GST纳米抗体偶联磁珠

货号：BN46008　　规格：1ml

产品描述

GST Nanobody Magarose Beads 是一种共价偶联 GST羊驼纳米抗体的磁珠，适用于从细菌、酵母、植物或动物细胞的裂解物中高效沉淀或纯化 GST融合蛋白。

产品属性

Beads 大小：25 μM（磁性的琼脂糖珠）。
储存溶液：PBS 缓冲液(含有 20%乙醇)。
结合能力：20 μL 的 slurry 可以结合 15-20 μg GST融合蛋白。
孵育时间：5-30 min。
亲和力：解离常数 nM-pM 级别。
保存条件：4℃储存有效期 1 年，-20℃储存有效期 2 年。
注意事项：避免高速离心、干燥和反复冻融。

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；

推荐试剂

细胞裂解液：20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1.0% Nonidet™ P40 Substitute (货号BN46010)
RIPA 裂解液：20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1.0% Triton™ X-100, 0.5 %deoxycholate (货号BN46011)
稀释缓冲液：20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA (货号BN46012)
洗涤缓冲液：20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % Nonidet™ P40 Substitute (货号BN46013)
甘氨酸洗脱液：200 mM glycine pH 2.5 (货号BN46014)
中和缓冲液：　1 M Tris pH 10.4 (货号BN46015)

注意:

1. 针对细菌、酵母、植物和昆虫等细胞样本，请对细胞裂解液进行优化。
2. 涉及免疫共沉淀实验时，建议采用不含变性剂的洗涤液。
3. 上述缓冲液的 pH 值均是在 4℃条件下标定。

声明

产品仅限于实验室研究，请勿用于临床检测治疗。

操作步骤

1. 细胞收集		常规的免疫沉淀反应一次大约使用 10^6-10^7 个表达 GST 融合蛋白的哺乳动物细胞。吸出生长培养基后，向培养皿中加入 2 mL 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，转移细胞到离心管，500 g 离心 3-5 min 并丢弃上清液。
2. 细胞裂解		用 1 mL 预冷的裂解液（含蛋白酶抑制剂）重悬细胞，转移至 EP 管后放置在冰上 30 min，每 10 min 充分吹打一次。将获取的细胞裂解产物在 4℃，20,000 g 条件下离心 15 min，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℃进行长期储存。
3. 平衡珠子		振荡混匀 GST Nanobody Magarose Beads，吸取 20 µL slurry 到 0.5 mL 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，并建议吸取 20 µLslurry 时剪掉枪头的前端）
4. 结合蛋白		将细胞裂解产物加入到平衡的 GST Nanobody Magarose Beads 中（如果未做第 3 步，可在细胞裂解产物中直接加入 20 µLslurry），在 4 ℃冷柜中的旋转混合仪上结合 5-30 min，也可以根据需要延长结合时间。如果需要，保存 50 µL 的裂解产物进行免疫印迹分析。最后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。
5. 清洗珠子		用 0.5-1mL 预冷的裂解或洗涤缓冲液洗涤GST Nanobody Magarose 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。（可选：在第二次洗涤的步骤中增加盐浓度到 200 - 500 mM）
6. 洗脱蛋白		方法一： 加入 20 µL 2×SDS-sample buffer 重悬 GST Nanobody Magarose Beads。在 95℃条件下加热 10 min，把免疫沉淀复合物从珠子上游离出来，然后在 4 ℃，2,500 g 条件下离心 3 min 收集上清，进行免疫印迹分析。 方法二： 替代方法一的可选步骤：加入 50 µL 0.2 M pH2.5 的甘氨酸洗脱结合的蛋白，建议孵育时间 30 s，并不断混匀，随后离心，转移上清液到新管中，为了中和酸性的甘氨酸，需添加 5 µL 1.0 M Tris（pH10.4）。 注意：为了提高洗脱效率可以重复这一步。

常见问题及解决方案

常见问题	可能原因和解决方法
是否可以沉淀 tag 融合在 N 端或者 C 端的目的蛋白	可以免疫沉淀或者纯化 tag 融合在 N 端或者 C 端的目的蛋白
高背景	可能是由于洗涤不充分，可以增加洗涤次数和时间，比如每次洗涤 5-10min，洗涤至少 3 次
	必要的时候，可以用 1-3%的 BSA 在 4℃对珠子封闭 1-2 hour
	标签抗体特异性差或灵敏度低，更换高质量的标签抗体
无特异性结合产生或免疫沉淀下来的蛋白偏少	目的蛋白有可能聚集，变性或降解，尽量采用新鲜的细胞样品，且在裂解时加入蛋白酶抑制剂，并在冰浴或 4℃条件下进行裂解和结合实验
	样品中的目的蛋白的表达量较低，或者裂解不充分，针对不同的目的蛋白，请选择合适的裂解缓冲液
	珠子使用过少或者在实验过程中有所损失，请在洗涤缓冲液中加入一定量的去垢剂以减少珠子的粘壁性，并在合适的离心力下收集珠子
	必要的时候，可以延长结合的时间，比如 4℃条件下过夜结合，但需保证目的蛋白不降解
免疫共沉淀不成功	相互作用蛋白与目的蛋白不结合，或者需要配体的介导等
	蛋白之间的相互作用被破坏，首先尽量使用新鲜的样品进行实验，其次选择合适的裂解液和洗涤缓冲液，比如 RIPA 裂解缓冲液可能破坏或减弱蛋白之间的相互作用，这时可以尝试温和的去垢剂，如 Nonidet P-10 和 Triton X-100