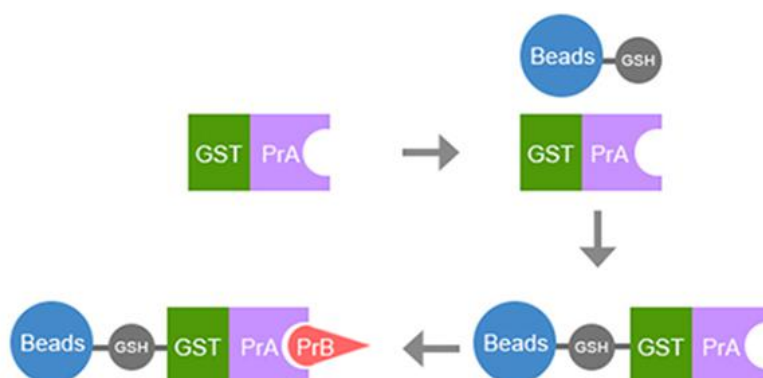


GST pull down 实验流程

本文主要介绍了 GST pull-down 实验的服务流程（数据以实际实验为准）

GST 蛋白的表达

1. 将表达 GST 融合蛋白的质粒转入 BL21 大肠杆菌菌株中；
2. 挑单克隆于 3ml LA(LB+Amp)培养基中，37℃摇菌过夜，获得种子液；
3. 将种子液稀释于 50ml 2x YT A(YTG+Amp)培养基中，使起始 OD600 为 0.1；
4. 28℃,220rpm 摇菌培养 2 小时；
5. 加入 50μl 100mM IPTG,16~27℃摇菌培养 1~8 小时；
6. 收菌，将菌液倒入大离心管，2 管/50ml 菌液，4℃ 5000rpm×5min 离心，弃上清；
7. 加入 10ml PBS/管，重悬细胞,5000rpm 离心 5min，弃上清；
8. 超声破壁，将裂解液分入 1.5ml 离心管中，4℃离心 12000rpm×10min，取上清；
9. 吸取少量上清，加入蛋白电泳上样缓冲液，在沸水中煮 3min，离心(12000rpm,1min)，取上清 SDS-PAGE 电泳，检测表达情况；



gst pull down 实验流程

准备 50% GST 琼脂糖凝胶

10. 将原 75% 谷胱甘肽琼脂糖凝胶的浆液弹至混匀;
11. 取 677 μ l 原液/管, 3000rpm 离心 5min, 弃上清;
12. 加 500 μ l PBS, 颠倒混匀, 3000rpm 离心 5min, 弃上清, 反复 5 次;
13. 加 500 μ l PBS, 颠倒混匀, 配成 50% 谷胱甘肽琼脂糖凝胶备用;

GST 蛋白的纯化

14. 在新鲜制备的细胞裂解液上清中加入 20 μ l 50% 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B, 4 $^{\circ}$ C, 摇床上摇, 反应 30min ~ 60min ;
15. 3000rpm 离心 5min, 弃上清; 该琼脂糖凝胶上即结合了 GST 融合蛋白, (如果仅仅是做纯化效果检测或者蛋白表达量很高, 可以只接合一次, 如果要结合更多则接着往下做);
16. 在管中加入离心后的 1.5ml 新鲜制备的细胞裂解液的上清, 4 $^{\circ}$ C, 反应 30min ~ 60min. 3krpm 离心 5min, 弃上清. 重复该步骤多次, 就可以使琼脂糖凝胶上结合 6 ~ 10ml 裂解液中的 GST 融合蛋白;
17. 在管中加入预冷的 200 μ l PBS (沿壁加入, 小心勿剧烈, 以免打断珠子与蛋白的联接), 轻晃悬浮珠子, 将琼脂糖凝胶洗涤一次, 3000rpm 离心 3min, 弃上清;
18. 反复三次 (最后一次以小枪吸净珠子表面水膜, 其余几次可以中枪吸, 尽量吸净但不吸走珠子), 即获得结合有 GST 融合蛋白的琼脂糖凝胶;
19. 如果用于检测, 在谷胱甘肽加入 15 ~ 20 μ l 1 $\times$ 蛋白电泳上样缓冲液, 在沸水浴中煮 3min. 12000rpm 离心 1min, 取上清作 SDS-PAGE 电泳;
20. 结合的 GST 融合蛋白可用谷胱甘肽洗脱缓冲液洗脱;

检测

21. 将结合有 GST 融合蛋白的谷胱甘肽琼脂糖凝胶悬浮在 500 μ l NETN 缓冲液中加入 20 ~ 30 μ l 含有其他蛋白的溶液同时采用结合有 GST 空蛋白的谷胱甘肽琼脂糖凝胶平行操作作为对照；
22. 在水平摇床上，4 晃动 4 ~ 8 小时；
23. 离心（3600rpm, 2min）吸去上清，注意不要扰动底层的琼脂糖球珠；
24. 加入 200 μ l 缓冲液对琼脂糖凝胶进行洗涤。注意加入缓冲液时要贴壁加，不要直接冲击琼脂糖凝胶，随后轻柔晃动，使其重悬即可；
25. 低速离心（3000rpm，2min）吸去上清，注意不要扰动底层的琼脂糖凝胶；重复步骤的洗涤 2 ~ 3 次；
26. 吸干琼脂糖凝胶上方的水层后，加入 20 ~ 30 μ l 1 $\times$ 蛋白电泳上样缓冲液，沸水浴 4min，冻存于 - 20 $^{\circ}$ C；
27. 做 SDS-PAGE 和 Western 检测另一个蛋白；

