

GST/HIS pull down 结果解读

| 专注 | 品质 | 诚信 |

提供核酸和蛋白的整体研究方案

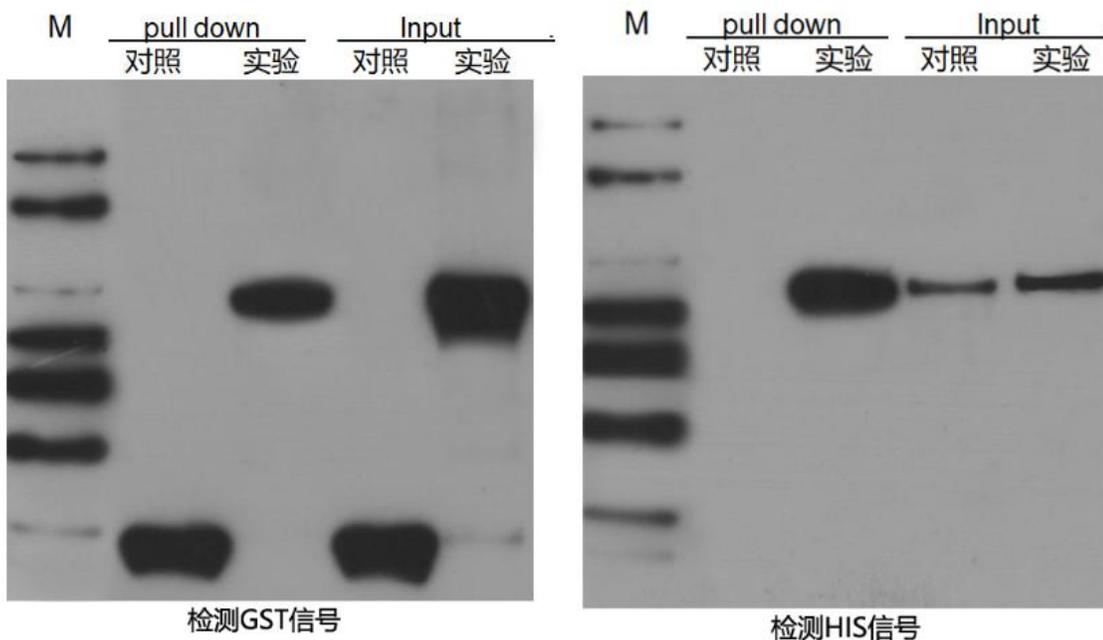
>>>

实验前的准备



- 1、在正式实验前，务必要对纯化蛋白做WB或考染质控，若蛋白降解严重，建议重新纯化蛋白后尽快进行实验；
- 2、如果需要在样本中拉取互作蛋白，则pull down前建议WB检测预期的猎物蛋白表达水平（如果有的话）以及内参蛋白；
- 3、内参蛋白条带必须清晰无拖带，如果内参条带不正常，说明样本内蛋白已经发生降解，需要重新备样；
- 4、猎物蛋白条带最好是强信号的单带，如果信号比较弱，IP后可能检测不到信号，导致误判成假阴性结果，建议在样本中过表达目的蛋白后再做尝试；

pull down后WB



1、左图是以GST-A为诱饵、HIS-B为猎物进行的pull down实验（A和B代表待验证的诱饵和猎物蛋白），包含对照组、实验组以及各自的Input组，pull down后分别用GST和HIS抗体检测信号；

