

Anti-RFP HRP-DirectT

Code No.	Quantity	Form
PM005-7	100 μ L	Rabbit Polyclonal

HRP-DirectT シリーズ

HRP-DirectT シリーズは 1 次抗体に HRP を直接標識した製品です。

HRP-DirectT シリーズの抗体は 2 次抗体を必要としないため、次の長所を持っています。

- ① アッセイ時間が半分になる。
2 次抗体の反応時間が節約できます。抗体の反応時間は振とう法ならわずか 30 分です。忙しい研究者に最適です。
- ② 2 次抗体由来の非特異反応がなくなる。
免疫沈降の後のウェスタンブロッティングでは、免疫沈降に用いた抗体に 2 次抗体が反応して目的のバンド以外のバンドが検出されてしまいます。2 次抗体を必要としない HRP-DirectT では、目的のバンドだけが検出されます。綺麗なデータが必要な研究者に最適です。

1 次抗体に直接標識をした製品はこのような長所を持っていますが、2 次抗体を使用する場合のように 2 次抗体によるシグナルの増幅が期待できないため、従来の標識方法では①シグナルが不足する。②シグナルを強くしようとするとバックグラウンドが高くなる。という問題がありました。MBL は標識方法を改良することでこの問題を解決しました。MBL の定評のある Tag 抗体に、すぐれた標識法で標識したのが HRP-DirectT シリーズです。

検出抗原

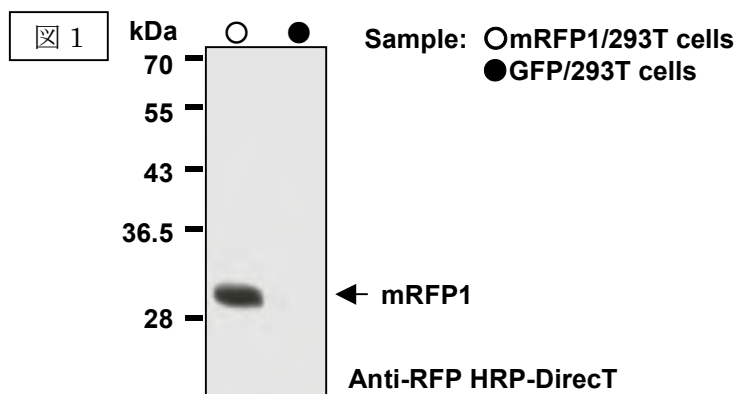
RFP (Red Fluorescent Protein) とそのバリエーションを検出します。

