

Anti-mCherry 纳米抗体磁珠

M1373496

储存温度 在 2-8°C 下储存，避免冻结，有效期 1 年。

产品描述

Anti-mCherry 纳米抗体磁珠偶联了经过严格筛选、优化并重组表达的 RFP 纳米抗体，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 RFP 融合蛋白及其相互作用蛋白。

实验前先将 RFP 蛋白与目标蛋白在细胞或组织中融合表达；之后将 Anti-mCherry 纳米抗体磁珠加入样本裂解液中，RFP 纳米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。

产品特性

1. 磁珠直径：10-30 μ m(磁性琼脂糖珠)。
2. 蛋白结合量： \geq 1.5mg 蛋白/mL 磁珠。
3. 反应性：可特异性结合各种常见类型的 RFP 蛋白(mRFP, mCherry, mRFPruby, mRuby2, tagRFP, mKate2, mPlum, mOrange, PA-mCherry, mScarlet)，对融合蛋白 N 端、C 端的 RFP 标签均可以识别。
4. 应用：免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(Co-IP)、染色质免疫沉淀(CHIP)、RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)。
5. 储存缓冲液：20mM PBS, 5% BSA。

产品优势

1. 纳米抗体，无轻重链污染。IP 复合物无论采用非变性洗脱还是变性洗脱均不会出现抗体的轻、重链污染问题。
2. 亲和力强。低 nM 级别亲和力，轻松应对低拷贝基因，或难转染细胞系。
3. 结合量高。采用定向偶联技术每 10 μ L 抗体磁珠可结合约 15 μ g 重组蛋白。
4. 特异性强。抗体磁珠通过了 10 株以上的空白细胞系检测不易产生非特异吸附。
5. 兼容性好。无论标签在诱饵蛋白的 N 端或 C 端都可识别。
6. 稳定性好。通过了 40°C 高温测试轻松应对物流失温，实验后忘记放冰箱等情况。

使用说明

一、所需主要仪器

磁力架、混匀仪、低温离心机、超声破碎仪。

二、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)
洗脱缓冲液	200 mM 甘氨酸 pH 2.5
2×SDS-PAGE 上样缓冲液	125mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝

三、注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请轻微涡旋或用枪头吹打混匀磁珠。
3. 实验前应在裂解缓冲液和漂洗缓冲液中加入足量的蛋白酶抑制剂，RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂，混合均匀，冰上保存，现配现用。
4. IP 实验前，应先确认样本裂解液(input)中诱饵蛋白的表达水平。
5. 每次 IP 实验应设置阴性对照组，通常采用表达 RFP 标签空载体的样本作为对照。
6. 如果使用建议的缓冲体系不能获得很好的实验结果，可自行筛选、配制缓冲液进行实验。
7. 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。
8. 当融合蛋白的分子量超过 200kD 时，磁珠 IP 效果可能受空间位阻影响而下降，需要测试用量。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
10. 本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

四、操作步骤

1. 样本裂解(参考)

(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 ⁷ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次, 每次 4°C 500g 离心 5min 收集沉淀, 尽量吸干液体
动物组织	100~200mg	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	200~300mg	无菌双蒸水清洗干净, 液氮充分研磨
革兰氏阴性细菌	50μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次, 每次 4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀, 尽量吸干液体

(2) 将样本置于冰上，每组样本加入 500 μL 预冷的裂解缓冲液，吹打混匀。

(3)

- ① 动物细胞: 最好冰上超声至溶液基本澄清; 若无超声条件, 可以置于冰上裂解 30min, 间隔手动混匀。
- ② 动物组织、植物组织、微生物: 冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- ③ 4°C 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中, 取 30 μ L 作为 input, 剩余置于冰上备用或 -80°C 保存。

[注意]:

- 1) 当样本不能完全裂解时(溶液很浑浊), 可以增加裂解缓冲液、改善裂解方法或改善超声条件继续裂解, 超声条件因样本类型和超声设备而异, 应提前摸索好合适的条件。
- 2) 裂解缓冲液用量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, 体积过大可以更换大规格离心管。

2. 免疫共沉淀

- ① 将 Anti-RFP 纳米抗体磁珠上下颠倒混匀, 每组取 20 μ L 磁珠到新的离心管中。
- ② 加入 200 μ L 漂洗缓冲液, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1min 并弃上清。
- ③ 重复上步操作一次。
- ④ 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液, 放混匀仪上 4°C 孵育 3h 至过夜。
- ⑤ 放磁力架上静置 1min 并弃上清。
- ⑥ 加入 500 μ L 漂洗缓冲液, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1min 并弃上清。
- ⑦ 重复上步操作两次, 共漂洗三次。

3. 洗脱

- ① SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱(变性洗脱法): 加入 50 μ L 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 95°C 加热 5~10min。放磁力架上静置 1min 或 5000g 离心 1min, 收集上清至新的离心管中。洗脱后的蛋白-20°C 保存, 或直接用于 SDS-PAGE 和 Western Blot 实验, SDS-PAGE 胶条可以用于质谱检测。
- ② 甘氨酸洗脱(非变性洗脱法): 加入 40~50 μ L 甘氨酸洗脱缓冲液, 涡旋震荡 20s, 放混匀仪上室温洗脱 10~15min, 涡旋震荡 20s; 1000g 离心 20s, 放磁力架上静置 1min, 收集上清至新的离心管中。洗脱后的蛋白-80°C 保存, 或直接用于 SDS-PAGE、Western Blot 和质谱等实验。

[备注: Anti-RFP 纳米抗体磁珠没有抗体轻重链污染问题, 建议首选变性洗脱法, 洗脱效率更高]。