

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

RFP Tag 琼脂糖凝胶

RFP Tag Agarose

产品描述

红色荧光蛋白 (Red Fluorescent Protein, RFP) 是一种从海葵中提取的分子标记, 广泛应用于蛋白质定位、报告基因表达以及蛋白质间相互作用的研究。

TargetMol 的 RFP Tag 琼脂糖凝胶是一种与抗 RFP 抗体偶联的琼脂糖介质, 适用于天然 RFP、RFP 突变体及其融合蛋白的免疫沉淀、免疫共沉淀和亲和层析等实验。

产品特点

- 使用的抗体与 RFP 具有极高的亲和力, 能够高效捕获裂解上清中的 RFP 标签蛋白。
- 免疫沉淀后, 通过 SDS-PAGE 检测, 背景信号更干净, 更利于鉴定蛋白相互作用。
- 琼脂糖基质具有低非特异性吸附和良好的兼容性, 每毫升的载量超过 1 mg, 适合进行 RFP 融合蛋白的大规模纯化。

产品信息

RFP Tag 琼脂糖凝胶	特性
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
粒径	45-165 μm
配体	Anti-RFP Antibody
载量	>1 mg RFP 标签蛋白/mL 介质
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
试剂耐受	Stable up to 80°C, 1 mM DTT, 3 M Guanidinium•HCl, 8 M Urea, 2 M NaCl, 2% Nonidet P40 Substitute, 1% SDS, 1% Triton X-100
保存溶液	1×PBS, 0.02% NaN ₃

产品应用

- 适用于天然 RFP、RFP 突变体及其融合蛋白的免疫沉淀、免疫共沉淀和亲和层析等实验。

操作说明

1. 缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分, 使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤:

- 1) 平衡/洗杂液: 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.4
- 2) 酸性洗脱液: 0.1 M glycine HCl, pH3.0
- 3) 中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.0
- 4) 保存溶液: 1×PBS, 0.02% NaN₃

2. 柱层析

- 1) 将 RFP Tag 琼脂糖凝胶装入适当的层析柱, 使用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡, 以确保填料处于与目标蛋白相同的缓冲条件下。
- 2) 将样品加入到已经平衡好的琼脂糖凝胶中, 并收集流出液。可以多次上样以提高结合效率。

- 3) 用 10-20 倍柱体积的洗涤液清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，并收集洗涤液。
- 4) 进行酸性洗脱，使用 5 倍柱体积的酸性洗脱液进行洗脱，随后在洗脱组分中添加洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 至 7.0-8.0，并分管收集。

注：酸性洗脱后，填料需立即用平衡液平衡，琼脂糖凝胶在洗脱液中的停留时间不应超过 20 min。

- 5) 使用 3 倍柱体积的洗脱液进行清洗，然后用平衡液调整至中性。
- 6) 用 3 倍柱体积的保存溶液进行平衡，保存于 2-8°C。

3. 静态吸附

- 1) 将适量的 RFP Tag 琼脂糖凝胶加入层析柱中，流干保护液。随后用 5 倍柱体积的平衡液进行清洗。
- 2) 将样品溶液加入填料中，在 4°C 或室温下震荡孵育至少 30 min（避免使用磁力搅拌），以确保填料与样品溶液充分混合。
- 3) 孵育结束后，进行离心（5000×g，1 min）或过滤，以收集填料。
- 4) 将收集到的填料装入层析柱中，用平衡液清洗，直到紫外检测稳定。
- 5) 使用酸性洗脱液进行洗脱。
- 6) 参照 2 中的第 5) 和第 6) 步骤进行填料的再生和保存。

4. 免疫沉淀

- 1) 取 40 μL 的 RFP Tag 琼脂糖凝胶（柱体积 20 μL）混合液，加入到 1.5 mL 的离心管中，5000×g 离心 1 min，吸去上清液。
- 2) 向填料中加入 0.5 mL 的平衡液，轻轻悬浮填料（以确保填料处于与目标蛋白相同的缓冲体系中，保护蛋白），5000×g 离心 1 min，吸去上清液。此步骤重复一次。
- 3) 将 200-1000 μL 的样品加入处理好的填料中，混合均匀。将离心管置于翻转混合仪中轻轻翻转，确保样品与填料充分接触和吸附，室温孵育至少 1 h（对于易降解的蛋白，建议添加蛋白酶抑制剂，如 C0001，并在 2-8°C 的层析柜中操作，也可以在冷库中进行）。5000×g 离心 1 min，吸去上清液，注意不要吸走填料。
- 4) 洗杂：向填料中加入 0.5 mL 的洗杂液，悬浮填料并轻轻混匀。5000×g 离心 1 min，吸去上清液。此步骤重复三次，以确保去除非特异性吸附。
- 5) 样品洗脱：根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。
 - a) 酸性洗脱：加入 100 μL 的洗脱液，悬浮填料，室温孵育 5 min。5000×g 离心 1 min，吸去上清液，避免吸到填料，随后用中和液中和。洗脱样品放置在 4°C，长时间可储存于 -20°C。
 - b) 变性洗脱：每管中加入 20 μL 的 SDS-PAGE Loading Buffer（自备），95°C 加热 5 min。5000×g 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。

注：变性洗脱后的琼脂糖凝胶不能重复使用。

保存条件

4°C，2 年。

注意事项

1. 凝胶应保存在储存溶液中，防止干燥。
2. 在从保存管中取出琼脂糖凝胶之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
3. 并非所有的 RFP 蛋白都能与 RFP Tag 琼脂糖凝胶结合。本产品已验证能够结合 Tag-RFP、turbo-RFP、DsRed、mRFP、mCherry、mOrange、mPlum、mRuby、mKate2 和 mRFPpruby。
4. 纯化前建议通过 Western Blot 检测 RFP 标签融合蛋白表达情况。
5. DTT 可能导致 RFP 抗体在凝胶上脱落，因此请避免使用含有 DTT 的细胞裂解液样品。
6. 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，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

