



GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads

货号: GNM/MNM/RNM/HNM/FNM/VNM

储存条件: 短期使用 4°C保存; 长期保存-20°C, 有效期 1 年(确保完全密封), 避免离心、干燥和冻融。

产品描述

偶联 anti-GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5 纳米抗体的磁性纳米微球用于免疫沉淀 GFP 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: 10ul 纯 beads 可以结合 8-10μg 蛋白 (V5 标签载量为 6-8ug) ;

较短的孵育时间, 结合 5-30 min 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

GFP 款可以结合 GFP、EGFP、YFP 和 EYFP 等。

产品特性

存储缓冲液: PBS(含有 20%乙醇)。

实验步骤:

植物组织裂解处理:

取适量植物组织样本 (叶片等) 放置于冷冻液氮中, 之后将冷冻后得植物组织样本放于研钵中进行研磨, 尽可能充分研磨破坏其细胞壁。加入 500-1000ul RIPA 裂解液 (已添加蛋白酶抑制剂 PMSF 等) 进行裂解, 为了提高裂解效率, 加入 200ul 玻璃粉充分震荡 30min, 裂解完成后 12000 rpm, 离心 30min, 吸取上清置于新的离心管中, 弃去沉淀。

收集细胞:

每个免疫沉淀反应大约使用 10^6 - 10^7 的哺乳动物细胞 (约一个 10 cm 培养皿) 表达绿色荧光蛋白融合蛋白。吸出生长培养基、向培养皿中加入 2ml 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 利用细胞刮或胰酶消化的方法收集贴壁细胞, 细胞转移到离心管, 500 g 离心 3 分钟并丢弃上清液。

细胞裂解:

1. 用 500μl 预冷的裂解缓冲液重悬细胞, 在裂解缓冲液中按照体积比加入蛋白酶抑制剂 (推荐 LABLEAD CAT:C0101)。对于核/染色质蛋白可使用 RIPA 裂解液中加入 1 mg/ml DNase, 2.5 mM MgCl₂, 蛋白酶抑制剂与 1 mM PMSF (自备)。
2. 把离心管放置在冰上 30 分钟, 可以每 10 分钟充分吹打一次。
3. 细胞裂解产物在 4°C, 20,000 g 条件下离心 15 分钟, 转移裂解产物到一个新的预冷管中, 丢弃沉淀。注意: 此时细胞裂解产物可以放在-80°C 进行长期储存。

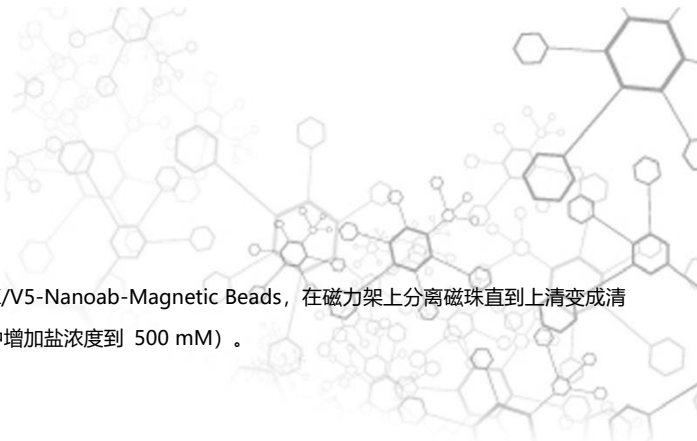
平衡珠子:

4. 振荡混匀 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK-Nanoab-Magnetic Beads, 吸取 40μl slurry 到 500 μl 预冷的裂解缓冲液中, 在磁力架上分离磁珠直到上清变成清亮的状态, 丢弃上清液。(此步骤可选)

结合蛋白

5. 将细胞裂解产物加入到平衡的 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads 中 (如果未做第 4 步, 可在细胞裂解产物中直接加入 40μl slurry), 在 4 °C冷柜中的旋转混合仪上结合 30-60 min。如果需要, 保存 50 μl 的裂解产物进行免疫印迹分析。
6. 在磁力架上分离磁珠直到上清变成清亮的状态, 丢弃上清液。如果需要, 保存 50 μl 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 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads，在磁力架上分离磁珠直到上清变成清亮的状态，丢弃上清液并重复洗涤 2 次。（可选：在第二次洗涤的步骤中增加盐浓度到 500 mM）。

洗脱蛋白：

方法一：

加入 20 μ l 2X SDS-sample buffer 重悬 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads。

在 95 $^{\circ}$ C，10 min 条件下，加热 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads，把免疫沉淀复合物从珠子上游离出来。

GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads 可在磁力架上进行分离，收集的产物可以进行 SDS-PAGE 分析。

方法二：

替代步骤 8 和 9 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，建议孵育时间 30 秒，并不断混匀，随后用磁力架进行分离，转移上清液到新管中，为了中和酸性的甘氨酸，需添加 5 μ l 1.0 M Tris (pH10.4) (LABLEAD beads 已验证可以不添加 Tris 进行中和，只需用 PBS 清洗 3-5 次即可回收 beads)。

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 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-Nanoab-Magnetic Beads 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 GFP 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，交联反应的逆转，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 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-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：

GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/V5-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。

