

DYKDDDDK免疫(共)沉淀试剂盒(凝胶)

DYKDDDDK IP/Co-IP Kit

本产品 4°C运输；保存于 4°C，其中 **SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)** 需-20°C保存，保质期12个月，**Anti-DYKDDDDK免疫凝胶** 严禁冻结，长期存放请保证试剂管竖立向上，免疫凝胶浸没于保存液中。

货号规格

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-DYKDDDDK 免疫凝胶是由高质量的鼠源 IgG 单克隆抗体与脂糖凝胶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-DYKDDDDK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. **悬浮细胞**：离心收集细胞 (4°C, 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°C, 12,000~16,000×g, 10 min)，置于冰上备用 (或置于 -20°C长期保存)；



- B. 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 \times 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 $^{\circ}\text{C}$,12,000~16,000 $\times g$,10 min),置于冰上备用(或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存);
- C. 大肠杆菌: 离心收集大肠杆菌(4 $^{\circ}\text{C}$,12,000 $\times g$,2 min),弃上清后称重,按每克菌体(湿重)10 mL 的比例用 1 \times 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 $^{\circ}\text{C}$,12,000~16,000 $\times g$,10 min)。

凝胶预处理

2. 用移液器轻柔吹打 **Anti-DYKDDDDK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 $^{\circ}\text{C}$ 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 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**;

洗涤

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 \times SDS-PAGE 上样缓冲液(由 5 \times 稀释为 1 \times)混合均匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 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 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-DYKDDDDK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。

