

GST pull down 实验

1. 案例概述	2
2. 实验设计	2
3. GST 融合蛋白的表达纯化	2
3.1. 基因表达载体的构建	2
3.2. 转化	2
3.3. 诱导融合蛋白表达	3
3.4. GST 融合蛋白放大培养与表达鉴定	3
3.5. GST 融合蛋白纯化	3
4. 对照设计	4
5. 对照组实验	4
5.1. 验证 GST 标签与靶蛋白 B 是否结合	4
5.2. 验证层析柱与靶蛋白 B 是否结合	5
6. GST-A 与靶蛋白 B 之间的相互作用分析	5
6.1. 考马斯亮蓝染色与银染结果分析	5
6.2. Western Blot 检测	6
7. 服务网址	7

1. 案例概述

GST 融合蛋白沉降技术 (GST pull down) 是利用 GST 对谷胱甘肽 (GSH) 偶联球珠的亲水性, 使 GST 融合蛋白与谷胱甘肽偶联球珠结合, 从蛋白的混合溶液中钓取与 GST 融合蛋白相互作用的靶蛋白。该法可以鉴定与已知蛋白相互作用的未知蛋白, 也可鉴定两个已知蛋白间是否存在相互作用。

某客户希望通过 GST pull down 实验, 体外验证两种蛋白 A 与 B 之间的相互作用。靶蛋白 B 由客户提供, 是 His 标签蛋白, GST 融合蛋白 A 由德泰生物制备。我们根据过去的项目经验, 制定了严谨可靠的实验方案, 表达纯化得到纯度高于 90% 的 GST-A 融合蛋白, 设计多组对照, 排除了所有干扰因素, 成功验证了两个蛋白之间的相互作用。

2. 实验设计

将客户提交的序列添加 GST 标签连接到载体, 转入大肠杆菌后表达得到 GST 融合蛋白。然后设计对照实验, 排除靶蛋白 B 与 GST 标签的结合的可能, 以及靶蛋白 B 与 GST-Beads 结合的可能, 从而验证 GST-A 和 B 之间的相互作用。先将 GST-A 固定在层析柱上, 捕获与 A 相互作用的靶蛋白 B, 用 PBS 洗去未结合蛋白, 取第一次洗杂的样品, 将 GST-A 与靶蛋白结合的复合物从层析柱上洗脱下来, SDS-PAGE 分析。考马斯亮蓝染色之后, 再银染, 分别拍照, 对比分析。最后 Western Blot 检测蛋白复合物。

3. GST 融合蛋白的表达纯化

高纯度的融合蛋白能降低 GST pull down 假阳性结果的出现概率。德泰生物通过优化基因序列与实验条件, 选择合适载体, 最终纯化得到纯度高于 90% 的 GST-A 融合蛋白。

3.1. 基因表达载体的构建

载体的选择对融合蛋白的获取有很大的影响, 根据不同的实验需要, 构建的载体也是不同的, 我们采用可溶性的 pGEX 载体, 其自带的 GST 标签能促进下游融合蛋白的表达, 使融合蛋白易于纯化。在基因优化之后, 构建 pGEX 表达载体, 酶切鉴定。

