



Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)

货号: R32269

储存条件: -20℃

有效期: 12个月

产品简介:

Anti-Flag 亲和层析介质以 4%琼脂糖凝胶为基质, 杂蛋白非特异性结合少。本试剂盒包含高质量的 Anti-Flag 琼脂糖凝胶及经过优化验证的免疫沉淀必要试剂, 使免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP, 也称 Pull-down)或免疫共沉淀(Co-IP)实验更加简单、便捷、高效, 广泛用于带有 Flag 标签的融合蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀、免疫共沉淀或纯化等实验。

His 标签(His-tag)、Myc 标签(Myc-tag)、Flag 标签(Flag-tag)、HA 标签(HA-tag)、V5 标签(V5-tag)和 GST 标签(GST-tag)等是表达载体上最常见的一些标签, 通过与这些标签的融合表达可以非常方便地检测目的蛋白及与目的蛋白相互结合的蛋白, 也可以非常方便地用于目的蛋白的纯化。

产品组份:

R32269	Component	20 T	100 T	Storage conditions	Quantity Per Test
R32269-A	IP 裂解液	50 mL	250 mL	2-8° C	200 μ L
R32269-B	TBS 缓冲液(10×)	5 mL	15 mL	2-8° C	50 μ L
R32269-C	Flag 标签蛋白琼脂糖凝胶	0.4mL	2mL	2-8° C	20 μ L per 500~1000 μ g 裂解液
R32269-D	IP 洗脱缓冲液	2 mL	10 mL	2-8° C	50 μ L
R32269-E	IP 中和缓冲液	0.2 mL	1 mL	2-8° C	5 μ L
R32269-F	SDS 上样缓冲液(2 ×)	0.6 mL	3 mL	-20° C	20 μ L

使用方法:

1. 样本处理: (注意: 样品裂解需在 4℃ 或冰上操作)



(1) 对于血清样本的准备:

若目标蛋白丰度较高, 建议用裂解液稀释血清样本至目标蛋白终浓度为 50~150 $\mu\text{g/mL}$, 置于冰上备用(或置于 -20°C 长期保存);

(2) 对于贴壁细胞的裂解和准备:

吸除培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 然后吸净残留的液体。按照每 50-100 万细胞 (相当于6孔板的一个孔) 加入 100-200 μL 的含抑制剂裂解液, 适当吹打, 使裂解液和细胞充分接触。

通常裂解液接触动物细胞 1-2 秒后, 细胞就会被裂解。植物细胞宜在冰上裂解 2-10 min。充分裂解后, 用细胞刮刀刮落细胞, 收集至 1.5 mL 离心管内 10,000-14,000 $\times g$ 在 4°C 离心 3-5 分钟, 取上清, 进行蛋白浓度测定后即可进行后续的免疫沉淀或免疫共沉淀等。

注: 裂解后会出现少量不溶性物质, 主要为基因组 DNA 等, 离心后会产生沉淀物。

(3) 对于悬浮细胞的裂解和准备:

250-1000 $\times g$ 室温离心 5min 收集细胞。用 PBS 洗涤 2 次, 然后吸净残留的液体。轻轻旋涡或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照每 50-100 万细胞加入 100-200 μL 的比例加入含抑制剂裂解液。混匀后置于冰上孵育 5~20 min(期间混匀几次), 轻弹管底或适当吹打, 以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多, 建议分装成 50-100万细胞/管, 然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分, 而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触, 相对比较容易裂解充分。充分裂解后, 10,000-14,000 $\times g$ 在 4°C 离心 3-5 分钟, 取上清, 进行蛋白浓度测定后即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

注: 裂解后会出现少量不溶性物质, 主要为基因组 DNA 等, 离心后会产生沉淀物。

(4) 对于细菌或酵母样品的裂解和准备:

对于 1ml 菌液或酵母液, 离心去上清, 用 PBS 洗涤 2 次, 然后吸净残留的液体。轻轻旋涡或者弹击管底以把细菌或酵母尽量分散开。加入 100-200 μL 含抑制剂



裂解液，轻轻旋涡或者弹击管底以混匀，冰上裂解 2-10min。如果希望获得更好的裂解效果，细菌和酵母可以分别使用溶菌酶(lysozyme)和破壁酶(lyticase)消化，然后再使用含抑制剂裂解液进行裂解。充分裂解后，10,000-14,000×g 在 4℃ 离心 3-5 分钟，取上清，进行蛋白浓度测定后即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

注：裂解后很可能会出现少量不溶性物质，主要为基因组 DNA 等，离心后会生成沉淀物。

(5) 对于组织样品的裂解和准备：

把组织剪切成细小的碎片，按照每 20mg 组织加入约 100-200μl 裂解液的比例加入裂解液，然后用玻璃匀浆器或其它匀浆设备进行匀浆。充分匀浆可以确保组织被完全裂解。裂解后 4℃ 12000g 离心 5 分钟，取上清，进行蛋白浓度测定后即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

