

Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)

产品编号	产品名称	包装
P2202S	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2202M	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次

产品简介:

- 碧云天生产的Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法) (Flag-tag Protein IP Assay Kit with Agarose Gel)是一种通过高特异性的Anti-Flag琼脂糖凝胶进行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琼脂糖凝胶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(如琼脂糖凝胶或磁珠)，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[1-2]。
- Flag标签(Flag-tag)、Myc标签(Myc-tag)、HA标签(HA-tag)、V5标签(V5-tag)、His标签(His-tag)和GST标签(GST-tag)等是表达载体上最常见的一些标签，通过与这些标签的融合表达可以非常方便地检测目的蛋白及与目的蛋白相互结合的蛋白，也可以非常方便地用于目的蛋白的纯化。
- Flag-tag是8个氨基酸残基(DYKDDDDK)组成的多肽，常用的形式有Flag和3X Flag，通过基因重组技术把Flag-tag的核酸序列与目的基因的5'端或3'端连接，就可以最终表达形成Flag-tag的目的蛋白。Flag-tag具有以下优点：Flag-tag通常不会与目的蛋白相互作用，并且大多数情况下不会影响目的蛋白的功能；Flag-tag作为标签蛋白，后续通过Flag抗体(AF519/AF2852)、Anti-Flag磁珠(P2115)或Anti-Flag亲和凝胶(P2271/P2282)即可对目的基因的表达、定位及功能进行检测或对目的蛋白进行纯化、免疫沉淀或免疫共沉淀等；融合在N端的Flag标签，可被肠激酶(Enterokinase, EK)切除(DDDK)，从而得到完美的没有标签的目的蛋白。基于以上优点，Flag标签已被广泛应用于蛋白表达、纯化、鉴定、相互作用和功能等多方面的研究[3]。
- 本试剂盒包含高质量的Anti-Flag Agarose Gel (Anti-Flag琼脂糖凝胶)、Mouse IgG Agarose Gel (小鼠IgG琼脂糖凝胶，作为阴性对照)及优化的各种缓冲液如Lysis Buffer、TBS (10X)、Protease Inhibitor Cocktail (100X)、3X Flag Peptide (25X)、Acid Elution Buffer、Neutralization Buffer、SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)等免疫沉淀必要试剂，使免疫沉淀或免疫共沉淀实验更加简单、便捷、高效。本试剂盒进行免疫沉淀的流程参考图1。

