



兰博利德 LABLEAD
高新技术企业



MBP-Nanoab-Magnetic Beads

货号: BNM

储存条件: 可在 4℃ 保存 1 年, 或在 -80℃ 长期保存, 避免反复冻融。

产品描述

偶联 anti-MBP 标签纳米抗体的磁珠用于免疫沉淀 MBP 融合蛋白。

产品优势

- 没有普通抗体的轻链和重链;
- 高亲和力: 解离常数达到 pM 级别;
- 高载量: 10μl 的 slurry 可以结合 2-4μg MBP 蛋白;
- 较短的孵育时间, 结合 5-30min 即可;

应用范围

可用于免疫沉淀 (IP) / 免疫共沉淀 (CoIP)、染色质免疫沉淀 (ChIP) / RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)、酶活性测定、质谱分析等;

特异性

可以结合 MBP 标签融合蛋白。

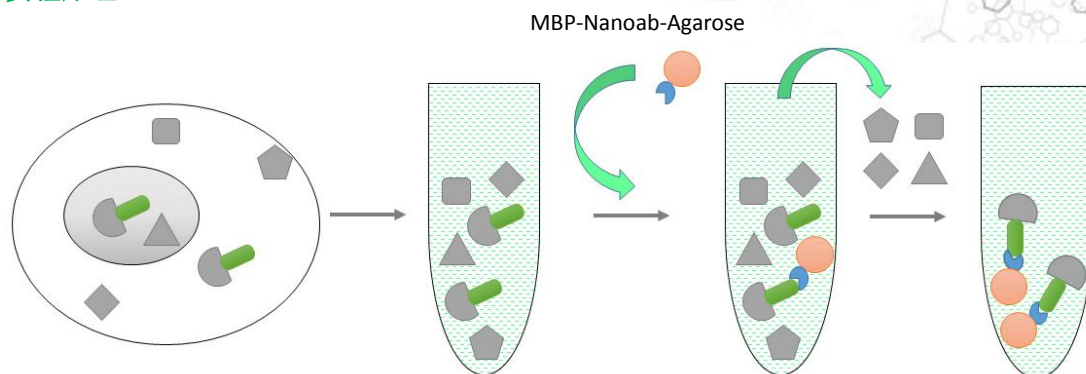
产品特性

存储缓冲液: PBS(含有 20%乙醇)。

保存条件: 可在 4℃ 保存 1 年, 或在 -80℃ 长期保存, 避免反复冻融。



实验原理



实验步骤:

收集细胞:

每个免疫沉淀反应大约使用 10^6 - 10^7 个表达绿色荧光蛋白融合蛋白的细胞，可根据绿色荧光蛋白融合蛋白表达量适当调整细胞数。吸出培养基，向培养皿中加入预冷的 $1\times$ PBS，漂洗 2 次，利用细胞刮或胰酶消化收集贴壁细胞，细胞转移到离心管，500g 离心 3 分钟并丢弃上清液。

细胞裂解:

1. 在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，用 500 μ l 预冷的裂解缓冲液重悬细胞。
2. 置于冰上 30 分钟，可每 10 分钟充分吹打一次。
3. 4 $^{\circ}$ C，20,000g 离心 15 分钟，将裂解产物（上清）转移到一个新的预冷管中，丢弃沉淀。注意：此时细胞裂解产物可长期保存于-80 $^{\circ}$ C。

平衡珠子:

4. 振荡充分混匀 MBP-Nanoab-Magnetic Beads，吸取 40 μ l 该产品到 500 μ l 预冷的裂解缓冲液中，4 $^{\circ}$ C，2,500g 离心 2 分钟，丢弃上清液。（此步骤可选）

结合蛋白

5. 将平衡好的 MBP-Nanoab-Magnetic Beads 加入到细胞裂解产物中（如果未做第 4 步，可在细胞裂解产物中直接加入 20 μ l 该产品），于 4 $^{\circ}$ C 旋转混合结合 5-30min。如果需要，留存 50 μ l 的裂解产物进行免疫印迹分析。
6. 4 $^{\circ}$ C，2,500g 离心 2 分钟，丢弃上清液。如果需要，留存 50 μ l 上清液进行免疫印迹分析。

清洗珠子:

7. 用 500 μ l 预冷的裂解缓冲液中重悬 6 中的 MBP-Nanoab-Magnetic Beads，4 $^{\circ}$ C，2,500g 条件下离心 2 分钟，丢弃上清液并重复洗涤 2 次。

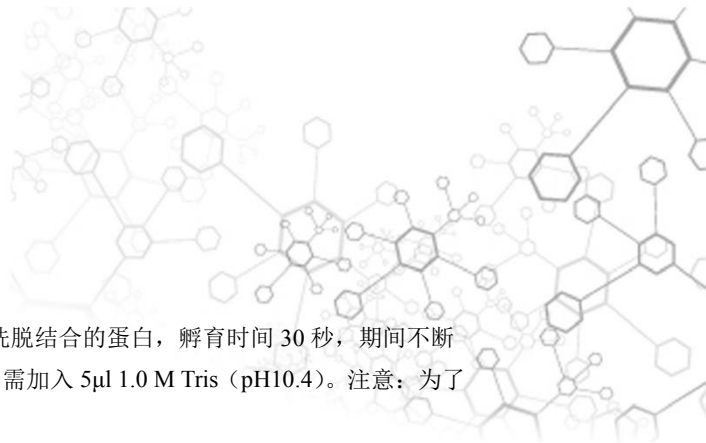
洗脱蛋白:

方法一:

8. 加入 20 μ l $2\times$ SDS-sample buffer 重悬 MBP-Nanoab-Magnetic Beads。

95 $^{\circ}$ C，加热 10min，2,500g 离心 2 分钟收集上清，收集的产物可进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。





方法二:

9. 替代步骤 8 的可选步骤: 加入 50 μ l 0.2 M pH2.5 的甘氨酸洗脱结合的蛋白, 孵育时间 30 秒, 期间不断混匀, 2,500g 离心 2 分钟收集上清, 为了中和酸性的甘氨酸, 需加入 5 μ l 1.0 M Tris (pH10.4)。注意: 为了提高洗脱效率可以重复这一步。

可选方案

方案一:

如需进行 MBP 融合酶的活性检测, 无需洗脱, 可以直接检测。

方案二:

如需进行染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验, 主要用于含有 MBP 融合蛋白的蛋白质/DNA 相互作用的实验。染色质免疫沉淀一般包括细胞固定, 染色质断裂, 染色质免疫沉淀, 联反应的逆转, DNA 的纯化以及 DNA 的鉴定。其中前期细胞固定, 染色质断裂不变; 然后接着直接进入说明书的第 5 步, 加入细胞裂解产物后, DNA-蛋白质复合物结合到 MBP-Nanoab-Magnetic Beads 上;

进入第 6 和 7 步, 分离得到复合物; 进入第 10 步, 得到洗脱的复合物; 后期交联反应的逆转, DNA 的纯化及 DNA 的鉴定等同于普通的 ChIP 实验。RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 实验步骤同上。

方案三:

MBP-Nanoab-Magnetic Beads 不仅可以用于在体内外检测和验证蛋白质之间的相互作用, 也可以结合质谱分析筛选与已知蛋白相互作用的未知蛋白。其操作步骤同免疫沉淀法, 得到洗脱的复合物后, 然后进行 SDS-PAGE 分析, 用考马斯亮蓝或者银染的方法染色后, 切下未知蛋白的条带, 用质谱技术鉴定未知蛋白。

