



# MagHub Anti-GFP Beads

## 目录

- 1. 产品介绍 ..... 1
- 2. 使用方法 ..... 1
- 3. 注意事项 ..... 3
- 4. 参考信息 ..... 3
- 5. 订购信息 ..... 3
- 6. 相关产品 ..... 4

## 1. 产品介绍

### 1.1 GFP 标签介绍

绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 由其编码基因表达产生, 在蓝光激发光照射下可发出绿色荧光信号。在分子生物学研究中, 可将 GFP 作为标签序列, 在基因水平与目的蛋白的 N 端或 C 端融合表达, 构建 GFP 融合蛋白。

### 1.2 MagHub Anti-GFP Beads 介绍

MagHub Anti-GFP Beads 是专为免疫沉淀 (IP) 与免疫共沉淀 (Co-IP) 实验设计的高聚物磁珠。微球表面通过共价偶联方式固定高亲和力抗 GFP 标签纳米抗体(VHH), 可从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多物种细胞裂解液中, 特异性富集 GFP 标签融合蛋白。该磁珠采用无标签、无轻重链结构的纳米抗体, 能有效降低非特异性结合, 显著提升目的蛋白富集效率与检测信噪比, 适用于蛋白互作分析、表达验证、蛋白功能研究等多种下游分子生物学实验。

表 1: MagHub Anti-GFP Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	高聚物磁性微球
配体	抗 GFP 标签纳米抗体
粒径	1 $\mu\text{m}$
保存条件	2-8°C可稳定保存 2 年
应用	适用于 IP 和 Co-IP 实验
储存缓冲液	20 mM Tris (pH 8.0), 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20, 0.1% proclin 300

## 2. 使用方法

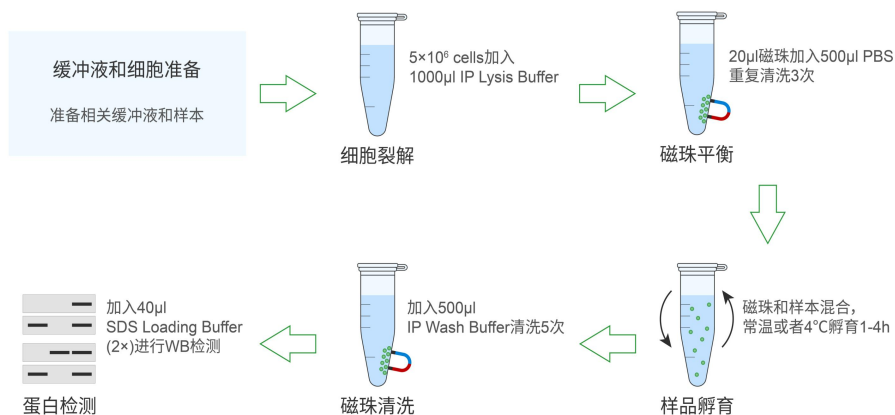


图 1. MagHub Anti-GFP Beads 使用流程图



## 2.1 缓冲液配置

表 2: 缓冲液配方推荐

缓冲液名称	缓冲液成分
1× PBS 缓冲液	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.4)
IP 裂解液 (IP Lysis Buffer)	25 mM Tris (pH=8.0), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 选择性加入蛋白酶抑制剂
磁珠洗杂液 (IP Wash Buffer)	1× PBS (pH 7.4), 0.05% Tween-20
IP-MS 洗脱液 (Elution Buffer D)	20 mM Tris (pH 8.0), 6M 尿素, 0.5% SDS
2x SDS Loading Buffer	125 mM Tris (pH 6.8), 4% SDS, 20% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 100 mM DTT

## 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 5 min, 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 5 min, 弃上清, 收集细胞。重复三次;
- 3) 向细胞团块中加入预冷 IP Lysis Buffer, 每 1×10<sup>6</sup>-5×10<sup>6</sup> cells 使用 1000 μl;
- 4) 将上述加了 IP Lysis Buffer 的样品上下颠倒混匀 5-10 次, 随后置于冰上裂解 5-10 min, 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 清洗细胞三次;
- 3) 根据表 3 中推荐体积将 IP Lysis Buffer 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 5-10 min, 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. IP Lysis Buffer 推荐体积

培养皿大小/细胞数量	IP Lysis Buffer	备注
100×100 mm	500-1000 μl	
60×60 mm	250-500 μl	
6 孔板	200-400 μl	贴壁细胞
24 孔板	100-200 μl	
1×10 <sup>6</sup> -5×10 <sup>6</sup> cells	500-1000 μl	悬浮细胞

### 2.2.3 植物样本的裂解

- 1) 剪取植物叶片 1-2 克;
- 2) 转移到研钵中加入少量液氮, 用杵研磨成细粉;
- 3) 加入 1 ml IP Lysis Buffer, 再次研磨
- 4) 13,000× g 离心 10 min, 去除植物碎片;
- 5) 将上清转移至新的离心管中, 标记为植物裂解样品。

## 2.3 磁珠漂洗

- 1) 将磁珠充分混匀后取 20 μl 磁珠置于离心管中, 向管中加入 500 μl PBS, 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 500 μl PBS, 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。