GST-pull down 的对照问题

28. 做 SDS-PAGE 时点一个 input 的蛋白（即 B-6 * His）阳性对照，看一下 Western 操作过程中试剂、操作步骤有没有问题
29. 谷胱甘肽琼脂珠上只固定 GST 蛋白，input B-6 * His，用于做阴性对照，看一下是否 GST 会与 input 的蛋白相互作用

相关服务：[GST pull-down 服务](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对,亲和力更优



高通量,周期短,单抗发现快至29天



ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

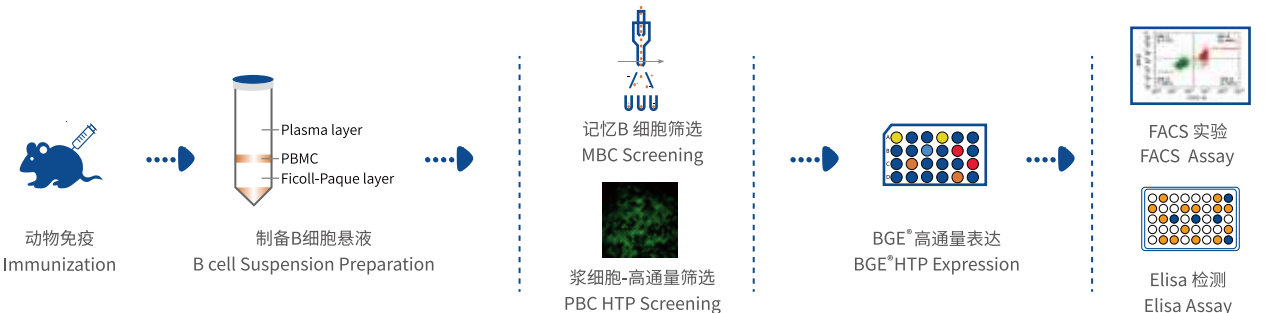


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

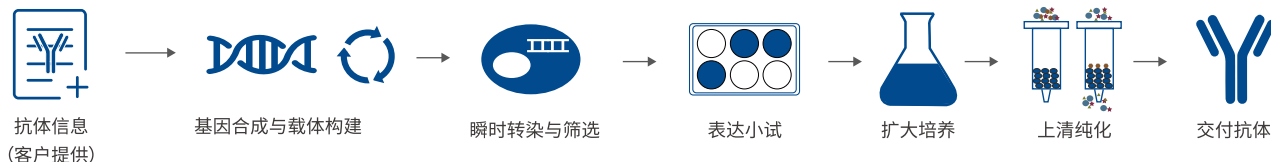
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

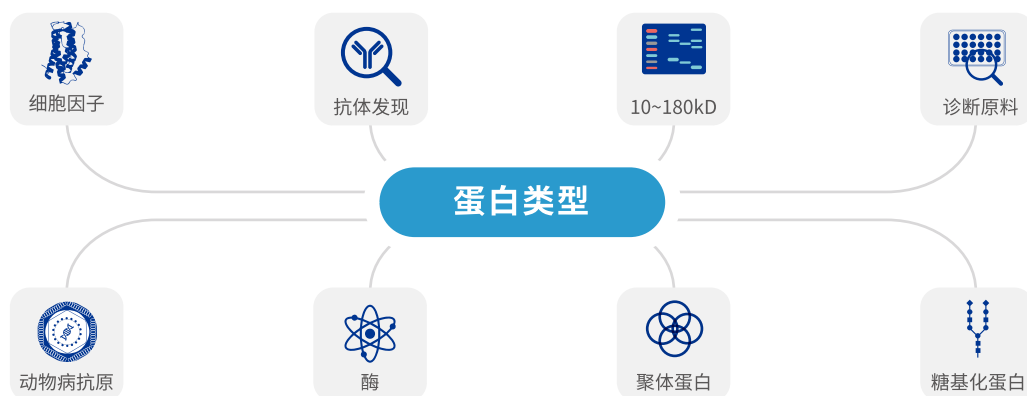


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

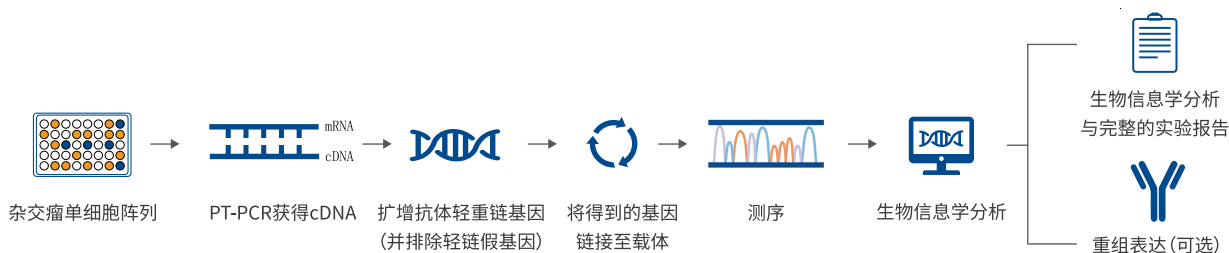
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

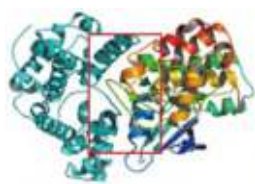


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



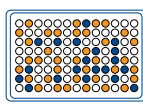
基因合成&质粒抽提



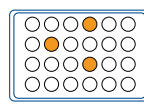
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L