

## ABM®Anti-Rabbit VHH Magarose

货号: MA205-25T



ABMagic™

### 产品信息

规 格: 500  $\mu$ L 悬浮液

固含量: 50%

类 型: 磁性琼脂糖微珠

配 体: 抗 兔 IgG 单域抗体 (VHH, 纳米抗体)

反应性: 识别兔IgG Fc 的纳米抗体 (VHH) , 不与人, 小鼠, 牛, 马, 绵羊和山羊的 IgG 结合

分子量:  $\approx$ 15 KDa

结合力: 1  $\mu$ L Rabbit 磁性琼脂糖微珠混匀液结合约 10  $\mu$ g 兔 IgG

亲和力: 1pM

应 用: IP, CoIP, MS, Purification

储存液: 1x10 mM PBS, 25%甘油, 和 0.03% Proclin 300

微珠粒径: 30~100  $\mu$ m (磁性琼脂糖微珠)

运输温度: 冰袋或常温运输

储存温度: 4°C (避免冻存) 有效期 1 年

### 产品说明

Rabbit-VHH Magarose 是用于抓取或纯化 Rabbit IgG 抗体的优势工具, 由抗 Rabbit IgG 的高亲和力纳米抗体 (单域抗体 VHH 区) , 重组表达后共价结合在磁性琼脂糖微珠上, 抗体和磁珠不易分离。

### 产品优势

高特异性: 不会受到培养细胞中血清里其他物种 IgG 的干扰, 导致非特异结合

孵育时间短: 通常 4°C 孵育 1~2 小时

高载量: 1  $\mu$ L 悬浮液可结合约 10  $\mu$ g Rabbit IgG

## 推荐缓冲液表 (以 4-10°C PH 值为准)

| Buffer                 | Composition   |
|------------------------|---|
| Lysis buffer (CoIP)    | 50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton-100, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP40                         |
| RIPA buffer            | 10 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholate        |
| Dilution/Wash buffer   | 50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA  |
| 2×SDS loading buffer   | 120 mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 10% $\beta$ -mercaptoethanol |
| Glycine-elution buffer | 200 mM glycine pH2.5  |
| Neutralization buffer  | 1 M Tris pH10.4   |

## 缓冲液兼容表

| Buffer ingredients | Max. concentration |
|--------------------|--------------------|
| DTT                | 5 mM               |
| EDTA               | 5 mM               |
| Glycerole          | 30%                |
| NaCl               | 3 M                |
| Gua-Hcl            | 3 M                |
| NP40               | 2 %                |
| SDS                | 0.1 %              |
| Triton X-100       | 2 %                |
| Urea               | 8 M                |

## 产品使用步骤

### 一、样品准备

注：细胞裂解时应使用提前预冷的缓冲液。我们强烈建议在裂解缓冲液中添加蛋白酶抑制剂，以防止您的靶蛋白及其相互作用蛋白降解；细菌如大肠杆菌的裂解可采用化学法、机械法和超声波法等，此处省略。

#### 1.1 哺乳动物细胞收集步骤：

每  $10\text{ cm}^2$  培养皿约可收集  $10^6\text{-}10^7$  个哺乳动物细胞, 吸出生长培养基、向培养皿中加入 2 mL 提前预冷的 PBS (pH7.5) 洗涤细胞 2 次, 利用胰酶消化的方法收集贴壁细胞, 细胞转移到离心管,  $500\times g$  离心 5 min 并丢弃上清液, 获得  $10^6\text{-}10^7$  个细胞。

## 1.2 哺乳动物细胞裂解

1. 在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂, 用 200-500  $\mu\text{L}$  预冷 Lysis buffer 重悬细胞。

注: 对于细胞质蛋白在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂和 1 mM PMSF。

对于核染色质蛋白可选择: 在 RIPA buffer 中加入 DNase (75- 150 KunitzU/mL)、 $\text{MgCl}_2$  (2.5 mM) 、蛋白酶抑制剂和 PMSF (1 mM)