3.2. 转化

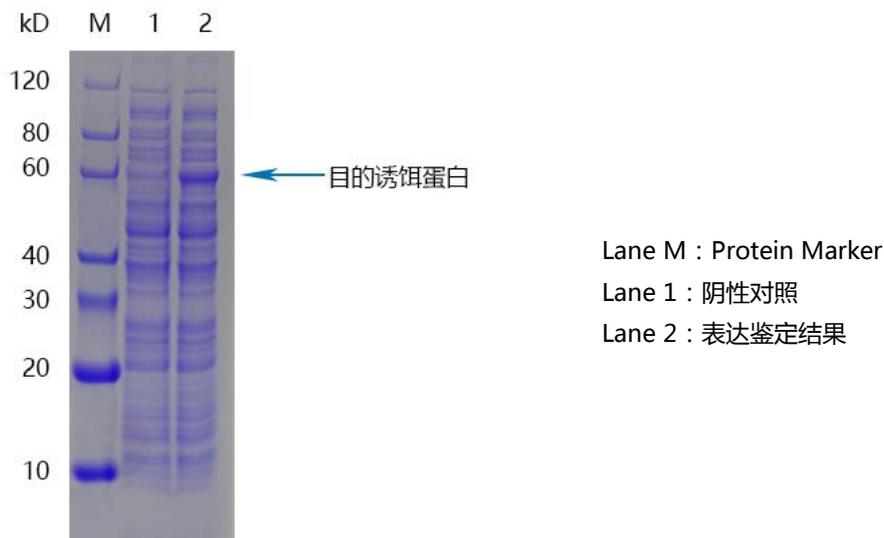
测序和酶切验证无误后，将构建好的含有 GST 标签的基因表达载体，以电转的方式转到感受态细胞内。然后均匀涂布到 LB 平板上（含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硫酸卡那霉素），倒置于 37°C 培养箱过夜。

3.3. 诱导融合蛋白表达

从转化的平板中挑选单克隆，接种到 LB 培养基中（含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硫酸卡那霉素），待培养至 OD_{600} 为 0.5-0.8，向试管培养液中加入终浓度 0.1 mM IPTG，之后分别置于 15°C、37°C 诱导表达。

3.4. GST 融合蛋白放大培养与表达鉴定

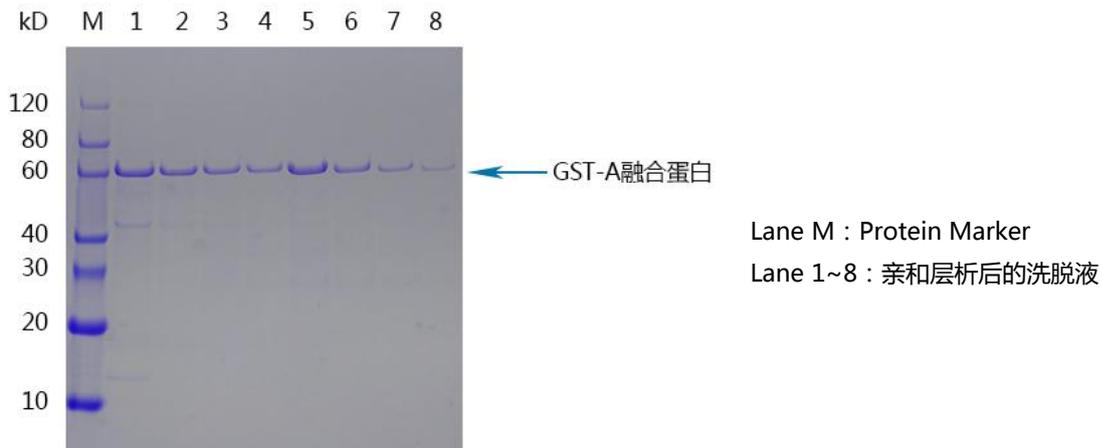
培养 3L 的表达菌，生长至 $\text{OD}_{600}=0.8$ 时，加终浓度 0.1 mM IPTG，15°C 诱导 16 h 后收集菌体。



3-1 融合蛋白表达鉴定结果

3.5. GST 融合蛋白纯化

缓冲液平衡 GSH 层析柱，之后用不同浓度的平衡缓冲液洗脱目标蛋白。并收集洗脱组分，SDS-PAGE 电泳后分析检测。



3-2 融合蛋白纯化结果

4. 对照设计

1. 琼脂糖球珠-GSH (GST-Beads) + GST+ B (排除 GST 标签与靶蛋白 B 的结合作用)
2. 琼脂糖球珠-GSH (GST-Beads) + GST-A+B (验证 GST-A 与 B 相互作用)
3. 琼脂糖球珠-GSH (GST-Beads) + B (排除层析柱 GST-Beads 与靶蛋白 B 的结合作用)

