

Anti-GFP 标签-Sc 亲和凝胶

Cat#: IP0057S

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

GFP, 绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein), 来源于维多利亚多管发光水母, 由约 238 个氨基酸组成, 从蓝光到紫外线都能使其激发出绿色荧光。GFP 常用于真核蛋白质重组表达标记。Anti-GFP 标签-Sc 亲和凝胶, 由高品质的 GFP 纳米抗体与琼脂糖胶共价偶联制成。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。该产品同时还具有高载量(至少为 1.2mg protein/ml 凝胶), 高特异性, 性质稳定, 可反复使用的特点, 可用于 GFP 标签融合蛋白的亲亲和纯化及免疫(共)沉淀。

二. 性能指标

- 应用范围:** 可用于 N 端 GFP 融合蛋白 (GFP-Protein) 和 C 端 GFP 融合蛋白 (Protein-GFP) 的免疫(共)沉淀。
- 抗体属性:** Anti-GFP 纳米抗体。
- 载量:** 1ml 琼脂糖颗粒, 共价偶联 6mg Anti-GFP 纳米抗体。
- 成分:** 2ml PBS 中含有 1ml 共价偶联 Anti-GFP 纳米抗体的琼脂糖凝胶。
- 保存方法:** 本产品含有 50%甘油、0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年。

三. 用前必读

1. 以下试剂及设备, 需要客户自备, 试剂推荐配方见说明书附件 1, 推荐蛋白质制备方案见附件 2。

离心机, 1.5mL 离心管若干, 重力纯化柱 (大量纯化需要)
细胞裂解液, PBS, PBST, 2x 蛋白上样缓冲液。

2. 注意事项 (开箱前必读)

- 1) 本产品在含有 50%甘油、0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年, 冷藏条件下运输。
- 2) 勿干燥凝胶, 勿使用超声处理凝胶, 勿使酸处理凝胶时间超过 10min。
- 3) 以下使用方法中的凝胶用量, 均为少量制备的示范用量, 具体用量请根据实际情况调整。

四. 使用方法

免疫(共)沉淀法检测 GFP 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-GFP 亲和凝胶至均一, 转移 20 μ L 混合液(约含 10 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 100 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4°C孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用(上清液可用于检测 GFP-tag 蛋白是否存在残留)。
- 4) 清洗凝胶, 加入 10 倍凝胶 PBST, 用上述离心法清洗凝胶三次。离心, 弃上清。

- 加入 2x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。

附件 1. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐, 客户应根据具体情况进行调整。

细胞裂解液:	150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂, 使用说明见附件 2)
酸性预洗液:	0.15M PBS buffer, pH5.0
10xPBS (pH7.5) :	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 2.8g, NaCl 89g 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
1xPBST	1xPBS, 0.1% Tween-20, pH7.5
2x 上样缓冲液	125mM Tris HCl, pH6.8, with 4% SDS, 20%glycerol and 0.004% bromphenol blue

附件 2. 细胞裂解液制备

- 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中, 1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来, 放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 预冷的 1xPBS 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复一次。
- 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液, (例如: T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%, 一般约 $0.5-1 \times 10^7$ 细胞, 需要加入 1mL 细胞裂解液)。反复吹打后冰上放置 10-20min, 让细胞充分裂解。
- 用超声破碎仪将细胞裂解液超声, 直至细胞裂解液透明, 不再粘稠。冰上放置 30min 之后, 12000rpm, 4°C 离心 10min。取上清, -80°C 冷冻保存。