

## Anti-DYKDDDDK IP/Co-IP Kit (Magnetic Beads)

Cat# PM1011

### 产品概述

Anti-DYKDDDDK 免疫（共）沉淀试剂盒，包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25 $\mu$ 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。Anti-DYKDDDDK 磁珠是粒径为 200nm 的纳米磁珠表面上共价结合了大量的高质量的鼠源抗 DYKDDDDK 单克隆抗体，纳米级磁珠提供的超大比表面积，具有更多的结合位点，磁珠使用量更少，非特异性吸附率低。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）。由于采用磁性分离，使得每次 IP 和 Co-IP 可以节省 40% 的时间。

试剂盒中提供 Anti-DYKDDDDK 磁珠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（IP）或免疫共沉淀（Co-IP）。

### 产品/组分信息

类别	组分编号	产品组成	PM1011-40T
Part I	PM1011-40T-1	Anti-DYKDDDDK Magnetic Beads	1 mL
	PM1011-40T-2	IP Lysis / Wash Buffer	100 mL
	PM1011-40T-6	Elution Buffer	5 mL
	PM1011-40T-7	Neutralization Buffer	1 mL
Part II	PM1011-40T-3	5 $\times$ SDS-PAGE Sample Loading Buffer	10 mL
	PM1011-40T-4	50 $\times$ Phosphatase Inhibitor Cocktail	2 mL
	PM1011-40T-5	100 $\times$ PMSF	1 mL

### 储存方式

Part I 组分于 2~8  $^{\circ}$ C 保存；

Part II 组分于 -25~-15  $^{\circ}$ C 保存。

### 使用说明

#### 注意事项

- 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。
- 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。
- 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。
- 本产品仅供科学研究使用。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

## 操作步骤

### 细胞样品的制备

#### 1. 贴壁细胞样品

- 1.1 移去培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次，按比例加入 IP Lysis/Wash Buffer（注意添加 1mM PMSF 等相应的抑制剂）裂解细胞，混匀后置于冰上静置 5~20 min（期间混匀几次），使细胞充分裂解（也可通过超声充分裂解细胞，30 s on, 10 s off, 振幅设定 35%，2-3 个循环）。
- 1.2 4℃、12,000rpm、15 min 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）。
- 1.3 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 × 100 mm	500~1,000 $\mu$ L
100 mm × 60 mm	100~300 $\mu$ L
6 孔板	100~200 $\mu$ L

#### 2. 悬浮细胞样品

- 2.1 4℃、1000 g、3min，离心收集细胞，弃上清。
- 2.2 用 PBS 洗细胞 1 次，4℃、500~1,000 g、5min，弃上清。
- 2.3 用预冷的 IP Lysis / Wash Buffer 重悬细胞，每 50 mg 细胞使用 500 $\mu$ L IP Lysis / Wash Buffer（注意添加 1mM PMSF 等相应的抑制剂）裂解细胞，混匀后置于冰上静置 5~20 min（期间混匀 2~3 次），使细胞充分裂解（可通过超声充分裂解细胞，30 s on, 10 s off, 振幅设定 35%，2-3 个循环）。
- 2.4 4℃、12000rpm、15min 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）。

#### 3. 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  $\mu$ g/mL，置于冰上备用（或置于-20℃长期保存）。

### 免疫沉淀

【注】：为保证磁珠均匀分布，使用前涡旋振荡 1 min，使其充分混匀。

1. 将 20~50  $\mu$ L 的 Anti-DYKDDDDK Beads 加入 1.5 mL 离心管中，加入 500  $\mu$ L 预冷的 PBS，轻柔混匀，将离心管放入磁力架中，使磁珠吸附到离心管的一侧，用移液器吸取并弃上清。
2. 向离心管中加入 200~500  $\mu$ L IP Lysis / Wash Buffer，轻微涡旋混匀 1 min，用磁力架收集磁珠，弃上清，重复 1 次。
3. 将含有 DYKDDDDK 标签标记的蛋白样品加入装有磁珠的离心管中，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪翻转孵育 10min，使抗原和抗体充分结合，如结合能力较弱则可在室温反应 1~2h 或 4℃孵育 2~4h。
4. 孵育完毕后，用磁力架收集磁珠，弃上清（可保留部分上清，用于检测免疫沉淀的效果）。向离心管中加入 1000  $\mu$ L IP Lysis / Wash Buffer，轻柔混匀磁珠 5~10min。将离心管放入磁力架中 15 sec，收集磁珠，弃上清，重复洗涤 3 次。可通过检测洗涤得到的洗涤液的 OD<sub>280</sub> 来判断是否洗涤完全，若 OD<sub>280</sub> 大于 0.05，需要适当增加洗涤次数。
5. 变性洗脱：向离心管中加入 80~100  $\mu$ L SDS-PAGE Loading Buffer (1 $\times$ ) 混合均匀，煮沸 10 min。将离心管放入磁力架中去除磁珠，保留含有目的抗原的上清，Western blotting 检测沉淀及共沉淀蛋白质。

【注】：如需保持蛋白活性，也可采用低 pH 洗脱：向离心管中加入 100 $\mu$ L Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育 10min。用磁力架吸附磁珠，收集洗脱液至新的 EP 管中。每 100  $\mu$ L 洗出液中加入 20  $\mu$ L Neutralization Buffer 来中和低 pH 至 7.0-8.0。

## Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: [www.cytoch.com](http://www.cytoch.com).

Or contact us by:

E-mail: [support@cytoch.com](mailto:support@cytoch.com)

Tel: 400-969-8881

For research use only.

**CYTOCH**