* 標識に用いた抗体は下記の RFP バリエーションとウェスタンブロッティングで反応することが確認されています。

DsRed, mRFP1, mCherry, mOrange, mPlum, mStrawberry, TdTomato

GFP とは反応しません。GFP と RFP を識別できます。

WB による、GFP, RFP 特異性の確認



性状

PBS/保存剤/安定剤

保存

4 °C

出荷日から1年間安定

注意

本品は研究用試薬です。直接ヒトに用いないで下さい。

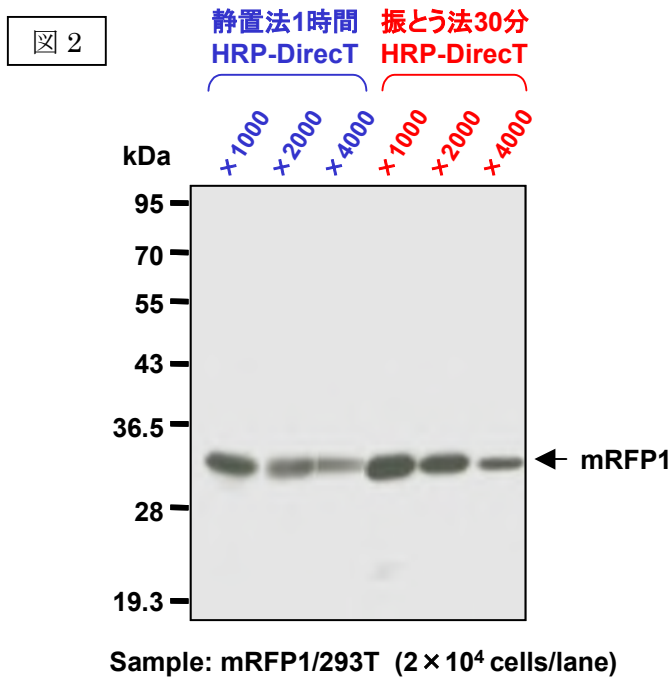
アプリケーション

- ・ウエスタンブロッティング

プロトコル	反応時間	希釈倍数	検出
静置法	1時間	1,000~4,000	化学発光
振とう法	30分	1,000~4,000	化学発光

* 静置法と振とう法の詳細については、プロトコルの項を参照してください。

静置法と振とう法の比較



- ・組織染色、細胞染色：未検討

免疫沈降（綺麗なデータを出すために）

IP Western の非特異反応の原因は2つあります。

原因1：免疫沈降に用いた抗体と2次抗体との反応

解決法：免疫沈降後の WB を間接法で行うと2次抗体が免疫沈降に用いた抗体を検出してしまいます（図3; lane 1）。1次抗体に HRP を直接標識した MBL の HRP-Direct シリーズを使えばこの非特異反応は起こりません（図3; lane2*,3,4）。*lane2 の非特異バンドは protein A/G に因るものです。詳しくは下記原因2を参照してください。

原因2：ProteinA/G と1次抗体、2次抗体との反応

意外と見落とされるのがこの非特異反応です。

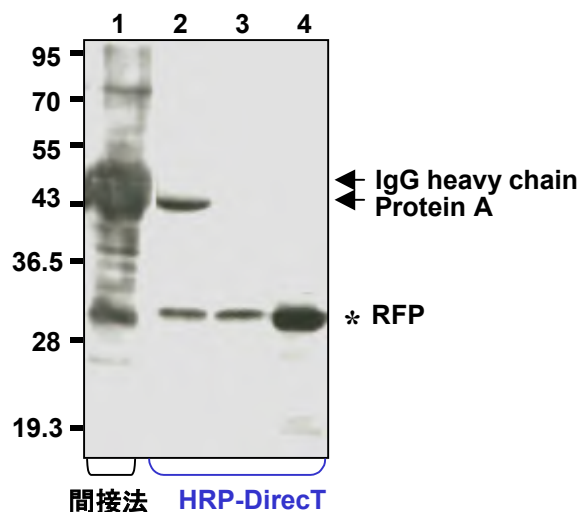
免疫沈降に protein A/G を用いた場合、Laemmli's sample buffer でボイルした時に、protein A/G が担体から外れてしまいます。そこに1次抗体や2次抗体が反応します。（図3; lane2）

解決法1：Clear Back for IP Western 試薬（MBL; Code no. MTG-002）を希釈後の HRP-Direct シリーズ標識抗体液に1：100の割合で添加して下さい。Western Blotting のメンブレンに転写された protein A/G と HRP-Direct 標識抗体との反応がブロックされて非特異反応が出ません。（図3; lane 3）

解決法2：免疫沈降に Anti-RFP-Agarose (Code no: M165-8)をお使い下さい。より簡単に綺麗なデータが取得できます。（図3; lane4）

図3

IP Antibody
1: anti-RFP (code no. PM005) + Protein A
2: anti-RFP (code no. PM005) + Protein A
3: anti-RFP (code no. PM005) + Protein A + Clear Back for IP Western
4: anti-RFP-Agarose (code no. M165-8)



ウェスタンブロットティング プロトコル

1. SDS-PAGE

一般的な方法を用いて SDS-PAGE を行います。

2. ブロットティング

一般的な方法を用いてブロットティングを行います。

3. ブロッキング

ブロットティング後のメンブレンを 5% スキムミルク/PBS (又は TBS) に浸して室温で 1 時間振とうします。(4°C で一晩静置でもよい)

