

## 简介

GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒主要用于IP(immunoprecipitation)或者Co-IP实验。本试剂盒主要由GST Nanoselector® 磁性琼脂糖珠及相关配套试剂组成。

GST Nanoselector® 磁性琼脂糖珠是由一种抗标签蛋白（GST）纳米抗体（VHH）与磁性琼脂糖珠共价结合组成，用于从细菌等各种生物的细胞提取物中免疫沉淀GST-融合蛋白，具有载量高、无轻重链干扰等优势。

## 磁珠特性

|       |                                        |
|-------|----------------------------------------|
| 配体    | 抗GST的纳米抗体（VHH）                         |
| 特异性   | 与GST及其衍生物特异性结合                         |
| 结合能力  | 每 10 $\mu$ L 磁珠悬液结合 20 $\mu$ g GST重组蛋白 |
| 珠粒大小  | ~ 40 $\mu$ m                           |
| 储存缓冲液 | 10mM PBS (pH 7.5), 0.01% proclin300    |
| 储存条件  | 收货后于 4°C储存。请勿冷冻！                       |
| 稳定性   | 收货后 4°C可稳定保存 1 年。                      |
| 装运    | 低温装运                                   |

## 试剂盒主要成分

| 缓冲液                              | 成分                                                                                               | 体积    | 储存条件 |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|
| GST Nanoselector® Magnetic beads | 50% 磁珠悬液, 10mM PBS pH 7.5, 0.01% proclin300 (Code: 010-101-003)                                  | 500uL | 4°C  |
| Binding Control Magnetic beads   | 50% 磁珠悬液, 10mM PBS pH 7.5, 0.01% proclin300 (Code: 100-100-200)                                  | 500uL | 4°C  |
| Lysis buffer                     | 10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5mM EDTA                                           | 20mL  | 4°C  |
| Wash buffer                      | 10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.05% NP40, 0.5mM EDTA                                          | 120mL | 4°C  |
| Acidic elution buffer            | 0.2M Glycine-HCl pH 2.5                                                                          | 10mL  | 4°C  |
| Neutralization buffer            | 1M Tris-HCl pH 10.4                                                                              | 1mL   | 4°C  |
| 2xSDS Sample buffer              | 120mM Tris-HCl pH6.8, 20% Glycerol, 4% SDS, 0.04% bromophenol blue, 10% $\beta$ -mercaptoethanol | 2.5mL | 常温   |
| 5x TBST                          | 0.1M Tris-HCl pH7.5, 2.5M NaCl, 0.5% Tween-20, 0.5% ProClin300                                   | 60mL  | 4°C  |
| 阳性参照(GST-mNeogreen)*             | GST-mNeogreen in Lysis buffer                                                                    | 1 mL  | 4°C  |

# GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：010-101-003K



\*注：需使用阳性参照时，请每个IP反应加入500ul阳性参照/25 ul磁珠。

注：每次使用完请确保管盖紧闭，以免影响试剂性能。

注：各成分需要保存在合适的温度条件下。

## Lysis buffer 及Wash buffer成分兼容性

| 缓冲液成分                   | 最大兼容浓度 |
|-------------------------|--------|
| DTT                     | 1 mM   |
| Glycerol                | 30 %   |
| Guanidine HCl           | 4 M    |
| NaCl                    | 2 M    |
| Nonidet™ P40 Substitute | 2 %    |
| SDS                     | 1 %    |
| TCEP                    | 0.2 mM |
| Triton™ X-100           | 1 %    |
| Urea                    | 8 M    |

\*注：用户可根据实验目的适当调整或添加上述组分加入Lysis buffer 和Wash buffer中，请注意最大兼容浓度。

## 产品规格

| 产品                                     | 规格       |
|----------------------------------------|----------|
| GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒 | 20X Test |

## 流程预览

### 准备工作

所有步骤均 4°C 操作；  
准备细胞裂解缓冲液和细胞裂解条件

### 细胞裂解物



每 $10^6$ - $10^7$ 个细胞加入500μL 的 Lysis buffer；  
裂解细胞并离心取上清

### 平衡磁珠



将25μL 磁珠悬浮液转移到1.5mL 的 EP 管中；  
用500uL Wash buffer平衡3次

### 结合蛋白



向磁珠中加 500 μL 细胞裂解物； 4°C 上下旋转  
1 小时

### 洗磁珠



用Wash buffer洗涤磁珠3次，每次500μL；  
在最后一次洗涤步骤中，将磁珠转移到一个新EP  
管中

### 用 SDS Sample buffer 洗脱



吸干上清，80ul 2XSDS Sample bufer重悬磁珠；  
95°C以上沸水浴10分钟；  
上清可用于SDS-PAGE/WB分析

# GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：010-101-003K



## 免疫沉淀流程

### 细胞材料

以下方案描述了哺乳动物细胞裂解物的制备。

对于其他类型的细胞，我们建议使用 500 µg 细胞提取物，并从磁珠平衡步骤开始实验。

### 哺乳动物细胞裂解

注意：使用预冷的缓冲液收获细胞并裂解细胞。强烈建议将蛋白酶抑制剂添加到裂解缓冲液中，以防止目标蛋白及其结合物降解。对于一次免疫沉淀反应，我们推荐使用约  $10^6$ - $10^7$  个细胞。

#### 1. 选择裂解缓冲液。

· 对于细胞质蛋白，通过上下吹打将细胞团重悬于 500 µL 预冷的 Lysis buffer 中。

注：Lysis buffer 使用前，需要额外添加蛋白酶抑制剂混合液和 1mM PMSF（抑制目的蛋白降解）。

· 对于核/染色质蛋白，将细胞团重悬于 500 µL 预冷的 RIPA 缓冲液中。

注：RIPA 缓冲液使用前需要额外添加 DNaseI（75-150 Kunitz U/mL），MgCl<sub>2</sub>（2.5 mM），蛋白酶抑制剂混合液和 PMSF（1 mM）。

