

GFP IP 试剂盒手册

介绍

该试剂盒是从细胞裂解液中捕获 GFP 及其融合蛋白质的。作为免疫沉淀抗体的生物素-鸡抗 GFP 与作为基质的带有链霉亲和素的磁珠结合使用，使该试剂盒具有几点优点：

1. 在该试剂盒中，鸡 IgY 抗 GFP 抗体是抗原亲和纯化的，将大大减少珠的使用，与在 IP 中使用总 IgG 或总 IgY 相比较，最大限度地减少非特异性。
2. 由于链霉亲和素和生物素的极高的亲和力，链霉-磁珠能够以非常高的效率捕捉生物素化 IgY GFP/GFP 复合物，增加了捕捉的敏感度。该试剂盒将允许用户捕捉最低 1ng GFP 蛋白质，最高 330ng GFP 蛋白质。
3. 鸡 IgY 的 Fc 区与哺乳动物 IgG 的 Fc 区有很大不同。当来自哺乳动物物种的蛋白质检测抗体被用于蛋白质印迹分析，在免疫沉淀后，它将不会显示杂带带，因为抗-IgG 二抗体不结合 IgY 或结合很少的 IgY。

试剂盒内容

产品编号	GFP-IP-50	GFP-IP-200
规格	50 rxns	200 rxns
生物素化 IgY 抗-GFP (0.2mg/mL)	260μL	1020μL
链霉-磁珠 (10mg/mL)	65μL	250μL
洗脱液	1.25mL	5mL
中和液	0.2mL	0.8mL

提示

1. 用户必须使用适当的方法来制备细胞裂解液以确保：1) 染色体 DNA 被破坏，如此裂解液不是黏的，2) 裂解液中蛋白水解被抑制。
2. 捕获流程使用圆底 96 孔板发展，用户可以选择其它版式，如微量离心管或 PCR 管。
3. 对于短期内储存（最多 2 周），整个试剂盒于 4℃ 存放；对于长期储存，取出标记生物素的 IgY anti GFP 的管存放于 -20℃，其它剩余部分存放于 4℃。避免频繁的冻溶。

实验流程

1. 预处理链霉磁珠

通过涡旋充分悬浮珠，并取出所需的珠量（每个捕捉反应 12μg）。在磁力架（由用户提供）上除去液体，用 TBST（0.05% Tween 20）清洗珠 3 次，每次用 10 被磁珠体积重悬，用磁力架吸附磁珠吸去上清。在 PBST 中重悬浮珠 2mg/mL。备用。

2. 往 100-200uL 细胞裂解液中加入 5uL (0.2ug/uL) 生物素化 IgY 抗-GFP，混合均匀。

3. 在室温下温浴震荡 1h。

4. 往混合物中加入 6 uL (2ug/uL) 预处理的链霉磁珠（充分悬浮），混合均匀。

5. 室温下培养 30min 或 4℃ 震荡过夜培养。在温浴期间，每 10min 吹吸混匀几次。（如果使用管，温浴可在旋转器或其它适当的设备进行，没有必要间隔吹吸）

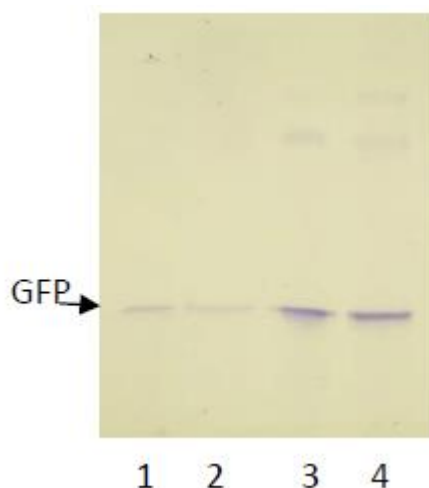
6. 在磁力架上取出上清，保留磁珠。（可以保存上清液）

7. 使用 200uL PBST（0.05% Tween 20）清洗珠 3 次，用磁力架吸附磁珠吸去上清。

8. 清洗后，加入 10 或 20uL 洗脱液，充分重悬磁珠。然后在磁力架上，把珠和溶液分开。转移洗脱液至一个预先加入 1 或 2uL 中和溶液的新管中。（通过该洗脱条件，没有或很少的 IP 抗体将被洗脱，大大减少了使用来自相同物种一抗作为 IP 抗体应用于免疫印迹的干扰）。

洗脱液现在可以用于下游分析。

例子



用免疫印迹法分析捕获效率

1: 加入 1ng GFP

2: 在 100 μ L 组织裂解液中加入 1ng GFP IP 捕捉

3: 加入 10ng GFP

4: 在 100 μ L 组织裂解液中加入 10ng GFP 捕捉

一抗: IgY 抗-GFP