

简介

Rabbit IgG Nanoselector® 磁珠是由一种抗Rabbit IgG纳米抗体（VHH）与磁性琼脂糖珠共价结合组成，主要用于免疫沉淀Rabbit IgG抗体。与传统的protein A/G磁珠相比，Rabbit IgG Nanoselector® 磁珠具有更高的亲和力(KD<1nM),能有效结合更多的Rabbit IgG抗体，是一种高效的结合Rabbit IgG研究工具。

特性

配体	抗Rabbit IgG的纳米抗体（VHH）
特异性	与Rabbit IgG抗体特异性结合
结合能力	每 10 μ L 磁珠悬液结合 100 μ g Rabbit IgG
珠粒大小	~ 40 μ m
储存缓冲液	20% 乙醇
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

缓冲液成分建议

缓冲溶液要求

缓冲液	成分
Lysis buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP40
RIPA buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % TritonX-100, 1 % deoxycholate
Dilution buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA
Wash buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % NP40, 0.5mM EDTA
2xSDS Sample buffer	120 mM Tris-HCL pH 6.8, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0.04 % bromophenol blue, 10 % β -mercaptoethanol
Acidic elution buffer	200 mM glycine pH 2.5
Neutralization buffer	1 M Tris-HCL pH 10.4

注：对于其他细胞类型如酵母、植物、昆虫、细菌，请使用相应的细胞裂解缓冲液。

注：考虑使用无去垢剂的洗涤缓冲液进行免疫共沉淀。

Rabbit IgG Nanoselector® 磁珠

产品货号：025-101-003



产品规格

产品	规格
Rabbit IgG Nanoselector® 磁珠	20 个反应（ 500 μ L 悬浮液）
	200 个反应（ 5 mL 悬浮液）

流程预览

准备工作		所有步骤均4℃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200 μ L 的 Lysis buffer; 裂解细胞并离心取上清; 混合200 μ L 上清样品和300 μ L dilution buffer
一抗结合		将500 μ L细胞裂解液转移至新的1.5 mL EP管中，加入2-4 ug一抗/样本；4℃上下旋转过夜
平衡磁珠		将25 μ L 磁珠悬浮液转移到1.5mL 的 EP 管中； 用500 μ L dilution buffer平衡3次
结合蛋白		将平衡好的磁珠加入一抗结合管中；4℃上下旋转1小时
洗磁珠		用wash buffer洗涤磁珠3次，每次500 μ L；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		80 μ L2XSDS sample bufer重悬磁珠； 95℃以上沸水浴5分钟； 上清可用于SDS-PAGE/WB分析

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 200 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。

· 对于核/染色质蛋白，将细胞团重悬于 200 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) , $MgCl_2$ (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, 17,000xg 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，并加入 300 µL Dilution buffer（Dilution buffer 使用前需要额外添加蛋白酶抑制剂混合液和 1mM PMSF）。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）。

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）。

一抗结合

1. 将 500 µL 细胞裂解液转移至新的 1.5 mL EP 管中，加入 2-4 µg 一抗/样本；

2. 4°C 上下旋转过夜。

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 预冷的稀释缓冲液。

4. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清。丢弃上清。

Rabbit IgG Nanoselector® 磁珠

产品货号：025-101-003



蛋白结合

1. 将平衡好的磁珠加入一抗结合管中；
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 μ L 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 μ L 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，可测试各种盐浓度，如 150 mM-500 mM，和 / 或添加非离子洗涤剂，如 Triton X-100

2x SDS sample buffer洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
2. 加入 80 μ L 2x SDS Sample buffer 重悬磁珠。
3. 在 95°C 以上的沸水浴磁珠 5 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 μ L 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 μ L 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。

相关产品

Code Number	Product Description	Applications	Size
001-101-002	Mouse IgG Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-101-003	Mouse IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
025-101-002	Rabbit IgG Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
025-101-003	Rabbit IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-300-002	Mouse IgG&Rabbit IgG Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-300-003	Mouse IgG&Rabbit IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)