

## ChainFree™ Anti-V5 Magnetic Beads

## 产品信息

产品名称	货号	储存条件
ChainFree™ Anti-V5 Magnetic Beads	FI8203-0.5 mL	4℃（避免冻存），2年
ChainFree™ Anti-V5 Magnetic Beads	FI8203-1 mL	4℃（避免冻存），2年
ChainFree™ Anti-V5 Magnetic Beads	FI8203-5 mL	4℃（避免冻存），2年

## 产品描述

ChainFree™ Anti-V5 磁珠偶联了经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 V5 抗体，可用于捕获哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物细胞、组织提取物中的 V5 标签（GKPIPPELLGLDST）融合蛋白及其相互作用蛋白。

实验前先将 V5 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达；之后将 ChainFree™ Anti-V5 磁珠加入样本裂解液中，V5 抗体与目标融合蛋白及其结合蛋白形成复合体；去除未结合的蛋白后，可以采用多种方法洗脱蛋白质，并且 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

## 产品属性

磁珠直径	2 μm
储存缓冲液	20 mM PBS, 5% BSA
蛋白结合量	1.0~1.5 mg 蛋白 / mL 磁珠
反应性	可特异性结合 V5 标签（GKPIPPELLGLDST），对融合蛋白 N 端、C 端或中间的 V5 标签均可以识别。
应用	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）

注意事项和免责声明：本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

## 使用说明

### 建议的缓冲液配方

缓冲液	配方
裂解缓冲液	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40 (在 4°C 下调整 PH)
漂洗缓冲液	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % NP-40 (在 4°C 下调整 PH)
2×SDS-PAGE 上样缓冲液	125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝
甘氨酸洗脱缓冲液	200 mM 甘氨酸 pH2.5

### 免疫沉淀操作方法 (参考)

#### \*注意:

- 实验前应在裂解缓冲液 (辉骏产品货号 **FI8101**) 和漂洗缓冲液中加入足量的蛋白酶抑制剂 (辉骏产品货号 **FI8105**)，RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂 (辉骏产品货号 **FI8106**)，混合均匀，冰上保存，现配现用。
- 为保证磁珠均匀分布，请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
- 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。

### 1. 样本裂解

(1) 按如下方法收集样本:

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	1×10 <sup>7</sup> ~ 2×10 <sup>7</sup> 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨
微生物	50 μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀

(2) 样本加入 300~500 μL 预冷的裂解缓冲液，吹打混匀。

(3) a. 动物细胞：置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀)；为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清。

b. 动物组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀)。

c. 植物、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30 μL 作为 input，剩余用于 IP 实验，-80°C 保存。

\*注意：如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合力较弱，可增加样本量以获得更多蛋白；裂解缓冲液的最小使用体积为 300 μL，其体积可随样本量增加而等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3。

## 2. 免疫共沉淀

- (1) 每组实验取 20~40  $\mu\text{L}$  ChainFree™ Anti-V5 磁珠，加入 200  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (2) 再次加入 200  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 向上步磁珠中加入样本裂解液，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4℃ 过夜，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (4) 加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作两次。

## 3. 洗脱

- (1) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 检测。加入 50  $\mu\text{L}$  2×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃ 加热 5 分钟。放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。
- (2) 甘氨酸洗脱法（非变性洗脱法）：洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续检测（例如 SDS-PAGE、Western-blot、质谱实验、RNA 或 DNA 提取）。加入 40-50  $\mu\text{L}$  甘氨酸洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s；1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80℃ 保存或直接用于后续实验。

## 结果展示

