

IPKine™ Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒（磁珠法）

Cat #: KT12014

Size: 20 T/100 T

	Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒（磁珠法）		
REF	货号：KT12014	LOT	批号：见产品标签
	结合能力：≥0.6 mg Flag 标签融合蛋白/mL 磁珠		磁珠浓度：20 mg/mL
	应用：免疫沉淀		
	反应性：哺乳动物、细菌		
	保质期：按各组分标签提示分开存储，保质期 12 个月		

原理

DDDDK-Tag (Flag-Tag, Flag 标签) 小鼠单克隆抗体通过共价键偶联磁珠，可用于免疫沉淀检测和捕获含有 Flag-Tag 序列的融合蛋白，优化后的 Anti-Flag Magnetic Beads 具有更高效的抗原结合能力。根据目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的要求等，本试剂盒提供三种洗脱方法，包括 Flag 多肽竞争洗脱、酸洗脱和 SDS-PAGE Loading Buffer 洗脱方法对目的蛋白进行洗脱。特别是 Flag 多肽洗脱和酸洗脱后不会包含抗体的轻链和重链，可以有效解决免疫沉淀后 Western Blotting 实验中抗体重链和轻链的干扰问题。

包装清单

试剂盒组分		规格		储存条件
		20 T	100 T	
Part 1 of 2	Non-Denaturing Lysis Buffer	20 mL	100 mL	4°C
	TBS (10×)	20 mL	100 mL	4°C
	Anti-Flag Magnetic Beads	0.4 mL	2 mL	4°C，避免冷冻
	Mouse IgG Magnetic Beads	80 µL	400 µL	4°C，避免冷冻
	Elution Buffer	2 mL	10 mL	4°C
	Neutralization Buffer	0.2 mL	1 mL	4°C
Part 2 of 2	3×Flag Peptide (25×)	80 µL	80 µL×5	-20°C
	SDS-PAGE Loading Buffer (5×)	1 mL	2 mL×2	-20°C

自备耗材

- 磁分离架
- 垂直旋转混合仪

- 低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水
- PBS 缓冲液
- 匀浆器（组织样本）

试剂准备

Non-Denaturing Lysis Buffer: 天然蛋白裂解液，用于 IP 样本的提取，即用型；置于冰上待用；4℃保存。

1×TBS: 临用前配制，向 10×TBS 中添加去离子水，将 10×TBS 稀释成 1×TBS；4℃保存。

Anti-Flag Magnetic Beads: 即用型；4℃保存，避免冷冻。

Mouse IgG Magnetic Beads: 即用型；4℃保存，避免冷冻。

Elution Buffer: 即用型；用于非变性的酸洗脱，4℃保存。

Neutralization Buffer: 即用型；用于中和酸洗脱的非变性蛋白，4℃保存。

Working 3×Flag Peptide: 临用前用 1×TBS 将 3×Flag Peptide (25×) 稀释 25 倍，即得到 Working 3×Flag Peptide，置于冰上备用，用于非变性的竞争性洗脱，-20℃保存。

SDS-PAGE Loading Buffer (5×): 即用型；-20℃保存。

注意：（1）蛋白酶抑制剂不是必须加入，可根据实验需求在 Non-Denaturing Lysis Buffer 中分别添加选择不同类型的蛋白酶抑制剂；（2）建议使用低吸附的离心管进行磁珠操作，可减少磁珠粘附离心管壁。在 1×TBS 中添加 0.01%-0.1%(V/V) 的非离子型表面活性剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）也可以有效降低耗材对磁珠的粘附。

实验步骤

A. 蛋白样品的准备

注意：取一定量的制备好的样本作为全细胞裂解液（WCL）用于后续的 Western Blotting 检测。

1. 细胞蛋白提取：

（1）细胞收集（贴壁细胞：10 cm 细胞培养皿中单层细胞长满 80%-90%，吸除细胞培养液，PBS 洗涤 1 次；悬浮细胞：离心收集 5×10^6 个细胞，PBS 洗涤 1 次）。

（2）加 0.5-1 mL 预冷的 Non-Denaturing Lysis Buffer 到细胞中，4℃裂解细胞 5 min，期间用移液枪反复吹打，然后将细胞悬浮液转移到新的离心管中。