**注: 本试剂盒中提供适量阴性对照 (MagHub Control Nb Beads), 免疫沉淀实验时建议设置阴性对照组, 使用方法与 MagHub Anti-GFP Beads 完全一致。若有更多需求, 可以订购本公司的 MagHub Control Nb Beads (货号: MP6701)。**

## 2.4 样品孵育

- 1) 向上述漂洗好的磁珠中加入细胞裂解样品, 室温或 4 °C 下孵育 60 min (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 500 μl 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 1 h 或者 4℃ 4 h, 根据实际的结合效果适当调整孵育时间, 一般情况下不建议过夜孵育, 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 分钟。

## 2.5 蛋白洗脱

### 1) 洗脱液洗脱

该方法适用于 IP-MS 应用。每 20  $\mu$ l 原始磁珠体积加入 60  $\mu$ l Elution Buffer D 洗脱液, 常温洗脱 5-10 min, 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 或质谱检测。

注: Elution Buffer D 可以充分洗脱标签蛋白, 且能保证磁珠上的抗体几乎没有脱落, 但是磁珠上可能仍有少量目的蛋白残留。

### 2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

该方法适用于 IP-WB 应用。每 20  $\mu$ l 原始磁珠体积加入 40  $\mu$ l 的 2 $\times$  SDS Loading Buffer, 摇晃混匀后 100  $^{\circ}$ C 高温处理 10 min, 将离心管置于磁力架上分离 10 s, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或进行 Western 检测。

注: Western 检测的上样量建议控制在 20  $\mu$ l 以内, 剩余的样本可冻存于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

## 3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8  $^{\circ}$ C, 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) 本产品能耐受  $\leq 1$  mM DTT, 不建议在样本中加入过高浓度的还原剂;
- 4) 本产品能耐受  $\leq 2$  M 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得到磁珠, 清洗时吸取得到磁珠会影响最终的载量, 洗脱时吸取得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) GFP tag IP 实验: 样品为 293 细胞胞内表达蛋白, 含有 His 和 GFP 标签。
- 2) 取 1 ml 悬浮细胞 ( $\approx 3 \times 10^6$  个) 常温下 1 $\times$  PBS (pH=7.4) 清洗三次后快速进行裂解、离心;
- 3) 加入 20  $\mu$ l 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 60 min;
- 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 1 $\times$  IP Wash Buffer 清洗 5 次后加入 2 $\times$  SDS Loading Buffer 99  $^{\circ}$ C 高温处理 10 min 后进行 WB;
- 6) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb, 阴性对照(-)为 MagHub Control Nb Beads 和样本孵育, 结果请见图 2。

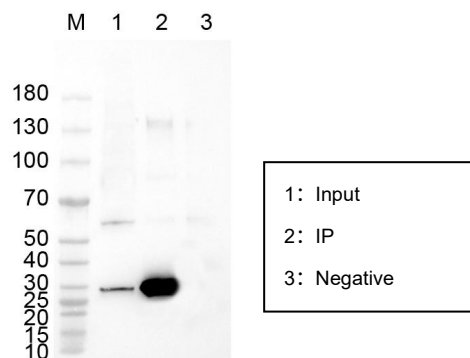


图 2. MagHub Anti-GFP Beads 进行 IP 实验后的 WB 图

图 2 表明 MagHub Anti-GFP Beads 能够高效捕获样品中的 GFP 标签融合蛋白, 同时没有非特异性的蛋白结合。

## 5. 订购信息

名称	货号	规格
MagHub Anti-GFP Beads	MP6801-01	0.2 ml
	MP6801-02	1 ml
	MP6801-03	5 ml
	MP6801-04	25 ml
	MP6801-05	100 ml



## 6. 相关产品

类型	名称	货号
Magnei-G 蛋白标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	Magnei-G His 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0049
	Magnei-G Myc 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0050
	Magnei-G HA 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0051
	Magnei-G GFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0052
	Magnei-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0053
	Magnei-G Strep-tag II IP 试剂盒	BK0071
	Magnei-G MBP-tag IP 试剂盒	BK0075
MagHub 蛋白标签 IP 试剂盒	MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒	BK0073
	MagHub GFP-tag IP 试剂盒	BK0078
	MagHub Myc-tag IP 试剂盒	BK0074
	MagHub V5-tag IP 试剂盒	BK0076
	MagHub HA-tag IP 试剂盒	BK0072
Magnei-G 标签抗体磁珠	Magnei-G Anti-DYKDDDDK Beads	MP5101
	Magnei-G Anti-His Beads	MP5201
	Magnei-G Anti-Myc Beads	MP5301
	Magnei-G Anti-HA Beads	MP5401
	Magnei-G Anti-GFP Beads	MP5501
	Magnei-G Anti-RFP Beads	MP5601
	Magnei-G Control IgG Beads	MP5801
	Magnei-G Anti Strep-tag II Beads	MP6001
	Magnei-G Anti MBP Beads	MP6401
MagHub 标签抗体磁珠	MagHub Anti-HA Beads	MP6101
	MagHub Anti-DDDDK Beads	MP6201
	MagHub Anti-Myc Beads	MP6301
	MagHub Anti-V5 Beads	MP6501
	MagHub Control Fab Beads	MP6601
	MagHub Control Nb Beads	MP6701