Anti-mCherry 纳米抗体免疫磁珠

Catalog Number: EA-IP-005MN

Note: *请勿离心，轻柔混匀后使用。*

性能指标

应用范围	mCherry 标签融合蛋白的免疫沉淀（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）。 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	磁性琼脂糖珠，平均粒径 10~30 μm。
凝胶载量	1 mL Anti-mCherry 免疫磁珠，可沉淀至少 1.5 mg mCherry 融合蛋白。
储存缓冲液	20 mM PBS, 5% BSA。

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. 本产品以悬液形式提供亲和磁珠，使用前通过反复颠倒、轻微涡旋温和混匀磁珠悬液。
4. 请勿使用 PBS 漂洗磁珠，否则会导致磁珠无法被磁力架吸附。
5. 使用前应在裂解液中加入足量蛋白酶抑制剂（PMSF），RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂，混匀后冰上放置，现配现用。
6. 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 0.5~1×10^7 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 免疫磁珠，混合均匀，取 20~30 μL 磁珠悬液至离心管中。加入 200μL 的 1×PBST 轻柔重悬清洗磁珠，磁力架上静置 1 min 后，弃上清，重复上述步骤 2 次。

注：多个样品时，可将磁珠重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。

b. 加入 50-200μL 含有目标蛋白的样本溶液，轻柔重悬磁珠，室温摇床孵育 2h 或者 4℃孵育过夜。

c. 磁力架上静置 1 min 后，将上清液转移到新的离心管中备用（上清液可用于检测 mCherry-tag 蛋白是否存在残留）。加入 500μL 1×PBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复 2 次。

4. 目标蛋白洗脱

1) 变性洗脱法

a. 向磁珠中加入 20μL 1×PBS 和 5μL 5×上样缓冲液，混合均匀，95℃煮样 5min。

b. 磁性分离，收集上清至新的离心管中。-20℃保存或直接用于 SDS-PAGE 和 Western-Blot 实验。

2) 酸性洗脱法

a. 向磁珠中加入 50~100μL 酸性洗脱液，轻柔混匀 20s，室温孵育 10min；

注：酸性环境会缩短免疫磁珠的使用寿命，应尽量缩短磁珠与酸性洗脱液的接触时间，建议不超过 10min。

b. 分离磁珠，收集上清至新的离心管，并立即滴入总体积 1/10 体积的 10×PBST Buffer 中和，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品可用于后期功能分析。

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 纳米抗体免疫磁珠，由高品质的 mCherry 纳米抗体与磁珠共价偶联制成，具有高载量，高特异性，操作迅速便捷，性质稳定，可反复使用的特点，可用于 mCherry 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀、染色质免疫沉淀、RNA 结合蛋白免疫沉淀。

储存方法

4 ℃可保存 12 个月。