4. 抗体反応

抗体使用量が節約できる静置法と、抗体反応時間が短縮できる振とう法があります。

① 静置法 (抗体量が節約できます)。

平らな平面にラップを敷き、その上にブロッキング済みメンブレンをブロット面が上になるように置きます。

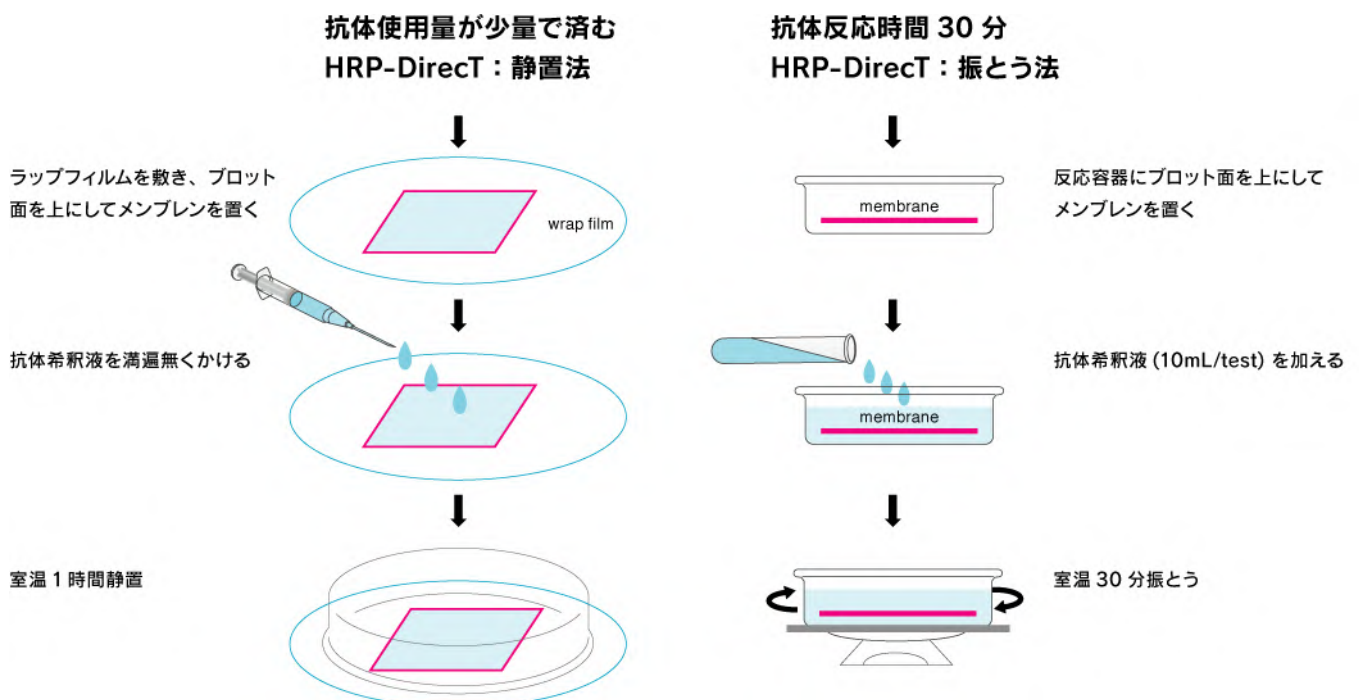
抗体を 1% スキムミルク/PBS (又は TBS) で希釈して全体を覆うようにかけます。抗体希釈液の必要量の目安は 30 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ メンブレンです。抗体の希釈倍数はアプリケーションの欄を参考にしてください。

抗体希釈液が乾燥しないよう、プラスチックケースなどを被せ、1 時間室温で静置します。

② 振とう法 (抗体の反応時間を短縮できます)

清潔な容器に 1% スキムミルク/PBS (又は TBS) で希釈した抗体を入れ、メンブレンを浸します。抗体希釈液の必要量の目安は 10 mL です。抗体の希釈倍数はアプリケーションの欄を参考にしてください。

30 分間室温で振とうします。



5. 洗浄

メンブレンを PBS（又は TBS）/0.05% Tween-20 に浸して振とうして洗浄します。（5 分間× 3 回）

6. 検出

化学発光の検出試薬を用いて検出して下さい。

Anti-RFP HRP-DirectT

Code No.	Quantity	Antibody type
PM005-7	100 μ L	Rabbit Polyclonal

HRP-DirectT Series

HRP-DirectT is a series of HRP conjugated primary antibodies developed by MBL.