2. 冰上放置 30 分钟，然后每 10 分钟用移液管吸取一次。

3. 4°C，17,000x g 离心细胞裂解液 10 分钟。将澄清的裂解物（上清液）转移到预冷 EP 管中。如果需要，可保存 50 µL 稀释的裂解物用于进一步分析（如进行 input 对照）。

注：产品用户可根据自己需求适当调整裂解液成分，注意不要破坏蛋白质结构，详情可参考：Lysis buffer 和 Wash buffer 成分兼容性。

### 植物组织裂解（例：拟南芥）：

1. 用纸巾将液体培养的拟南芥幼苗吸干，称取 0.7 克，转移到研钵中。

2. 用液氮冷冻，用杵研磨成细粉。

3. 加入 4ml 提取缓冲液 (PBS, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 蛋白酶抑制剂)，缓慢解冻，进一步研磨样品。

4. 将样品转移到 1.5 ml 微量离心管中，在 4°C 下以 16000 x g 离心 20 分钟。

5. 将上清液通过 0.20µm 的过滤注射器，并将提取物置于冰上。如果需要，可保存 50 µL 稀释的裂解物用于进一步分析（如进行 input 对照）。

注：如果材料为其他物种来源，可自行根据常用的裂解液进行裂解液样本制备，试剂盒内磁珠及其他溶液一般都可以兼容。

### 磁珠平衡

1. 通过移液枪吹打或上下旋转 EP 管悬浮磁珠。不要漩涡磁珠！

2. 将 25 µL 的磁珠悬浮液转移到 1.5 mL 的离心管中。

3. 加入 500 µL 预冷的 Wash buffer。

4. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清。丢弃上清。

## 蛋白结合

1. 将稀释的裂解物加入到平衡的磁珠中。
2. 在 4°C 上下旋转 1 小时。

## 洗涤

1. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清。
2. 如果需要，可保存 50 µL 上清液用于进一步分析（穿流液/非结合组分）。
3. 丢弃剩余的上层清液。
4. 加入 500 µL Wash buffer 重悬磁珠。
5. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清，丢弃剩余的上清液。
6. 重复洗涤步骤（步骤 4 和 5）至少两次。
7. 在最后的洗涤步骤中，将磁珠转移到新管中。

可选：为了增加洗涤缓冲液的强度，可添加非离子洗涤剂，如 Triton X-100。

## 2x SDS sample buffer洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
2. 加入 80 µL 2xSDS Sample buffer 重悬磁珠。
3. 在 95°C 以上的沸水浴磁珠 10 分钟，以从磁珠上分离其中的免疫复合物。
4. 用磁铁分离磁珠。
5. 用 SDS-PAGE/WB 分析上清。

## Acidic elution buffer 洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
2. 加入 50-100 µL Acidic Elution Buffer，在 4°C 或室温不停吹打 30 - 60 秒。
3. 用磁铁分离磁珠直到上层溶液澄清。
4. 将上清液转移到新的离心管中。
5. 加入 5-10 µL Neutralization buffer 中和洗脱产物。
6. 至少重复洗脱步骤（步骤 2，3，4，5）一次以提高洗脱效率。

注：室温洗脱比 4°C 效率更高。缓冲液要在室温下预温。

# GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号: 010-101-003K



## WB检测

1. 按照正常流程进行WB跑胶及转膜实验。
2. 向1个体积的5x TBST中加入4个体积的纯水获得1x TBST;
3. 将膜放入5%牛奶(1x TBST稀释)或者5%BSA(1xTBST稀释), 4°C封闭过夜。
4. 将膜放入1;5000 稀释的Anti-GST, AlpHcAbs® Rabbit antibody(HRP) (1x TBST稀释或者同封闭液稀释)缓冲液中, 室温孵育1h。\*
5. 将膜放入1x TBST中洗涤20min;
6. 去除1x TBST, 加入新的1x TBST中洗涤20min;
7. 重复步骤6一次。
8. 曝光。

\*注: 步骤4为直接孵育HRP标记抗体, 此步骤也可以更换为孵育检测一抗-洗涤-孵育对应二抗。

## Nanoselector® IP试剂盒其它产品

| Code Number  | Product Description                                      | Applications | Size     |
|--------------|----------------------------------------------------------|--------------|----------|
| 019-101-003K | GFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                   | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 020-101-003K | RFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                   | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 013-101-003K | mNeongreen Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒            | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 014-101-003K | TurboGFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒              | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 015-101-003K | MBP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                   | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 010-101-003K | GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                   | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 011-101-003K | SNAP tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒              | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 012-101-003K | Halo Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                  | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 003-101-003K | HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 004-101-003K | His tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒               | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 049-101-003K | mWasabi Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒               | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 017-101-003K | TagFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                 | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 064-101-003K | V5 tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 082-101-003K | StayGold/mBaojin Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒      | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 016-101-003K | DYKDDDDK tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒          | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 026-101-003K | tdTomato Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒              | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 028-101-003K | mScarlet3-H/mYongHong Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒 | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 078-101-003K | Biotin Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 006-101-003K | SUMO tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒              | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 061-101-003K | mGold Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒                 | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 002-101-003K | Myc tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒               | IP,Co-IP     | 20X Test |
| 025-101-003K | Rabbit IgG Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒            | IP,Co-IP     | 40X Test |
| 001-101-003K | Mouse IgG Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒             | IP,Co-IP     | 40X Test |
| 001-300-003K | Mouse IgG&Rabbit IgG Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒  | IP,Co-IP     | 40X Test |