2、Input泳道作为阳性对照：对照组input加入GST标签蛋白和HIS-B，实验组input加入GST-A和HIS-B；

3、判定实验成功标准，是能够在检测GST信号时，对照泳道检测到**GST标签蛋白**，实验泳道检测到**GST-A**。

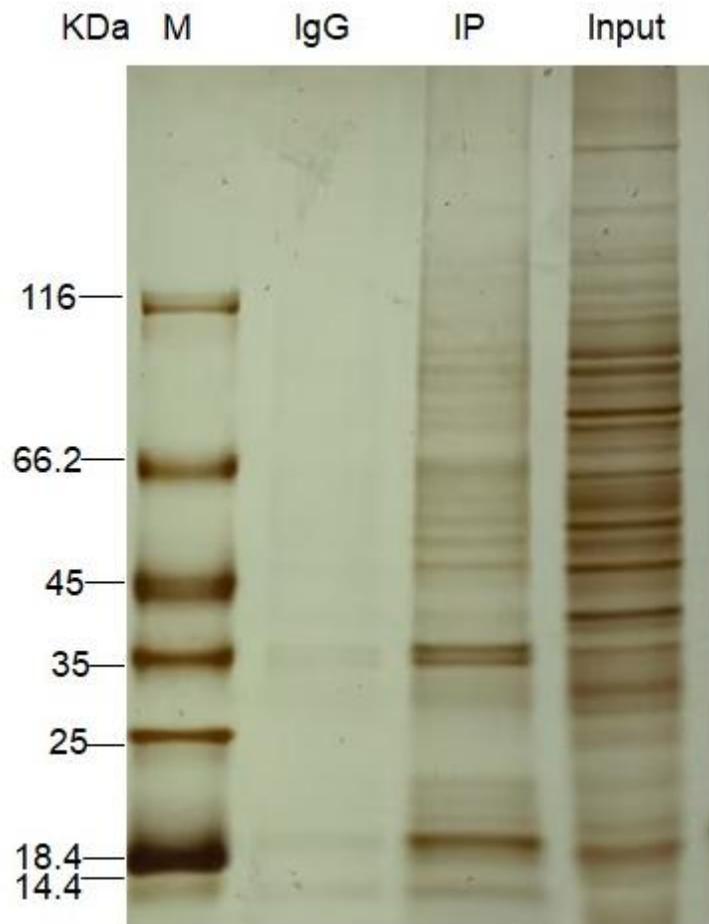
4、在**条目3**的前提下，如果检测HIS信号时，实验泳道检测到**HIS-B**，且对照泳道没有，说明B能够和A结合；

5、如果检测HIS信号时，对照和实验泳道均能检测到**HIS-B**，说明B可能是与GST标签蛋白发生的结合，而不是与A蛋白；

6、如果检测HIS信号时，对照和实验泳道均没有信号，说明两个蛋白不互作，至少在这个样本和实验体系下不互作，并不代表实验本身有问题；

7、注：以上结论均为以GST为诱饵，HIS为猎物的前提下得出，如果以HIS为诱饵，将GST和HIS词条替换一下即可，但由于HIS标签较小（仅几KD），在检测HIS信号时，对照泳道一般检测不到HIS标签蛋白。

银染和质谱鉴定



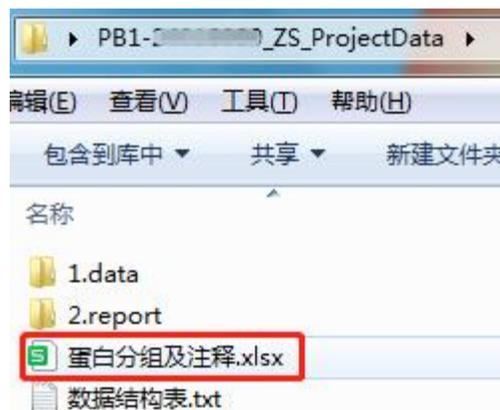
1、银染通常作为质谱送样上机前的质控，检测pull down后蛋白液的质量，或在知道预期蛋白大小的前提下切胶送质谱，减少杂蛋白的干扰；

2、在质谱结果中挑选候选蛋白时，建议选择实验组中iBAQ较高，且与研究方向相关的蛋白，如鉴定到的蛋白太多需要缩小选择范围，可以考虑优先选择实验组特有蛋白；

3、质谱在上机前会将蛋白酶解成肽段，而高丰度的肽段很可能会掩盖掉低丰度肽段的信号峰，因此质谱无法保证一定能鉴定到某一个或某一类蛋白；

4、对照组的蛋白液因为蛋白丰度都比较低，肽段信号被掩盖的情况有时候反而没有实验组那么多，因此可能最终鉴定出来对照组的特异性蛋白比实验组还要多，这也是很正常的情况。