HRP-DirectT Series products don't need secondary antibodies. That brings the following advantages:

- ① Total incubation time is cut in half.

The reaction with the secondary antibody becomes unnecessary. In the shaking method, reaction time is only 30 minutes. Spend your evening doing more important things.

- ② Clear result

No more heavy and light chain bands in Immunoprecipitation. The HRP conjugated primary antibody will not detect your precipitating antibody. Clear result helps your research.

Usually, the secondary antibody amplifies the signal of an unconjugated primary antibody. Therefore, it is thought to be difficult to obtain a strong signal with a directly conjugated antibody. To overcome this hurdle, MBL has improved the HRP conjugation method. MBL's HRP-DirectT Series yield strong signal with minimum background. Give it a try - the HRP-DirectT Series will not disappoint you.

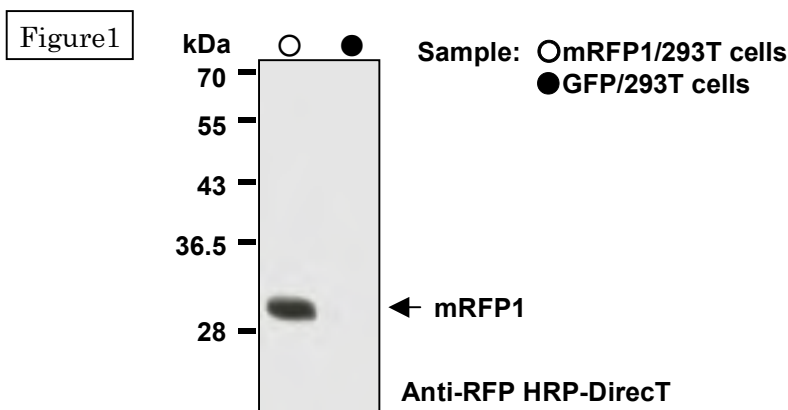
DETECTED ANTIGEN

RFP (Red Fluorescent Protein) , RFP Variants.

*Our RFP polyclonal antibody has been confirmed to react with the following RFP Variants.

DsRed, mRFP1, mCherry, mOrange, mPlum, mStrawberry, TdTomato

This antibody does not react with GFP (Green Fluorescent Protein), which distinguish RFP from GFP.



REAGENT

PBS/Preservative/Stabilizer

STORAGE

This antibody is stable for one year from the date of purchase when stored at 4°C.

INTENDED USE:

