

Anti-DYKDDDDK (Flag) MagAgarose Beads

Anti-Flag 纯化磁珠

产品简介

Anti-Flag 纯化磁珠 (Anti-DYKDDDDK (Flag) MagAgarose Beads) 是一种聚合物磁性微球, 由高质量的鼠源抗 DYKDDDDK (Flag) 单克隆抗体与平均粒径约为 70 μm 的琼脂糖磁珠通过共价偶联制备。琼脂糖磁珠是采用天然高分子材料琼脂糖与超顺磁性材料复合形成的一种新型功能化磁性微球, 具有更快的磁响应性同时保持微球良好的分散性、极低的非特异性吸附和更丰富的结合位点等特性, 可用于 Flag 标签蛋白的纯化, 也可用于带有 Flag 标签的蛋白免疫沉淀 (IP) 或免疫共沉淀 (Co-IP)。

Anti-Flag 纯化磁珠 (Anti-DYKDDDDK (Flag) MagAgarose Beads) 可结合 Met 修饰的 N 端 Flag 融合蛋白 (Met-FLAG-Protein), N 端 Flag 融合蛋白 (FLAG-Protein), C 端 Flag 融合蛋白 (Protein-FLAG)。

产品信息

货号	20785ES03/20785ES08
规格	1 mL/5 mL

产品性质

基质 (Matrix spherical)	琼脂糖磁珠
配体 (Ligand)	鼠源抗 Flag 单克隆抗体
结合能力 (Binding Capacity)	≥ 1.0 mg Flag 标签融合蛋白/mL 磁珠
粒径 (Particle size)	30-100 μm
磁珠浓度 (Concentration)	磁珠悬浮于储存保护液中, 含量为 20% (V/V)
储存缓冲液 (Storage Buffer)	PBS, 0.01% Tween-20, 0.02% Na ₃
应用 (Application)	蛋白纯化、IP、Co-IP

储存条件

2~8°C 保存, 有效期 2 年。

使用说明

1. 缓冲液配制

【注】建议以下缓冲液在使用前用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

裂解缓冲液: 0.15 M NaCl, 50 mM Tris, 1% NP-40, pH7.4 或 WB/IP 裂解液 (Cat#20118ES)

平衡/结合/洗杂缓冲液: 0.15 M NaCl, 50 mM Tris, pH7.4 或 1x TBS Buffer, TBS 缓冲液(粉末), PH 7.4, 1L (Cat#60157ES)

洗脱缓冲液 (竞争洗脱): 平衡缓冲液溶解 Flag 多肽, 终浓度为 0.2-1 mg/mL

洗脱缓冲液 (酸性洗脱): 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和缓冲液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

2. 样品准备

本操作说明书提供以下三种样品处理方法，建议您根据不同来源的样品选择适当的方式进行预处理，使待检测蛋白释放至样品溶液中。

血清样品处理：若目标蛋白丰度较高，建议用结合缓冲液稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，置于冰上备用(或置于 -20°C 长期保存)。

悬浮细胞样品处理：离心收集细胞 (4°C , 1000 g, 5 min)，用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 μL 裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(裂解液应在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM)。混匀后置于冰上处理 10 min；离心收集上清液 (4°C , 14000g, 10 min)，置于冰上备用(或置于 -20°C 长期保存)。

贴壁细胞样品处理：移去培养基，用 PBS 清洗细胞两遍；用细胞刮棒刮脱细胞，收集至 1.5 mL EP 管内，按照 6 孔板每孔加入 150-250 μL 裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(裂解液应在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM)。用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。混匀后置于冰上处理 10 min；离心收集上清液 (4°C , 14000g, 10 min)，置于冰上备用(或置于 -20°C 长期保存)。

3. 应用

1) 蛋白纯化，步骤如下：

a. 磁珠预处理

a) 用移液器轻柔吹打 Anti-Flag 纯化磁珠，使其充分混悬，依照所需纯化的样品量，取适量 Anti-Flag 纯化磁珠悬液加入于离心管中，置于磁分离器上，磁性分离大约 1 min，弃上清。

b) 加入与悬浮液体积相同平衡缓冲液，并轻轻移液器混合，用移液器轻柔吹打重悬 Anti-Flag 纯化磁珠，放置在磁分离器上，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清。重复洗 2 次。

