

# Goat Anti-Rabbit IgG Magnetic Beads

## 使用说明:

### 一、样品制备

1. 建议将蛋白裂解液控制在 pH6-8, NaCl 或 KCl 浓度 $\geq$ 0.15M 可获得较好的实验效果。
2. 蛋白裂解液需要离心 (10000 $\times$ g, 15min) 才能去除干扰蛋白质结合的细胞碎片和微粒。如想获得更好的实验效果, 蛋白裂解液还可通过 0.45  $\mu$ m 或 0.22  $\mu$ m 滤器过滤。

### 二、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)

对于 IP 反应, 建议每个反应 (1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞 或 500 $\mu$ L 裂解液) 使用 20-30 $\mu$ L 的磁珠。

1. 轻轻重悬磁珠, 取出适当的体积到合适的离心管中。置于磁力架上分离 10 秒, 去除上清。
2. 用 10 倍凝胶悬浮液体积的 TBST 清洗亲和凝胶, 置于磁力架上分离 10 秒, 弃上清, 重复该步骤三次。
3. 将 500 $\mu$ L 处理好的细胞裂解液添加到洗涤过的磁珠中。(可根据样品中目的蛋白丰度来调整裂解液的体积)。对于阳性对照, 将 500 $\mu$ L TBST 和 4  $\mu$ L 50 ng/ $\mu$ L Rabbit IgG (~200ng) 添加到洗涤过的磁珠中。对于阴性对照, 仅添加 500 $\mu$ L 的裂解缓冲液, 不含蛋白质。
4. 轻轻摇动 (推荐使用旋转混匀仪) 所有样品和对照 1 小时。为了提高结合效率, 可将结合步骤延长至 4 $^{\circ}$ C 过夜反应。
5. 置于磁力架上分离 10 秒以收集磁珠。用移液器吸头 (推荐使用细长的吸头或者 1mL 吸头上套 200 $\mu$ L 吸头来使用) 去除上清液 (注意防止吸头沾到磁珠)
6. 用 10 倍磁珠悬浮液体积的 TBST 清洗磁珠三次。

### 三、洗脱:

本产品根据不同的下游应用要求等, 可使用多种洗脱方法, 包括酸性和 SDS-PAGE 上样缓冲液等洗脱液进行洗脱。

**1、酸性洗脱法:** 本方法为非变性法, 比较快速且高效。洗脱后的蛋白保持原有的生物活性, 便于后续分析检测。

每 10 $\mu$ L 原始凝胶悬浮液, 加入 100 $\mu$ L 酸性洗脱液(0.1M 甘氨酸, pH2-3), 混匀后置于旋转混合仪上, 室温孵育 10 分钟。孵育完毕后, 置于磁力架上分离 10 秒, 将上清转移到新的离心管中, 并立刻加入 10 $\mu$ L 中和液(1M Tris-HCl, pH9.0), 混匀。为了获得最大的洗脱效率, 可重复上述步骤, 并将相同样品合并。

洗脱并中和的目的蛋白置于 4 $^{\circ}$ C 待用, 或者 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 长期保存。

注: 1) 酸性洗脱法虽然高效, 但仍可能低于 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

2) 由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响, 如果对洗脱效率的要求比较高, 可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整, 相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整。

**2、SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法:** 本方法为变性法, 得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 检测。每 20 $\mu$ L 原始凝胶磁珠悬浮液体积, 加入 20 $\mu$ L 2X SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟。置于磁力架上分离 10 秒, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 WB 检测。

**注:** 由于上样缓冲液中 SDS 会破坏 Goat Anti-Rabbit IgG, 所以 SDS 煮样洗脱后的磁珠不能重复使用。