



Anti-DYKDDDDK Magarose Beads

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 试剂准备.....	1
3. 样品纯化.....	1
4. 试剂兼容性.....	3
5. 问题及解决方案.....	3
6. 订购信息及相关产品.....	3

1. 产品介绍

Flag 标签是一个由八个亲水氨基酸组成的多肽片段，定位在融合蛋白表面，因此更易与对应抗体结合以及被肠激酶分解。Magarose Beads 系列产品具有超顺磁性、快速磁响应性、丰富羟基官能团和相对集中的粒径等特点，是医学与分子生物学研究中重要的载体工具。

Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 是以抗 flag (DYKDDDDK) 抗体为亲和配体，可一步纯化原核、酵母或哺乳动物细胞表达的 flag 标签融合蛋白。

表 1. Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 产品性能

项目	性能
基质	磁性琼脂糖微球
配体	Anti-DYKDDDDK Antibody
结合能力	>1 mg DYKDDDDK 标签蛋白/ml 磁珠
粒径	30-100 μm
储存缓冲液	1 \times PBS, 0.02% NaN ₃
磁珠体积	磁珠体积占悬浮液体积的 20%
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

2. 试剂准备

2.1 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡液对样品或细胞培养液稀释，或者用平衡液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.2 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.4

洗脱液: 0.1 M Glycine-HCl, pH3.0

竞争性洗脱液: 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 100-500 μg flag 多肽/ml, pH7.4

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.0

3. 样品纯化

根据两种应用来介绍产品的使用方法: 蛋白纯化流程和 IP 流程。

3.1 磁珠预处理

将 Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 颠倒数次，保证磁珠完全混匀，取计算量（根据样品体积和所含样品含量计算）的磁珠悬浮液，转移至离心管中，放置在磁分离器上，静置大约 1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液。将离心管磁分离器上取下来，加入与悬浮液等体积的平衡液，使用枪头反复吹打 5 次，将离心管置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液，重复洗涤 2 次。

3.2 Flag 标签蛋白纯化

1) **磁珠结合目的蛋白:** 在步骤 3.1 预处理的磁珠管中加入样品溶液，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，混合 30 min 以上（具体时间根据结合效果调整），置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸取并保留上清液，作为流穿样品，用于后续检测。





2) **磁珠洗杂:** 向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液, 振荡悬浮, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。该操作重复两次以上。

3) **洗脱目的蛋白:**

A 酸性洗脱:

在上述离心管中加入 3-5 倍磁珠体积的酸性洗脱液 (0.1 M Glycine-HCl, pH3.0), 用移液器吹打 5 次, 然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 5-10 min 后, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸取并保留上清液, 为洗脱组份, 即为目标蛋白。该操作建议重复两次。

向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液, 调节 pH 值至 7.0-8.0。

注: 酸性洗脱后磁珠要立即用平衡液平衡, Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 在洗脱液中不要放置超过 20 min。

B 竞争性洗脱:

使用 3-5 倍磁珠体积的竞争性洗脱液 (flag 多肽含量 100 µg/ml) 洗脱, 2-8℃ 孵育 30 min, 将离心管置于磁分离器上大约 1 min, 待溶液变澄清后, 小心取出上清, 不要吸到填料, 为洗脱组份。洗脱样品放置 4℃, 长时间放置-20℃ 保存。

C: 变性洗脱

此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE Loading Buffer 中含有β-巯基乙醇或 DTT, 可以使填料上抗体配体重链和轻链断开 (大小分别为 50 和 25 kDa)。另外所含有的 SDS 可以使 Anti-DYKDDDDK 抗体变性, 洗脱后的 Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 没办法重复使用。

每管中加入磁珠体积等量的 2XSDS-PAGE Loading Buffer, 95℃ 加热 10 min。将离心管置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测, 也可以离心后取上清用于电泳检测。

注: Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 再生效果受限, 请谨慎使用。

3.3 IP/Co-IP 操作流程

1) **磁珠结合靶蛋白:** 将含有 Flag 标签的靶蛋白样品加入到步骤 3.1 处理好的磁珠中, 颠倒混匀。将离心管置于混合仪上, 室温孵育 30 min 以上 (具体时间根据结合效果调整)。