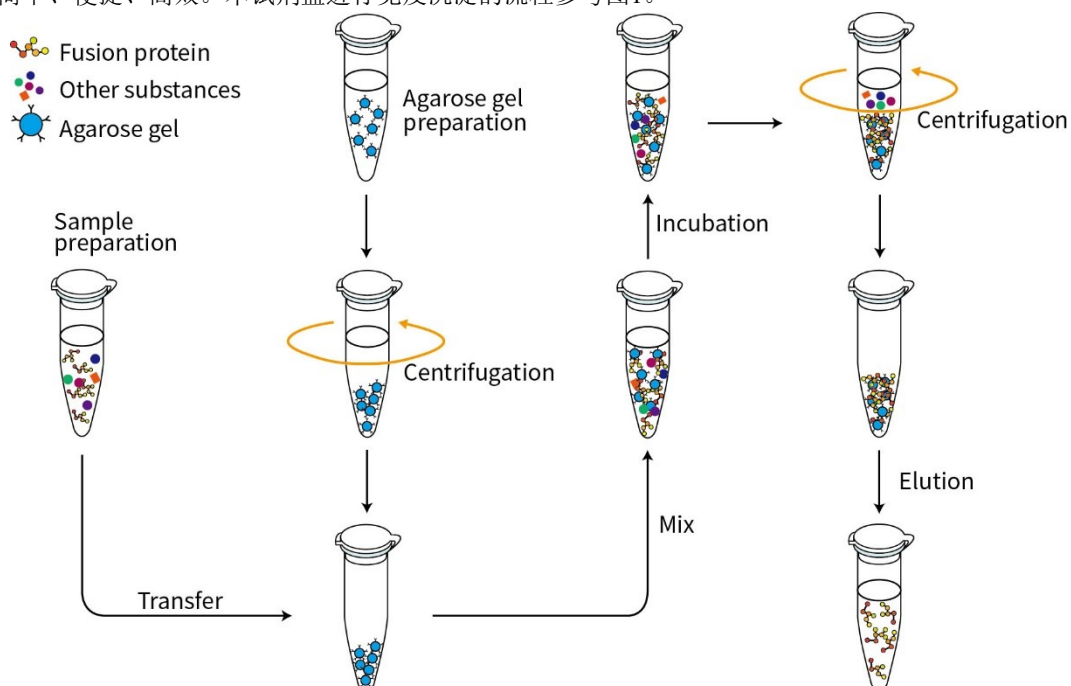


图1. 碧云天Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)的免疫沉淀流程图。

- 本试剂盒中的Anti-Flag Agarose Gel (即Anti-Flag Affinity Gel, 中文名称为Anti-Flag琼脂糖凝胶或Anti-Flag亲和凝胶), 也被称为Anti-DYKDDDDK Agarose Gel/Beads/Resin或者Anti-DYKDDDDK IP Gel/Beads/Resin, 可以特异性地结合Flag标签融合蛋白, 广泛应用于带有Flag标签的融合蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀或纯化等实验。其特点有: (1)较高的融合蛋白结合量、特异性强。每毫升纯凝胶(settled gel)含有约8mg Flag抗体, 可结合约1mg融合蛋白, 且特异性强, 非特异性杂蛋白结合少。(2)可结合多种形式的Flag标签蛋白。Anti-Flag Agarose Gel可特异性地结合甲硫氨酸修饰的N端Flag标签融合蛋白(Met-Flag-Protein)、N端Flag标签融合蛋白(Flag-Protein)、C端Flag标签融合蛋白(Protein-Flag)或中间带有Flag标签的融合蛋白。(3)可重复使用多次, 性价比高。在正常情况下, 本产品用于相同蛋白的纯化时可回收使用3-5次。如果用于免疫共沉淀检测蛋白与蛋白的相互作用, 不推荐重复使用。本试剂盒中Anti-Flag Agarose Gel的主要指标如下表:

Characteristics	Description
Product content	50% settled gel in 50% glycerol with 10 mM phosphate-buffered saline and preservative (pH7.4)
Matrix	4% agarose
Average bead size	90µm
Antibody	Mouse monoclonal antibody against Flag-tag
Isotype	IgG2b
M.W. of antibody	Approximately 150kDa
Antibody concentration	Approximately 8mg Flag antibody per ml settled gel
Binding capacity	Approximately 1mg Flag-tagged protein per ml settled gel
Elution method	Acid, alkaline, neutral, peptide competitive or SDS-PAGE loading buffer elution. Note: If elute with SDS-PAGE loading buffer, the light (~25kDa) and heavy (~50kDa) chain of antibody will be denatured and release from the gel.
Reagent compatibility	Chaotropic reagents will denature the target Flag-tagged protein. Do not exceed 0.3M GuHCl or 1.5M Urea.
Application	Suitable for IP、Co-IP and protein purification.
Storage	-20°C

- 本试剂盒提供三种洗脱方法。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、酸性和SDS-PAGE上样缓冲液洗脱液进行洗脱。特别是Flag多肽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实验中轻链和重链的干扰问题。本试剂盒用于p53和LTA (SV40 Large T antigen)的免疫共沉淀效果参考图2 [4]。

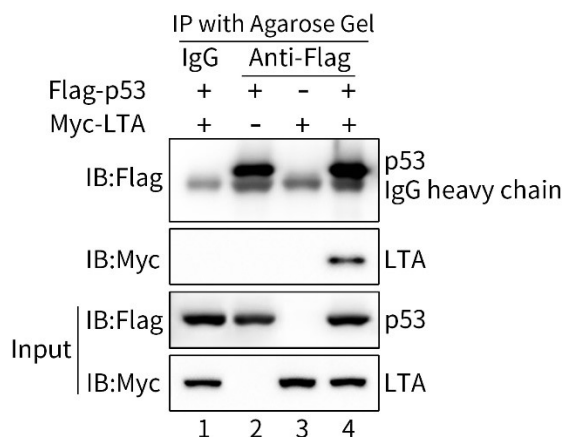


图2. 碧云天Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)用于Flag-p53和Myc-LTA融合蛋白的免疫共沉淀效果图。293T细胞(人胚肾细胞)单独或共转染pCMV-3X Flag-p53 (D3031)、pCMV-Myc-LTA (D3036)质粒36小时后, 使用本试剂盒中的Lysis Buffer裂解。泳道1为Mouse IgG Agarose Gel (小鼠IgG琼脂糖凝胶)免疫沉淀后经本试剂盒提供的SDS-PAGE Sample Loading Buffer洗脱后的样品, 该Mouse IgG是正常的小鼠IgG (Normal Mouse IgG), 为免疫共沉淀的阴性对照; 泳道2、3和4为Anti-Flag Agarose Gel免疫沉淀后, 经本试剂盒提供的SDS-PAGE Sample Loading Buffer洗脱后的样品, 从泳道4可观察到共转染的Flag-p53与Myc-LTA可以相互作用。Input即全细胞裂解液(Total cell lysate)。Western印迹成像由BeyoImager™ 600化学发光成像系统完成(EI600)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供的Anti-Flag Agarose Gel为50%凝胶悬浊液, 包装体积为总体积, 每毫升中含有0.5ml纯凝胶(沉淀物)。对于常规的免疫沉淀实验, 按照每100µl样品使用20µl凝胶悬液, 本试剂盒小包装P2202S和中包装P2202M分别可以进行20次和100次样品的免疫沉淀, 同时分别可以进行4次和20次阴性对照的免疫沉淀。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2202S-1	Lysis Buffer	50ml
P2202S-2	TBS (10X)	5ml
P2202S-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	0.5ml
P2202S-4	Anti-Flag Agarose Gel	0.4ml
P2202S-5	Mouse IgG Agarose Gel	80μl
P2202S-6	3X Flag Peptide (25X)	80μl
P2202S-7	Acid Elution Buffer	2ml
P2202S-8	Neutralization Buffer	0.2ml
P2202S-9	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	0.6ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2202M-1	Lysis Buffer	250ml
P2202M-2	TBS (10X)	15ml
P2202M-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	2.5ml
P2202M-4	Anti-Flag Agarose Gel	2ml
P2202M-5	Mouse IgG Agarose Gel	0.4ml
P2202M-6	3X Flag Peptide (25X)	0.4ml
P2202M-7	Acid Elution Buffer	10ml
P2202M-8	Neutralization Buffer	1ml
P2202M-9	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	3ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。

注意事项：

- 如果免疫沉淀的目的蛋白涉及磷酸化修饰或者乙酰化修饰，需要自备相应的磷酸酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂。推荐选购碧云天的磷酸酶抑制剂混合物A (50X) (P1081/P1082)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。
- 本试剂盒提供的Lysis Buffer经反复测试，适合很多情况下的免疫沉淀或免疫共沉淀时的样品裂解和后续的洗涤。但由于免疫沉淀或免疫共沉淀蛋白样品的复杂性和特殊性，本Lysis Buffer不一定适合所有免疫沉淀样品的裂解与洗涤。在使用本试剂盒提供的Lysis Buffer效果欠佳的情况下，需要自行对于裂解液和洗涤液进行摸索和调整。此时建议根据文献自行配制裂解液和洗涤液，或尝试碧云天的其它适当裂解液：<https://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- Agarose Gel使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。
- Agarose Gel含有微量的防腐剂，不会影响常规的蛋白或蛋白复合物的纯化和免疫沉淀。但如果后续涉及酶活性测定等防腐剂可能产生干扰的实验，使用前宜先用TBS等适当溶液洗涤凝胶3次，以充分消除防腐剂可能产生的干扰。
- 在免疫沉淀时，建议设置阳性和阴性对照组(Mouse IgG Agarose Gel)。本试剂盒中提供适量的阴性对照，更多需求，可以订购碧云天的Mouse IgG Agarose (小鼠IgG琼脂糖凝胶) (P2265)。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。
- 如果离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45μm的滤膜过滤。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 试剂盒的准备。

- a. 参考下表，按照每个样品使用100μl裂解液的比例，准备相关试剂。

Steps	Solution required	Volume per assay
Cell lysis and sample preparation	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100μl
Preparation of 3X Flag Peptide elution buffer and agarose gel	TBS	~1.6ml
Immunoprecipitation	Agarose gel	20μl
Wash (3 times)	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	500μl each time
Peptide competitive elution (optional)	Peptide solution (1X)	100μl

Acid elution and neutralization (optional)	Acid Elution Buffer	100µl
	Neutralization Buffer	10µl
SDS-PAGE sample loading buffer elution (optional)	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	20µl

- b. **含抑制剂裂解液的配制。**参考上表,按照每50-100万细胞使用100-200µl含抑制剂裂解液用于裂解以及300-600µl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10µl 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°C。
- 注1:** 如果免疫沉淀的目的蛋白涉及磷酸化修饰或者乙酰化修饰,需要添加磷酸酶抑制剂或去乙酰化酶抑制剂。推荐使用碧云天的磷酸酶抑制剂混合物A (50X) (P1081/P1082)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。如果有特殊需求,可考虑选择其它适当的抑制剂混合物: <https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。
- 注2:** 本试剂盒提供的Lysis Buffer不仅用于样品裂解,也用于后续的洗涤步骤,请特别注意“注意事项”中的相关描述。
- 注3:** 含抑制剂裂解液宜现用现配,不宜配制后冻存并留作后续使用。如果有特殊需求,可以尝试碧云天的其它多种蛋白酶、磷酸酶和去乙酰化酶抑制剂混合物: <https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。
- c. **TBS的配制。**将TBS (10X)用超纯水稀释至1X,即为TBS。例如1ml TBS (10X)加入9ml超纯水,混匀后即TBS。
- d. **凝胶的准备。**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,尽量形成均匀的凝胶悬浊液,按照通常每100µl中加入20µl混合均匀的凝胶悬浊液(以下免疫沉淀步骤中都以每样加入20µl凝胶悬浊液为例),取适量Anti-Flag Agarose Gel至一洁净离心管中(FTUB015),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)吸取凝胶悬浊液会比较方便。
- (b) 轻轻重悬Anti-Flag Agarose Gel, 6000×g在4°C离心30秒,小心去除上清,不要吸到凝胶。重复上述步骤两次。
注: 由于抗体偶联的特殊性,凝胶中微量抗体的脱落或残留不可避免,所以凝胶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。
- (c) 按照初始的凝胶悬浊液的体积,用1X TBS重悬Anti-Flag Agarose Gel。
- e. **3X Flag多肽洗脱液的配制。**将3X Flag Peptide (25X)用TBS稀释25倍即为3X Flag多肽洗脱液,如将10µl 3X Flag Peptide (25X)加入240µl TBS中混匀即可。配制好的3X Flag多肽洗脱液宜放置在冰浴或4°C。本3X Flag Peptide (25X)经过优化,适用于大多数洗脱,如果标签蛋白丰度高,也可以仅稀释10倍。如需更多的3X Flag多肽,可订购碧云天的3X Flag Peptide (3X Flag多肽) (P9801)。
- f. **(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,但冻融可能会影响蛋白与蛋白的相互作用。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,注意取一定量作为Input或Total,以用于后续的Western等检测。
- a. **悬浮细胞的样品裂解和准备。**250-1000×g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vortex或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照每50-100万细胞加入100-200µl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。如果细胞量较多,建议分装成50-100万细胞/管,然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分,而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触,相对比较容易裂解充分。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。**注:** 裂解后会出现少量不溶性物质,主要为基因组DNA等,离心后会产生沉淀物。
- b. **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50-100万细胞(相当于6孔板的一个孔)加入100-200µl的含抑制剂裂解液,适当吹打,使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞1-2秒后,细胞就会被裂解。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。**注:** 裂解后会出现少量不溶性物质,主要为基因组DNA等,离心后会产生沉淀物。
- c. **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,如有必要,可以使用PBS洗涤一次,然后吸净残留的液体。轻轻vortex或者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vortex或者弹击管底以混匀,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。**注:** 裂解后很可能会出现少量不溶性物质,主要为基因组DNA等,离心后会产生沉淀物。
- d. **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,或使用碧云天生产的TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或TissueMaster™高通量组织研磨

仪(1.5/2ml×48) (E6618)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, 其蛋白浓度约为15-25mg/ml, 不同状态的不同组织有所不同。**注:**裂解后很可能出现少量不溶性物质, 主要为基因组DNA等, 离心后会产生沉淀物。

3. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)。

a. **加入凝胶与孵育。**按照每100µl蛋白样品加入20µl凝胶悬浊液的比例加入凝胶, 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。

注2:对于使用Anti-Flag Agarose Gel进行免疫沉淀后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。Mouse IgG Agarose Gel用于进行预免疫沉淀时用量比较多, 需要另行订购。

b. **离心分离。**孵育完毕后, 6000×g在4°C离心30秒, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。**注:**可保留部分上清液, 用于检测免疫沉淀的效果。

c. **洗涤。**加入0.5ml含抑制剂裂解液, 重悬凝胶。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, 不要吸到凝胶。重复使用含抑制剂裂解液洗涤三次。**注:**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。

a. **3X 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原始凝胶悬浊液体积, 加入100µl 3X 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。3X Flag多肽洗脱液体积一般为凝胶悬浊液的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。

b. **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原始凝胶悬浊液体积, 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凝胶悬浊液的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。

注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3X 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。

c. **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原始凝胶悬浊液体积, 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。

注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)。

注3:由于上样缓冲液中的SDS会破坏Flag抗体, 所以洗脱后的凝胶不能重复使用。

常见问题:

Problem	Possible Causes	Solution
Very few or no tagged protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	Change elution methods.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the tagged protein by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	Reduce the time and number of washes.
	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation time.
	Interfering substance is present in sample.	Lysates containing high concentration of DTT, 2-mercaptoethanol, or other reducing agents may destroy antibody function, and must be

		avoided.
	Detection system is inadequate.	If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity. 2. Verify that the transfer was adequate by using prestained protein marker or staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.
Background is too high.	Proteins bind nonspecifically to the monoclonal antibody, insufficient washing on agarose gel, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Mouse IgG Agarose (P2265) to remove nonspecific binding proteins. 2. After suspending beads for the final wash, transfer entire sample to a clean microcentrifuge tube before centrifugation.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Choose other wash buffers. Increase the salt and/or detergent concentrations in the wash solutions. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins.
Multiple protein bands found in the eluate.	The protein is not stable at room temperature.	Purify the target protein at lower temperature, such as 4°C.
	Protein degradation due to proteases activity during purification process.	Add protease inhibitors to cell lysate.
	Non-specific binding.	1. Prepare cell lysate again. 2. Add additional wash steps.

参考文献:

1. Lee C. Methods Mol Biol. 2007. 362:401-406.
2. Gevaert K, Vandekerckhove J. Electrophoresis. 2000. 21:1145-1154.
3. Brizzard B L, Chubet R G, Vizard D L, BioTechniques. 1994. 16(4):730-5.
4. Bargonetti J, Reynisdóttir I, Friedman PN, Prives C. Genes Dev. 1992. 6(10):1886-98.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2175S	免疫沉淀试剂盒(Protein A磁珠法)	20-100次
P2175M	免疫沉淀试剂盒(Protein A磁珠法)	100-500次
P2177S	免疫沉淀试剂盒(Protein G磁珠法)	20-100次
P2177M	免疫沉淀试剂盒(Protein G磁珠法)	100-500次
P2179S	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)	20-100次
P2179M	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)	100-500次
P2181S	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2181M	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2183S	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2183M	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2185S	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2185M	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2187S	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2187M	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2193S	免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)	20次
P2193M	免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)	100次
P2195S	免疫沉淀试剂盒(Protein G琼脂糖凝胶法)	20次
P2195M	免疫沉淀试剂盒(Protein G琼脂糖凝胶法)	100次
P2197S	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G琼脂糖凝胶法)	20次
P2197M	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G琼脂糖凝胶法)	100次
P2202S	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2202M	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次
P2204S	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2204M	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次

P2206S	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2206M	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次
P2208S	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2208M	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次

Version 2022.01.13