GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose beads

货号：GNA/MNA/RNA/HNA/FNA/BNA/VNA

储存条件：短期使用可 4℃保存，长期-20℃保存，避免反复冻融。

产品描述

偶联 anti-GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5 纳米抗体的琼脂糖珠子用于免疫沉淀 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5 等融合蛋白。

产品优势

没有普通抗体的轻链和重链；

高亲和力：解离常数达到 pM 级别；

高载量：10μl 的 beads 可以结合 8-12μg 蛋白（V5 标签载量为 6-8ug）；

较短的孵育时间，结合 5-30min 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

GFP 款可以结合 GFP、EGFP、YFP 和 EYFP 等；RFP 可结合 mCherry。

产品特性

存储缓冲液：PBS(含有 20%乙醇)。

实验步骤：

植物组织裂解处理：

取适量植物组织样本（叶片等）放置于冷冻液氮中，之后将冷冻后得植物组织样本放于研钵进行研磨，尽可能充分研磨破坏其细胞壁。加入 500-1000ul RIPA 裂解液（需加蛋白酶抑制剂）进行裂解，为了提高裂解效率，可加入 200ul 玻璃粉充分震荡 30min，裂解完成后 12000 rpm，离心 30min，吸取上清置新的离心管中，弃去沉淀。

收集细胞：

每个免疫沉淀反应大约使用 10^6-10^7 个表达融合蛋白的细胞，可根据绿色荧光蛋白融合蛋白表达量适当调整细胞数。吸出培养基，向培养皿中加入预冷的 1×PBS，漂洗 2 次，利用细胞刮或胰酶消化收集贴壁细胞，细胞转移到离心管，500g 离心 3 分钟并丢弃上清液。

动物细胞裂解：

1．在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，用 500μl 预冷的裂解缓冲液重悬细胞。

2．置于冰上 30 分钟，可每 10 分钟充分吹打一次。

3．4℃，20,000g 离心 15 分钟，将裂解产物（上清）转移到一个新的预冷管中，丢弃沉淀。注意：此时细胞裂解产物可长期保存于-80℃。

平衡珠子：

4．振荡充分混匀 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose，吸取 20μl 该产品到 500 μl 预冷的裂解缓冲液中，4℃，2,500g 离心 2 分钟，丢弃上清液。(此步骤可选)

结合蛋白：

5．将平衡好的 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose 加入到细胞裂解产物中（如果未做第 4 步，可在细胞裂解产物中直接加入 20μl 该产品），于 4℃旋转混合结合 5-30min。如果需要，留存 50μl 的裂解产物进行免疫印迹分析。

6．4℃，2,500g 离心 2 分钟，丢弃上清液。如果需要，留存 50μl 上清液进行免疫印迹分析。

清洗珠子：

7．用 500μl 预冷的裂解缓冲液中重悬 6 中的 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose，4℃，2,500g 条件下离心 2 分钟，丢弃上清液并重复洗涤 2 次。

洗脱蛋白：

方法一：

8．加入 20μl 2×SDS-sample buffer 重悬 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose。95℃，加热 10min，2,500g 离心 2 分钟收集上清，收集的产物可进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。

方法二：

9．替代步骤 8 的可选步骤：加入 50μl 0.2 M pH2.5 的甘氨酸洗脱结合的蛋白，孵育时间 30 秒，期间不断混匀，2,500g 离心 2 分钟收集上清，为了中和酸性的甘氨酸，需加入 5μl 1.0 M Tris（pH10.4）。

注意：为了提高洗脱效率可以重复这一步。

可选方案

方案一：

如需进行 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5 融合酶的活性检测，无需洗脱，可以直接检测。

方案二：

如需进行染色质免疫沉淀（ChIP）实验，主要用于含有 GFP 融合蛋白的蛋白质/DNA 相互作用的实验。染色质免疫沉淀一般包括细胞固定，染色质断裂，染色质免疫沉淀，交联反应的逆转，DNA 的纯化以及 DNA 的鉴定。其中前期细胞固定，染色质断裂不变；然后接着直接进入说明书的第 5 步，加入细胞裂解产物后，DNA-蛋白质复合物结合到 GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose 上；

进入第 6 和 7 步，分离得到复合物；进入第 10 步，得到洗脱的复合物；后期交联反应的逆转，DNA 的纯化及 DNA 的鉴定等同于普通的 ChIP 实验。RNA 结合蛋白免疫沉淀（RIP）实验步骤同上。

方案三：

GFP/Myc/RFP/HA/DYKDDDDK/MBP/V5-Nanoab-Agarose 不仅可以用于在体内外检测和验证蛋白质之间的相互作用， 也可以结合质谱分析筛选与已知蛋白相互作用的未知蛋白。其操作步骤同免疫沉淀法，得到洗脱的复合物后，然后进行 SDS–PAGE 分析，用考马斯亮蓝或者银染的方法染色后，切下未知蛋白的条带，用质谱技术鉴定未知蛋白。