

Anti-DDDDK-tagmAb

目录号: ANT301/ANT301L

规格: 100ul/200ul (1mg/ml)

储存: -20°C

同型: Mouse IgG2aκ

应用: WB,IP,ICC,FCM,IP

来源: Purified IgG from hybridoma supernatant

特异性: This antibody reacts with N-terminal, Internal and C-terminal DDDDK-tagged(DYKDDDDK)proteins.

稀释比:

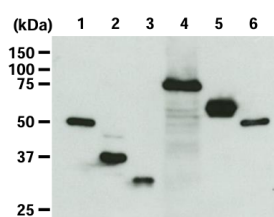
Western blotting 0.1ug/mL

Immunoprecipitation 2ug/sample

Immunocytochemistry 0.1ug/mL

Flowcytometry 0.05ug/ml

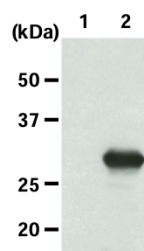
Chromatin Immunoprecipitation 参看文献: Lee, Y. K., et al., *Cancer Lett.* 403, 144-151 (2017)



Western blot analysis of DDDDK-tagged protein

Lane 1: N-terminal Met-DDDDK-tagged protein A
Lane 2: N-terminal DDDDK-tagged protein B/293T
Lane 3: Internal DDDDK-tagged protein C
Lane 4: Internal DDDDK-tagged protein D/293T
Lane 5: C-terminal DDDDK-tagged protein E/293T
Lane 6: C-terminal DDDDK-tagged protein A

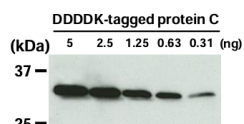
Immunoblotted with M185-3L



Immunoprecipitation of DDDDK-tagged GFP

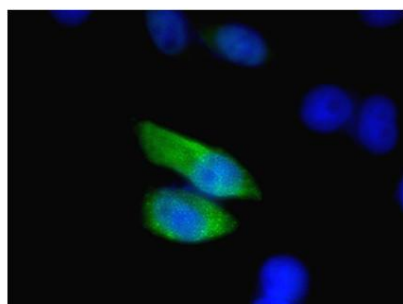
Lane 1: IP with Mouse IgG2a (isotype control) (M076-3)
Lane 2: IP with M185-3L

Immunoblotted with Anti-DDDDK-tag HRP-DirectT (PM020-7)



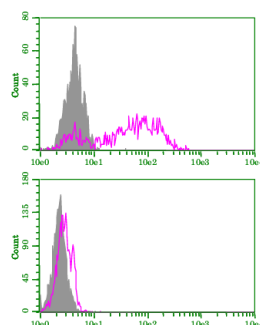
Western blot analysis of DDDDK-tagged protein C

Immunoblotted with M185-3L



Immunocytochemical detection of DDDDK-tagged protein X in HeLa

Green: M185-3L
Blue: DAPI



Flow cytometric detection of DDDDK-tagged protein X in HeLa

Open: M185-3L
Closed: Mouse IgG2a (isotype control) (M076-3)

Upper: DDDDK-tagged protein X in HeLa
Lower: Parental cell (HeLa)

SDS-PAGE与免疫印迹 (Western Blotting)

- 1) 转染样品制备: 用PBS洗涤 1×10^6 个细胞3次, 然后将细胞悬浮于1mL Laemmli上样缓冲液中, 超声短暂处理 (不超过10秒)。
重组蛋白样品制备: 将样品与等体积的Laemmli上样缓冲液混合。
- 2) 将样品煮沸3分钟后离心。每孔上样10 μ L, 使用1mm厚的SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (12.5%丙烯酰胺) 进行电泳。
- 3) 在半干式转膜系统中, 以1mA/cm²的电流将蛋白转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 转印1小时 (转膜缓冲液: 25mM Tris、190mM 甘氨酸、20%甲醇)。具体转膜步骤请参照仪器使用说明书。
- 4) 为降低非特异性结合, 将膜置于10%脱脂奶粉 (用PBS配制, pH7.2) 中, 于4°C封闭过夜。
- 5) 用PBS-T (0.05%Tween-20的PBS溶液) 洗膜, 5分钟/次, 共3次。
- 6) 将膜与一抗 (用1%脱脂奶粉/PBS, pH7.2稀释, 稀释比例参见说明书建议) 在室温下孵育1小时。 (**抗体浓度需根据具体实验条件调整。**)
- 7) 用PBS-T洗膜, 5分钟/次, 共3次。
- 8) 将膜与1:10,000稀释的Anti-IgG (Mouse) pAb-HRP (MBL, 货号330, 用1%脱脂奶粉/PBS, pH7.2稀释) 在室温下孵育1小时。
- 9) 用PBS-T洗膜, 5分钟/次, 共3次。
- 10) 擦去膜上多余的缓冲液, 随后加入适量化学发光试剂, 孵育1分钟。用吸水纸轻蘸去除膜上多余的显色液, 然后用保鲜膜包好封存。
- 11) 在暗室中曝光X光片1分钟。按常规方法显影。曝光及显影条件可能需要根据实际情况调整。

免疫沉淀 (Immunoprecipitation)

