

## Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 琼脂糖凝胶

### 包装清单

名称	货号	包装
Anti-DYKDDDDK	L-1013	1mL
琼脂糖凝胶	L-1013A	5mL

### 产品概述

Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 琼脂糖凝胶是以自制的琼脂糖凝胶为介质,以高质量的鼠源抗 Flag 单克隆抗体为配体,具有很高的物理化学稳定性,配基不易脱落,寿命长,使用方便。本产品广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中带有 DYKDDDDK 标签融合蛋白的免疫沉淀 (IP) 或免疫共沉淀 (Co-IP),也可以用于 DYKDDDDK 标签融合蛋白的纯化。

### 产品特性

基质	4%高度交联的琼脂糖凝胶
配体	鼠源抗 DYKDDDDK 单克隆抗体
粒径	30~100 $\mu$ m
浓度	50% (v/v)
结合能力	$\geq 1.0$ mg DYKDDDDK 标签蛋白/mL 凝胶
适用范围	IP, Co-IP, DYKDDDDK 标签蛋白纯化
保质期	在 2~8℃稳定保存两年

### 操作流程

**注意：缓冲液自行准备或直接购买我司 IP 试剂盒。**

#### 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℃, 12000~16000xg,10min 离心收集上清液,置于冰上以备后续实验 (或置于-80℃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 $\mu$ L
100 mm x 60 mm	100~300 $\mu$ L
6 孔板	100~200 $\mu$ L

#### 悬浮细胞样品：

1. 4℃、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℃、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 $\mu$ 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℃,12000~16000xg,10min 离心收集上清液,置于冰上以备后续实验 (或置于-80℃长期保存)。

#### 血清样品：

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

#### 免疫沉淀：

**注意：为保证凝胶均匀分布,使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中凝胶。**

1. 将 20~50 $\mu$ L 的 Biolinkedin® Anti-DYKDDDDK 琼脂糖凝胶加入 1.5mL 离心管中。
2. 向凝胶中加入 500 $\mu$ L 预冷 PBS,轻柔混匀。
3. 将离心管放入离心机中 1000rpm、5min 收集凝胶到离心管的底部,去除上清。
4. 向离心管中加入 200~500 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。将离心管放入离心机中 1000rpm,5min 收集凝胶到离心管的底部,去除上清。
5. 将制备好含有 DYKDDDDK 标签标记的蛋白样品加入装有凝胶的离心管中,保持混匀室温下孵育 1~2h,或 4℃ 2~4h。
6. 离心 1000rpm,5min 收集凝胶,除去未结合的样品,保存以备分析。
7. 向离心管中加入 1000 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer,轻柔混匀 5~10min。收集凝胶,弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱：**向离心管中加入 80~100 $\mu$ L SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1 $\times$ ),将样品置于 100℃水浴或者金属浴中加热 10min。通过离心分离凝胶,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 100μL Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过离心分离凝胶，保留含有目的抗原的上清。每 100μL 洗出液中加入 20μL 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. 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。**
3. 琼脂糖凝胶使用前应充分振荡均匀。凝胶应保存在储存溶液中，防止干燥。
4. 本产品仅供科学研究使用。

### 相关产品

货号	产品名称
L-1009	Anti-HA 磁珠
L-1010	Anti-Myc 磁珠
L-1011	Anti-DYKDDDDK 磁珠
<b>L-1013</b>	<b>Anti-DYKDDDDK 琼脂糖凝胶</b>
L-1014	Anti-GST 磁珠
L-1015	Anti-His 磁珠
L-1016	Anti-GFP 磁珠

### 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 所使用的凝胶量不够  
**建议：**提高捕获免疫复合物所使用的凝胶量
- 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凝胶上  
**建议：**在 IP Lysis/Wash Buffer 中加入 50~350mM NaCl。加大洗脱力度和次数。

#### 4. 凝胶易粘附管壁

**建议：**使用低吸附率的耗材进行凝胶操作。