

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

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

存储条件：-20℃ 保存，GFP-Magnetic beads 经常使用可在 4℃保存，在 -20 或 -80℃长期保存，避免反复冻融。

试剂盒组分：

货号	名称	规格
GNM-25-1000	GFP-Nanoab-Magnetic	1000ul(25T)
HNM-25-1000	HA-Nanoab-Magnetic	
FNM-25-1000	DYKDDDDK-Nanoab-Magnetic	
MNM-25-1000	Myc-Nanoab-Magnetic	
RNM-25-1000	RFP-Nanoab-Magnetic	
VNM-25-1000	V5-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

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℃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 500μl 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℃，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 40μl **GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP/V5-Nanoab-Magnetic beads** 到 500μl 预冷的溶液 A 或溶液 B 中，4℃，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：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 40μl slurry）加入到细胞裂解产物中，于 4℃ 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。

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℃，利用磁性分离，丢弃上清液。用 500μl 预冷的溶液 C 或溶液 D 重悬 beads，4℃，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 20μl 2×SDS-sample buffer 重悬 beads。95℃，加热 10min 充分变性，GFP/HA/DYKDDDDK/Myc/RFP/V5-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。

方法二：

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 5μl 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：裂解液 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。

