 可以一步纯化各种表达系统表达的谷胱甘肽 -S- 转移酶、谷胱甘肽依赖型蛋白和谷胱甘肽转移酶的重组衍生物。另外试剂盒内经过优化的缓冲液, 为蛋白互作实验提供了最佳的反应条件, 增强了蛋白互作实验的稳定性, 更有效的去除实验背景。本产品可广泛应用于大肠杆菌裂解物、细胞裂解物、细胞分泌上清等样品中的蛋白互作验证, 具体组分见表 1。

表1. GST Protein Pull Down Kit产品组分

组分名称	规格(5T)	规格(25T)
Glutathione Beads 4FF	0.15ml	0.75ml
Lysis Buffer A	5ml	25ml
Lysis Buffer B(1000×)	0.1ml	0.5ml
Wash Buffer Enhanced (GST)	25ml	125ml
Balance/Wash Buffer	100ml	500ml
GSH	0.2g	1g
Pull-down Column Accessory	10套	50套

注: 表格中标注的为填料实际体积 (填料: 保护液=1:1), 如0.15ml填料的混悬液体积为0.3ml。

## 2. 使用方法

### 2.1 缓冲液的准备

可使用试剂盒准备的缓冲液, 也可根据实际情况配制不同的缓冲液体系。所有缓冲液在使用前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤, 缓冲液建议 4℃保存, 若试剂浑浊, 请立即丢弃。

下列可能用到的试剂及材料未提供, 需额外准备:

- 1) 电泳上样缓冲液 (SDS Loading Buffer), 非还原性 (5×): 0.3M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 50% 甘油, 0.5% 溴酚蓝;
- 2) 二硫苏糖醇 (DTT);
- 3) 蛋白酶抑制剂;
- 4) 蛋白互作所用诱饵蛋白、靶蛋白。

### 2.2 样品准备

#### 方案 I: 大肠杆菌细胞的裂解

- 1) 按照适当方法进行细菌培养、诱导、离心收菌, 先加入 Balance/Wash Buffer (添加比例: 1g 菌体加入 9ml), 震荡完全分散菌体, 加入 Lysis Buffer A (添加比例: 1g 菌体加 1ml)。混合均匀后室温裂解 5-10min, 菌体悬液渐渐变清亮透明。
- 2) 按菌体悬液总体积加入 1/1000 体积的 Lysis Buffer B (如 10ml 已裂解菌液加入 10μl Lysis Buffer B), 混合均匀后, 消化核酸反应 5-10min, 反应后菌液应不粘稠。

3)按照适当方法离心(例如: 12000×g, 5-10min), 分离上清与沉淀。如果是可溶蛋白, 直接取上清进行使用, 如果是包涵体, 则取沉淀, 对包涵体进行洗涤以及变性复性。

注: 如裂解终产物较为浑浊, 或样品中目的蛋白丰度较低, 可调整 Lysis Buffer A 的使用量。

#### 方案 II: 哺乳动物细胞的裂解

1)将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 收集细胞, 弃上清。

注: 如果是贴壁细胞, 通过胰蛋白酶消化将其从培养容器表面释放。

2)用预冷的 Balance/Wash Buffer 将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 收集细胞, 弃上清。同时配制裂解液, 配方为 Balance/Wash Buffer: Lysis Buffer A=7: 3, 配制好后置于冰上预冷。

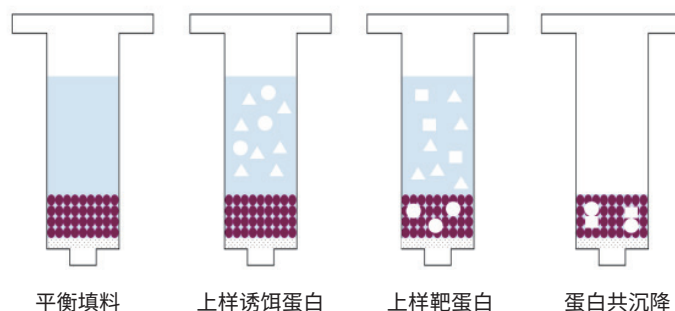
3)向细胞团块中加入上述步骤 2)的预冷裂解液。每 50mg 细胞团块使用 500μl。

4)将上述的样品在冰上孵育 30min, 期间混匀几次, 13000×g 离心 10min, 去除细胞碎片。

5)将上清转移到一个新管中, 准备蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

注: 如果互作蛋白与核酸存在相互作用, 可加入 Lysis Buffer B(1000×) 进行样本处理。

## 2.3 蛋白互作



蛋白互作操作流程

### 2.3.1 填料平衡

1)将 Glutathione Beads 4FF 充分混匀, 取 50μl 加入到装有垫片的 Pull-down Column Accessory 内管中(填料实际体积占悬液一半, 即实际填料为 25μl)。

2)取下红色堵头, 可用掌上离心机或其他微量离心机 6000rpm 瞬时离心, 去除填料保存液。

3)堵住下堵头, 每次取 500μl 的 Balance/Wash Buffer 加入到填料中, 充分混匀填料与液体后, 取下堵头瞬时离心, 甩去管内液体并将液体丢弃, 填料重复平衡 3-5 次后待用。

注: 填料不可长时间干涸, 且每次清洗、上样、洗脱均需吹打混匀填料与样品。

### 2.3.2 上样诱饵蛋白

堵住下堵头, 向上述平衡好的填料(步骤 2.3.1)中加入诱饵蛋白, 如诱饵蛋白为纯样, 根据填料载量推荐上样量为 250μg, 如是裂解产物, 可根据跑胶条带或者直接上样。建议上样前用 Balance/Wash Buffer 稀释补充体积至 500μl, 离心柱管最大装载体积为 800μl, 室温混旋孵育 30min 以上。

