

# ChainFree<sup>®</sup> Flag 标签 Co-IP 试剂盒 (动物)

## ChainFree<sup>®</sup> DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) Co-IP Kit

### 产品信息

货号	产品名称	规格
FI8801-12T	ChainFree <sup>®</sup> DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) Co-IP Kit	12 次
FI8801-24T	ChainFree <sup>®</sup> DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) Co-IP Kit	24 次

### 产品描述

本试剂盒采用 ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠来完成 Flag 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白的免疫共沉淀实验。

ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 抗体，所以 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前先将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。裂解样本后，将 ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠加入样本中，磁珠上偶联的 Flag 抗体与 Flag 标签融合蛋白及其结合蛋白形成复合体，去除未结合的蛋白后，可以采用多种方法洗脱蛋白质。

### 试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	ChainFree <sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	25 mL	50 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	650 $\mu$ L	1.3 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 $\mu$ L	380 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	10 mL 离心管	1 个	1 个	—

**\*注意：**该试剂盒包含足够完成 12 或 24 个反应的试剂，每个反应使用 20  $\mu$ L 磁珠。由于每次 IP 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

### 额外所需材料

1. 自备试剂：Flag 抗体（用于 Western-Blot 检测，辉骏产品货号 FI01104）、PBS。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 FI7101）、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

## 使用说明

### I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### II 操作步骤

#### 1. 总蛋白提取

##### 1.1 动物细胞

- (1) 实验组和对照组分别取  $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$  个细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；
- (2) 将样本管置于冰上，每组加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- (5) 取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或 -80°C 保存。

##### 1.2 动物组织

- (1) 采用预冷的 PBS 清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作；
- (2) 实验组和对照组分别取 0.1~0.2 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，再转移粉末到预冷的新离心管中；
- (3) 将样本管置于冰上，每组加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- (5) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- (6) 取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或 -80°C 保存。

#### \*注意：

- i. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。
- ii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

## 2. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑥10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③漂洗液、19  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂（按照 0.5%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

## 3. 免疫共沉淀

- (1) 将①ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20  $\mu$ L 磁珠到新的离心管中；
- (2) 每组加入 200  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作一次；
- (4) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜；
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (6) 每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 重复上步操作两次，共漂洗三次；

## 4. 蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

- (1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50  $\mu$ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- (2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50  $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95  $^{\circ}$ C 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

**\* 注意：** i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱，辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。

ii. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。

iii. Co-IP 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤参考如下：

（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）

- (1) 固定：30 min（乙醇：乙酸：水=4：1：5 体积比）；
- (2) 敏化：30 min（乙酸钠 10.2 g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45 mL，加水至 150 mL）；
- (3) 水洗：4 次，每次 10 min；
- (4) 银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150 mL）；
- (5) 水洗：2 次，每次 40 s；
- (6) 显色：显影至条带清楚（碳酸钠 3.75 g，60  $\mu$ L 甲醛，加水至 150 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

## 问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的诱饵蛋白量少	蛋白质降解	裂解液中应加入足量的蛋白酶抑制剂
	样品中的目标蛋白量不够	提高样本用量或改进裂解方法
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量或改进裂解方法
	孵育时间不够	延长孵育时间（如 4℃ 孵育过夜）
	洗脱条件过于温和	延长洗脱液孵育时间至 15 min
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数
	孵育时间太长	缩短孵育时间（如室温孵育 1~2 h）

## 使用案例

实验目标：检测样本中的诱饵蛋白与猎物蛋白之间是否有相互作用。

- (1) 实验组：表达 Flag-诱饵蛋白和猎物蛋白的样本采用 ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠进行 Co-IP 实验；
- (2) 对照组：表达 Flag 空载体和猎物蛋白的样本采用 ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠进行 Co-IP 实验。

