

GFP-Nanoab-Magnetic Beads

货号：GNM-25-500

储存条件：可在 4℃ 保存半年，避免离心，干燥，长时间保存可冻存。

产品描述

偶联 anti-GFP 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：10 μ l 的 slurry 可以结合 2-4 μ g GFP 蛋白；

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

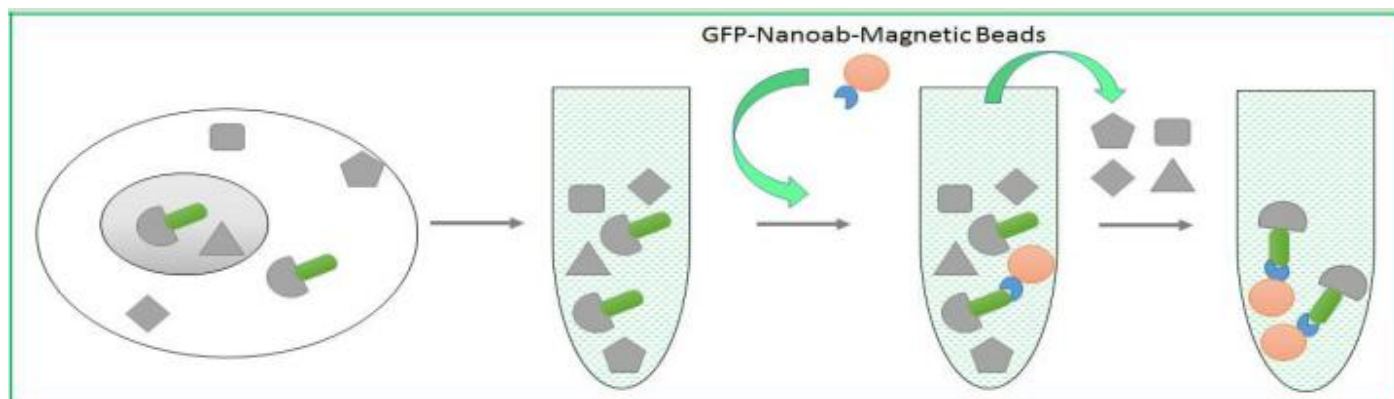
可以结合 GFP、EGFP、YFP 和 EYFP 等。

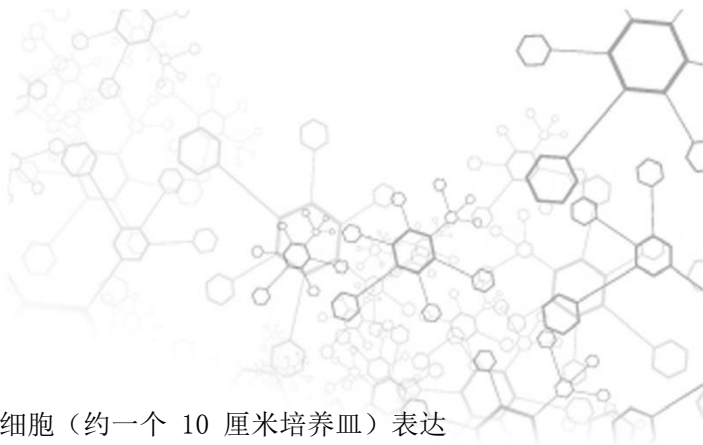
产品特性

保存条件：可在 4℃ 保存半年，避免离心，干燥，长时间保存可冻存。

存储缓冲液：PBS (含有 20% 乙醇)。

实验原理





实验步骤:

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 厘米培养皿）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 2 毫升预冷的 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 500 μ l 预冷的裂解缓冲液重悬细胞，在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂与 1 mM PMSF（自备）。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-Nanoab-Magnetic Beads，吸取 20 μ l slurry 到 500 μ l 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-Nanoab-Magnetic Beads 中（如果未做第 4 步，可在细胞裂解产物中直接加入 20 μ l 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 μ l 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 μ l 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-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-Nanoab-Magnetic Beads。

在 95°C, 10 min 条件下, 加热 GFP-Nanoab-Magnetic Beads, 把免疫沉淀复合物从珠子上游离出来。GFP-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)。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 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-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-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。

