

RFP Nanobody Agarose Beads

货号: BN20547 规格: 25T/50T

产品描述

RFP Nanobody Agarose Beads 是一种共价偶联 RFP 羊驼纳米抗体的琼脂糖珠, 适用于从细菌、酵母、植物或动物细胞的裂解物中高效沉淀或纯化 mCherry, mRFP 等融合蛋白。

产品属性

Beads 大小: 90 μ M (琼脂糖珠)。

储存溶液: PBS 缓冲液(含有 20%乙醇)。

结合能力: 20 μ L 的 slurry 可以结合 10-15 μ g mCherry, mRFP 等融合蛋白。

孵育时间: 5-30 min。

亲和力: 解离常数 nM-pM 级别。

保存条件: 4 $^{\circ}$ C 储存有效期 1 年, -20 $^{\circ}$ C 储存有效期 2 年。

注意事项: 避免高速离心、干燥和反复冻融。

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;

推荐试剂

细胞裂解液: 20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1.0 % NonidetTM P40 Substitute (货号 BN46010)

RIPA 裂解液: 20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1.0% TritonTM X-100, 0.5 %deoxycholate (货号 BN46011)

稀释缓冲液: 20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA (货号 BN46012)

洗涤缓冲液: 20 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % NonidetTM P40 Substitute(货号 BN46013)

甘氨酸洗脱液: 200 mM glycine pH 2.5(货号 BN46014)

中和缓冲液: 1 M Tris pH 10.4(货号 BN46015)

注意:

1. 针对细菌、酵母、植物和昆虫等细胞样本, 请对细胞裂解液进行优化。
2. 涉及免疫共沉淀实验时, 建议采用不含变性剂的洗涤液。
3. 上述缓冲液的 pH 值均是在 4 $^{\circ}$ C 条件下标定。

声明

产品仅限于实验室研究, 请勿用于临床检测治疗。

操作步骤

1. 细胞收集



常规的免疫沉淀反应一次大约使用 10^6 - 10^7 个表达 mCherry, mRFP 融合蛋白的哺乳动物细胞。吸出生长培养基后, 向培养皿中加入 2 mL 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, 转移细胞到离心管, 500 g 离心 3-5 min 并丢弃上清液。

2. 细胞裂解



用 1 mL 预冷的裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 重悬细胞, 转移至 EP 管后放置在冰上 30 min, 每 10 min 充分吹打一次。将获取的细胞裂解产物在 4°C, 20,000 g 条件下离心 15 min, 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°C 进行长期储存。

3. 平衡珠子



振荡混匀 RFP Nanobody Agarose Beads, 吸取 20 μ L slurry 到 0.5 mL 预冷的裂解缓冲液中, 颠倒混匀数次, 3000 rpm 离心 5 min, 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)

4. 结合蛋白



将细胞裂解产物加入到平衡的 RFP Nanobody Agarose Beads 中 (如果未做第 3 步, 可在细胞裂解产物中直接加入 20 μ L slurry), 在 4°C 冷柜中的旋转混合仪上结合 5-30min, 也可以根据需要延长结合时间。如果需要, 保存 50 μ L 的裂解产物进行免疫印迹分析。最后 3000 rpm 离心 5 min 分离琼脂糖珠, 丢弃上清液。

5. 清洗珠子



用 0.5-1.0 mL 预冷的裂解或洗涤缓冲液洗涤 RFP Nanobody Agarose Beads, 然后 3000 rpm 离心 5 min 分离琼脂糖珠, 丢弃上清液。(可选: 在第二次洗涤的步骤中增加盐浓度到 200-500 mM)

6. 洗脱蛋白



方法一:

加入 20-50 μ L 2 \times SDS-sample buffer 重悬 RFP Nanobody Agarose Beads。在 95°C 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°C, 3000 rpm 条件下离心 3 min 收集上清, 进行免疫印迹分析。

方法二:

替代方法一的可选步骤: 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 s, 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。

常见问题及解决方案

常见问题	可能原因和解决方法
是否可以沉淀 tag 融合在 N 端或者 C 端的目的蛋白	可以免疫沉淀或者纯化 tag 融合在 N 端或者 C 端的目的蛋白
高背景	可能是由于洗涤不充分, 可以增加洗涤次数和时间, 比如每次洗涤 5-10 min, 洗涤至少 3 次
	必要的时候, 可以用 1-3%的 BSA 在 4℃对珠子封闭 1-2 hour
	标签抗体特异性差或灵敏度低, 更换高质量的标签抗体
无特异性结合产生或免疫沉淀下来的蛋白偏少	目的蛋白有可能聚集, 变性或降解, 尽量采用新鲜的细胞样品, 且在裂解时加入蛋白酶抑制剂, 并在冰浴或 4℃条件下进行裂解和结合实验
	样品中的目的蛋白的表达量较低, 或者裂解不充分, 针对不同的目的蛋白, 请选择合适的裂解缓冲液
	珠子使用过少或者在实验过程中有所损失, 请在洗涤缓冲液中加入一定量的去垢剂以减少珠子的粘壁性, 并在合适的离心力下收集珠子
	必要的时候, 可以延长结合的时间, 比如 4℃条件下过夜结合, 但需保证目的蛋白不降解
免疫共沉淀不成功	相互作用蛋白与目的蛋白不结合, 或者需要配体的介导等
	蛋白之间的相互作用被破坏, 首先尽量使用新鲜的样品进行实验, 其次选择合适的裂解液和洗涤缓冲液, 比如 RIPA 裂解缓冲液可能破坏或减弱蛋白之间的相互作用, 这时可以尝试温和的去垢剂, 如 Nonidet P-10 和 Triton X-100