根据 B(靶蛋白)和 GST-A (诱饵蛋白) 设对照组, 排除 GST 标签与靶蛋白的结合, 以及层析柱与靶蛋白的非特异性结合, 以验证 GST-A 与靶蛋白 B 之间的相互作用。

5. 对照组实验

5.1. 验证 GST 标签与靶蛋白 B 是否结合

取 1 个 EP 管, 加入 100 μ l GST-Beads 到 EP 管中, 用 1000 μ l PBS 润洗三次, 加入 150 μ g GST 标签蛋白混合均匀, 并用 PBS 补至 600 μ l, 4 $^{\circ}$ C 层析柜中孵育结合 2h。

分别用 PBS+1% Triton X-100 洗 3 次, 再用 PBS 洗 3 次, 取出 50 μ l 层析柱填料进行 SDS-PAGE, 确认 GST 标签蛋白与层析柱有结合。再加入 150 μ g 的 B 蛋白, 并用 PBS 补足液体到 600 μ l 左右, 以促进蛋白之间充分结合, 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育结合 2h。

对孵育后的流出液取样，洗杂后，取第一次洗杂的溶液留样，再加入 50 μ l 2 \times loading buffer 煮 5min (1 : 1 制样) ， 12000rpm 离心 2min ， 留取上清。对上述样品进行 SDS-PAGE 电泳分析，确认 GST 与 B 蛋白之间无结合 (结果见图 6-1 中的 Lane1-5) 。

5.2. 验证层析柱与靶蛋白 B 是否结合

取 1 个 EP 管，加入 100 μ l GST-Beads 到 EP 管中，用 1000 μ l PBS 润洗三次，加入 150 μ g 的 B 蛋白，并用 PBS 补足液体到 600 μ l 左右，4 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2h。对孵育后的流出液取样，洗杂后，取第一次洗杂的溶液留样。再加入 50 μ l 2 \times loading buffer 煮 5min(1 : 1 制样) ， 12000rpm 离心 2min ， 留取上清。对上述样品进行 SDS-PAGE 电泳分析，确认 GST-Beads 与 B 蛋白之间无结合 (结果见图 6-1 中的 Lane12-14) 。

6. GST-A 与靶蛋白 B 之间的相互作用分析

取 1 个 EP 管，加入 100 μ l GST-Beads 到 EP 管中，用 1000 μ l PBS 润洗三次，加入 150 μ g GST-A 融合蛋白混合均匀，并用 PBS 补至 600 μ l ， 4 $^{\circ}$ C 层析柜中孵育结合 2h。

洗杂后取出 50 μ l 柱子进行 SDS-PAGE ， 确认 GST-A 蛋白与层析柱已经结合。再加入 150 μ g 的 B 蛋白，并用 PBS 补足液体到 600 μ l 左右，以促进蛋白之间充分结合，4 $^{\circ}$ C 条件下孵育结合 2h。对孵育后的流出液取样，洗杂后，取第一次洗杂的溶液留样。

再加入 50 μ l 2 \times loading buffer 煮 5min (1 : 1 制样) ， 12000rpm 离心 2min ， 取上清 SDS -PAGE 电泳分析，Western Blot 进行，确认 GST-A 与 B 蛋白之间有相互作用 (结果见图 6-1 中的 Lane 6-10) 。

