

Anti-FLAG (DYKDDDDK) 免疫 (共) 沉淀 (IP/CoIP) 试剂盒(磁珠法)

Cat#: KMIP0064S

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

本产品由高品质的的 FLAG 单克隆抗体与磁珠共价偶联制成, 可用于 FLAG 标签蛋白的免疫沉淀 (IP), 也可用于免疫共沉淀 (Co-IP)、染色质 IP (ChIP) 或 RNA IP (RIP)。本产品具有高载量; 操作迅速便捷 (最短可在 40 分钟内完成一个 IP 流程); 特异性强, 非特异性吸附低等特点。

二. 性能指标

- 应用范围:** 可用于 Met 修饰的 N 端 FLAG 融合蛋白 (Met-FLAG-Protein), N 端 FLAG 融合蛋白 (FLAG-Protein) 和 C 端 FLAG 融合蛋白 (Protein-FLAG) 免疫 (共) 沉淀。
- 抗体属性:** Anti-FLAG (DYKDDDDK) 单克隆抗体。
- 磁珠属性:** 琼脂糖包裹的超顺磁珠, 平均粒径 50um。
- 载量:** 1ml 纳米磁珠, 共价偶联 2mg Anti-FLAG 单克隆抗体, 可沉淀至少 0.6mg FLAG 融合蛋白。
- 强度:** 竞争洗脱, 可反复使用 5 次以上。
- 成分:** 1ml 共价偶联 Anti-FLAG 单克隆抗体的磁珠, 溶于 2ml PBS 中。
- 保存方法:** 在加入了 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年。

三. 试剂盒组成

| 产品编号 | 组分 | 规格 | 保存 |
|------|------------------|------|---------|
| L1 | 细胞裂解液 | 30ml | 4°C一年 |
| / | 磁力架 (四孔) | 1 个 | 室温 |
| G1 | FLAG 单克隆抗体磁珠 | 2ml | -20°C一年 |
| E3 | 酸性洗脱液 | 2ml | 4°C一年 |
| P10 | 10xPBS (结合液/储存液) | 50ml | 4°C一年 |
| P10T | 10xPBST (清洗液) | 50ml | 4°C一年 |

四. 用前必读

- 以下试剂及设备, 需要客户自备, 试剂推荐配方见说明书附件 1, 推荐蛋白质制备方案见附件 2。

1.5mL 离心管若干
中和液, 2x 蛋白上样缓冲液,
待测抗原样品及检测抗体

- 注意事项 (开箱前必读)**

- 1) 本产品是在加入了 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，-20°C可保存 1 年，冷藏条件下运输。
- 2) 勿离心、冷冻、干燥磁珠，勿使用超声处理磁珠，勿使酸处理磁珠时间超过 10min。
- 3) 混匀磁珠时，请采用移液枪轻柔吹打，柔和涡旋，上下颠倒及摇床混匀等方法。勿使用超声等方法。
- 4) 以下使用方法中的磁珠用量，均为少量制备的示范用量，请根据实际情况，调整磁珠用量。

五. 使用方法

免疫（共）沉淀法检测 FLAG 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-FLAG 免疫磁珠至均一，取 40 μ L 磁珠悬液(约含 20 μ L 磁珠)至 1.5mLEP 管中，加入 500 μ L 1xPBS，轻柔重悬清洗磁珠，磁力架上静置 10 sec 后，弃上清，重复上述步骤两次。
注意：多个样品时，可将磁珠重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液，轻柔重悬磁珠，室温摇床孵育 2hr 或者 4°C孵育过夜。
- 3) 磁力架上静置 10 sec 后，将上清液转移到新的 EP 管中备用（上清液可用于检测 FLAG-tag 蛋白是否存在残留）。加入 500 μ L 1xPBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复两次。
- 4) 加入 2x 上样缓冲液，煮样 5min，冷却至室温并离心。
- 5) 取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。
- 6) 免疫磁珠的保存：用 1xPBS (含 50%甘油，0.2%叠氮钠) 清洗磁珠，再加入与磁珠等体积的 1xPBS (含 50%甘油，0.2%叠氮钠) 至磁珠中，混合均匀，保存在-20°C。

1)

附件 1. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐，客户应根据具体情况进行调整。

| | |
|------------------|---|
| 细胞裂解液: | 150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂, 使用说明见附件 2) |
| 酸性预洗液: | 0.15M PBS buffer, pH5.0 |
| 酸性洗脱液: | 0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH3.0 |
| 中和液: | 1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0 |
| 10xPBS (pH7.5) : | Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 2.8g, NaCl 89g 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 2% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍) |
| 1xPBS (清洗液/储存液) | 1xPBS, pH7.5 |
| 2x 上样缓冲液 | 125mM Tris HCl , pH6.8, with 4% SDS, 20%glycerol and 0.004% bromphenol blue |

附件 2. 细胞裂解液制备

- 1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 2) 预冷的 1xPBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，（例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约 0.5-1x10⁷ 细胞，需要加入 1mL 细胞裂解液）。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4°C离心 10min。取上清，-80°C冷冻保存。