

#M20038

Anti-Flag Tag mAb Agarose conjugated

(避重轻链特制款)

- 500ul
- 1 mL



Order	021-34695924 orders@ab-mart.com
Support	400-6123-828 support1@ab-mart.com
Web	www.abmart.cn

产品描述

本产品是特别制备的 Flag Tag beads 产品，使用该产品进行 IP 实验，在后续的 IP-WB 步骤中，可以完全避免抗体轻重链的条带出现。本产品可以识别带有 Flag tag 以及 3 × Flag tag 的融合蛋白或者细胞裂解液。

Flag Tag 序列: DYKDDDK。

产品储存

储存于 4° C，禁止冻存。保质期 12 个月。

使用指南

1. 收集细胞:

对于一个免疫共沉淀反应，推荐使用 10^6 - 10^7 个表达 Flag 融合蛋白的哺乳动物细胞。服出培养液，加 1ml 预冷 PBS 于细胞中并刮下细胞，之后将细胞转入预冷管中。4°C，500g 离心 3 分钟，弃上清液。用预冷 PBS 洗两遍细胞沉淀物。

2. 裂解细胞:

(1) 用 500μl 预冷的 Lysis buffer (RIPA 或者 NP40) 重悬细胞。

注: 在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂 (推荐使用 cocktail 类型的蛋白酶抑制剂, 货号 A10004: 200X 蛋白酶抑制剂复合物)

(2) 将离心管放在冰上 30 分钟, 每 10 分钟重悬一次细胞。(建议超声 1-2 次)

注: 在这步细胞溶解物可放入-80°C 保存。

3. 平衡 beads: 涡旋 anti-Flag Agarose, 吸取 25μl anti-Flag Agarose 至预冷 500μl Lysis buffer 中, 3000rpm/1200g, 4°C 离心 2 分钟, 去掉上清, 重复一次。

4. 结合蛋白:

(1) 将裂解获得的细胞蛋白提取液加入平衡后的 anti-Flag Agarose 中 (建议取 50μl 上清液作为 input 对照用于免疫印迹分析), 在 4°C 环境中上下颠倒孵育 3-4 小时。

(2) 3000rpm/1200g, 4°C 离心 2 分钟, 去掉上清。

5. 洗 anti-Flag Agarose: 重悬 beads 于 500μl 预冷的 PBST 溶解液中, 1200g, 4°C 离心 2 分钟, 去掉上清, 重复 3 次。

注: 如果非特异结合比较多, 可以在 PBST 中增加 NaCl 浓度到 200-500mM。

6. 洗脱结合蛋白:

- (1) 100 μ l SDS loading buffer 重悬 anti-Flag Agarose。
- (2) 将 Agarose 在 95 $^{\circ}$ C 中加热 10 分钟, 使免疫复合物分离出来。3000rpm/1200g, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 分钟, 取上清跑 SDS-PAGE。
- (3) 如果后续 IP 产物需要进行质谱鉴定, 可以使用以下方法来替代步骤 (1) 和 (2): 加 100-200 μ l 0.2M, PH2.5 的甘氨酸-盐酸(含有 0.2%的 SDS), 重悬 Agarose, 保持混匀状态孵育 30s, 3000rpm/1200g, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 分钟。将上清转移至新的离心管中, 加入 10-20 μ l 1M PH10.4 的 Tris base 中和。

IP 实验结果