2) **磁珠洗杂:** 将离心管置于磁分离器, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器移出上清液, 保留, 以备取样检测。向离心管中加入 5 倍悬浮液体积的洗杂液, 使用枪头反复吹打 5-10 次, 将离心管置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃上清液。重复上述步骤 2 次。即得到靶蛋白-磁珠复合物。如果进行的是 IP 实验, 则跳过 3、4 两步, 直接进行第 5 步。

3) **目标蛋白与靶蛋白-磁珠复合物的结合:** 将含有目标蛋白样品加入到处理好的靶蛋白-磁珠复合物中, 颠倒混匀。将离心管置于混合仪上, 室温孵育 30 min 以上 (具体时间根据结合效果调整)。

4) **磁珠洗杂:** 将离心管置于磁分离器, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器移出上清液, 保留, 以备取样检测。向离心管中加入 5 倍悬浮液体积的洗杂液, 使用枪头反复吹打 5-10 次, 将离心管置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃上清液。重复上述步骤 2 次。目标蛋白通过与靶蛋白的结合, 从混合体系中被捕获。

5) **洗脱目的蛋白: A 酸性洗脱:**

在上述离心管中加入 3-5 倍磁珠体积的酸性洗脱液 (0.1 M glycine HCl, pH3.0), 用移液器吹打 5 次, 然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 5-10 min 后, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸取并保留上清液, 为洗脱组分, 即为目标抗体。该操作建议重复两次。

向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液, 调节 pH 值至 7.0-8.0。

注: 酸性洗脱后磁珠要立即用平衡液平衡, Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 在洗脱液中不要放置超过 20 min。

B 竞争性洗脱:

使用 3-5 倍磁珠体积的竞争性洗脱液 (flag 多肽含量 100 µg/ml) 洗脱, 2-8℃ 孵育 30 min, 将离心管置于磁分离器上大约 1 min, 待溶液变澄清后, 小心取出上清, 不要吸到填料, 为洗脱组份。洗脱样品放置 4℃, 长时间放置-20℃ 保存。

C 变性洗脱

此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE Loading Buffer 中含有β-巯基乙醇或 DTT, 可以使填料上抗体配体重链和轻链断开 (大小分别为 50 和 25 kDa)。另外所含有的 SDS 可以使 Anti-DYKDDDDK 抗体变性, 洗脱后的 Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 没办法重复使用。

每管中加入磁珠体积等量的 2XSDS-PAGE Loading Buffer, 95℃ 加热 10 min。将离心管置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测, 也可以离心后取上清用于电泳检测。





4. 试剂兼容性

表 2. Anti-DYKDDDDK Magarose Beads 试剂兼容性

试剂名称	最大耐受浓度	备注
β-巯基乙醇	10 mM	纯化过程中应避免使用, 如果在 IP 中使用, 填料不能回收重复利用。
DTT	80 mM	
SDS	--	
EDTA	5 mM	过高的 EDTA 会降低蛋白回收率。
Tween-20	5%	过高浓度会影响标签蛋白结合效率。
Triton X-100	5%	
NP-40	4%	
盐酸胍	0.3 M	过高浓度会使抗体变性。
尿素	1.5 M	
甘油	20%	过高浓度会影响标签蛋白结合。
氯化钠	1 M	减少非特异性吸附

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
流穿中有目的蛋白	过载	减少上样体积或增加磁珠体积。
	结合时间太短	延长样品和磁珠的结合时间。
	标签未暴露	可以加入低浓度的变性剂, 上样前透析。
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行透析。
洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品。 低温操作。 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前 Western 检测是否有 flag 标签融合蛋白
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。 增加上样量。 减少 NaCl 浓度。
背景太杂	非特异性吸附	减少上样量
	洗杂不充分	增加洗杂次数, 每次清洗孵育 5-10 min。 增加洗杂液中盐离子浓度。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Anti-DYKDDDDK Magarose Beads	SM009001	1 ml
	SM009005	5 ml
	SM009025	25 ml
	SM009100	100 ml
	SM00901L	1 L
Anti-DYKDDDDK Affinity Beads	SA042001	1 ml
	SA042005	5 ml
	SA042025	25 ml
	SA042100	100 ml
	SA042500	500 ml
	SA04201L	1 L