2. 冰上放置 30 分钟, 每 10 分钟重悬细胞充分混匀一次。
3.  $4^\circ\text{C}$ ,  $16000\times g$  离心 10 分钟, 将上清液转移到预冷 EP 管中加入 300  $\mu\text{L}$  Dilution buffer (Dilution buffer 使用前需要添加蛋白酶抑制剂和 1mM PMSF), 丢弃沉淀 (如需, 可保存 50  $\mu\text{L}$  稀释的裂解物用于进一步分析, 如做为 input 对照)。

注: 此步骤获得的细胞溶解物可置于-80°C下保存

## 二、一抗结合

1. 将细胞裂解上清液转移到新 EP 管中, 然后加入一抗 (2-5ug)
2.  $4^\circ\text{C}$ , 旋转过夜孵育。

## 三、平衡磁珠

1. 通过移液枪吹吸或上下旋转重悬微珠, 将 20  $\mu\text{L}$  的微珠混匀液转移到至 1.5 mL 的离心管中。
2. 加入 500  $\mu\text{L}$  预冷的稀释缓冲液 (Dilution buffer ), 混匀。
3. 用磁力架分离磁珠, 直到上清变为澄清状态, 丢弃上清液, 并重复清洗 3 次收集磁珠。

## 四、结合蛋白

1. 将收取的细胞裂解物加入到平衡好的磁珠中。 (如需, 可保存 30  $\mu\text{L}$  裂解产物用于免疫印迹分析)

2. 4°C, 上下旋转孵育 1-2 小时。

## 五、洗杂

1. 用磁力架分离磁珠, 直到上清液变为澄清状态。
2. 丢弃剩余上清液。(如需, 可保存 30  $\mu$ L 上清液用于进一步分析(流穿液 / 非结合组分)。
3. 加入 500  $\mu$ L Dilution buffer 重悬磁珠。
4. 用磁力架分离磁珠, 丢弃剩余上清液。
5. 重复上述洗涤步骤 (步骤 3 和 4) 2-3 次。
6. 洗涤完成后, 将磁珠转移至新的 EP 管中。

**可选** : 清洗液 (Dilution buffer) 可按照需要测试多种盐离子浓度, 如 150 mM-500 mM, 或添加非离子洗涤剂, 如 TritonX-100 (见缓冲液兼容性表中的最大浓度)。

## 六、洗脱蛋白 (可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法)

### 5.1 2×SDS loading buffer 洗脱

1. 丢弃剩余上清液。
2. 加入 10~80  $\mu$ L 2xSDS loading buffer 重悬磁珠 (根据样品情况选择 loading buffer 用量)。
3. 在 95°C以上煮沸水浴 5-10 分钟, 从磁珠上分离免疫复合物。
4. 用磁力架分离磁珠, 丢弃沉淀, 收集上清液。
5. 用 SDS-PAGE 或 WB 分析上清液。

### 5.2 甘氨酸缓冲液洗脱

1. 丢弃剩余上清液。
2. 加入 50–100  $\mu$ L Glycine-elution buffer (pH2.5), 在 4°C或室温用移液枪吹吸 30 - 60 秒。

3. 用磁力架分离磁珠，丢弃沉淀，收集上清液至新的离心管中。
4. 立即加入 5-10  $\mu\text{L}$  Neutralization buffer (pH10.4) 中和洗脱产物。
5. 重复洗脱步骤 (步骤 2, 3, 4, 5) 2 次以提高洗脱效率。

**注：**室温洗脱比 4°C 效率更高，如靶蛋白较稳定，缓冲液可提前置于室温预热。

#### **注意事项：**

1. 使用本产品进行实验，需先确认样品中目的蛋白的表达情况。
2. 为了预防目的蛋白降解，请添加合适的蛋白酶抑制剂。
3. 请勿离心或冷冻磁珠，以免引起磁珠聚团，板结。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品不能用于诊断医疗或其它用途仅用于科学实验研究。