

Y-Tec GFP Magbeads(human)产品说明书

Cat# : MPNH30-005 / MPNH30-025 / MPNH30-100

Size : 200ul / 1ml / 5ml

►产品介绍:

GFP标签是一类绿色荧光蛋白标签，其融合目的蛋白可自发荧光，广泛应用于目的基因在细胞中的定位，可应用于检测基因表达效率以及目的蛋白的表达和分布。Y-Tec GFP Magbeads(human)是将抗GFP人源化重组单克隆抗体共价偶联到4%琼脂糖磁珠上，用于捕获哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物的细胞提取物中的含 GFP 标签的蛋白及与其紧密相互作用的蛋白，可用于 GFP 标签融合蛋白的免疫沉淀（IP），chIP实验与蛋白纯化。

►产品性能:

Magbeads粒径：45-90 μm （4%交联琼脂糖磁珠）

储存液：1xPBS (pH7.4)，0.2% Proclin 300

结合能力：>0.6mg GFP标签蛋白/ml Magbeads混和液

配体：抗GFP标签人源化重组单克隆抗体（避轻重链干扰）

用量：25-50ul混和液/样本

储存条件：2-8℃保存2年，切勿冰冻

►免疫沉淀操作流程

1) 缓冲液准备与建议:

实验中用到的水和buffer，使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

各参考使用buffer体系表：

平衡/洗杂缓冲液	样本IP裂解buffer 或 50 mM Tris , 0.15 M NaCl , 0.1 % NP40, 1mM EDTA, pH7.4
酸性洗脱液	200 mM glycine pH 2.5
变性洗脱液	2xSDS Sample buffer(120 mM Tris-HCL pH 6.8, 20 % 甘油, 4 % SDS, 0.04 % 溴酚蓝, 10 % β -巯基乙醇)
中和缓冲液	1 M Tris-HCl , pH8.0

2) **磁珠准备:** 取25-50ul Y-Tec GFP Magbeads(human)混合液加入1.5 ml离心管中，5000 $\times$ g离心1min，吸弃上清。

3) **磁珠平衡:** 加入0.5ml平衡buffer，悬浮Magbeads（使Magbeads与目的蛋白处于相同的buffer体系下，可保护蛋白）1min，磁力架分离上清吸弃，重复2次。

4) **蛋白结合:** 加入200-1000ul样品裂解液到处理好的Magbeads中，混合均匀，在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管，保证样品和Magbeads充分接触结合，4℃或室温孵育30-60min（注意结合时间不要超过60min，否则可能导致非特异性结合）。5000 $\times$ g离心1 min，磁力架分离上清吸弃。

5) **洗杂:** 加入0.5ml的洗杂buffer，悬浮磁珠，轻轻混匀1 min，磁力架分离上清吸弃。再重复三次。确保去除非特异性吸附。

6) **样品洗脱:** 可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

酸性洗脱 - 加入100ul酸性洗脱液，悬浮磁珠室温孵育5-10min，磁力架分离上清后小心取出上清，不要吸到磁珠，用酸性洗脱液1/10体积中和液中中和。洗脱样品放置4℃，长时间放置-20℃保存。

变性洗脱 - 实验室常规蛋白上样缓冲液（Loading Buffer）中含有SDS的样品缓冲液可以使Y-Tec GFP Magbeads (human) 抗体变性，洗脱后的Y-Tec GFP Magbeads (human) 不能重复使用。每管中加入25ul 2×Loading Buffer，95℃加热10min。5000×g离心1 min，吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测。

➡免疫沉淀常见问题分析与解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
样本结合不完全	蛋白量超过Magbeads载量	减少上样体积或增加磁珠体积。
	结合时间太短	延长样品和磁珠的结合时间。
	标签包裹未充分暴露	可以加入低浓度的变性剂，上样前透析。
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行脱盐处理。
未检测到目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品。 低温操作。 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前 Western 检测是否有 GFP 标签融合蛋白。
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。增加上样量。 减少 NaCl 浓度。
非特异性杂带过多	非特异性吸附	减少上样量，减少孵育时间。
	洗杂不充分	增加洗杂次数，或增加洗杂液中盐离子浓度。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic applications.

