

# 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	30~100μm
浓度	50% ( v/v )
结合能力	≥1.0mg 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°C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：

- 移去培养基，用 PBS 洗细胞两次。
- 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)。
- 4°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°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	500~1000μL
100 mm x 60 mm	100~300μL
6 孔板	100~200μL

### 悬浮细胞样品：

- 4°C、500~1000xg、10min，收集细胞，弃上清。
- 用 PBS 洗细胞一次，即用 PBS 将细胞团重悬，4°C、500~1000xg、5min，收集细胞，弃上清。
- 用预冷的 IP Lysis/Wash Buffer 重悬细胞。每 50mg 细胞使用 500μL 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°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°C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 50~150μg/mL，置于冰上备用 (或置于-20°C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。

- 将 20~50μL 的 BiolinkedIn® Anti-DYKDDDDK 琼脂糖凝胶加入 1.5mL 离心管中。
- 向凝胶中加入 500μL 预冷 PBS，轻柔混匀。
- 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。
- 向离心管中加入 200~500μL 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。
- 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°C 2~4h。
- 离心 1000rpm，5min 收集凝胶，除去未结合的样品，保存以备分析。
- 向离心管中加入 1000μL IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀 5~10min。收集凝胶，弃上清。再重复洗两次。
- 变性洗脱：**向离心管中加入 80~100μL SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1×)，将样品置于 100°C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。