（3）12,000 rpm，4℃，离心 10 min，收集上清。

2. 组织蛋白提取：

（1）称取 0.1 g 组织，加入 1 mL Non-Denaturing Lysis Buffer，匀浆器研磨。（若需要提高蛋白浓度，可以适量减少 Non-Denaturing Lysis Buffer 用量）。

（2）将匀浆液转移至新的离心管中，冰上裂解 5 min。

（3）12,000 rpm，4℃，离心 10 min，收集上清。

3. 细菌蛋白提取：

（1）12,000 rpm，4℃，离心 2 min 收集细菌，PBS 洗涤 1 次。

（2）每 1 mL 菌液加 100-200 μ L Non-Denaturing Lysis Buffer 重悬细菌，冰浴超声波破碎细菌 5 min（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次）。

（3）12,000 rpm，4℃，离心 10 min，收集上清。

注意：（1）样品中必须带有 Flag-Tag 的目的蛋白及其复合物；（2）免疫沉淀宜用新鲜的蛋白样品为佳；（3）免疫沉淀实验中不同类型的抗原与抗体间的亲和力是有区别的，抗体与抗原结合还会受到裂解液和缓冲液的影响，如使用 Non-Denaturing Lysis Buffer 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裂解液和缓冲液进行实验。

B. 磁珠准备

注意：按照每 500 μ L 蛋白样品取 20 μ L 的 Anti-Flag Magnetic Beads 的比例，吸取磁珠混悬液。以下实验步骤按照加入 20 μ L 的 Anti-Flag Magnetic Beads 的量，进行具体操作说明。

(1) 将磁珠加入 1.5 mL 离心管中，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清。

(2) 加入 1 mL 1×TBS，重悬 Anti-Flag Magnetic Beads，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清，重复 3 次，用 20 μL 1×TBS 重悬磁珠。

C. 免疫沉淀

(1) 处理好的 Anti-Flag Magnetic Beads 加入 500 μL 蛋白样品，置于垂直旋转混合仪室温下孵育 1-2 h 或 4℃过夜。

注意：a) 建议酌情在部分样品中加入 **Mouse IgG Magnetic Beads** 进行免疫沉淀以作为阴性对照，可排除 IgG 本身和目的蛋白或其它特定生物分子的非特异性结合；b) 对于使用 **Anti-Flag Magnetic Beads** 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 Magnetic Beads** 预处理样品，以消除非特异性吸附，然后再使用 **Anti-Flag Magnetic Beads** 进行免疫沉淀。

(2) 离心管置于磁分离架上，静置 10 s，去除上清。上清液可转移至新的离心管中，用于检测免疫沉淀的效果。

(3) 加入 1 mL 1×TBS，重悬 Anti-Flag Magnetic Beads，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清，重复 3-5 次，直至上清液 OD280 小于 0.05。

(4) 洗脱

a) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测。向离心管中加入 100 μL (5 倍磁珠体积) 1×SDS-PAGE Loading Buffer (用 1×TBS 将 SDS-PAGE Loading Buffer (5×) 稀释 5 倍) 混匀，100℃加热 5 min，然后进行离心，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测分析。

b) 多肽竞争洗脱法：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。向离心管中加入 100 μL (5 倍磁珠体积) Working 3×Flag Peptide 混匀，置于垂直旋转混合仪 4℃孵育 1-2 h，800 rpm，4℃，离心 2 min，吸取上清液，收集洗脱组分，即为 Flag 标签蛋白及其复合物，为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱，Flag 标签蛋白及其复合物置于 4℃待用，-20℃或 -80℃长期保存。可向磁珠沉淀中加入 100 μL 1×SDS-PAGE Loading Buffer，用于检测免疫沉淀及洗脱效果。

c) 酸洗脱法：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。向离心管中加入 100 μL (5 倍磁珠体积) Elution Buffer 混匀，然后在室温下置于垂直旋转混合仪孵育 5-10 min，800 rpm，4℃，离心 2 min，吸取上清液，收集洗脱组分，即为 Flag 标签蛋白及其复合物，收集上清液至新的离心管中，并立即加入 10 μL Neutralization Buffer，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，为了获得最大的洗脱效率，可重复用酸洗脱，并将相同样品合并，Flag 标签蛋白及其复合物置于 4℃待用，-20℃或 -80℃长期保存。可向磁珠沉淀中加入 100 μL 1×SDS-PAGE Loading Buffer，用于检测免疫沉淀及洗脱效果。