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

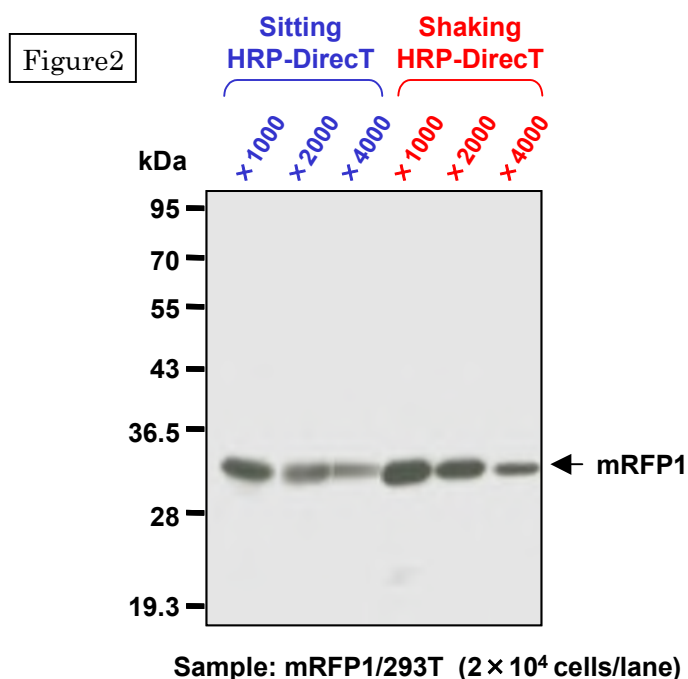
APPLICATION

Western blotting

Method	Reaction times	Dilution	Detaction
Sitting	1hour	1,000~4,000	chemiluminescence
Shaking	30minutes	1,000~4,000	chemiluminescence

* Detailed procedure is provided in the following protocols.

Comparison of Sitting method and Shaking method



Immunocytochemistry; Not tested

Immunohistochemistry; Not tested

Immunoprecipitation (for clear results)

There are two causes of non-specific bands at Western blotting that follows Immunoprecipitation.

Cause1: Reaction of the secondary antibody with the antibody used at IP. (Fig.3; lane 1)

Solution

MBL HRP-Direct series (HRP conjugated primary antibodies products series) does not detect the precipitating antibody (Fig. 3; lanes 2*, 3, and 4). *The nonspecific band in lane 2 represents protein A/G. Please refer to **Cause 2**.

Cause 2: Reaction of protein A/G with the primary and secondary antibodies used at WB. (Fig.3; lane 2)

Boiling the Immunoprecipitated sample with Laemmli's sample buffer; this causes dissociation of protein A/G from its carrier. Therefore, the primary and secondary antibodies bind to protein A/G at western blotting.

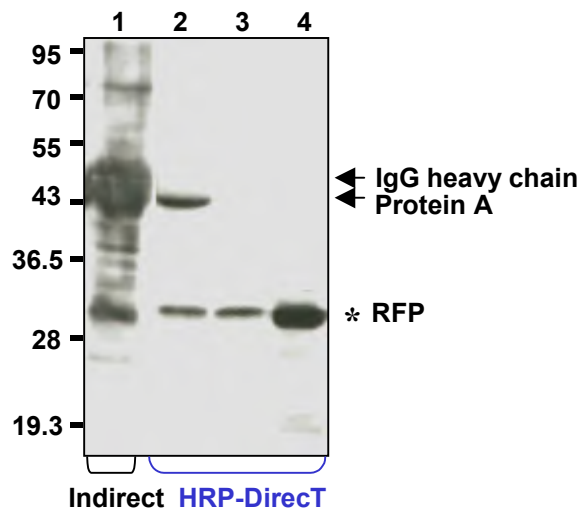
Solution

- ① Add Clear Back for IP Western (MBL; code no. MTG-002) in 1:100 ratio to the diluted HRP-Direct. (Fig.3; lane 3)
- ② Use an Agarose-conjugated antibody for Immunoprecipitation. (Fig.3; lane 4)

Figure3

IP Antibody

- 1: anti-RFP (code no. PM005) + Protein A
- 2: anti-RFP (code no. PM005) + Protein A
- 3: anti-RFP (code no. PM005) + Protein A + Clear Back for IP Western
- 4: anti-RFP-Agarose (code no. M165-8)



PROTOCOL

Western Blotting

1. SDS-PAGE and Western Blotting

Perform SDS-PAGE electrophoresis on the protein samples and transfer the protein to a PVDF membrane according to standard techniques.

2. Blocking

Block the membrane with 5% skimmed milk in PBS (or TBS). Incubate for 1 hour with shaking at room temperature or over night at 4°C.