b. 样品结合

a) 在预处理后的磁珠中加入含有 Flag 标签的蛋白样品，置于翻转混合仪上孵育(常温 1~2 h，或 4°C 2~4 h，具体孵育时间可根据结合效果调整)；

b) 将上述混合液置于磁力架上静置，大约 1 min，待溶液变澄清后，把上清液转移到新的离心管中备用(上清可保留作为流穿液，用于电泳鉴定)，原离心管中剩余的即为蛋白-磁珠复合物；

c. 洗涤

a) 向上述步骤所得的蛋白-磁珠复合物中加入 5 倍磁珠体积的洗杂缓冲液，轻柔混匀磁珠 5~10 min，接着在磁力架上静置，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清；重复 3-5 次(最后 1 次洗涤更换新离心管)

d. 蛋白洗脱

根据下游用途选择洗脱方法。

a) 竞争洗脱 (Flag 多肽洗脱)

加入 3~5 倍磁珠体积的竞争洗脱缓冲液(终浓度为 0.2-1 mg/mL Flag 多肽洗脱液)，轻柔混匀磁珠， 4°C 孵育 30 min (慢慢摇晃)，分离磁珠上的磁珠并保存含有目标抗原的上清液，重复洗脱步骤一次以获得更高的回收率。

b) 酸性洗脱 (0.1 M Gly-HCl, pH 3.0)

加入 3~5 倍磁珠体积的酸性洗脱缓冲液 (0.1 M Gly-HCl, pH 3.0)，轻柔混匀磁珠，室温孵育 5-10 min (慢慢摇晃)，分离磁珠上的磁珠并保存含有目标抗原的上清液，上清液应立即用中和缓冲液 (1 M Tris-HCl, pH 8.5) 中和低 pH。一般每 100 μL 洗脱液加入 20 μL 中和缓冲液。

注：酸性洗脱后磁珠要立即用平衡缓冲液平衡，Anti-Flag 纯化磁珠在酸性洗脱液中不要超过 20 min。

2) 免疫沉淀 (IP)，步骤如下：

a. 磁珠预处理

a) 用移液器轻柔吹打 Anti-Flag 纯化磁珠，使其充分混悬，取 25~50 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中。

b) 加入 500 μL 平衡缓冲液，并轻轻移液器混合，用移液器轻柔吹打重悬 Anti-Flag 纯化磁珠，放置在磁分离器上，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清。重复洗 2 次。

b. 样品结合

a) 在预处理后的磁珠中加入含有 Flag 标签的蛋白样品，置于翻转混合仪上孵育(常温 1~2 h，或 4°C 2~4 h，具体孵育时间可根据结合效果调整)；

b) 将上述混合液置于磁力架上静置，大约 1 min，待溶液变澄清后，把上清液转移到新的离心管中备用(上清可保留作为流穿液，用于电泳鉴定)，原离心管中剩余的即为蛋白-磁珠复合物；

c. 洗涤

a) 向上述步骤所得的蛋白-磁珠复合物中加入 1000 μL 的洗杂缓冲液，轻柔混匀磁珠 5~10 min，接着在磁力架上静置，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清；重复 2-3 次

d. 蛋白洗脱

根据下游用途选择洗脱方法。

a) 竞争洗脱 (Flag 多肽洗脱)

加入 100 μL 竞争洗脱缓冲液 (终浓度为 0.2-1 mg/mL Flag 多肽洗脱液)，轻柔混匀磁珠，4°C 孵育 30 min (慢慢摇晃)，分离磁珠上的磁珠并保存含有目标抗原的上清液，重复洗脱步骤一次以获得更高的回收率。

b) 酸性洗脱 (0.1 M Gly-HCl, pH 3.0)

加入 100 μL 酸性洗脱缓冲液 (0.1 M Gly-HCl, pH 3.0)，轻柔混匀磁珠，室温孵育 5-10 min (慢慢摇晃)，分离磁珠上的磁珠并保存含有目标抗原的上清液，上清液应立即用中和缓冲液 (1 M Tris-HCl, pH 8.5) 中和低 pH。一般每 100 μL 洗脱液加入 20 μL 中和缓冲液。

注：酸性洗脱后磁珠要立即用平衡缓冲液平衡，Anti-Flag 纯化磁珠在酸性洗脱液中不要超过 20 min。

c) 用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

如需直接检测目的蛋白，则在上述洗涤过的蛋白-磁珠复合物中加入 80~100 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 10 min，冷却至室温并在磁力架上分离磁珠，取上清进行 SDS-PAGE 检测。

注意事项

1. 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。
2. 本产品仅作科研用途。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。