

Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 免疫 (共) 沉淀试剂盒 (G2)

包装清单

名称	货号	包装
Anti-DYKDDDDK 免疫 (共) 沉淀试剂盒 (G2)	IK-1103	40T/Kit

产品概述

Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 免疫 (共) 沉淀试剂盒 (G2)，包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25 μ L 磁珠。能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验。

试剂盒中提供 Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 磁珠 (G2) 可以实现快速便捷的抗原磁性分离。免疫 (共) 沉淀试剂盒配有经过优化预制的缓冲液，为免疫沉淀实验提供了最佳的反应条件，增强了免疫沉淀实验的稳定性。本产品可广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀反应。

试剂盒组成:

Anti-DYKDDDDK 磁珠 (G2)	1 mL
IP Lysis/Wash Buffer	100 mL
SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5 \times)	10 mL
Phosphatase inhibitor cocktail (50 \times)	2 mL
PMSF (100 \times)	1 mL
Elution Buffer	5 mL
Neutralization Buffer	1 mL
磁力架	双排 16 孔

操作流程

贴壁细胞样品：

1. 移去培养基，用 PBS 洗细胞两次。
2. 收集细胞至 1.5mL EP 管内，按比例加入 IP Lysis/Wash Buffer，同时加入 PMSF 等相应的抑制剂，混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
3. 4 $^{\circ}$ C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验 (或置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存)。

培养皿 IP Lysis/Wash Buffer 推荐使用体积：

培养皿大小/表面积	IP Lysis/Wash Buffer 体积
100 mm x 100 mm	500~1000 μ L
100 mm x 60 mm	100~300 μ L
6 孔板	100~200 μ L

悬浮细胞样品：

1. 4 $^{\circ}$ C、500~1000xg、10min，收集细胞，弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次，即用 PBS 将细胞团重悬，4 $^{\circ}$ C、500~1000xg、5min，收集细胞，弃上清。
3. 用预冷的 IP Lysis/Wash Buffer 重悬细胞。每 50mg 细胞使用 500 μ L IP Lysis/Wash Buffer。同时加入 PMSF 等相应的抑制剂，混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
4. 4 $^{\circ}$ C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验 (或置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存)。

血清样品：

一般建议用 IP Lysis/Wash Buffer 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50~150 μ g/mL，置于冰上备用 (或置于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存)。

免疫沉淀：

注意：为保证磁珠均匀分布，使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中磁珠。

1. 将 25 μ L (0.25mg) 的 Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 磁珠 (G2) 加入 1.5mL 离心管中。
2. 向磁珠中加入 500 μ L 预冷 PBS，轻柔混匀。
3. 将离心管放入磁力架中收集磁珠到离心管的一边。去除上清。
4. 向离心管中加入 200~500 μ L IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。用磁力架收集磁珠。去除上清。
5. 将含有 DYKDDDDK 标签标记的蛋白样品加入装有磁珠的离心管中，保持混匀室温下孵育 1~2h，或 4 $^{\circ}$ C 2~4h。
6. 用磁力架收集磁珠，除去未结合的样品，保存以备分析。
7. 向离心管中加入 1000 μ L IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀磁珠 5~10min。收集磁珠，弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱：**向离心管中加入 80~100 μ L SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1 \times)，将样品置于 100 $^{\circ}$ C 水浴或者金属浴中加热 10min。通过磁力架分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。

备注：如需保持蛋白活性，也可采用以下洗脱方式。

低 pH 洗脱：向离心管中加入 100 μ L Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过磁力分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。每 100 μ L 洗出液中加入 20 μ L Neutralization Buffer 来中和低 pH。

注意事项

1. 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
2. 请勿高速离心、干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
3. IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 IP Lysis/Wash Buffer 的影响，因此**可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。**
4. 磁珠使用前应充分振荡均匀。磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
5. **低温运输**：Anti-DYKDDDDK 磁珠（G2）、IP Lysis/Wash Buffer、Elution Buffer、Neutralization Buffer 于 **4℃保存**，PMSF、Phosphatase inhibitor cocktail、SDS-PAGE Sample Loading Buffer 于 **-20℃保存**。
6. 本产品仅供科学研究使用。

相关产品

货号	产品名称
IK-1011	Anti-DYKDDDDK 免疫（共）沉淀试剂盒
IK-1013	Anti-DYKDDDDK 免疫（共）沉淀试剂盒（凝胶法）
IK-1103	Anti-DYKDDDDK 免疫（共）沉淀试剂盒（G2）
IK-1109	Anti-DYKDDDDK 免疫（共）沉淀试剂盒（G2 凝胶法）
IK-1303	Anti-DYKDDDDK 免疫（共）沉淀试剂盒（Magarose）

问题解决

1. 抗原没有免疫沉淀下来

- ① 样品中所含的抗原过少，不足以被检测
建议：通过 SDS-PAGE 或蛋白免疫印迹验证裂解液中蛋白的表达和/或裂解效率；如果需要，加大样品量
- ② IP Lysis/Wash Buffer 中的成分干扰了抗原与抗体的结合
建议：使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（例如，含有 0.5% CHAPS 的 TBS）

2. 获得的蛋白量低

- ① 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂
- ② 所使用的磁珠量不够
建议：提高捕获免疫复合物所使用的磁珠量
- ③ 样品中的目标蛋白量不够
建议：提高抗原样品量

3. 多条非特异条带

有非特异性的蛋白结合在磁珠上

建议：在 IP Lysis/Wash Buffer 中加入 50~350mM NaCl。加大洗脱力度和次数。

4. 磁珠聚集

磁珠在低 pH 的 Elution Buffer 中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。

建议：用 IP Lysis/Wash Buffer 至中性，然后用含有 0.1% (v/v) Tween-20 的 Tris buffer (pH7.5) 振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理，即可使磁珠恢复均匀状态，以上处理均不影响磁珠的抗体结合效率。也可添加终浓度为 0.1% (v/v) 的非离子型去垢剂（如 Tween-20 或 Triton X-100）可有效防止磁珠聚集。

注意：超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。