Alpaca anti–GFP VHH Agarose Beads

● 产品规格

货号： SB-NM011

规格： 500uL（20 次， 50%nanobody coated agarose beads)

储存条件： 4℃(禁止冻存)

保质期： 24 个月

运输：冰袋运输

● 产品说明

绿色荧光蛋白(GFP)广泛应用于蛋白定位和蛋白动力学分析。在质谱分析、酶活性测定等生化分析手段中，这些 GFP 融合蛋白及其互作因子可以通过 anti-GFP(A)的作用快速高效的分开。 anti-GFP(A)是一种共价欧联羊驼单分子纳米抗体的琼脂糖珠。适用于组织和细胞中 GFP 融合蛋白的免疫共沉淀实验。

● 产品属性

珠子规格： ~40um（7.5%交联琼脂糖珠)

储存缓冲液： 20%乙醇

结合能力：每 10ul 磁珠结合 3-4ug GFP

配体：抗 gfp 单域抗体(vhh、 nanobody)

反应性：与最常见的绿色荧光蛋白及其衍生物结合

● 推荐使用溶液

Buffer	Composition
Lysis buffer（CoIP)	10mM Tris-HCl pH7.5;150mM NaCl;0.5mM EDTA;0.5% NP-40
RIPA buffer	10mM Tris-HCl pH7.5;150mM NaCl;0.5mME DTA;0.1%SDS;1% Triton X-100;1% Deoxycholate
Dilution/Wash buffer	10mM Tris-HCl pH7.5;150mM NaCl;0.5mM EDTA;
2×SDS loading buffer	120mM Tris-HCl pH6.8;20% glycerol;4%SDS,0.04% Bromophenol blue;10% β -mercaptoehanol

● 操作说明

1. 收集细胞：

对于一个免疫共沉淀反应，推荐使用 10^6-10^7 个表达 GFP 融合蛋白的哺乳动物细胞。吸出培养液，加 1ml 预冷 1XPBS 于细胞中并刮下细胞，之后将细胞转入预冷的离心管中，4℃，500G 离心 3 分钟，弃上清液，用预冷 1XPBS 洗两次细胞沉淀物，轻轻重悬细胞。

2. 裂解细胞

1) 对于细胞质蛋白，用 200μL 预冷 Lysis buffer 重悬细胞

注：在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂和 1mM PMSF 。

对于核蛋白可选做：加入 1mg/mL DNase、2.5mM $MgCl_2$、蛋白酶抑制剂 RIPA buffer 和 1mM PMSF

2) 将离心管放在冰上 30 分钟，每隔 10 分钟重悬细胞一次。

3) 4℃、 16000g 离心 10 分钟，将上清液转移到一个新的预冷离心管中，加入 300μL dilution buffer，丢掉沉淀。 如果需要，保存 50uL 裂解液进行进一步分析。

注：此步骤获得的细胞溶解物可置于-80℃下长期保存。

可选做：在稀释液中加入 1mM PMSF 和蛋白酶抑制剂。

3. 平衡 beads：涡旋 anti-GFP(A),吸取 25uL anti-GFP(A) 至预冷 500ul dilution buffer 中， 1200g, 4℃, 离心 2 分钟， 弃上清液，重复 2 次.

4. 结合蛋白

1) 将第 3 步获得的细胞蛋白提取液加入平衡后的 anti-GFP(A)中，如有需要，可取 50ul 上清液用于免疫印迹分析。在 4℃环境中上下颠倒孵育 1 小时。

2) 1200g, 4℃, 离心 2 分钟， 弃上清液。

5. 洗涤

洗 anti-GFP(A):重悬 GFP beads 于 500ul 预冷的溶解液中， 1200g, 4℃, 离心 2 分钟，弃上清液，重复 2 次。

可选做：在第二次清洗中将盐浓度提高到 500mM.

6. 洗脱结合蛋白

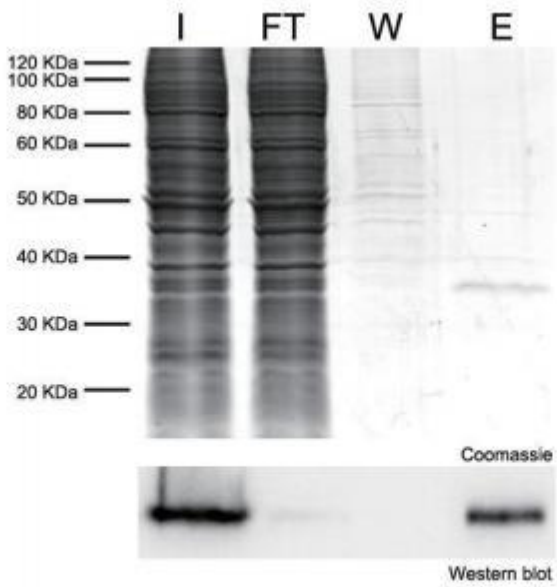
1) 100ul SDS loading buffer 重悬 anti-GFP(A)。

2) 将 anti-GFP(A)在 95°C 中加热 10 分钟，使免疫复合物分离出来。 1200g, 4℃, 离心 2 分钟，取上清跑 SDS-PAGE。

3) 可替代步骤 1)和 2)：加 50ul 0.2M,PH2.5 的甘氨酸重悬 anti-GFP(A)，保持混匀状态孵育 30S， 1200g, 4℃, 离心 2 分钟。将上清转移至新的离心管中，加入 5ul 1M PH10.4 的 Tris base 中和甘氨酸。可重复此步骤以增加洗脱效率。

● 实验结果示例

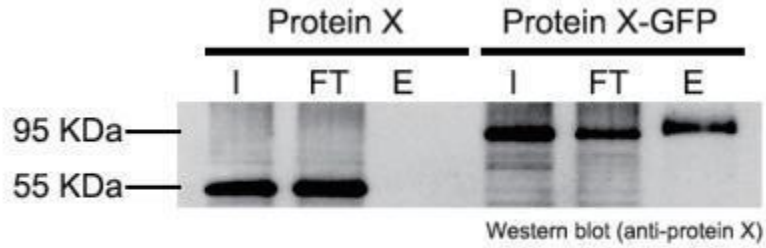
1.细胞中 GFP 蛋白的免疫沉淀实验结果：



Immunoprecipitations of GFP:

Total extract from 293T cells expressing GFP. Input (I), Flow though (FT) fraction, wash (W) fraction and Elution (E) fraction

2.组织中 GFP 融合蛋白的免疫沉淀实验结果：



Immunoprecipitations of GFP fusion protein from *Drosophila* extract containing protein X or protein X-GFP fusion. Input (I), flow though (FT) fraction and elution (E) fraction

T

声明：本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。