

琼脂糖珠 免疫沉淀试剂盒 说明书统一版

货号： PGA0xx/PHA0xx/PFA0xx/PMA0xx/PRA0xx/PBA0xx/PVA0xx

存储条件： -20℃ 保存，beads 经常使用可在 4℃ 保存，-80 或 -20℃ 可长期保存，阳性对照蛋白建议分装后 -80 保存，阳性对照蛋白与 beads 避免反复冻融。

试剂盒组分：

货号	名称	规格
GNA-25-500/GNA-50-1000 HNA-25-500/HNA-50-1000 FNA-25-500/FNA-50-1000 MNA-25-500/MNA-50-1000 RNA-25-500/RNA-50-1000 BNA-25-500/BNA-50-1000 VNA-25-500/VNA-50-1000	GFP-Nanoab-Agarose beads HA-Nanoab-Agarose beads DYKDDDDK-Nanoab-Agarose beads Myc-Nanoab-Agarose beads RFP-Nanoab-Agarose beads MBP-Nanoab-Agarose beads V5-Nanoab-Agarose beads	500ul (25T) /1000ul (50T)
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	3x 1ml
IP001F	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、亲和力和特异性强，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，并且节省实验时间。本试剂盒配齐了免疫沉淀实验所需全部的缓冲液，可方便快捷完成免疫沉淀实验。

实验步骤：

提示： 尽量在 4℃ 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

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 裂解细胞。在溶液 A 或溶液 B 中加入蛋白酶抑制剂，用 500μl 预冷的溶液 A 或溶液 B 重悬细胞（溶液具体的选择可参考注意事项 1）；置于冰上 30 分钟，可每 10 分钟充分吹打一次；细胞裂解物 4℃，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 20 μ l 对应标签的 **Agarose beads** 到 500 μ l 预冷的溶液 A 或溶液 B 中, 4 $^{\circ}$ C, 2,500g 离心 2 分钟, 丢弃上清液。(如需同时做阳性对照, 建议取 40ul beads 进行平衡)

4. 结合蛋白:

实验组: 将平衡好的 20ul beads 加入到细胞裂解产物中, 于 4 $^{\circ}$ C 旋转混合结合 30min-1h (不建议孵育过长时间, 以免造成不稳定蛋白的降解)

阳性对照组: 取 1.5ml ep 管, 加入 100ul 阳性对照蛋白 (试剂盒中组分), 添加 10ul 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漂洗液 C 或漂洗液 D (可参考注意事项 1 选择合适的漂洗液) 清洗 beads。4 $^{\circ}$ C, 2,500g 离心 2 分钟, 丢弃上清液。用 500 μ l 预冷的漂洗液 C 或漂洗液 D 重悬 beads, 4 $^{\circ}$ C, 2,500g 条件下离心 2 分钟, 丢弃上清液并重复洗涤 3 次。

6. 洗脱蛋白

方法一 (煮沸洗脱, 适用于不回收 beads 的情况):

加入 20 μ l 2 $\times$ SDS-loading buffer 重悬 beads。95 $^{\circ}$ C, 加热 10min 充分变性, 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。(loading buffer 如果未 4x/5x 的可用 ddH₂O 进行稀释使用)

方法二 (酸洗脱, 可回收 beads):

加入 50ul 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 分钟收集上清, 为了中和酸性的甘氨酸, 收集上清中立即加入 5 μ l 1.0 M Tris (pH10.4)。Beads 本身可通过 PBS 清洗 2-3 次会回收重复使用

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。

方法三 (多肽洗脱, Flag/Myc/HA 等标签可用此种方式)

在清洗后的琼脂糖珠中加入 50 μ l 对应标签的多肽洗脱液 (参考浓度: 150 μ g/ml), 冰浴并摇床孵育 30min-2h, 为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱步骤。多肽洗脱液体积一般为琼脂糖珠体积的 5 倍左右。

孵育后 2500g 离心 2 分钟, 收集含有免疫沉淀复合物的上清。琼脂糖珠可经过 PBS/TBS 清洗 3-5 次后回收, 添加 20% 乙醇的 PBS 置于 4 $^{\circ}$ C 或者 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注: 多肽洗脱条件需要摸索最优条件, 为提高洗脱效率也可适当提高多肽的浓度进行洗脱。一般多肽的洗脱工作浓度在 100-400 μ g/ml。

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 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。

