

# Anti-DYKDDDDK (Flag) IP/Co-IP Kit

## Flag 标签蛋白免疫(共)沉淀试剂盒

### 产品简介

Anti-DYKDDDDK (Flag) IP/Co-IP kit (Flag 标签蛋白免疫 (共) 沉淀试剂盒)是一种通过高质量的 Anti-Flag 免疫磁珠, 进行 Flag 标签融合蛋白免疫沉淀或免疫共沉淀的试剂盒。本试剂盒包含高质量的 Anti-Flag 免疫磁珠及经过优化验证的免疫沉淀必要试剂, 每个反应使用 25  $\mu$ L 磁珠, 本试剂盒所含试剂足够完成 40 个反应。

Anti-Flag 免疫磁珠 (Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads) 是一种聚合物磁性微球, 由高质量的鼠源抗 DYKDDDDK (Flag) 单克隆抗体与粒径为 200 nm 的硅基磁珠通过共价偶联制备, 本产品具有快速的磁响应性, 超顺磁性、良好的分散性、粒径均一、极低的非特异结合和丰富的结合位点等特点, 可用于带有 Flag 标签的蛋白免疫沉淀 (IP) 或免疫共沉淀 (Co-IP)。

Anti-Flag 免疫磁珠 (Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads) 可结合 Met 修饰的 N 端 Flag 融合蛋白 (Met-FLAG-Protein), N 端 Flag 融合蛋白 (FLAG-Protein), C 端 Flag 融合蛋白 (Protein-FLAG)。

### 产品信息

类别	编号	组分名称	20765ES40 (40T)	保存方式	翌圣货号
Part I	20765-A	Lysis Buffer for IP Assays 免疫沉淀用(IP)裂解液	100 mL	-25~-15°C	20118ES
	20765-B	蛋白酶抑制剂 Cocktail,EDTA-free,100 $\times$ DMSO 储液	1 mL	-25~-15°C	20124ES
	20765-C	5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	1 mL	-25~-15°C	20315ES
Part II	20765-D	Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads	1 mL	2~8°C	20565ES
	20765-E	1x TBS Buffer, TBS 缓冲液(粉末), PH 7.4,1L	1 L	RT	60157ES
	20765-F	洗脱缓冲液	5 mL	2~8°C	N/A
	20765-G	中和缓冲液	1 mL	2~8°C	N/A

### 储存条件

Part I -25~-15°C保存; Part II 2~8°C保存; 有效期 1 年。

Part II 中的 Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads, 避免冷冻。

### 使用说明

工作液浓度应根据具体实验确定, 建议进行预实验摸索最佳实验浓度。

#### 1. 缓冲液配制

**裂解缓冲液:** 免疫沉淀用(IP)裂解液 (20765-A) 可解冻后直接使用。

**平衡/结合/洗杂缓冲液:** 1x TBS Buffer, TBS 缓冲液(粉末), PH 7.4,1L (20765-D), 使用时用蒸馏水或超纯水溶解, 定容至 1L 即可。

**洗脱缓冲液:** 洗脱缓冲液 (20765-F) 可直接使用。

**中和缓冲液:** 中和缓冲液 (20765-G) 可直接使用。

**SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)的配制:** 取适量 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X) (20765-C) 用水稀释 5

倍即为 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。

## 2. 样品制备

本操作说明书提供以下三种样品处理方法，建议您根据不同来源的样品选择适当的方式进行预处理，使待检测蛋白释放至样品溶液中。

**血清样品处理：**若目标蛋白丰度较高，建议用结合缓冲液稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，置于冰上备用(或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存)。

**悬浮细胞样品处理：**离心收集细胞 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1000g, 5 min)，用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250  $\mu\text{L}$  裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液（裂解液应在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 Cocktail，使蛋白酶抑制剂 Cocktail 的最终浓度为 1 $\times$ ）。混匀后置于冰上处理 10 min；离心收集上清液 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000g, 10 min)，置于冰上备用（或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存）。

**贴壁细胞样品处理：**移去培养基，用 PBS 清洗细胞两遍；用细胞刮棒刮脱细胞，收集至 1.5 mL EP 管内，按照 6 孔板每孔加入 150-250  $\mu\text{L}$  裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液（裂解液应在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 Cocktail，使蛋白酶抑制剂 Cocktail 的最终浓度为 1 $\times$ ）。用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。混匀后置于冰上处理 10 min；离心收集上清液 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000g, 10 min)，置于冰上备用（或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存）。

## 3. 磁珠预处理

3.1 用移液器轻柔吹打 Anti-Flag 免疫磁珠，使其充分混悬，取 25  $\mu\text{L}$  磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中。

3.2 加入 500  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液/结合缓冲液并轻轻移液器混合，用移液器轻柔吹打重悬 Anti-Flag 免疫磁珠，放置在磁分离器上，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清。重复洗 2 次。

## 4. 样品的结合

4.1 在预处理后的磁珠中加入含有 Flag 标签的蛋白样品，置于翻转混合仪上孵育(常温 1~2 h，或  $4^{\circ}\text{C}$ 过夜)；

4.2 将上述混合液置于磁力架上静置，大约 1 min，待溶液变澄清后，把上清液转移到新的离心管中备用(上清液可用于检测 Flag 标签蛋白是否存在残留)，原离心管中剩余的即为蛋白-磁珠复合物；

注意：结合过程中，磁珠可能会出现聚团或呈片状，属于正常现象，不会影响实验结果。

## 5. 洗涤

5.1 向上述步骤 4.2 所得的蛋白-磁珠复合物中加入 1000  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液/洗杂缓冲液，轻柔混匀磁珠 5~10 min，接着在磁力架上静置，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清；

5.2 重复步骤 5.1 两次，直至洗涤后的上清液 OD280 小于 0.05 为止；

注意：如上清液的 OD280 仍大于 0.05，则适当增加洗涤次数。

## 6. 蛋白洗脱

**A. 变性洗脱** 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

1) 从磁分离器上取下离心管，向其中加入 80~100  $\mu\text{L}$  1 $\times$  SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀， $95^{\circ}\text{C}$ 加热 5min。

2) 置于磁性分离器上，进行磁性分离，收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

### B. 非变性洗脱

1) 向磁珠-抗体-抗原复合物中加入 100  $\mu\text{L}$  洗脱液，混合均匀，室温孵育 10 min。

2) 置于磁性分离器上，进行磁性分离，收集洗脱液至新的 EP 管中。

3) 重复步骤 1) 和 2)，收集洗脱液，与 2) 中洗脱液混合，加入中和液中和至 pH7.0-8.0。

## 注意事项

1. 请勿高速离心、干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。

2. 本试剂盒提供的 Lysis Buffer for IP Assays 经反复测试，适合很多情况下的免疫沉淀或免疫共沉淀时的样品裂解和后续的洗涤。但 IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 Lysis/Wash Buffer 的影响，因此可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。

3. 本产品仅作科研用途。

4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。