

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

Anti-FLAG 标签 (DYKDDDDK) 快速免疫沉淀套装

Anti-DYKDDDDK-tag FAST IP Kit

产品货号: EA-IP-K001

产品规格: 50 T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：techsupport@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

背景信息

Anti-FLAG 标签（DYKDDDDK）快速免疫沉淀套装，由 Anti-FLAG 亲和凝胶，Mouse IgG 亲和凝胶，FLAG-Tag Rabbit pAb 和 HRP 标记的羊抗兔二抗，这四个组分组成，用于快速、高效、特异的 FLAG 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀。

Anti-FLAG 亲和凝胶，由高品质的 FLAG-Tag Mouse mAb 与琼脂糖凝胶共价偶联制成，具有高载量，高特异性，性质稳定的特点；Mouse IgG 亲和凝胶作为 CoIP 实验对照，性质稳定；FLAG-Tag Rabbit pAb 抗体具有高特异性，高亲和力，高效价的优点；HRP 标记的羊抗兔二抗经过交叉吸附纯化，仅识别 FLAG-Tag Rabbit pAb，与小鼠单抗的重链轻链没有交叉反应。四个组分均经严格质检，可单独使用；四者组合的套装则具有快速，简便，无干扰条带的优点。

性能指标

1. 应用范围:

Flag 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀。

Flag 标签可以位于蛋白的 N 端，C 端或中间，如 N 端 Flag 融合蛋白（Flag-Protein）、C 端 Flag 融合蛋白（Protein-Flag）和 Met 修饰的 N 端 Flag 融合蛋白（Met-Flag-Protein）。

2. 抗体属性:

FLAG-Tag Mouse mAb: 小鼠 IgG2a 亚型; FLAG-Tag Rabbit pAb: 兔 IgG。

3. 凝胶属性:

琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 50 μ m。

4. 凝胶载量:

0.5mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联 4mg Anti-Flag 小鼠单克隆抗体。

产品组分

组分名称	组分编号	规格/浓度	保存方法
细胞裂解液 Lysis buffer	L1	30mL	4°C, 12 个月
Anti-Flag 标签亲和凝胶 Anti-DYKDDDDK Affinity Agarose	G1	2mL (0.5mL/mL) *	-20°C, 12 个月
Mouse IgG 亲和凝胶 Mouse IgG affinity agarose	G2	2mL (0.5mL/mL) *	-20°C, 12 个月
Flag-Tag Rabbit pAb	E1	100µg (1mg/mL) *	-20°C, 12 个月
HRP 标记的羊抗兔二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(peroxidase/HRP conjugated)	E2	100µg (1mg/mL) *	-20°C, 12 个月
说明书一份			

*注释：缓冲液为含有 50%甘油的 PBS。

注意事项

1. 运输和保存：

本试剂盒在冷藏条件下运输。

收货后，如果暂时不用，请将裂解液取出，于 4°C 保存；试剂盒其余组分保存于 -20°C。

2. 凝胶悬液与亲和凝胶

本试剂盒以凝胶悬液形式提供亲和凝胶，凝胶悬液中亲和凝胶的含量为 50%，使用前先温和重悬凝胶悬液，然后按照需求取用。

例如：2mL 凝胶悬液中，含有 1mL 亲和凝胶。

自备试剂

1. 抗体稀释液

1×PBST 配制终浓度为 5%的脱脂奶粉。现用现配。

2. 1x PBST

按照 9:1 的比例用去离子水将 10xPBST 稀释待用。例如：1mL 10xPBST 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBST。现用现配。

3. 1 x PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 10xPBS 稀释待用。例如：1mL 10xPBS 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBS。现用现配。

4. 化学发光显影液（ECL）

化学发光底物 ECL 液 A 和 ECL 液 B 按照 1:1 比例等体积混匀。现用现配。

使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。

1. 细胞裂解液制备

1) 收集细胞

悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

2) 用预冷至 4°C 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，反复吹打后冰上放置 10-20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 $0.5 \sim 110^7$ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂。

4) 用超声破碎仪处理细胞裂解液，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。取上清即为蛋白样本。建议立即进行下一步实验，若时间不允许，置于 -80°C 保存。

5) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。

2. 免疫（共）沉淀 Flag 标签的蛋白

1) 实验组亲和凝胶预处理。温和重悬 Anti-Flag 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 40 μ L 凝胶悬液（约含 20 μ L 亲和凝胶）至离心管中。加入 10 倍凝胶体积（约 200 μ L）的 1xPBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤三次。

2) 对照组亲和凝胶预处理。温和重悬 Mouse IgG 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 40 μ L 凝胶悬液（约含 20 μ L 亲和凝胶）至离心管中。加入 10 倍凝胶体积（约 200 μ L）的 1xPBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤三次。

注：以下步骤在对照组和实验组中同步进行。

- 3) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的样本溶液, 室温摇床孵育 2h 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 4) 加入 10 倍凝胶体积 (约 200 μ L) 的 1xPBS 清洗亲和凝胶, 5000rpm 离心 30sec, 弃上清, 重复此步骤三次。
- 5) 加入预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 5 倍凝胶体积 (约 100 μ L) 的 PBST 预洗液洗涤亲和凝胶, 除去非特异性结合蛋白。5000rpm 离心 30sec, 弃上清。
- 6) 加入 4 μ L 5x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。
- 7) 取上清进行 SDS-PAGE 实验, 以备后续的 Western Blotting 检测。

3. Western Blotting 检测 Flag 标签蛋白质

- 1) 用 WB 转膜仪将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转移到膜上。
- 2) 电转结束后, 取膜置于膜处理液中 1min, 取出, 室温平衡 30min。
- 3) 加适量抗体稀释液封闭膜上的非特异性结合位点, 完全覆盖膜即可, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1h。
- 4) 用抗体稀释液稀释 Flag-Tag Rabbit pAb 一抗, 稀释度 1:10000, 加在膜上, 保证完全覆盖膜, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1h。
- 5) 用 PBST 洗膜, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 5min, 此步骤重复 4 次。
- 6) 用抗体稀释液稀释 HRP 标记的羊抗兔二抗, 稀释度 1:10000, 加在膜上, 保证完全覆盖膜, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1h。
- 7) 用 PBST 洗膜, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 5min, 此步骤重复 4 次。
- 8) 将膜平摆在一干净平面上, 取等体积的 ECL 液 A 和 ECL 液 B 混合后均匀地加到膜上, 避光反应 1min。
- 9) 将膜取出, 弃去 ECL 液, 置于暗盒中显影。可根据背景和目的条带的强度, 选择不同的曝光时间。

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白共沉淀或者后续 IP 实验结果。
4. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同目标蛋白的性质，优化实验条件，选择最合适的实验方案。