Magneti-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒

目录

1. 产品介绍 1
2. 使用方法 2
3. 注意事项 3
4. 参考信息 3
5. 常见问题与解答 4
6. 订购信息 4
7. 相关产品 4

1. 产品介绍

1.1 Magneti-G 商标

Magneti-G 商标来自于磁性（Magnetic）的英文谐音，G 为高聚物的汉语拼音的首字母，因此本公司带有这一商标的产品，均为高聚物材质的磁性微球。这一商标主要用于一系列基于抗体亲和方法的标签蛋白 IP 试剂盒，目前已有 Anti-His-tag、Anti-Myc-tag、Anti-HA-tag、Anti-DYKDDDDK-tag、Anti-GFP-tag 和 Anti-RFP-tag 六种标签 IP 试剂盒。

1.2 RFP 标签

红色荧光蛋白基因是从海葵中分离出的一种红色荧光蛋白基因，其蛋白质的最大吸收光谱为 583 nm，不需要任何预处理便可检测到，通过重组 DNA 技术将 RFP 标签融合到目的蛋白的 C 端或 N 端后，可以检测其融合表达蛋白的表达、定位纯化，该系统已广泛应用于各种细胞类型，包括细菌、酵母和哺乳动物细胞等。

1.3 Anti-RFP 抗体

Anti-RFP 抗体可以用于检测和 RFP 标签融合表达蛋白的表达、细胞内定位，也可以用于 RFP 融合表达蛋白的纯化、定性或定量检测。本公司的 Anti-RFP 亲和力较高，适合做 WB、IP 等蛋白互作实验。

1.4 磁珠性质

高聚物磁珠采用高分子聚合技术将超顺磁性材料和高分子材料完美地结合在一起，具有更快的磁响应性同时保持微球良好的分散性、极低的非特异性吸附和更丰富的结合位点。磁珠具体性能见表 1。

表 1：Magneti-G Anti-RFP Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	高聚物磁性微球
配体	Anti-RFP 重组标签抗体
粒径	1 μm
磁珠浓度	10 mg/ml
储存缓冲液	Tris（pH8.0），0.01% Tween20，0.1% proclin300

1.5 试剂盒组分

本产品适用于原核和真核细胞裂解物或者培养上清中分泌表达的 RFP 标签蛋白的 IP、Co-IP 等蛋白质相互作用实验，具体组分见表 2。

表 2：试剂盒组份

试剂盒组分	规格/10T	规格/50T
Magneti-G Anti-RFP Beads	0.2ml	1 ml
Magneti-G Control IgG Beads	0.1ml	0.5ml
IP Lysis Buffer A（5×）	4 ml	20 ml
IP Lysis Buffer B	0.2ml	1ml
IP Wash Buffer（10×）	8ml	40 ml
Elution Buffer D	0.8ml	4 ml
2×SDS Loading Buffer	0.4ml	2 ml
说明书	1 份	

2. 使用方法

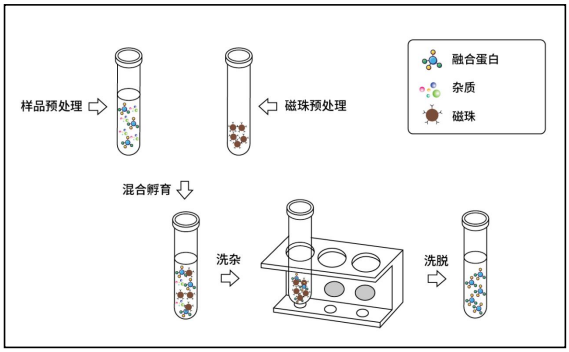

图 1. Magneti-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒的使用流程图

2.1 缓冲液配制

1) 1×Lysis Buffer(A+B)配置：使用前将 IP Lysis Buffer A（5×）用 ddH_2O 稀释成 1×IP Lysis Buffer A，并补加终浓度为 0.1%的 IP Lysis Buffer B（1ml 1×IP Lysis Buffer A 中加 1ul IP Lysis Buffer B），标记为 1×Lysis Buffer（A+B）备用。稀释后的缓冲液建议 4℃保存；
2) 1×IP Wash Buffer 配置：将 IP Wash Buffer（10×）用 ddH_2O 稀释 10 倍使用。如：配置 10ml 1×IP Wash Buffer，具体操作为取 1ml IP Wash Buffer，加入 9ml ddH_2O，充分混匀标记为 1×IP Wash Buffer 即可使用。实验未用完的 1×IP Wash Buffer 可稳定保存在 2-8℃ 3 个月，保存时间过久易长菌。
3) PBS 为自备试剂。

2.2 样品前处理

2.2.1 悬浮细胞样品裂解

1) 1000×g 室温离心 5min，弃上清，收集细胞；
2) 用适量 PBS 将细胞团轻轻重悬，将细胞悬液以 1000×g 离心 5min ，弃上清，收集细胞。重复三次；
3) 向细胞团块中加入预冷 1×Lysis Buffer(A+B)，每 1×10^6-5×10^6 cells 使用 1000ul。
4) 将上述加了 1×Lysis Buffer（A+B）的样品上下颠倒混匀 5-10 次，随后置于冰上裂解 5-10min，期间混匀 2-3 次。
5) 13,000 ×g 离心 10 min，去除细胞碎片。
6) 将上清转移至新的离心管中，标记为细胞裂解样品。

2.2.2 贴壁细胞样品裂解

1) 小心除去单层细胞的培养基
2) 用适量预冷的 PBS 细胞清洗三次。
3) 根据表 3 中推荐体积将 1×IP Lysis Buffer（A+B）慢慢滴加至细胞孔板中，滴加时尽量覆盖整个平皿，随后置于冰上裂解 5-10min，期间混匀 2-3 次。
4) 将上述裂解好的样品转移至新的离心管中，约 13,000 ×g 离心 10 min，去除细胞碎片。
5) 将上清转移至新的离心管中，标记为细胞裂解样品。

表 3. 1×IP Lysis Buffer（A+B）推荐体积

培养皿大小/细胞数量	1×IP Lysis Buffer （A+B）	备注
100×100 mm	500-1000μl	贴壁细胞
60×60 mm	250-500μl	
6 孔板	200-400μl	
24 孔板	100-200μl	
1×10^6-5×10^6 cells	500-1000μl	悬浮细胞

2.2.3 注意事项

真核表达的分泌蛋白可直接取培养上清离心。真核表达的胞内蛋白先用 1×PBS（pH=7.4）清洗 3-5 次，随后用裂解液裂解细胞后离心取上清，再进行后续步骤。核酸是强电性物质，如果核酸吸附到磁珠上，最终将造成杂蛋白变多。除去核酸有两个常用的方法：

1) 充分超声可以打断核酸，但过度超声也 7 会造成蛋白降解。
2) 使用伯仪生物超级核酸酶(SLP008)消化，这一方法需要注意缓冲液的选择。低浓度非离子型表面活性剂，如吐温-20、曲拉通-100 可以帮助分散脂类团块，有助于获得更纯的目的蛋白。

2.3 磁珠漂洗

1) 将磁珠充分混匀后取 20ul 磁珠置于离心管中，向管中加入 500ul 1×IP Wash Buffer，上下颠倒混匀 5-10 次。
2) 将离心管置于磁力架上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清。
3) 向管中加入 500ul 1×IP Wash Buffer，上下颠倒混匀 5-10 次，将离心管置于磁力架上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清。
4) 重复操作 3 次。
5) 注：本试剂盒中提供适量阴性对照（Magneti-G Control IgG Beads），免疫沉淀实验时建议设置阴性对照组。使用方法与 Magneti-G Anti-RFP Beads 完全一致。若有更多需求，可以订购本公司的 Magneti-G Control IgG Beads (货号：MP5801) 。

2.4 样品孵育

1) 向上述漂洗好的磁珠中加入 500-1000ul 的细胞裂解样品，常温或 4℃下孵育 60min（建议在旋转混匀仪上孵育，使样品和磁珠充分接触）。
2) 孵育结束后，将离心管置于磁力架上，待磁珠全部吸附后，将上清转移至新的离心管中，留样备检。
3) 向离心管中加入 500ul 1×IP Wash Buffer，轻轻颠倒混匀 5-10 次后将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后弃去上清。
4) 重复操作 5 次。

注：孵育温度和时间范围推荐为：室温 0.5 h-2 h 或者 4℃、1 h-4 h，根据实际的结合效果适当调整孵育时间，不建议过夜孵育，过夜孵育可能会引起过多的非特异性吸附。磁珠每次洗涤，加入 IP Wash Buffer 后可以冰上静置 3-5 分钟。

2.5 蛋白洗脱

1) 洗脱液洗脱

每 20ul 原始磁珠体积加入 40ul 洗脱液，常温或 4℃洗脱 5-10min，期间轻轻混匀 3-5 次。孵育结束后将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后，吸取上清至新的离心管中，进行 Western 检测。