注: 非离心时, 离心柱管应用堵头封闭下水口。孵育温度和时间范围推荐为: 室温、30min-2h, 或者 4°C、1h-16h, 根据实际的结合效果进行调整。

### 2.3.3 上样靶蛋白

1)诱饵蛋白孵育完成后, 取下堵头, 将孵育完成的填料(步骤 2.3.2)瞬时离心甩干液体(上清留样, 用于后续检测)。

2)每次取 500μl 的 Balance/Wash Buffer 加入到孵育完成的填料中, 充分混匀填料与液体后, 进行瞬时离心, 填料重复清洗 3-5 次后待用。

3)如洗杂效果不佳, 可加入 Wash Buffer Enhanced (GST) 进行增强洗杂, 后续步骤清洗时, 同样需要使用 Wash Buffer Enhanced (GST)。如果上一步清洗满足需求, 可跳过此步骤。

4)堵住下堵头, 将带有靶蛋白的裂解液或上清加入到清洗后的填料中, 如需进行稀释, 可用 Balance/Wash Buffer 将样本稀释至 500ul, 室温孵育 1h 以上。

注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、1h-2h, 或者 4°C、1h-16h, 根据实际的蛋白互作效果进行调整。

5)孵育完成后离心甩去液体(上清留样, 用于后续检测), 每次取 500μl 的 Balance/Wash Buffer 加入到孵育完成的填料中, 充分混匀填料与液体后, 进行瞬时离心, 填料重复清洗 3-5 次, 最后一次清洗可以将介质 - 诱饵蛋白 - 靶蛋白复合物转移至一个新的 Pull-down Column Accessory 外管中进行。



## 2.4 洗脱

### 方案 I: 竞争 \ 酸 \ 变性洗脱

- 1) 本试剂盒提供 GSH 粉末, 用分析天平称取 3.1mg GSH, 加入到 1ml 的 Balance/Wash Buffer 或 Wash Buffer Enhanced (GST) 中稀释成终浓度为 10mM 谷胱甘肽洗脱缓冲液(现用现配), 然后用 NaOH 调至中性, 吸取 150-250 $\mu$ l 配制好的 GST 洗脱液加入到清洗好后的填料中, 充分混匀填料与洗脱液后, 进行离心并收集洗脱液。如洗脱效果不佳, 则可提高谷胱甘肽浓度或多次洗脱。
- 2) 使用甘氨酸 (pH 3.0) 同样可以洗脱蛋白, 此方案需要自备试剂, 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱可能会损伤蛋白, 并且使用后需要用 1M Tris, pH 8.5 进行中和。
- 3) 使用 SDS Loading Buffer 亦可进行洗脱, SDS Loading Buffer 洗脱能力较强, 可以洗脱填料上的绝大部分蛋白(包括非特异性吸附), 但是会使蛋白失活, 无法维持三维结构。

### 方案 II: 煮球

用 150-250 $\mu$ l Balance/Wash Buffer 或 Wash Buffer Enhanced (GST) 重悬填料, 直接将填料混合物取出添加 SDS Loading Buffer, 95-100 $^{\circ}$ C 煮样 10min, 12000rpm 离心 10min 后取上清进行跑胶。

## 3. 注意事项

- 1) 在进行蛋白互作操作之前, 请务必认真阅读此说明书。
- 2) 除非另有说明, 所有操作建议于 4 $^{\circ}$ C 下进行。
- 3) 填料应保存在储存溶液中, 防止干燥, 使用前请充分混匀。
- 4) 如果需要在还原条件下洗脱, 向 1 $\times$  电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 10-20mM)。
- 5) 经煮沸后的填料失去结合能力, 经煮沸的填料不应再次使用。
- 6) 为保证最佳的实验结果, 请选择纯度较高的诱饵蛋白进行蛋白互作。
- 7) 对于蛋白互作实验, 不同类的诱饵蛋白与靶蛋白结合的亲和性是有区别的, 因此若本试剂盒提供的缓冲体系不能获得很好的实验结果, 可自行优化缓冲液进行实验。
- 8) 实验设计时, 建议加入对照组, 以备后续实验结果分析。
- 9) 在确定实验结果前, 建议保留各步骤的样品以备验证(如 input、流穿、洗杂、洗脱、煮球)。

## 4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
洗脱组分中没有诱饵蛋白	蛋白可能是包涵体, 没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式
	表达量太低	优化表达条件
	GST 标签表达无活性	优化表达条件
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在填料上	用 Wash Buffer Enhanced 进行增强洗杂
	进行蛋白免疫印迹时, 清洗不充分	增加清洗次数
靶蛋白没有被捕获	样品中靶蛋白量过少	通过 SDS-PAGE 或 Western Bolt 验证蛋白表达或裂解效率, 将靶蛋白量提高至推荐用量
	蛋白互作力太弱或无法结合	优化 Lysis/Wash Buffer 添加蛋白互作的辅助因子
	蛋白降解	加入蛋白酶抑制剂 对温度敏感的蛋白, 尽量在 4 $^{\circ}$ C 或冰浴条件下进行实验操作



## 5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
GST Protein Pull Down Kit	BK0054-t	5T
	BK0054-01	25T
His Protein Pull Down Kit	BK0055-t	5T
	BK0055-01	25T
BCA Protein Assay Kit	BK0001-01	250T
	BK0001-02	1250T