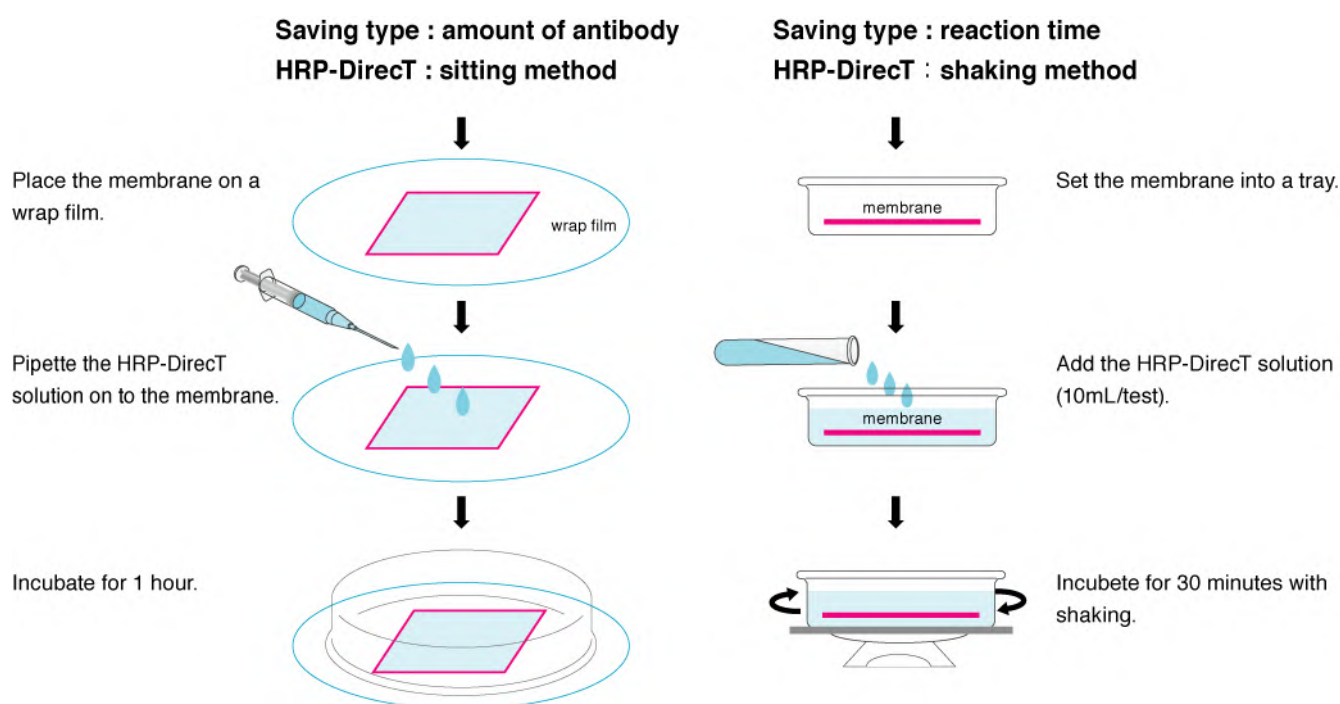
3. Incubate the membrane with HRP-Direct antibody as follows:

① Sitting Method (Saving type: amount of antibody)

Dilute the HRP-Direct antibody with 1% skimmed milk in PBS (or TBS). Use at least 30 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ membrane. Antibody dilution ratio is suggested in the APPLICATION. Drain the excess blocking buffer from the membranes and place them, protein side up, on a wrap film or other suitable clean surface. Pipette the HRP-Direct solution on to the membrane. Cover the membrane with plastic case to avoid drying. Incubate for 1 hour at room temperature.

② Shaking Method (Saving type: reaction time)

Dilute the HRP-Direct antibody with 1% skimmed milk in PBS (or TBS). Use at least 10mL. Antibody dilution ratio is suggested in the APPLICATION. Transfer membrane to a tray containing HRP-Direct antibody. Incubate for 30 minutes with shaking at room temperature.



4. Washing

Wash the membrane in PBS (or TBS) with 0.05% Tween-20 three times for 5 minutes each.

5. Detection

Detect with a chemiluminescence substrate according to the manufacturer's instructions.

250901-2