



## 红色荧光蛋白抓取试剂盒

RFP/mCherry-Arrest Kit

Catalog # Ab-RA-027

## 使用说明书



[www.affinibody.com](http://www.affinibody.com)  
Swiss Affinibody LifeScience

---

Version 2.2 V

# 目录 Contents

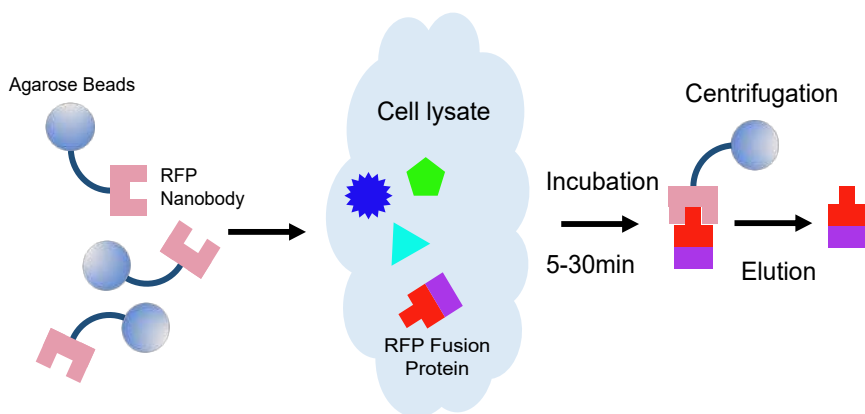


Illustration of Affinibody RFP/mCherry-Arrest Kit

01 产品概述	02
02 产品组分	02
03 储存条件	02
04 适用范围	03
05 组分说明	03
05-1 Buffer组分	03
05-2 琼脂糖小球	03
06 实验步骤	04
06-1 细胞收集	04
06-2 细胞裂解	04
06-3 平衡Beads	04
06-4 孵育	04
06-5 洗涤	04
06-6 洗脱	05
07 常见问题	05
07-1 目的蛋白洗脱量低	05
07-2 多个蛋白条带	06

## 01 产品概述

红色荧光蛋白捕获试剂盒 (RFP/mCherry-Arrest Kit)包含RFP纳米抗体琼脂糖球，可以从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等生物的细胞提取物中免疫沉淀RFP/mCherry-融合蛋白。纳米抗体亲和力极高，Kd在皮摩尔范围( $8.9 \pm 1.7 \cdot 10^{-10} \text{M}$ )，能够快速识别并结合RFP/mCherry-融合蛋白，5-30 min即可完成孵育；形成的复合物稳定性极高，能够耐受多种极限缓冲体系(如下表)；且仅含有抗体分子的可变区(VHH)，相比于传统抗体，不会出现重链带和轻链带的信号干扰。

缓冲液成分	最大浓度
DTT	1 mM
NaCl	2 M
Nonidet™ P40 Substitute	不超过2%
Urea	8M
SDS	1%
Triton X-100	不超过1%
Guanidine HCl	3M

## 02 产品组分

组分	货号	规格
RFP Nanobody Beads	Ab-RA-027.01	500 $\mu\text{L}$
BSA Control Beads	Ab-RA-027.02	500 $\mu\text{L}$
Co-IP Lysis Buffer	Ab-RA-027.03	25 ml
RIPA Buffer (IP)	Ab-RA-027.04	25 ml
5x Wash/Dilution Buffer	Ab-RA-027.05	2 $\times$ 10 mL
Elution Buffer	Ab-RA-027.06	3 mL

- a. 若使用的是其他细胞，比如酵母，植物，果蝇等，建议配制相应的细胞裂解液；
- b. 5 $\times$ Wash/Dilution Buffer使用前需加入40 mL ddH<sub>2</sub>O进行稀释。

### 03 储存条件

4°C 保存，避免冷冻。运输温度：≤0 °C。有效期一年。

### 04 适用范围


本试剂盒适用于免疫（共）沉淀（IP/Co-IP），质谱（Mass spectrometry，MS），染色质免疫沉淀（Chromatin Immunoprecipitation, CHIP）、以及酶活性检测等。

### 05 组分说明

#### 05-1 缓冲液组分

Buffer	组分
Co-IP Lysis Buffer	50 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.02% Na-Azide
RIPA Buffer (IP)	50 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.5 mM EDTA; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 1% Deoxycholate, 150 mM NaCl, 0.02% Na-Azide;
5x Wash/Dilution Buffer	250 mM Tris/HCl pH 7.4; 2.5 mM EDTA, 0.02% Na-Azide, 750 mM NaCl
Elution Buffer	150 mM Glycine 150 mM NaCl pH 2.2

a. 配制缓冲液时，请在4°C下调整pH；

 b. 使用前，建议在Lysis Buffer中加入蛋白酶抑制剂和PMSF (1 mM)；在RIPA Buffer中加入DNaseI (75-150 Kunitz U/mL), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), 蛋白酶抑制剂和PMSF (1 mM)；在1× Wash/Dilution Buffer中加入蛋白酶抑制剂和PMSF (1 mM)；