- 1) 取20 μ L 50%ProteinA 琼脂糖珠悬浮液 (用300 μ LIP缓冲液[10mM Tris-HCl (pH8.0)、500mM NaCl、0.1%NP-40]重悬), 加入按稀释比建议使用的一抗, 室温下轻柔振荡孵育1小时。
- 2) 用1mLIP缓冲液洗涤磁珠3次。
- 3) 加入2 μ g重组蛋白 (溶于300 μ L裂解缓冲液 [50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.05%NP-40] 中), 室温下轻柔振荡孵育1小时。
- 4) 用1mL裂解缓冲液洗涤磁珠5次。
- 5) 用20 μ L Laemmli上样缓冲液重悬磁珠, 煮沸2分钟后离心。
- 6) 每孔上样10 μ L, 使用1mm厚的SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (12.5%丙烯酰胺) 进行电泳。
- 7) 在半干式转膜系统中, 以1mA/cm²的电流将蛋白转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 转印1小时 (转膜缓冲液: 25mM Tris、190mM 甘氨酸、20%甲醇)。具体转膜步骤请参照仪器使用说明书。
- 8) 为降低非特异性结合, 将膜置于10%脱脂奶粉 (用PBS配制, pH7.2) 中, 于4°C封闭过夜。
- 9) 将膜与1:5,000稀释的Anti-DDDDK-tagpAb-HRP-DirecT (MBL, 货号PM020-7; 用含1%脱脂奶粉的PBS, pH7.2稀释) 在室温下孵育1小时。 (**抗体浓度需根据具体实验条件调整。**)
- 10) 用PBS-T (0.05%Tween-20的PBS溶液) 洗膜, 5分钟/次, 共3次。
- 11) 擦去膜上多余的缓冲液, 随后加入适量化学发光试剂, 孵育1分钟。
- 12) 用吸水纸轻蘸去除膜上多余的显色液, 然后用保鲜膜包好封存。
- 13) 在暗室中曝光X光片30秒。按常规方法显影。曝光及显影条件可能需要根据实际情况调整。

免疫细胞化学 (Immunocytochemistry)

- 1) 将处于培养条件下的细胞铺于载玻片上, 置于CO₂培养箱中培养过夜。
- 2) 小心吸除培养上清液。
- 3) 将载玻片浸入4%多聚甲醛 (PFA) /PBS中, 室温 (20~25°C) 下固定10分钟。
- 4) 准备一个洗涤容器 (如带磁力搅拌器的500mL烧杯)。将固定后的细胞玻片浸泡于容器内充足的PBS中洗涤5分钟, 注意勿触碰细胞。重复洗涤一次。
- 5) 将玻片浸入0.2%TritonX-100/PBS中, 室温下处理10分钟。
- 6) 按步骤4) 的方法用充足的PBS洗涤玻片。
- 7) 取200μL一抗 (按稀释比部分建议, 用2%胎牛血清 (FCS) /PBS稀释), 滴加于细胞上, 室温孵育30分钟。 (如有需要, 建议优化抗体浓度或孵育条件。)
- 8) 按步骤4) 的方法用充足的PBS洗涤玻片。
- 9) 取100μL 1:500稀释的AlexaFluor®488标记抗小鼠IgG (Invitrogen, 货号A11001, 用PBS稀释), 滴加于细胞上, 室温孵育20分钟, 并用铝箔避光。
- 10) 按步骤4) 的方法用充足的PBS洗涤玻片。
- 11) 擦去玻片上多余的液体, 注意勿触碰细胞, 切勿使细胞干燥。
- 12) 用DAPI复染3分钟, 室温下进行。
- 13) 按步骤4) 的方法用充足的PBS洗涤玻片。
- 14) 立即在玻片上滴加封片剂, 然后盖上盖玻片。

贴壁细胞流式细胞术分析

- 1) 将细胞从培养皿上消化下来。
- 2) 用1mL洗涤缓冲液 [含2%胎牛血清 (FCS) 的PBS] 洗涤细胞1次。
- 3) 轻弹细胞沉淀后, 加入200μL 4%多聚甲醛 (PFA), 混匀, 室温固定10分钟。
- 4) 用1mL洗涤缓冲液洗涤细胞2次。
- 5) 轻弹细胞沉淀后, 加入200μL含0.2%TritonX-100的PBS, 混匀, 室温通透处理10分钟。
- 6) 用1mL洗涤缓冲液洗涤细胞1次。
- 7) 用洗涤缓冲液将细胞重悬 (5×10⁶细胞/mL)。
- 8) 取100μL细胞悬液加入每支离心管中, 室温 (20~25°C) 下以500×g离心1分钟, 小心吸除上清液。
- 9) 轻弹细胞沉淀后, 加入20μL ClearBack (人Fc受体封闭试剂, MBL, 货号MTG-001), 混匀, 室温孵育5分钟。
- 10) 加入40μL用洗涤缓冲液稀释至稀释比部分建议浓度的一抗, 混匀, 于4°C孵育1小时。
- 11) 加入1mL洗涤缓冲液, 室温下以500×g离心1分钟, 小心吸除上清液。再重复洗涤一次。
- 12) 加入40μL用洗涤缓冲液稀释的1:500AlexaFluor®488标记抗小鼠IgG (Invitrogen, 货号A11001), 混匀, 室温孵育20分钟。
- 13) 加入1mL洗涤缓冲液, 室温下以500×g离心1分钟, 小心吸除上清液。
- 14) 用500μL洗涤缓冲液重悬细胞, 上机进行流式细胞术分析。