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竖立向上，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	125 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：

A. **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)；

B. **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)；

C. **贴壁细胞：**移去培养基，按每 1.0×10^5 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 1.0×10^5 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)；

D. **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 μL 混合液置于新的离心管中；
3. 向离心管中加入 200~500 μL **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 μL 处理后的样本，置于翻转混合仪上孵育（常温 2 h 或 4℃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 μL **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 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液（由 5×稀释为 1×）混合均匀，100℃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 μL **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 μL 洗出液中加入 10 μL **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：21H27

版本号：21C22