6.1. 考马斯亮蓝染色与银染结果分析

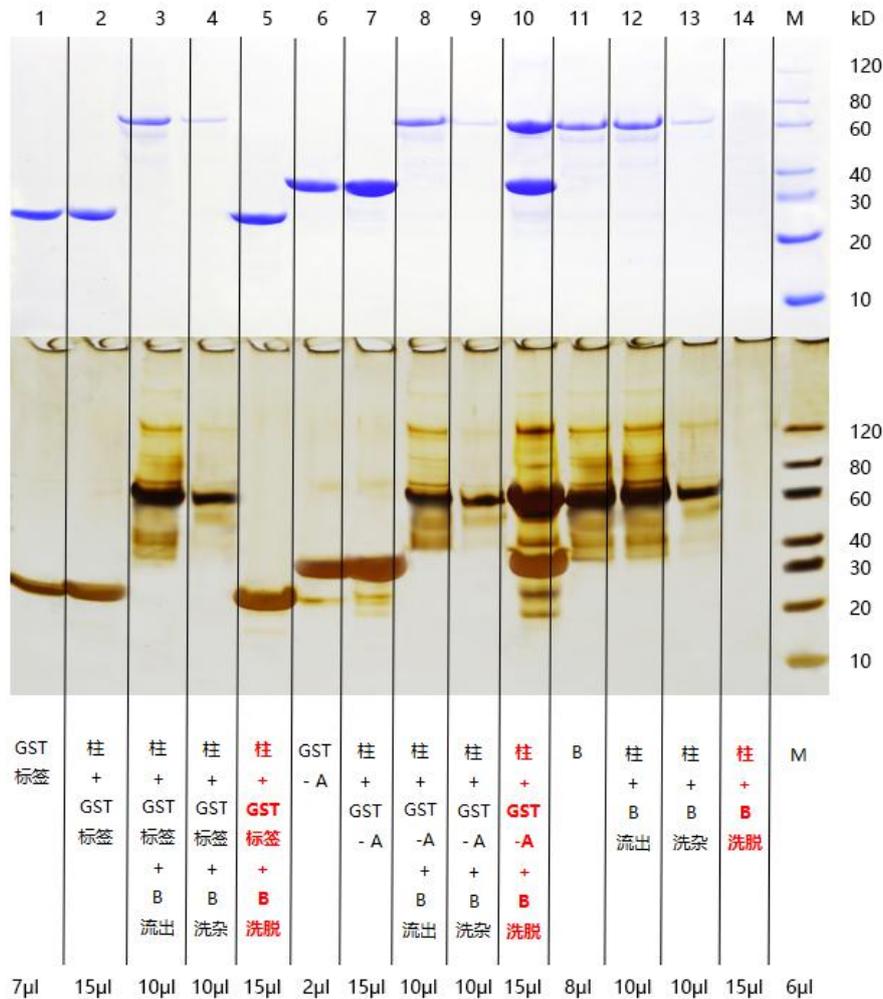


图 6-1 考马斯亮蓝染色与银染结果对比

Lane 1-5 与 Lane 11-14 为对照组实验结果, Lane 1-5 用于验证 B 蛋白是否会与 GST 标签结合, Lane 12-14 用于验证 B 蛋白能否结合在层析柱上。Lane 6-10 为实验组, 验证 A 蛋白和 B 蛋白之间的相互作用。其中 Lane 6 为 GST-A 融合蛋白电泳图, Lane 7 为 GST-A 与 GSH 结合后的电泳图。Lane 8 为加入 B 蛋白孵育后, 流出液电泳图。Lane 9 为加入 PBS 洗杂, 第一次洗杂样品的电泳图。Lane 10 为洗脱后得到的 GST-A 融合蛋白复合物的电泳图。

对照组实验排除了靶蛋白 B 与层析柱结合, 以及靶蛋白 B 与 GST 标签结合的可能。由第 10 泳道和其余泳道对比可知, GST-A 融合蛋白与靶蛋白 B 之间存在相互作用。

6.2. Western Blot 检测

由于靶蛋白 B 是 His 标签蛋白, 为了进一步确认实验结果, 我们用抗 His 标签抗体 Western Blot 检测目的条

带是否是 B 蛋白，检测结果显示 GST-A 融合蛋白结合的确是 B 蛋白。



图 6-2 Western Blot 检测结果

7. 服务网址

www.detaibio.com/gst-pull-down-service.html