

Anti-mCherry 纳米抗体亲和凝胶

Catalog Number: EA-IP-005N

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

性能指标

	mCherry 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀。
应用范围	mCherry 标签可以位于蛋白的N 端，C 端，如N 端mCherry 融合蛋白（mCherry - Protein）、C 端mCherry 融合蛋白（Protein-mCherry）。
抗体属性	Anti-mCherry 纳米抗体。
凝胶属性	琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100~200 μm。
凝胶载量	1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联6mg Anti-mCherry 纳米抗体。
主要成分	1mL 亲和凝胶可沉淀至少 1.2mg mCherry 融合蛋白。 1mL Anti-mCherry 亲和凝胶，保存于 1mL 含防腐剂和50%甘油的PBS 中。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品以凝胶悬液形式提供亲和凝胶，凝胶悬液中亲和凝胶的含量为50%，使用前先温和重悬凝胶悬液，然后按照需求取用。
4. 配套使用的相关试剂，需实验室自备。

使用方法

1. 目标蛋白样品制备

1) 血清及分泌表达目标蛋白样品处理

收集血清或培养基上清，检测目标蛋白浓度。如果目标蛋白质浓度较高，建议用 1×PBS 稀释至蛋白质终浓度为 10~100μg/mL，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 将悬浮细胞或贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
- b. 用预冷至4℃的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。
- c. 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，反复吹打后冰上放置 10~20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

- d. 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4℃离心 10min。取上清，可立即进行下一步实验或置于 -80℃ 冻存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

2. 对照组设置（仅供参考，实验过程中请按实际需要调整）

1) 阴性对照

- a. 抗体的阴性对照：以凝胶偶联 Mouse IgG 亚型标签抗体为例，选择 Mouse IgG 亲和凝胶（货号：EA-IP-100）做为抗体的阴性对照，使用方法与凝胶偶联抗体相同。
- b. 蛋白的阴性对照：使用不表达靶蛋白 X 但表达无关蛋白 Y 的蛋白样品做对照，处理方法与待对照靶蛋白相同。

2) 阳性对照

- a. 以稀释至 10~100μg/mL 未添加磁珠凝胶偶联抗体处理的蛋白样品作为阳性对照，即 Input 组。上样缓冲液制备方法与实验组相同。

3. 免疫（共）沉淀法检测 mCherry 标签蛋白质

- a. 温和重悬 Anti-mCherry 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 40μL 凝胶悬液（约含 20μL 亲和凝胶）至离心管中。加入 5 倍凝胶体积（约 100μL）的 1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。

For Research Use Only

- b. 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的样本溶液，室温摇床孵育 2h 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- c. 加入 10 倍凝胶体积（约 200 μ L）的 1 $\times$ PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。
- d. 加入预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 5 倍凝胶体积（约 100 μ L）的 PBST 预洗液洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。5000rpm 离心 30sec，弃上清。
- e. 加入 20 μ L 1 $\times$ PBS 和 5 μ L 5 $\times$ 上样缓冲液，煮沸 5min，冷却至室温并离心。
- f. 取上清进行 SDS-PAGE 实验，以备后续的 Western Blotting 检测。

背景信息

mCherry，是一种来源于珊瑚（Discosoma）的红色荧光蛋白，由 266 个氨基酸组成。由于其颜色和单体分子的光稳定性，比其它荧光蛋白标签表现更优异。mCherry 常用于真核蛋白质重组表达标记。Anti-mCherry 纳米抗体亲和凝胶，由高品质的 mCherry 纳米抗体与琼脂糖凝胶共价偶联制成，由于纳米抗体仅含有抗体分子的可变区，做免疫（共）沉淀时，不会有抗体的重链带和轻链带的信号干扰。具有高载量，高特异性和性质稳定的特点，可用于 mCherry 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀。

储存方法

-20 $^{\circ}$ C 可保存 12 个月。