

Pulldown Protokoll GFP-bindendes Protein Agarose

- Tag 1 HEK 293T-Zellen:mind. 2 Schalen pro Transfektion (Kontrolle, Ziel-Gen)
- Konfluente Zellen einen Tag zuvor 1:3 Splitten
 - Platten beschichten mit Poly-L-Lysin 20 µg/ml (Stocklösung)
 -
- Tag 2 Transfektion mit CaPO₄
- Tag 3 Zellen 2xWaschen mit TBS
- Lyse in 1ml IP-Puffer (mit Zellschaber ernten)
- Lysate in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Auftauen in einem Wasserbad bei RT
- Zentrifugieren 5 min bei 14.000 rpm; 4°C
- Je 50 µl Überstand abnehmen und mit 50 µl Laemmli-Puffer versetzen, aufkochen – Inputkontrolle (Lagerung bei -80°C)
- Prazipitation mit GFP-BP-Agarose
- 70µl GFP-BP-Agarose 3x waschen mit 500 µl IP-Puffer
(Zentrifugation max bei 3000xg, 2 min, 4°C)
- GFP-BP-Agarose auf 2 Eppis verteilen (pro Eppi ~ 30 µl)
- Je 1 ml Überstand auf die Agarose geben
- 1h bei 4°C in einen Überkopfschüttler (drehendes Rad) bei langsamer Geschwindigkeit (~ 14 rpm) inkubieren
- Agarose 3x waschen mit 500µl IP-Puffer
- Agarose mit Insulinspritze trocken saugen, mit Je 25 µl Laemmli-Puffer versetzen, aufkochen – Pulldown (Lagerung bei -80°C)

Tag 4 SDS-PAGE und Western Blot

IP-Puffer:

20 mM Tris HCL pH 8

137 mM NaCl

10% Glycerol

1% IGEPAL Ca

2 mM EDTA

+ frisch zugeben: HALT protease inhibitor (Pierce) Lsg. 1x (Stamm 100x)

HALT phosphatase inhibitor (Pierce) Lsg. 1x (Stamm 100x)