

Flag 免疫(共)沉淀试剂盒(凝胶)

Flag IP/Co-IP Kit

本产品 4℃ 运输; 保存于 4℃, 保质期 12 个月, 其中 **Anti-Flag 免疫凝胶** 严禁冻结, 长期存放请保证试剂管直立向上, 凝胶浸没于保存液中。

货号规格

YJ208 ≥40 次

产品简介

本产品能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验, 其核心成分 **Anti-Flag 免疫凝胶** 是由高质量的鼠源 IgG 单克隆抗体与琼脂糖凝胶 4B 通过共价偶联制备而成, 试剂盒中配有经过优化预制的各种缓冲液, 为免疫(共)沉淀实验提供了合适的反应条件, 增强了实验的稳定性, 可应用于多种样品, 细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它的免疫抗原等均可适用。

产品内容

组分名称	体积及数量
Anti-Flag 免疫凝胶	1 mL
裂解/漂洗缓冲液	100 mL
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)	10 mL
洗脱缓冲液	5 mL
中和缓冲液	1 mL

操作步骤

◆ 样本处理

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

- 血清样品:** 若目标蛋白丰度较高, 建议用 **裂解/漂洗缓冲液** 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50~150 µg/mL, 置于冰上备用 (或置于 -20℃ 长期保存);
- 悬浮细胞:** 离心收集细胞 (4℃, 500×g, 10 min), 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50 µL 的比例用 1×PBS (货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每毫克细胞 5~10 µL 的比例加入 **裂解/漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 5~20 min (期间混匀几次); 离心收集上清液 (4℃, 12,000~16,000×g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20℃ 长期保存);
- 贴壁细胞:** 移去培养基, 按每 1.0×10⁵ 个细胞 150 µL 的比例用 1×PBS (货号: PS110) 洗涤两次; 用细胞刮刀刮落细胞, 收集至 1.5 mL 离心管内, 按每 1.0×10⁵ 个细胞 20~30 µL 的比例加入 **裂解/漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 5~20 min (期间混匀几次); 离心收集上清液 (4℃, 12,000~16,000×g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20℃ 长期保存);
- 大肠杆菌:** 离心收集大肠杆菌 (4℃, 12,000×g, 2 min), 弃上清后称重, 按每克菌体 (湿重) 10 mL 的比例用 1×PBS (货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每克菌体 (湿重) 5~10 mL 的比例加入 **裂解/漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清 (4℃, 12,000~16,000×g, 10 min)。

◆ 凝胶预处理

2. 用移液器轻柔吹打 **Anti-Flag 免疫凝胶** , 使其充分混悬, 迅速吸取 25 μ L 混合液置于新的离心管中;
3. 向离心管中加入 200~500 μ L **裂解/漂洗缓冲液** , 盖上管盖, 颠倒数次或轻微涡旋混匀 1 min, 接着 1,000 rpm 离心 5 min, 吸弃上清;
4. 重复步骤 3 两次;

◆ 蛋白与凝胶的结合

5. 在预处理后的凝胶中加入 500 μ L 处理后的样本, 置于翻转混合仪上孵育 (常温 2h 或 4°C 过夜);
6. 将上述混合液 1,000 rpm 离心 5 min, 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 Flag 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** ;

◆ 漂洗

7. 向步骤 6 所得的 **蛋白-凝胶复合物** 中加入 500 μ L **裂解/漂洗缓冲液** , 用移液器轻柔吹打, 重新分散凝胶, 然后上下翻转使其彻底重悬。5000 rpm 离心 30 s, 吸弃上清;
8. 重复步骤 7 两次;

◆ 洗脱

9. 本操作说明书提供以下两种抗原洗脱方案, 操作者可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。
 - **变性洗脱**: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向步骤 8 洗涤后的 **蛋白-凝胶复合物** 中加入 80~100 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 (由 5 $\times$ 稀释为 1 $\times$) 混合均匀, 100°C 加热 10 min。待冷却后, 1000 rpm 离心 5 min 分离凝胶, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 检测。
 - **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。向步骤 8 洗涤后的 **蛋白-凝胶复合物** 中加入 100 μ L **洗脱缓冲液** , 室温孵育 5~10 min; 1000 rpm 离心 5 min 分离凝胶, 收集上清, 每 100 μ L 洗出液中加入 10 μ L **中和缓冲液** 将洗脱产物 pH 调节至中性, 用于后期功能分析。

常见问题及对策

◆ 抗原为何没有免疫沉淀下来?

答: ① 样品中抗原含量过少, 不足以被检测到

建议: 通过 SDS-PAGE 或 Western Blot 验证裂解液中蛋白的表达和裂解效率; 如有必要, 可加大样品用量;

② **裂解/漂洗缓冲液** 中的成分干扰了抗原与抗体的结合

建议: 使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗 (比如可选用含有 0.5% CHAPS 的 TBS 缓冲液)。

◆ 为何获得的蛋白量过低?

答: ① 蛋白质被降解

建议: 加入蛋白酶抑制剂;

② 所用的凝胶量不够

建议: 提高 **Anti-Flag 免疫凝胶** 用量;

③ 样品中的目标蛋白量不够

建议: 提高抗原样品量。

◆ 为何有多条非特异条带?

答: 有非特异性的蛋白结合在免疫凝胶上

建议: 在 **裂解/漂洗缓冲液** 中加入 50~350 mM NaCl, 并加大洗脱力度和次数。

◆ 如何解决凝胶易粘附管壁的现象?

答: 建议使用低吸附率的耗材进行凝胶操作。

注意事项

1. 请勿高速离心、干燥或冷冻免疫凝胶, 这些操作会导致凝胶聚集而降低其结合力;
2. 免疫(共)沉淀实验中不同类型的抗体与抗原间的亲和力是有区别的, 抗体与抗原结合还会受到 **裂解/漂洗缓冲液** 的影响, 因此, 如使用本试剂盒不能获得最佳的实验结果, 可自行优化操作细节或者筛选及配制合适缓冲液进行实验;
3. 凝胶应保存在储存溶液中, 防止干燥, 使用前应充分振荡混匀;
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
5. 本产品仅限科研使用。

版本号: 21C22