#### 05-2 琼脂糖小球

- ① 直径：60-100 μm；
- ② 配体：抗RFP 的纳米抗体 (VHH)；
- ③ 储存缓冲液：20%乙醇；
- ④ 结合能力：每10 μL的琼脂糖珠悬液结合18 μg以上的GFP融合蛋白；
- ⑤ 特异性：与常见的RFP及其衍生物特异性结合。

 a. 试剂盒提供的血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)-琼脂糖小球作为阴性对照。

## 06 实验步骤

### 06-1 细胞收集

对于一次免疫沉淀反应，推荐使用约  $10^6$ - $10^7$  个表达RFP 融合蛋白的哺乳动物细胞，按照以下步骤进行收集：

- ① 吸出培养液，加入1 mL预冷的1×PBS (Phosphate-buffered Saline)，混匀后转入预冷的离心管中，4°C，1200 g离心3 min；
- ② 去掉上清，再加入1 mL预冷的1×PBS重悬细胞，4°C，1200 g离心3 min；
- ③ 重复步骤①和②两次后，去掉PBS，细胞收集完毕。

### 06-2 细胞裂解

- ① 选择合适的裂解液：

细胞质蛋白：200  $\mu$ L 预冷的Lysis Buffer 重悬细胞；

核/染色质蛋白：200  $\mu$ L 预冷的RIPA Buffer 重悬细胞；

- ② 将离心管置于冰上30 min，每隔10 min混匀一次；
- ③ 4°C，17,000x g 离心10 min，将上清转移到新的预冷离心管中，加入300  $\mu$ L 1x Wash/Dilution Buffer；

 a. 可根据需要保存50  $\mu$ L稀释的裂解物，进一步分析。

### 06-3 平衡Beads

- ① 使用前，用移液枪轻轻吹打Beads进行重悬，不要涡旋；
- ② 取25  $\mu$ L RFP纳米抗体-琼脂糖小球于1.5 mL离心管中；
- ③ 加入500  $\mu$ L预冷的Wash/Dilution Buffer，涡旋混匀；
- ④ 4°C，2500x g 离心5 min，弃掉上清；
- ⑤ 用同样的步骤平衡BSA-琼脂糖小球。

### 06-4 孵育

- ① 将06-2得到的裂解液加入06-3平衡的Beads中；
- ② 4°C，上下颠倒孵育5-30 min。

### 06-5 洗涤

- ① 4°C, 2500x g离心5 min, 去掉上清;
- ② 加入500  $\mu$ L预冷的1x Wash/Dilution Buffer, 用移液枪轻轻吹打并重悬Beads;
- ③ 4°C, 2500x g离心5 min, 去掉上清;
- ④ 重复洗涤步骤②③至少两次, 然后将Beads转移到新的预冷离心管中。

## 06-6 洗脱

酸性条件洗脱:

- ① 加入50  $\mu$ L 250 mM Glycine 150 mM NaCl pH2.5的洗脱液重悬Beads, 保持混匀状态孵育约5 min;
- ② 4°C, 2500x g离心5 min, 将上清液转移至新的离心管中;
- ③ 加入25-35  $\mu$ L 1 M pH10.4 的Tris中和洗脱产物;
- ④ 可重复上述步骤一次以提高洗脱效率。

直接洗脱:

- ① 加入80  $\mu$ L 2 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液重悬Beads;
- ② 在95°C水浴中加热5 min, 分离免疫沉淀复合物和Beads;
- ③ 4°C, 2500x g离心2 min;
- ④ 取上清进行SDS-PAGE或者Western Blot。

## 07 常见问题


### 07-1 目的蛋白洗脱量低

- ① 蛋白未完全洗脱, 建议更改洗脱方式;
- ② 通过Western Blot或斑点杂交, 检测目的蛋白的表达情况;
- ③ 加大样品使用量或者优化蛋白表达条件, 提高表达量;
- ④ 延长孵育时间;
- ⑤ 避免裂解产物中含有可能破坏抗体功能的物质, 如高浓度 DTT、2-巯基乙醇或其他还原剂。

### 07-2 多个蛋白条带

- ① 洗涤不充分, 建议延长洗涤时间; 增加洗涤次数;
- ② 在裂解液中添加蛋白酶抑制剂, 避免蛋白质的降解;

③ 目的蛋白在室温条件不稳定，建议在低温条件下进行实验，比如 4°C。

-  a. 为了获得更好的实验结果，在实验前，所有的步骤均需要根据实际情况进行优化。比如根据细胞系的不同，选择最合适的细胞裂解条件；
- b. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- c. 本产品仅作科研用途，不用于诊断或治疗。



**Swiss Affinibody LifeScience AG**

网址: [www.affinibody.com](http://www.affinibody.com)

邮箱: [info@affinibody.com](mailto:info@affinibody.com)

电话: +41(0)763290285 +86 15902760422