注意：a) 对于少数样品，由于目的蛋白的差异，Flag-Tag 与 Flag 抗体的结合力非常强，酸洗脱和多肽竞争洗脱的效果可能比较差，建议优先使用 SDS-PAGE Loading Buffer 变性洗脱法；b) 由于目的蛋白的差异，酸性洗脱法的洗脱效率也会存在一定的差异。

如果对洗脱效率的要求比较高，可对酸性洗脱液的 pH 值在 2.5-3.1 之间进行适当的调整，相应的中和液的 pH 值或量也要进行适当的调整，例如 100 μL 酸洗脱液 (0.1 M Glycine-HCl, pH 2.8) 和 15 μL 中和液 (1 M Tris-HCl, pH 8.5)。

结果展示

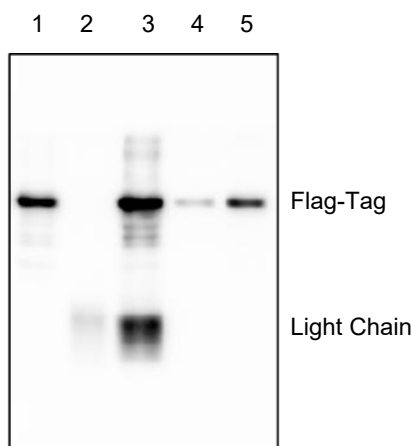


图. Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)用于 Flag-Tag 融合蛋白的免疫沉淀效果图，图中数据仅供参考。

HEK293T 细胞转染 Flag-Tag 质粒 48 h 后，Non-Denaturing Lysis Buffer 裂解细胞，免疫沉淀检测，Western Blotting 一抗选用 Flag 标签小鼠单克隆抗体 (1B10) (货号：ABT2010)，稀释比例 1:5000；二抗选用山羊抗小鼠 IgG 轻链二抗，HRP 标记 (消除重链干扰) (货号：A25012)，稀释比例 1:2000；使用超敏型 ECL 发光液 (飞克级) (货号：BMU102-CN) 显影。Lane 1 为全细胞裂解液 WCL；Lane 2 为 Mouse IgG Magnetic Beads 免疫沉淀后经变性洗脱后的样品；Lane 3 为 Anti-Flag Magnetic Beads 免疫沉淀后经变性洗脱后的样品；Lane 4 为 Anti-Flag Magnetic Beads 免疫沉淀后经酸洗脱后的样品；Lane 5 为 Anti-Flag Magnetic

Beads 免疫沉淀后经 Working 3×Flag Peptide 洗脱后的样品。酸洗脱和多肽洗脱仅含有 Flag-Tag 融合蛋白，不包含抗体重链和轻链。

常见问题

问题	原因	建议解决方案
目的蛋白洗脱量极低	蛋白未完全洗脱	更换洗脱方式
	目的蛋白无表达	通过 WB 或斑点杂交验证确保目的蛋白有表达
	蛋白表达量低	1. 加大样品量 2. 优化表达条件，提高蛋白表达量
	洗涤剧烈	减少洗涤时间或次数
	孵育时间不足	延长孵育时间
	样品中有干扰物质	避免裂解产物中含有可破坏抗体功能的物质，如高浓度 DTT、2-巯基乙醇或其他还原剂
	检测系统问题	如果使用 WB 检测： 1. 用适当的对照品验证一抗、二抗的结合能力及反应性 2. 使用预染蛋白 Marker 或丽春红染色确保转膜充分 3. 使用新鲜的底物或者尝试不同的检测系统
洗脱液中多个蛋白条带	蛋白质与抗体非特异性结合，离心管问题导致洗涤问题	1. 小鼠 IgG 磁珠预处理裂解产物，去除非特异性吸附 2. 磁珠进行最后的洗涤后，将整个样品转移到一个干净的离心管中，再分离
	洗涤不充分	1. 增加洗涤次数 2. 延长洗涤的时间，每次洗涤至少要孵育 15 min 3. 选择其他清洗缓冲液，在清洗液中加入盐或者非离子型去垢剂 4. 低速离心以避免变性蛋白的非特异性捕获
	目的蛋白在室温条件不稳定	低温条件下进行实验，例如 4℃
	实验过程中蛋白酶活性引起的蛋白质降解	裂解液中添加蛋白酶抑制剂

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTD104-CN	通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱（磁珠）
ABT2014	Flag 标签小鼠单克隆抗体（1B10），磁珠偶联

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

