

## Alpaca anti-GFP VHH Magnetic Beads

### ● 产品规格

货号: SB-NM001

规格: 500uL (20 次, 50%nanobody coated magarose beads)

储存条件: 4°C (禁止冻存)

保质期: 6 个月

运输: 冰袋运输

### ● 产品说明

GFP- 磁珠由绿色荧光蛋白纳米抗体组成,共价结合到磁珠上。GFP-磁珠用于免疫共沉淀来自哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物的细胞提取物中的荧光蛋白。

### ● 产品属性

珠子规格: 30-100um

储存缓冲液: 1XPBS、防腐剂 0.03%NaN3

结合能力: 每 10ul 磁珠结合 3-4ug GFP

配体: 抗 gfp 单域抗体 (vhh、nanobody)

反应性: 与最常见的绿色荧光蛋白及其衍生物结合

### ● 推荐使用溶液

Buffer	Composition
Lysis buffer (CoIP)	10mM Tris-HCl pH7.5;150mM NaCl;0.5mM EDTA;0.5% NP-40
RIPA buffer	10mM Tris-HCl pH7.5;150mM NaCl;0.5mM EDTA;0.1%SDS;1% Triton X-100;1% Deoxycholate
Dilution/Wash buffer	10mM Tris-HCl pH7.5;150mM NaCl;0.5mM EDTA;
2×SDS loading buffer	120mM Tris-HCl pH6.8;20% glycerol;4%SDS,0.04% Bromophenol blue;10% β-mercaptoethanol
Glycine-elution buffer	200 mM glycine pH 2.5
Neutralization buffer	1 M Tris pH 10.4

注意：对于其他细胞类型，如酵母、植物、昆虫、细菌，请使用等效的细胞溶解缓冲液

## ● 操作说明

### 1. 收集细胞：

对于一个免疫共沉淀反应，推荐使用  $10^6$ - $10^7$  个表达 GFP 融合蛋白的哺乳动物细胞。吸出培养液，加 1ml 预冷 1XPBS 于细胞中并刮下细胞，之后将细胞转入预冷的离心管中，4°C，800G 离心 3 分钟，弃上清液，用预冷 1XPBS 洗两次细胞沉淀物，轻轻重悬细胞。

### 2. 裂解细胞

1) 对于细胞质蛋白，用 200 $\mu$ L 预冷 Lysis buffer 重悬细胞

注：在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂和 1mM PMSF。

对于核蛋白可选做：加入 1mg/mL DNase、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、蛋白酶抑制剂 RIPA buffer 和 1mM PMSF

2) 将离心管放在冰上 30 分钟，每隔 10 分钟重悬细胞一次。

3) 4°C、16000g 离心 10 分钟，将上清液转移到一个新的预冷离心管中，加入 300 $\mu$ L dilution buffer，丢掉沉淀。如果需要，保存 50 $\mu$ L 裂解液进行进一步分析。

注：此步骤获得的细胞溶解物可置于-80°C下长期保存。

可选做：在稀释液中加入 1mM PMSF 和蛋白酶抑制剂。

### 3. 平衡磁珠：

1) 吸取 35 $\mu$ L 纯磁珠(70 $\mu$ L 混悬液) 放在 1.5ml 离心管中

2) 加入 1ml 预冷 1xPBST,手拿上下晃动 60 秒，不要太剧烈

3) 放入磁力架静置分离磁珠 60 秒，直到上清液澄清，丢掉上清液，重复 3 次

### 4. 结合蛋白

1) 在平衡好的磁珠中加入细胞裂解液 500 $\mu$ L

2) 在 4°C用 翻转摇床旋转 1 小时

### 5. 洗涤

1) 用磁力架静置分离磁珠，直到上清液澄清，丢弃上清液。（如果需要，保存 50 $\mu$ L 上清液以供进一步分析）

2) 再加 1ml 预冷 1xPBST 悬浮磁珠

3) 磁力架静置分离磁珠，丢弃上清液，重复此步骤至少 4 次

### 6. 洗脱结合蛋白

1) 除去剩余的上清液

2) 用 40 $\mu$ L 1XSDS 样品缓冲液悬浮磁珠

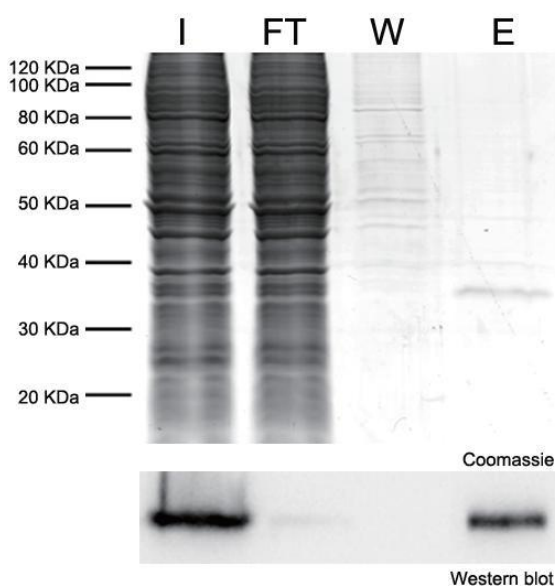
3) 将磁珠在 95°C 中加热 10 分钟，使免疫复合物与磁珠分离

4) 用磁力架静置分离磁珠并在 SDS-PAGE 中分析上清液

7. 甘氨酸洗脱缓冲液洗脱 (可替代步骤 6)
  - 1) 除去剩余的上清液
  - 2) 加入 70uL 甘氨酸洗脱缓冲液, 并在 4°C 保存混匀 10 分钟
  - 3) 用磁力架静置分离磁珠, 把上清部分转移到新的离心管里
  - 4) 立即用 35uL 中和缓冲液中和洗脱液部分

● 实验结果示例

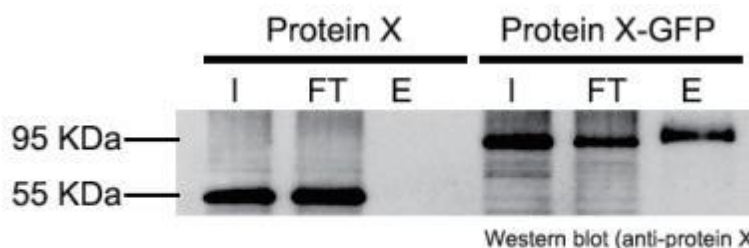
1. 细胞中 GFP 蛋白的免疫沉淀实验结果:



Immunoprecipitations of GFP:

Total extract from 293T cells expressing GFP. Input (I), Flow through (FT) fraction, wash (W) fraction and Elution (E) fraction

2. 组织中 GFP 融合蛋白的免疫沉淀实验结果:



Immunoprecipitations of GFP fusion protein from *Drosophila* extract containing protein X or protein X-GFP fusion. Input (I), flow through (FT) fraction and elution (E) fraction

**声明: 本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。**