

#A10024

## GST Pull-Down 试剂盒

【适用于蛋白相互作用】

□ 25 T



**Order** 021-34695924  
orders@ab-mart.com  
**Support** 400-6123-828  
support1@ab-mart.com  
**Web** www.abmart.cn

### 产品描述

GST 蛋白质相互作用 Pull-Down 试剂盒含有必要成分，用于捕获及纯化与包含谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合标签重组蛋白发生相互作用的蛋白。实验者需提供含有标签的融合蛋白 (诱饵) 及表达推测蛋白相互作用靶蛋白 (猎物) 的细胞。Pull-Down 试剂盒提供：细胞裂解缓冲液，谷胱甘肽亲和树脂 (琼脂糖微珠)，优化的结合、洗脱缓冲液及详细的操作步骤。该试剂盒可使初学者掌握实验方法，而对于有经验的研究者可更方便使用并获得稳定可靠的结果。

### 产品储存

4° C 保存，不要 -20° C 保存。

### 试剂盒组分 (可进行 25 次实验)

试剂名称	体积
谷胱甘肽琼脂糖介质	1ml
细胞裂解液 (适用于动物细胞)	100ml
平衡/洗杂液	50ml
洗脱液	10ml

注：细胞裂解液使用前，立刻加入蛋白酶抑制剂 (推荐购买 A10004 复合型蛋白酶抑制剂)。

### 使用方法

#### A. 制备细胞裂解物

1. 吸干培养基。添加含有调节分子的新鲜培养基，使其在预定的时间内对细胞进行处理。
2. 收集细胞，去除培养基后用冰预冷的 1X PBS 洗涤细胞一次。
3. 去除 PBS，并在并在细胞培养容器中加入适量的已经添加了 Cock tail 蛋白酶抑制剂的细胞裂解液。每  $10^7$  个细胞加入 1ml 冰预冷的细胞裂解液 (相当于 100mm 的培养皿，150cm<sup>2</sup> 的培养瓶)，并在冰上孵育至少 5 分钟。
4. 从板上刮下细胞，把提取物转移至微量离心管。置于冰上。
5. 在冰上进行 3 次超声破碎，每次 5 秒。
6. 在 4° C，在 14,000 x g 条件下，微量离心 10 分钟，将上清转移到新管中。上清液即为细胞裂解物。如有必要，裂解物可保存在 -80° C。

注：细胞裂解物制备好之后，可先进行蛋白免疫印迹法检测，以此来确定细胞裂解物里存在目标蛋白。

#### B. 谷胱甘肽琼脂糖介质的平衡

1. 吸取 40ul 的谷胱甘肽琼脂糖介质于 1.5ml 离心管中，加入 500ul 平衡/洗杂液；
2. 轻轻混匀，然后 12000g 离心 1min，去除上清，保留沉淀；

### C. 靶点蛋白捕获

1. 在上面的离心管内加入 500  $\mu$ l (含总蛋白 200-1000ug) 细胞裂解物。  
建议同时采用不含有目的蛋白的细胞裂解液作为对照。
2. 在 4°C 温和地混匀 1-3 小时或过夜。
3. 12000g 离心 1min, 保留沉淀。
4. 使用 0.5ml 平衡/洗杂液清洗沉淀, 12000g 离心 1min, 保留沉淀。
5. 重复第 4 步, 共计清洗 3 次。

注: 清洗, 去上清的时候需要注意避免吸走填料

### D. 用蛋白免疫印迹法进行分析

1. 在上述沉淀中加入 200ul 洗脱液, 温和振荡混匀 5min, 然后 12000g 离心 1min。
2. 取上清(15-30  $\mu$ l), 加入 loading buffer, 进行 SDS-PAGE 蛋白质印迹法分析。
3. 剩余上清转移至新的 1.5ml 离心管, 用于其他实验, -80 保存。

### 注意事项

实验前: 为了获得更好的实验结果, 所有的步骤均需要根据实际情况进行优化。

例如: 根据细胞系或被捕获的抗原后续用途的不同可选择更加合适的细胞裂解条件。对于没有细胞壁结构的哺乳动物细胞, 可以直接使用去污剂进行裂解, 但其它细胞, 则需要一些机械剪切力辅助, 例如超声破碎。以下列出的(包括裂解液、孵育时间、体积及浓度)是作为初始尝试的条件建议, 最终的优化需要根据实际情况调整。

另外, 细胞裂解物在进行免疫(共)沉淀前, 可先进行蛋白免疫印迹法检测, 以此来确定细胞裂解物里存在目标蛋白。

### 其他推荐产品

- |         |  |
|---------|--|
| #A10004 | 200X 蛋白酶抑制剂复合物 (200X Protease Inhibitor Cocktail) 【使用简单方便】 |
| #A10006 | 彩色预染蛋白 Marker (11-180kDa) 【超级性价比】                          |
| #A10008 | 膜蛋白提取试剂盒 【有效富集膜蛋白, 小白秒变高手】                                 |
| #A10009 | 核蛋白提取试剂盒 【有效富集核蛋白, 小白秒变高手】                                 |
| #A10010 | 1X 丽春红快染液 【转膜效果质控好帮手】                                      |
| #A10013 | SDS-PAGE 快速染色液 【2 分钟出条带, 再也不同等过夜了】                         |