

GFP Nanobody Agarose Beads

货号: BN20545

规格: 25 reactions (0.5 ml beads 悬液)

50 reactions (1.0 ml beads 悬液)

产品描述

偶联 anti-GFP 纳米抗体的琼脂糖珠用于免疫沉淀 GFP 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: 20ul 的 beads 悬液可以结合 2-10ug GFP 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

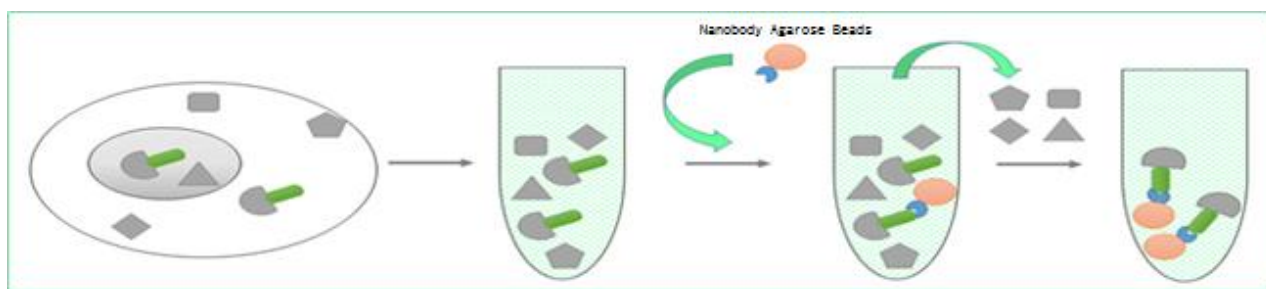
可以结合 GFP、EGFP、YFP 和 EYFP、CFP 和 ECFP 等。

产品特性

存储缓冲液: PBS (含有 20%乙醇)。

保存条件: 可在 4℃ 保存至少 1 个月, 在 -20 度或 -80℃ 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) 表达绿色荧光蛋白融合蛋白。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 500 ul 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 (货号: BN25012) 中加入蛋白酶抑制剂 (货号: BN25002)。
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。
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 GFP-Nanobody-Agarose Beads, 吸取 20ul beads 悬液到 500 ul 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)

结合蛋白

5. 将细胞裂解产物加入到平衡的 GFP-Nanobody-Agarose Beads 中 (如果未做第 4 步, 可在细胞裂解产物中直接加入 20ul beads 悬液), 在 4℃ 冷柜中的旋转混合仪上结合 5-30 min。根据实验需要可延长结合时间以达到更好的结合效果。如果需要, 保存 50 ul 的裂解产物进行免疫印迹分析。
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 500 ul 预冷的裂解缓冲液中洗涤 GFP-Nanobody-Agarose Beads, 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:

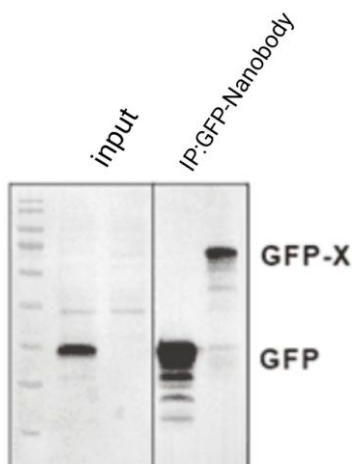
方法一:

8. 加入 20ul 2X SDS-sample buffer 重悬 GFP-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 50ul 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 5ul 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:



本产品仅用于科研