质谱鉴定



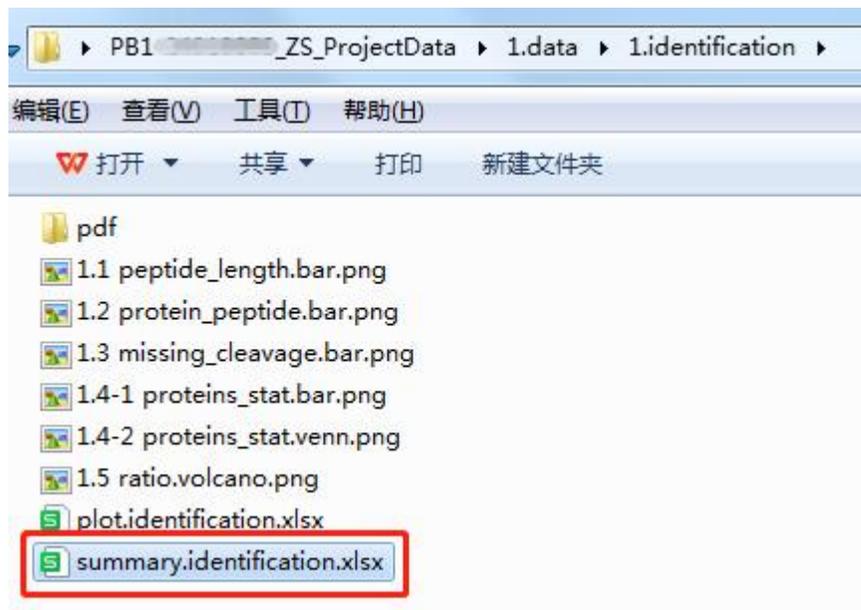
	A	B	C	D	E	F	
	Accession	Protein ID	Gene	Fasta description	Mw (kDa)	Length	Protein
3	P07814	SYEP_HUMAN	EPRS1	Bifunctional glutamyl	170.591	1512	
4	P41252	SYIC_HUMAN	IARS1	Isoleucine--tRNA ligase	144.498	1262	
5	O95793	STAU1_HUMAN	STAU1	Double-stranded RNA-binding	63.182	577	Q9NUL3
6	P04843	RPN1_HUMAN	RPN1	Dolichyl-diphosphoolig	68.569	607	
7	Q12906	ILF3_HUMAN	ILF3	Interleukin enhancer-binding	95.338	894	Q96SI9
8	Q86VP6	CAND1_HUMAN	CAND1	Cullin-associated NEDD8	136.376	1230	
9	Q99623	PHB2_HUMAN	PHB2	Prohibitin-2 OS=Homo	33.296	299	
10	O75367	H2AY_HUMAN	MACROH2A1	Core histone macroH2A1	39.184	369	Q9POM6
11	P08238	HS90B_HUMAN	HSP90A	Heat shock protein 90 class	83.264	724	P07900
12	P11388	TOP2A_HUMAN	TOP2A	DNA topoisomerase 2- α	174.385	1531	Q02880
13	P54652	HSP72_HUMAN	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa	70.021	639	P11142
14	P55060	XPO2_HUMAN	CSE1L	Exportin-2 OS=Homo sapiens	110.417	971	

Unique.DZ Unique.SY common

1、如图所示，我司质谱鉴定会将“对照组特有蛋白”、“实验组特有蛋白”、“共有蛋白”从data中挑出并单独制成表“蛋白分组及注释.xlsx”，包含蛋白功能注释、iBAQ等重点信息；

2、例图中“Unique.DZ”即对照组特有蛋白列表，“Unique.SY”即实验组特有蛋白列表，“common”即共有蛋白列表，实际sheet名称可能会根据项目不同有所变动。

质谱鉴定



表头信息如“Accession”等具体含义，总表中均有解释，文件路径如图所示，也可以百度一下，由于版面限制就不赘述了。

*其他验证实验：COIP、酵母双杂交、BIFC

表单	条目	描述
help		各表单的表头解释
stat		本次项目的统计信息
	Sample	样品名
	Identified pr	鉴定到的蛋白数目
	Quantified p	定量到的蛋白数目
	Identified pe	鉴定到的肽段数目
	Quantified p	定量到的肽段数目
	Unique pept	“唯一匹配”的肽段数目
	Comparison	比较组编号
	Comparison	比较组名称
	Gx:Gy	分子组、分母组编号
	SampleX	分子组包含的样品
	SampleY	分母组包含的样品
	FC threshol	判定下调差异蛋白的比值边界
	FC threshol	判定上调差异蛋白的比值边界
	Log2 FC thr	下调边界对数转换后的值
	Log2 FC thr	上调边界对数转换后的值
	P value thre	比较组采用的T检验方式
	T test	比较组采用的T检验方式
	Down count	下调差异蛋白数目
	Up count	上调差异蛋白数目
	Total diff	所有差异蛋白数目
	No diff	非差异的蛋白数目
	NA	无法进行差异计算的蛋白数目
	Total	定量到的蛋白数目，等同于“Quantified proteins”
protein		蛋白结果
	Accession	蛋白条目的Uniprot数据库登记号
	Protein ID	蛋白条目的Uniprot数据库编号
	Gene	蛋白条目的基因名
	Fasta descr	蛋白序列数据库Fasta文件中对蛋白条目的描述信息



感谢聆听

提供核酸和蛋白的整体研究方案