注：裂解后很可能会出现少量不溶性物质，主要为基因组 DNA 等，离心后会生成沉淀物。

2. Anti-Flag 琼脂糖凝胶预处理：

(1) 轻轻重悬 Anti-Flag 琼脂糖凝胶，尽量形成均匀的悬浊液，取 20μl 悬浊液至一洁净离心管中加入预冷的 1× TBS 至最终体积为约 0.5mL-1mL。

(2) 6000×g 在 4℃ 离心 60 秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复上述步骤两次。

3. 样品的结合：

(1) 将细胞裂解液与预处理过的 Anti-Flag 琼脂糖凝胶在离心管中混合。每个 IP 反应总蛋白建议量是 500 – 1000 μg，可使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定。

(2) 置于翻转混合仪上 4℃ 孵育 4-6 h 或者过夜（也可选择常温 1-2h）。

(3) 将上述混合液 6000×g 在 4℃ 离心 60 秒，然后把上清液转移到新的离心管中备用(上清液可用于检测 DYKDDDDK 标签蛋白是否存在残留)，原离心管中剩余的即为蛋白-凝胶复合物。



(4) 向所得的蛋白-凝胶复合物中加入 1mL 1×TBS 缓冲液, 用移液器轻柔吹打重悬, 接着6000×g 在 4℃ 离心 60 秒后, 吸弃上清, 重复上述步骤两次。

4. 洗脱:

本试剂盒提供以下两种洗脱方案, 操作者可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。变性洗脱适用于 Western blot 分析。非变性洗脱被中和后, 适用于酶法或功能测定。

(1) 变性洗脱:

此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向洗涤后的含抗原-抗体-复合物的 Anti-Flag 琼脂糖凝胶中加入 20 μL 2×SDS-PAGE 上样缓冲液混合均匀, 100℃加热 10 min。待冷却后, 6000×g 在 4℃ 离心 60 秒, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 检测。

(2) 非变性洗脱:

此方法洗脱的样品保持原有的生物活性, 可用于后期功能分析。向洗涤后的含抗原-抗体-复合物的 Anti-Flag 琼脂糖凝胶中加入 50 μL 洗脱缓冲液, 混匀后置于旋转混合仪上, 室温孵育 5 分钟, 孵育完毕后, 6000×g 在 4℃ 离心 60 秒, 将上清转移到新的离心管中, 并立刻加入 5μL 中和缓冲液, 适当混匀, 将洗脱产物 pH 调节至中性, 用于后期功能分析。

注:

- 为了获得最大的洗脱效率, 可重复该洗脱步骤若干次, 并将相同样品合并。
- 洗脱并中和的蛋白及其复合物置于 4℃ 待用或者-20℃ 或-80℃ 长期保存。
- 酸性洗脱法虽然高效, 但仍可能低于变性洗脱法。

d. 由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响, 如果对洗脱效率的要求比较高, 可对洗脱液的 pH 进行一定的调整, 相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整, 具体需要自行优化相关实验条件。也可以考虑采用效率可能更高的多肽竞争洗脱法或效率预期最高的变性洗脱法, 后者的缺点是在变性条件下进行洗脱, 可能会对后续对于蛋白活性有要求的实验产生影响。



注意事项:

1. 本试剂盒内包含的 IP 裂解液已包含蛋白抑制剂, 如果有特殊需求, 可考虑选择其它适当的抑制剂混合物。

2. 所有的样品裂解步骤宜在冰浴或 4°C 操作, 以尽量减少蛋白降解的可能性。若细胞裂解不够完全可在裂解液之后使用超声裂解细胞。

3. 本试剂盒提供的 IP 裂解液经反复测试, 适合很多情况下的免疫沉淀时的样品裂解和后续的洗涤。但由于免疫沉淀蛋白样品的复杂性和特殊性, 本裂解液不一定适合所有免疫沉淀样品的裂解与洗涤。在使用本试剂盒提供的裂解液和洗脱效果欠佳的情况下, 需要自行对于裂解液和洗涤液进行摸索和调整。

4. 琼脂糖凝胶使用前一定要充分重悬, 即充分颠倒若干次使混合均匀。

5. 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作, 并应始终放置在 4°C 或冰浴, 以减缓蛋白降解或变性。

6. 使用此试剂盒时抗体将与免疫沉淀的抗原一起被洗脱。因此, 在还原型 SDS-PAGE 凝胶或 Western blot 时至少产生三个蛋白条带: 抗体重链 (50 kDa)、轻链 (25 kDa) 和抗原。如果抗体条带掩盖了免疫沉淀的抗原, 则可用与免疫沉淀中不同种属的抗体做 Western blot 检测(如, 免疫沉淀用鼠抗的 IgG 而检测用兔抗的 IgG)。

7. 本试剂盒提供的裂解液不仅用于样品裂解, 也用于后续的洗涤步骤。