

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

GST pull-down 试剂盒(凝胶法)

GST pull-down Kit(Agarose)

产品货号：EA-IP-K008

产品规格：25 T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：techsupport@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

背景信息

GST Pull-Down 实验基于谷胱甘肽-S-转移酶蛋白（GST，glutathione-S-transferase）与谷胱甘肽（Glutathione，GSH）之间发生的可逆的特异性结合。通过 GST 标记的诱饵蛋白分离与纯化对应的未知捕获蛋白。简单的实验原理是：将 GSH 固定于琼脂糖凝胶上，形成 GSH-琼脂糖凝胶；将诱饵蛋白与 GST 融合表达，获得的 GST-诱饵蛋白融合蛋白可与 GSH-琼脂糖凝胶结合；若环境中存在与诱饵蛋白互做的捕获蛋白，则会形成“琼脂糖凝胶-GSH-GST-诱饵蛋白-捕获蛋白”复合物，那么与诱饵蛋白互做的捕获蛋白即可被分离并检测。

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，操作迅速便捷，特异性强和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。

性能指标

1. 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。

2. 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。

3. 凝胶属性：

琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 50 μ m。

4. 成分

1mL 共价偶联 GSH 的凝胶，保存于 1mL 含防腐剂与 50%甘油的 PBS 中。

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存方法
离心柱 Centrifugal column	C	27 个	室温, 12 个月
GSH-琼脂糖凝胶 GSH-agarose	G1	2mL	4°C, 12 个月
细胞裂解液 Lysis buffer	L1	30mL	4°C, 12 个月
GST 小鼠单抗 GST Monoclonal Antibody	A1	50 μ L	-20°C, 12 个月
谷胱甘肽 Glutathione	E3	1g	4°C, 12 个月
PBS Buffer, pH7.4 (10 \times)	P10	50mL	4°C, 12 个月
PBST Buffer,pH7.4 (10 \times)	P10T	50mL	4°C, 12 个月
说明书一份			

注意事项

1. 运输和保存:

本试剂盒在冷藏条件下运输。

收货后, 如果暂时不用, 请将离心柱 C 取出, 室温保存; GST 小鼠抗体 A1 取出, 于-20℃保存; 试剂盒其余组分保存于 4℃。

2. 试剂使用建议:

10×PBS、10×PBST 使用前需用去离子水稀释成 1×工作液。

3. 凝胶悬液与亲和凝胶

本试剂盒以凝胶悬液形式提供亲和凝胶, 凝胶悬液中亲和凝胶的含量为 50%, 使用前先温和重悬凝胶悬液, 然后按照需求取用。

例如: 2mL 凝胶悬液中, 含有 1mL 亲和凝胶。

4. 凝胶使用建议

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。

试剂配制

1. 1×PBST

按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBST 稀释待用，例如：1mL 10×PBST 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBST。现用现配。

2. 1×PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBS 稀释待用，例如：1mL 10×PBS 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBS。现用现配。

3. 洗脱液

称 0.6g Tris base, 0.88g NaCL, 0.31g 谷胱甘肽 E3, 溶解于 10ml 去离子水中，制成 10×洗脱液。

按照 9:1 的比例用去离子水将 10×洗脱液稀释成工作液待用。现配现用。

使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。以下试剂使用量以 40 μ L 凝胶体积计算，可从细胞上清中结合 100-150 μ g GST-融合蛋白。您也可以根据具体凝胶用量，按比例调整相应试剂用量。

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，由于构象的差异，GST 标签融合蛋白可能表现出较低的结合能力。此外，大分子量的融合蛋白质可能由于空间位阻，妨碍 GST 标签与凝胶上的 GSH 的结合。

