

产品信息:

品牌	货号	产品名称	规格	保存温度
KEL Biotech	KC1368-001	Anti-mCherry Nanobody Agarose beads	1ml/50T	4℃
KEL Biotech	KC1368-500ul	Anti-mCherry Nanobody Agarose beads	500ul/25T	4℃

产品描述

偶联 anti-mCherry 纳米抗体的琼脂糖珠用于免疫沉淀 mCherry 融合蛋白。

产品优势

- ☞ 没有普通抗体的轻链和重链;
- ☞ 高亲和力: 解离常数达 nM-pM 级别;
- ☞ 高载量: 20 μ l 的 slurry 可以结合 15-20 μ g mCherry 蛋白;
- ☞ 较短的孵育时间, 结合 5-30 min 即可;

应用范围

可用于免疫沉淀 (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)、酶活性测定、质谱分析等;

特异性

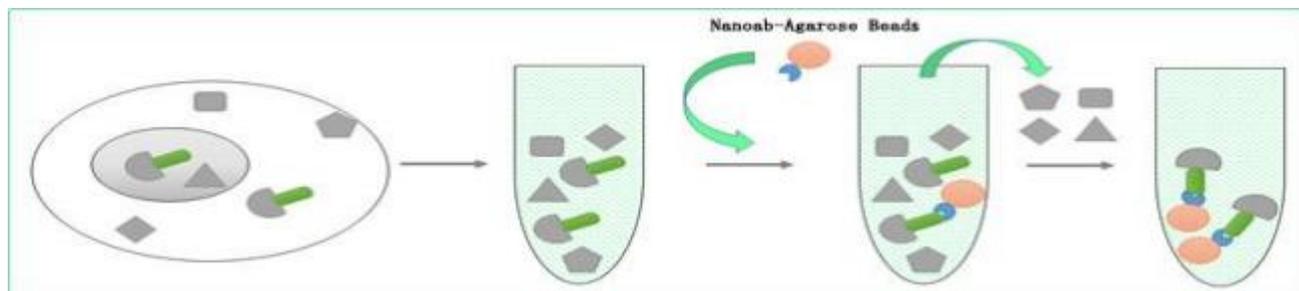
可以结合 mCherry, DsRed 等红色荧光蛋白。

产品特性

存储缓冲液: PBS (含有 20%乙醇)。

保存条件: 可在 4℃ 保存半年, -20 度保存 1 年, 避免高速离心, 干燥和反复冻融。

实验原理



实验步骤:**收集细胞:**

每个免疫沉淀反应大约使用 10^6 - 10^7 的哺乳动物细胞（约一个 10 厘米培养皿）表达 mCherry 融合蛋白。吸出生长培养基、向培养皿中加入 2 毫升预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，利用细胞刮或胰酶消化的方法收集贴壁细胞，细胞转移到离心管，500 g 离心 3-5 分钟并丢弃上清液。

细胞裂解:

1. 用 1.0 mL 预冷的裂解缓冲液重悬细胞，在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂（自备）。对于膜蛋白或核/染色质蛋白，可使用 RIPA 裂解液，或普通 IP 裂解液结合超声破碎细胞的方法。
2. 把离心管放置在冰上 30 分钟，可以每 10 分钟充分吹打一次，或者在 4 度旋转混合仪上裂解。
3. 细胞裂解产物在 4℃，20,000 g 条件下离心 15 分钟，转移裂解产物到一个新的预冷管中，丢弃沉淀。注意：此时细胞裂解产物可以放在-80℃进行长期储存。

平衡珠子:

4. 振荡混匀 Anti-mCherry Nanobody Agarose beads，吸取 20 μ l slurry 到 500 μ l 预冷的裂解缓冲液中，在 4℃，2,500 g 条件下离心 3 分钟，丢弃上清液。（此步骤可选，并建议吸取 20 μ l slurry 时剪掉枪头的前端）

结合蛋白

5. 将细胞裂解产物加入到平衡的 Anti-mCherry Nanobody Agarose beads 中（如果未做第 4 步，可在细胞裂解产物中直接加入 20 μ l slurry），在 4℃冷柜中的旋转混合仪上结合 5-30 min，也可以根据需要延长结合时间。如果需要，保存 50 μ l 的裂解产物作为 input 进行免疫印迹分析。
6. 在 4℃，2,500 g 条件下离心 3 分钟，丢弃上清液。

清洗珠子:

7. 用 1.0 mL 预冷的裂解缓冲液中洗涤 Anti-mCherry Nanobody Agarose beads，在 4℃旋转混合洗涤 5 min，然后在 4℃，2,500 g 条件下离心 3 分钟，丢弃上清液并重复洗涤 2 次。（可选：在第二次洗涤的步骤中增加盐浓度到 500 mM）。

洗脱蛋白:

方法一:

8. 加入 20 μ l 2X SDS-sample buffer 重悬 Anti-mCherry Nanobody Agarose beads。在 95℃条件下加热 10 min，把免疫沉淀复合物从珠子上游离出来，然后在 4℃，2,500 g 条件下离心 3 分钟收集上清，进行免疫印迹分析。

方法二:

9. 替代步骤 8 的可选步骤：加入 50 μ l 0.2 M pH2.5 的甘氨酸洗脱结合的蛋白，建议孵育时间 30 秒，并不断混匀，随后离心，转移上清液到新管中，为了中和酸性的甘氨酸，需添加 5 μ l 1.0 M Tris (pH10.4)。注意：为了提高洗脱效率可以重复这一步。

产品效果: