

Flag标签琼脂糖微珠法IP/Co-IP试剂盒(动物)

Flag-tag Agrose Beads IP/Co-IP Kit for Mammal

注:本产品干冰运输;试剂按说明书保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP013 (6T)	IPP013M (12T)	IPP013L (40T)	
01	Lysis Buffer	15.00 mL	30.00 mL	100.00 mL	4°C
02	TBS (10X)	1.50 mL	3.00 mL	10.00 mL	4°C
03	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	0.15 mL	0.30 mL	1.00 mL	-20°C
04	Anti-HA Agarose Gel	0.12 mL	0.24 mL	0.80 mL	-20°C
05	Mouse IgG Agarose Gel	24 µL	48 µL	160 µL	-20°C
06	3X Flag Peptide (25X)	24 µL	48 µL	160 µL	-20°C
07	Acid Elution Buffer	0.60 mL	1.20 mL	4.00 mL	4°C
08	Neutralization Buffer	0.06 mL	0.12 mL	0.40 mL	4°C
09	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	0.18 mL	0.36 mL	1.20 mL	4°C

注意:需自备 PBS、磁力架等试剂耗材。

产品简介/Product Description

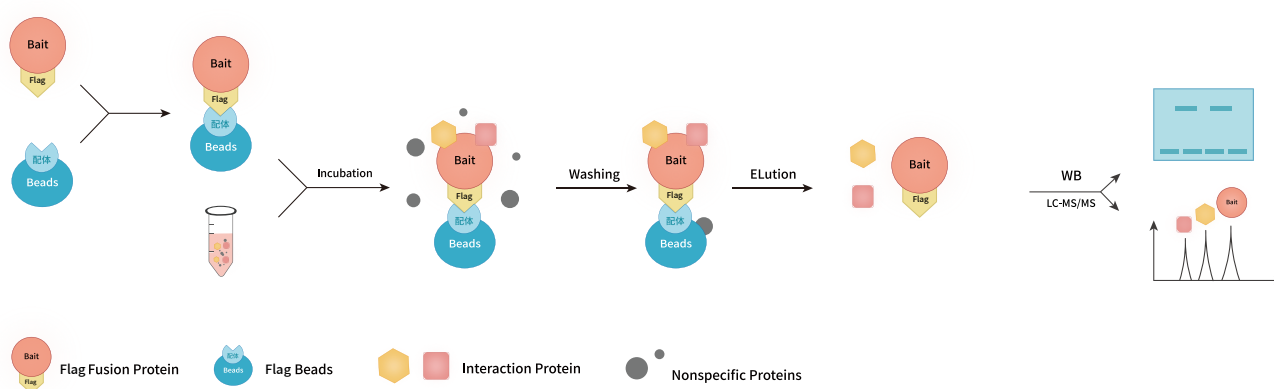
Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒 (琼脂糖微珠法) (Flag-tag Protein IP Assay Kit with Agarose Gel) 是一种通过高特异性的 Anti-Flag 琼脂糖微珠进行 Flag 标签融合蛋白免疫沉淀或免疫共沉淀的试剂盒。本产品的免疫沉淀产物,可以用于 Flag 标签融合蛋白或其蛋白复合物组分的检测。本试剂盒包含高质量的 Anti-Flag

琼脂糖微珠及经过优化验证的免疫沉淀必要试剂，使免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP, 也称 Pull-down) 或免疫共沉淀 (Co-IP) 实验更加简单、便捷、高效，广泛用于带有 Flag 标签的融合蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀、免疫共沉淀或纯化等实验。

免疫沉淀或免疫共沉淀是研究蛋白或蛋白与蛋白相互作用 (Protein-Protein Interactions, PPIs) 的常用实验技术，通过使用特异性抗体和可结合抗体的介质 (如 Protein A/G Agarose 或 Protein A/G 磁珠)，或直接使用偶联特异性抗体的介质 (如琼脂糖微珠或磁珠)，然后通过离心或磁力从溶液中分离出抗原和抗体复合物，从而将目标蛋白质从复杂样品中分离出来，随后可以用于 Western 印迹检测或质谱分析等。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



使用流程/Procedure

1. 细胞裂解

(1) 含抑制剂裂解液的配制

①按照每 50-100 万细胞使用 100-200 μ L 含抑制剂裂解液用于裂解以及 300-600 μ L 含抑制剂裂解液用于洗涤的比例，配制适量的含抑制剂裂解液。将 Lysis Buffer 与 Protease Inhibitor Cocktail (100X) 按照 100:1 的比例混合，例如在 1ml 的 Lysis Buffer 中加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail (100X)，即得 1ml 含抑制剂裂解液 (Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail)。配制好的含抑制剂裂解液宜放置在冰浴或 4 $^{\circ}$ C。

②TBS 的配制。将 TBS (10X) 用超纯水稀释至 1X，即为 TBS。

③微珠的准备。由于 Anti-Flag Agarose Gel 储存在含 50% 甘油的保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。
a. 轻轻重悬 Anti-Flag Agarose Gel，尽量形成均匀的微珠悬浊液，按照通常每 100 μ L 中加入 20 μ L 混合均匀的微珠悬浊液 (以下免疫沉淀步骤中都以每样加入 20 μ L 微珠悬浊液为例)，取适量 Anti-Flag Agarose Gel 至一洁净离心管中，加入 1X TBS 至最终体积为约 0.5ml。注：使用大孔径吸头 (如用剪刀剪去部分吸头) 吸取微珠悬浊液会比较方便。

b. 轻轻重悬 Anti-Flag Agarose Gel，6000 g 在 4 $^{\circ}$ C 离心 30 秒，小心去除上清，不要吸到微珠。重复上述步骤两次。

注意：由于抗体偶联的特殊性，微珠中微量抗体的脱落或残留不可避免，所以微珠的洗涤不仅可以去除甘油或防腐剂，对脱落或残留的抗体也有洗涤作用，特别是对于洗脱样品中通常不含轻重链的多肽竞争洗脱法或酸性洗脱法更有必要通过洗涤去除游离的抗体。如果有必要，可以适当增加洗涤次数。

④按照初始的微珠悬浊液的体积，用 1X TBS 重悬 Anti-Flag Agarose Gel。

⑤3×Flag 多肽洗脱液的配制。将 3×Flag Peptide (25X) 用 TBS 稀释 25 倍即为 3×Flag 多肽洗脱液，如将 10μL Flag Peptide (25X) 加入 240μL TBS 中混匀即可。配制好的 3×Flag 多肽洗脱液宜放置在冰浴或 4°C。

⑥(选做) SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X) 的配制。取适量 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X) 用水等体积稀释即为 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。例如 0.2ml SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X) 加入 0.2ml 超纯水，混匀后即 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。

2. 细胞或组织样品的裂解和准备。

样品裂解后宜立即进行后续的免疫沉淀或免疫共沉淀，如果不能立即进行后续的实验，可以 -20°C 或 -80°C 冻存。所有的样品裂解步骤宜在冰浴或 4°C 操作，以尽量减少蛋白降解的可能性。样品准备好后，取一定量作为 Input 或 Total，以用于后续的 Western 等检测。

(1) 悬浮细胞的样品裂解和准备。250-1000g 室温离心 3-5min 收集细胞。如有必要，可以使用 PBS 洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻弹击管底以把细胞尽量分散开。按照每 1×10^7 细胞加入 200μL 的比例加入含抑制剂裂解液。轻弹管底或适当吹打，以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。充分裂解后，10,000-14,000 g 在 4°C 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

(2) 贴壁细胞样品的裂解和准备。吸除培养液。如有必要，用 PBS 洗涤一次，然后吸净残留的液体。按照每 1×10^7 细胞加入 200μL 的含抑制剂裂解液，适当吹打，使裂解液和细胞充分接触。植物细胞宜在冰上裂解 2-10min。充分裂解后，10,000-14,000 g 在 4°C 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

(3) 细菌或酵母样品的裂解和准备。对于 1ml 菌液或酵母液，离心去上清，如果有必要，可以使用 PBS 洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻弹击管底以把细菌或酵母尽量分散开。加入 100-200μL 含抑制剂裂解液，轻轻弹击管底以混匀，冰上裂解 2-10min。如果希望获得更好的裂解效果，细菌和酵母可以分别使用溶菌酶 (lysozyme) 和破壁酶 (lyticase) 消化，然后再使用含抑制剂裂解液进行裂解。充分裂解后，10,000-14,000 g 在 4°C 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

(4) 组织样品的裂解和准备。

a. 把组织剪切成细小的碎片。如果组织样品本身非常细小，也可以不再进行剪切。

b. 按照每 10-20 毫克组织使用 100-200μL 的比例加入含抑制剂裂解液。如果裂解不充分可以使用更多的含抑制剂裂解液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少裂解液的用量。

c. 用玻璃匀浆器匀浆，或使用组织研磨仪研磨，直至充分裂解。也可以把组织样品冷冻后液氮研磨，研磨充分后加入裂解与洗涤液进行裂解。

d. 充分裂解后，10,000-14,000 g 在 4°C 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。每 20mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200μL 含抑制剂裂解液裂解后获得的上清。

3. 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)

(1) 加入微珠与孵育。按照每 100μL 蛋白样品加入 20μL 微珠悬浊液的比例加入微珠，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，4°C 孵育 1-2 小时。如需提高结合效率，可 4°C 孵育过夜。

注意：

1. 样品中需要加入 Anti-Flag Agarose Gel 用于免疫沉淀带有 Flag 标签的目的蛋白及其复合物，同时建议酌情在部分样品中加入 Mouse IgG Agarose Gel 进行免疫沉淀以作为阴性对照。

2. 对于使用 Anti-Flag Agarose Gel 进行免疫沉淀后续发现背景非常高的情况，可以考虑使用 Mouse IgG Agarose Gel 进行预沉淀处理，以消除非特异性吸附，然后再使用 Anti-Flag Agarose Gel 进行免疫沉淀。

(2) 离心分离。孵育完毕后，6000 g 在 4°C 离心 30 秒，小心去除上清，不要吸到微珠。注：可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。

(3) 洗涤。加入 0.5ml 含抑制剂裂解液，重悬微珠。冰浴并置于摇床上 5 分钟，然后 6000 g 在 4°C 离心 30 秒，小心去除上清，不要吸到微珠。重复使用含抑制剂裂解液洗涤三次。

注意：也可以通过检测洗涤得到的液体的 OD280 来判断是否洗涤完全，若 OD280 大于 0.05，应适当增加洗涤次数。

4. 洗脱。

根据标签蛋白的特点及后续实验要求，可以选择如下 3 种方法之一进行洗脱。

(1) 3×Flag 竞争洗脱法。本方法为非变性法，洗脱效率高，且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

a. 每 20μL 原始微珠悬浊液体积，加入 100μL 3×Flag 多肽洗脱液，室温摇床孵育 30-60 分钟，或 4°C 摇床孵育 1-2 小时。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。3×Flag 多肽洗脱液体积一般为微珠悬浊液的 5 倍。

b. 孵育完毕后，6000 g 在 4°C 离心 30 秒，将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的 Flag 标签蛋白及其复合物。

c. 洗脱的 Flag 标签蛋白及其复合物置于 4°C 待用，或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

(2) 酸性洗脱法。本方法为非变性法，比较快速高效。洗脱后的蛋白很多情况下能保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

a. 每 20μL 原始微珠悬浊液体积，加入 100μL Acid Elution Buffer (酸性洗脱液)，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育 5 分钟。酸性洗脱液体积一般为微珠悬浊液的 5 倍。**注：孵育时间不宜超过 15 分钟。**

b. 孵育完毕后，6000 g 在 4°C 离心 30 秒，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入 10μL Neutralization Buffer (中和液)，适当混匀。**注：须立刻加入中和液并混匀，否则长时间处于酸性洗脱液中会容易导致一些蛋白失去活性。**

c. 为了获得最大的洗脱效率，可重复步骤 a 和 b，并将相同样品合并。

d. 洗脱并中和的 Flag 标签蛋白及其复合物置于 4°C 待用，或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

注意：

1. 酸性洗脱法虽然高效，但仍可能低于竞争洗脱法或 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

2. 由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响，如果对洗脱效率的要求比较高，可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整，相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整，具体需要自行优化相关实验条件。也可以考虑采用效率可能更高的 3×Flag 竞争洗脱法或效率预期最高的 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法，后者的缺点是在变性条件下进行洗脱，可能会对后续的对于蛋白活性有要求的实验产生影响。

(3) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。本方法为变性法，得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。

a. 每 20μL 原始微珠悬浊液体积，加入 20μL SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)，95°C 加热 5 分钟。

b. 6000 g 在 4°C 或室温离心 30 秒，取上清即可用于 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。

注意：

1. 通常 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液含有 DTT 等还原剂，其洗脱得到的蛋白样品中会含有抗体的轻链和重链。

2. 如果希望获得更大的样品体积，也可以在加入 20μL SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X) 后再补充加入适量的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (1X)。

3. 由于上样缓冲液中的 SDS 会破坏 Flag 抗体，所以洗脱后的微珠不能重复使用。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

