

Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads

Anti-Flag 免疫磁珠

产品简介

Anti-Flag 免疫磁珠 (Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads) 是一种聚合物磁性微球, 由高质量的鼠源抗 DYKDDDDK (Flag) 单克隆抗体与粒径为 200 nm 的硅基磁珠通过共价偶联制备, 本产品具有快速的磁响应性, 超顺磁性、良好的分散性、粒径均一、极低的非特异结合和丰富的结合位点等特点, 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 免疫磁珠 (Anti-DYKDDDDK (Flag) MagBeads) 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	20565ES76/20565ES03/20565ES08
规格	500 μ L/1 mL/5 mL

产品性质

基质 (Matrix spherical)	硅基磁珠
配体 (Ligand)	Anti-Flag Antibody
结合能力 (Binding Capacity)	≥ 0.6 mg Flag 标签融合蛋白/mL 磁珠
粒径 (Particle size)	200 nm
磁珠浓度 (Concentration)	10 mg/mL
储存缓冲液 (Storage Buffer)	PBS, 0.01% Tween-20, 0.02% NaN ₃
应用 (Application)	IP、Co-IP 等

储存条件

2~8°C 保存, 有效期 1 年。**避免冻存!**

使用说明

以免疫沉淀 (IP) 为例, 步骤如下:

1. 缓冲液配制

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

裂解缓冲液: 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 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, 20 mM Na₂HPO₄, pH7.0

洗脱缓冲液: 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 10-100 μ g/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, 1000g, 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. 磁珠预处理

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

3.2 加入500 μL IP Lysis/Wash Buffer并轻轻移液器混合, 用移液器轻柔吹打重悬Anti-Flag免疫磁珠, 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。

4. 样品的结合

4.1 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过夜);

4.2 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(上清液可用于检测Flag标签蛋白是否存在残留), 原离心管中剩余的即为蛋白-磁珠复合物;

注意: 结合过程中, 磁珠可能会出现聚团或呈片状, 属于正常现象, 不会影响实验结果。

5. 洗涤

5.1 向上述步骤4.2所得的蛋白-磁珠复合物中加入1000 μL IP Lysis/Wash Buffer, 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;

5.2 重复步骤5.1两次, 直至洗涤后的上清液OD₂₈₀小于0.05为止;

注意: 如上清液的OD₂₈₀仍大于0.05, 则适当增加洗涤次数。

6. 蛋白洗脱

根据下游用途选择洗脱方法。

6.1 Flag融合蛋白洗脱

1) 配制Flag多肽洗脱液: TBS中溶解Flag多肽, 终浓度为0.2-1 mg/mL。

2) 分别加入100 μL Flag多肽洗脱液, 4°C孵育2 h-6 h(慢慢摇晃)

3) 分离磁珠上的磁珠并保存含有目标抗原的上清液。

4) 重复洗脱步骤一次以获得更高的回收率

6.2 酸性洗脱(0.1 M Gly-HCl, pH 3.0)

1) 加入100 μL 0.1 M Gly-HCl, pH 3.0, 室温孵育5-10 min(慢慢摇晃)。

2) 分离磁珠上的磁珠并保存含有目标抗原的上清液。

3) 中和低pH, 每100 μL洗脱液加入20 μL中和缓冲液(1 M Tris-HCl, pH 8.5)。

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