注：Elution Buffer D 可以充分洗脱标签蛋白，且能保证磁珠上的抗体只有很少量的脱落，但是磁珠上可能有少量目的蛋白残留。

2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

每 20ul 原始磁珠体积加入 30ul 的 PBS（自备）重悬磁珠，再加入 30ul 的 2×SDS Loading Buffer，轻摇摇晃混匀后 95-100℃高温处理 5-10min。将离心管置于磁力架上分离 10s，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或进行 Western 检测。

注：SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱会使目的蛋白能够完全从磁珠上脱离，但是抗体也会完全脱落。磁珠上 Anti-RFP 抗体为人源化抗体，后续 WB 实验建议选择鼠抗。Western 检测的上样量建议控制在 20ul 以内，剩余的样本可冻存于-20℃保存。

3. 注意事项

1) 本产品保存在 2-8℃，不可冻结保存；
2) 本产品出现轻微团聚属正常现象，可正常使用；
3) 本产品不要使用含有 DTT 等还原剂的细胞裂解液样品，DTT 可能会导致抗体配体的脱落；
4) 本产品能耐受≤2M 尿素，高浓度的尿素会导致抗体配体脱落；
5) 在清洗和洗脱时避免吸取到磁珠，清洗时吸取到磁珠会影响最终的载量，洗脱时吸取到磁珠会影响目的蛋白的质量和电泳效果，第一次洗脱后可以将洗脱液置于新的离心管中，再次置于磁力架上进行吸附。

4. 参考信息

1) RFP tag IP 实验：样品为胞内表达蛋白，含有 His 和 RFP 标签。

2) 取 0.5ml 悬浮细胞（≈1.5×10^6 个）常温下 1×PBS（pH=7.4）清洗三次后快速进行裂解、离心；
3) 加入 20 μl 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 30min；
4) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上，分离磁珠和液体，用移液器吸走上清，留下磁珠；
5) 用 IP Wash buffer 清洗 5 次后加入 2×SDS Loading Buffer 99℃ 高温处理 10min 后进行 WB；
6) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb，阴性对照(-)为不带 RFP 抗体的磁珠和样本孵育，结果请见图 2。

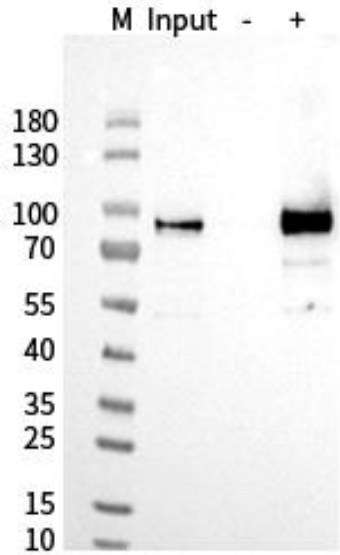

图 2.Magneti-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒进行 IP 后的 WB 图

图 2 表明 Magneti-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒能够很好的捕获样品中的 RFP 标签融合蛋白，同时没有非特异性的蛋白结合。

5. 常见问题与解答

聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别?

1) 琼脂糖磁珠是带孔微球，粒径在 30-100 μm，交联时会有一部分配体会进入球孔内部，所以偶联载量相对较高，适用于蛋白的快速纯化；而聚合物磁珠通常粒径为 1-3 μm 以下，配体主要分布在微球表面，这种类型的磁珠能够快速结合蛋白，空间位阻影响小，适用于蛋白互作实验，但其载量不高；
2) 推荐使用琼脂糖磁珠进行蛋白纯化实验，使用聚合物磁珠进行蛋白互作实验如 IP、Co-IP 和 pull down 实验等。

为何结合不到目的蛋白?

1) 可能是由于蛋白无表达造成的，建议在纯化前用 WB 检测下蛋白原始表达量，如果 WB 无信号，目的蛋白很难捕获；
2) 样本中有高浓度的还原剂等干扰物质，建议选用合适的裂解液。

6. 订购信息

名称	货号	规格
Magneti-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0053-01	10 T
	BK0053-02	50 T

7. 相关产品

类型	名称	货号
Magneti-G 蛋白标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	Magneti-GDYKDDDDK 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0048
	Magneti-G His 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0049
	Magneti-G Myc 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0050

	Magneti-G HA 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0051
	Magneti-G GFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0052

类型	名称	货号
Magneti-G 标签抗体磁珠	Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads	MP5101
	Magneti-G Anti-His Beads	MP5201
	Magneti-G Anti-Myc Beads	MP5301
	Magneti-G Anti-HA Beads	MP5401
	Magneti-G Anti-GFP Beads	MP5501
	Magneti-G Anti-RFP Beads	MP5601
	Magneti-G Control IgG Beads	MP5801