1. 诱饵蛋白制备

1) 分泌型 GST 标签融合蛋白

收集培养基上清，检测诱饵蛋白浓度。如果诱饵蛋白质浓度较高，建议用 1 \times PBS 稀释至蛋白质终浓度为 500 μ g/mL，以备后续实验。

2) 哺乳动物胞内表达的 GST 标签融合蛋白

a) 收集细胞

悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

b) 用预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 1 \times PBST 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。

c) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，反复吹打后冰上放置 10~20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 0.5~1 \times 10⁷ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

d) 用超声破碎仪处理细胞裂解液，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，以备后续实验。

3) 大肠杆菌表达的 GST 标签融合蛋白

注：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。

- a) 4°C 离心收集菌体，4000rpm 离心 15min，弃上清，加入适量 PBST 悬浮菌体，加入终浓度 1mM PMSF，冰浴条件下超声波破碎细胞。
 - b) 4°C 高速离心，8000rpm 离心 15min，取上清于新的 EP 管中，以备后续实验。
- 4) 已经纯化好的 GST 标签融合蛋白
- 检测诱饵蛋白浓度。如果诱饵蛋白质浓度较高，建议用 1×PBS 稀释至蛋白质终浓度为 500µg/mL，以备后续实验。

注：如果诱饵蛋白中含有 GSH，需要先通过透析或者超滤的方式去除，才可以进行后续实验步骤。

2. Pull-down 实验捕获未知蛋白

1) 装柱及诱饵蛋白固定

- a) 温和重悬 GSH-琼脂糖凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 80µL 凝胶悬液(约含 40µL 凝胶)至离心管中。加入 600µL 1×PBS 清洗亲和凝胶，1000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 2 次。
- b) 将步骤 1 得到的诱饵蛋白加入预洗好的凝胶中，轻柔混匀，在 4°C 摇床上孵育 3h。此处需保留部分诱饵蛋白样品，作为 input 对照，以备后续检测使用。
- c) 将离心管中的复合物转移到离心柱中，1000rpm 离心 5min，转移离心液至新的离心管中，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 500µL GST 标记的融合蛋白裂解液。对于已纯化好的 GST 标签融合蛋白，使用足够的体积以确保添加约 100-150µg 的诱饵蛋白。

d) 至向离心柱中加入 500 μ L 1 \times PBS，倒置几次温和混匀，清洗凝胶，1000rpm 离心 30sec，弃离心液。重复 4 次。得到诱饵蛋白-凝胶复合物。

2) 捕获未知蛋白

a) 向诱饵蛋白-凝胶复合物中，加入 800 μ L 的准备好的捕获蛋白样品。在 4 $^{\circ}$ C 的摇床上轻轻摇晃至少 3 小时或孵育过夜。此处需保留部分捕获蛋白样品，作为捕获蛋白 input，以备后续检测使用。

注：为保证诱饵蛋白和捕获蛋白充分结合，可能需要更长的孵育时间，可根据实验情况调整。

b) 孵育结束后，1000rpm 离心 30sec，转移离心液至新的离心管中，标记为捕获蛋白流穿液，以备后续检测使用。

c) 向离心柱加入 500 μ L 1 \times PBST，倒置几次温和混匀，清洗凝胶，1000rpm 离心 30sec，弃离心液。重复 4 次。得到诱饵-捕获蛋白-凝胶复合物。

3) 洗脱诱饵-捕获蛋白

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。

a) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

将适量凝胶移至 1.5ml 离心管，离心，弃上清，向凝胶中按 1:1 加入 2 \times 上样缓冲液，混合均匀，煮沸 5 min。离心分离凝胶，收集上清，进行 SDS-PAGE 或 Western Blot 分析。

b) 非变性洗脱法：此方法洗脱的蛋白，可用于后期功能分析。

向离心柱中加入 250-500 μ L 洗脱液，室温孵育 10 min；换新的收集管，1000rpm 离心 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。

c) 本试剂盒提供了 GST 小鼠单抗，您可以按照 1:10000 稀释度配制为工作液，用于诱饵蛋白的 WB 检测。

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白共沉淀或者后续 IP 实验结果。
4. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同目标蛋白的性质，优化实验条件，选择最合适的实验方案。