

GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP/V5/MBP-Magnetic 免疫沉淀试剂盒

货号: PGM025/PHM025/PFM025/PMM025/PRM025/PVM025/PBM025

存储条件: -20°C 保存, GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP/V5/MBP-Magnetic beads 经常使用可在 4°C 保存, 在 -20 或 -80°C 长期保存, 避免反复冻融。

试剂盒组分:

| 货号 | 名称 | 规格 |
|-------------------------|--|-------------------------|
| GNM-25-1000/GNM-50-2000 | GFP-Nanoab-Magnetic | 1000ul(25T)/2000ul(50T) |
| HNM-25-1000/HNM-50-2000 | HA-Nanoab-Magnetic | |
| FNM-25-1000/FNM-50-2000 | DYKDDDDK-Nanoab-Magnetic | |
| MNM-25-1000/MNM-50-2000 | Myc-Nanoab-Magnetic | |
| RNM-25-1000/RNM-50-2000 | RFP-Nanoab-Magnetic | |
| VNM-25-1000/VNM-50-2000 | V5-Nanoab-Magnetic | |
| BNM-25-1000/BNM-50-2000 | MBP-Nanoab-Magnetic | |
| IP001A | 裂解液 A | 30ml |
| IP001B | 裂解液 B | 30ml |
| IP001C | 漂洗液 C | 30ml |
| IP001D | 漂洗液 D | 30ml |
| IP001E | 洗脱液 E | 3x1ml |
| CLJ0615 | 磁力架 1.5ml, 6 孔 | 个 |
| IP001F-G/H/F/M/R | GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP 阳性对照蛋白 (配置与试剂盒同标签的对照蛋白) | 1ml |

产品简介:

LABLEAD 的免疫沉淀 beads 是基于基因工程改造的纳米抗体开发的; 纳米抗体由传统抗体的重链可变区 (VHH) 组成, 具有分子量小、亲和力高、特异性强, 且耐酸碱高温环境等特点; 基于纳米抗体的优点, LABLEAD 的免疫沉淀 beads 避免了免疫沉淀结果出现轻重链污染的现象, 并且孵育时间短大大节省实验时间。

实验步骤:

提示: 尽量在 4°C 进行操作, 洗脱蛋白方法一除外。

1. 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进行研磨, 尽可能充分研磨破坏其细胞壁。加入 500-1000ul 裂解液 A 或裂解液 B (需加入 PMSF 溶液) 进行裂解, 为了提高裂解效率, 可加入 200ul 玻璃粉 (非必需) 按照 600-800g 离心力充分震荡 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。(进行第 3 步)

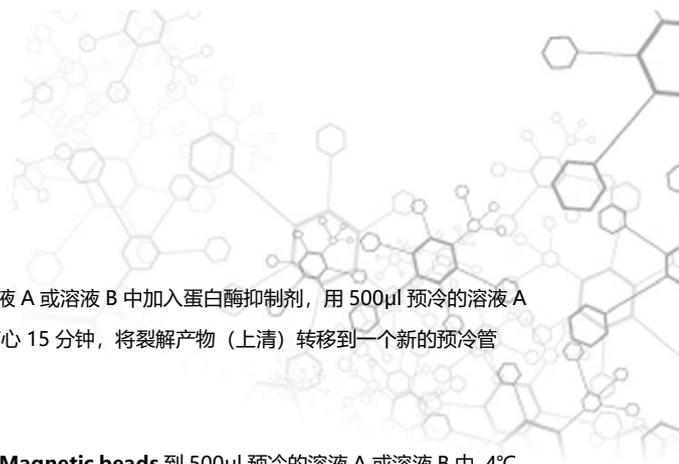
2. 动物细胞裂解

2.1 收集细胞:

根据实验要求收集适量的细胞, 通常每个免疫沉淀反应大约使用 10^6 - 10^7 个细胞。

2.2 裂解细胞:





根据实验要求选择使用溶液 A 或溶液 B (溶液选择可参考注意事项 1) 裂解细胞。在溶液 A 或溶液 B 中加入蛋白酶抑制剂, 用 500 μ l 预冷的溶液 A 或溶液 B 重悬细胞; 置于冰上 30 分钟, 可每 10 分钟充分吹打一次; 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。

3. 平衡珠子:

振荡充分混匀珠子, 吸取 40 μ l **GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP/V5/MBP-Nanoab-Magnetic beads** 到 500 μ l 预冷的溶液 A 或溶液 B 中, 4 $^{\circ}$ C, 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)

4. 结合蛋白:

实验组: 将平衡好的 beads (如果未做第 3 步, 可在细胞裂解产物中直接加入 40 μ l slurry) 加入到细胞裂解产物中, 于 4 $^{\circ}$ C 旋转混合结合 30min-1h。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。

阳性对照组: 取 1.5ml ep 管, 加入 100 μ l 阳性对照蛋白 (试剂盒中组分), 添加 10 μ l beads 于管中, 4 $^{\circ}$ C 孵育旋转混合结合 30min-1h。

5. 清洗珠子:

根据实验要求选择使用溶液 C 或溶液 D (漂洗液的选择可参考注意事项 1) 清洗 beads。4 $^{\circ}$ C, 利用磁性分离, 丢弃上清液。用 500 μ l 预冷的溶液 C 或溶液 D 重悬 beads, 4 $^{\circ}$ C, 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)。

6. 洗脱蛋白

方法一:

加入 20 μ l 2 \times SDS-sample buffer 重悬 beads。95 $^{\circ}$ C, 加热 10min 充分变性, GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP/V5/MBP-Nanoab-Magnetic beads 可在磁力架上进行分离, 收集的产物可进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。

注: 如使用其他浓度的 sample buffer, 可用水稀释至 2x 再添加重悬 beads;

方法二:

加入 50 μ l 溶液 E 洗脱结合的蛋白, 孵育时间 30 秒, 期间不断混匀, 2,500g 离心 2 分钟或利用磁性分离收集上清, 为了中和酸性的甘氨酸, 立即加入 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。收集的产物可进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。

注意事项:

1、关于裂解液与裂解液的选择:

裂解液 A 为温和裂解液, 裂解液 B 为强裂解液, 请根据自己实验样本选择相应的裂解液, 如: 若为胞质蛋白可选裂解液 A 或者 A 与 B 混合使用, 若为核蛋白则可选择裂解液 B。

漂洗液 C 和漂洗液 D 的选择: 漂洗液 D 为高盐溶液, 可能会破坏蛋白间较弱的相互作用), 若两个蛋白相互作用强, 同时还想减少非特异性结合, 可选 D; 若两个蛋白相互作用弱的优先 C。

2、为取得最佳的使用效果, 尽量避免过多的反复冻融。可以适当分装后使用。

3、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。

4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

