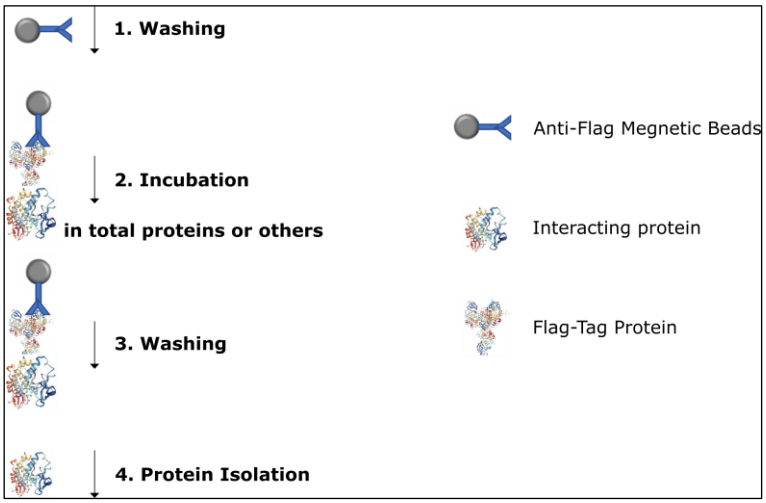
Waals™ Flag-Tag Protein-Protein Enrichment Kit

操作说明

- **描　述:** Waals™ Flag-Tag Protein-Protein Enrichment Kit，包含 Waals™ Anti-Flag Magnetic Beads, Waals™ Protein IP Lysis Buffer, Wash Buffer，Elution Buffer，Neutralization Buffer。
- **试剂盒储存:** Waals™ Flag-Tag Protein-Protein Enrichment Kit，4℃储存（勿冷冻）。
- **介　绍**

细胞中存在大量蛋白-蛋白复合物，它们的相互作用发挥重要的生物学功能。Waals™ Flag-Tag Protein-Protein Enrichment Kit 提供 Anti-Flag 磁珠，可稳定结合融合表达 Flag 的蛋白质 (Flag-Tag 蛋白)，从复杂的组分中分离与 Flag-Tag 蛋白相互作用的蛋白质，后续可进行 WB、质谱等检测。

操作流程



Protein IP 实验流程图

操作步骤

■ 细胞裂解及注意事项

1. 悬浮细胞：收集细胞（4℃，500×g，10 分钟），每 1×10^7 个细胞加入 500μL Protein IP Lysis Buffer（在使用前需加入蛋白酶抑制剂），置于冰上 10 分钟，期间混匀几次；离心收集上清液（4℃，14000 g，10 分钟），置冰上备用或置-80℃长期保存。
2. 贴壁细胞：弃掉培养基，PBS 洗 2 次；每 1.0×10^7 个细胞加入 10mL PBS，将培养瓶或皿置于冰上，用细胞刮刮取细胞，离心收集细胞（4℃，14000 g，10 分钟）；500μL Protein IP Lysis Buffer（在使用前需加入蛋白酶抑制剂），离心收集上清液（4℃，14000 g，10 分钟），置冰上备用或置-80℃长期保存。

■ 磁珠准备

1. 重悬 Anti-Flag 磁珠，吸取 50 μL 至 1.5 mL EP 管中。
2. 将离心管置于磁分离器上，收集磁珠并弃掉上清液。
3. 将离心管从磁分离器上取出，加入 500 μL 洗涤缓冲液，充分混悬，置于磁分离器上磁性分离，弃上清。重复以上洗涤步骤 2 次。

■ Protein IP

1. 将离心管从磁分离器上取出，加入 500 μL 细胞裂解液，温和混匀，旋转孵育室温 2 小时或 4℃过夜。
2. 将离心管置于磁分离器上，收集磁珠，弃上清。
3. 加入 500μL 洗涤缓冲液，温和混匀。
4. 将离心管置于磁分离器上，收集磁珠，弃掉上清。

5. 重复步骤 3 和 4 两次。【注】最后一次上清液可用于后续分析是否洗净。

■ **Protein Isolation**

【注】以下两种洗脱方案可据检测的需要选择：

1. 变性洗脱：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测：

1) 加入 25μL 1×SDS-PAGE Loading Buffer 于离心管中，混匀，95℃ 加热 5 分钟。

2) 将离心管置于磁分离器上，收集上清至新的离心管，-20℃保存。

3) SDS-PAGE 检测。

2. 酸性洗脱：此方法洗脱的样品可保持生物活性：

1) 加入 25μL 的洗脱缓冲液，充分均匀，室温孵育 10 分钟。

2) 将离心管置于磁分离器上，收集上清至新的离心管，立即加入 2.5μL 中和缓冲液，-80℃保存。

■ **注意事项**

1. 本产品需放置 4 度保存，禁止冷冻。

2. 本产品应避免禁止长时间置于磁场，可能会引起磁珠聚团，操作过程应轻柔，避免抗体脱落。

3. 使用本产品进行 IP 实验前，需先确认样品中 Flag 标签融合蛋白的表达情况。

5. 不要使用含有 Dithiothreitol (DTT) 的细胞裂解液样品，DTT 可能会引起磁珠上的 Flag 抗体脱落。

6. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。