



Magneti-G DYKDDDDK标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒

目录

| | |
|-----------------|---|
| 1. 产品介绍..... | 1 |
| 2. 使用方法..... | 2 |
| 3. 注意事项..... | 4 |
| 4. 参考信息..... | 4 |
| 5. 常见问题与解答..... | 4 |
| 6. 订购信息..... | 5 |
| 7. 相关产品..... | 5 |

1. 产品介绍

1.1 Magneti-G 商标

Magneti-G 商标来自于磁性 (Magnetic) 的英文谐音, G 为高聚物的汉语拼音的首字母, 因此本公司带有这一商标的产品, 均为高聚物材质的磁性微球。这一商标主要用于一系列基于抗体亲和方法的标签蛋白 IP 试剂盒, 目前已有 Anti-His-tag、Anti-Myc-tag、Anti-HA-tag、Anti-DYKDDDDK-tag、Anti-GFP-tag 和 Anti-RFP-tag 六种标签 IP 试剂盒。

1.2 DYKDDDDK 标签

DYKDDDDK 肽段是融合蛋白表达纯化过程中最常用的标签 (tag) 之一。它可以连接在融合蛋白的 N 端、C 端或序列中间, 具有极好的亲水性, 更容易展示在融合蛋白的表面, 干扰融合蛋白功能的可能性较小。另外将这一标签连接在目的蛋白的 N 端时, 可以被 Enterokinase (EK protease) 从序列 C 端赖氨酸的位置切除, 而不留下冗余残基。

1.3 Anti-DYKDDDDK 抗体

DYKDDDDK 肽段也经常被称为 Flag 肽段, 是 Sigma 公司的注册商标。大约四十年前, 该公司最早筛选了一系列抗 DYKDDDDK 标签的抗体, 分别命名为 Anti-Flag M1, Anti-Flag M2, Anti-Flag M5 等, 其中 M2 抗体广泛用于免疫杂交、免疫沉淀、亲和纯化等方向。本公司目前有两株 Anti-DYKDDDDK 抗体, 亲和力和都要高于 Anti-Flag M2 抗体, 更适合做 WB、IP 等蛋白互作实验。

1.4 磁珠性质

高聚物磁珠采用高分子聚合技术将超顺磁性材料和高分子材料完美地结合在一起, 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。磁珠具体性能见表 1。

表 1: Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads 产品性能

| 项目 | 性能 |
|-------|--|
| 微球基质 | 高聚物磁性微球 |
| 配体 | Anti-DYKDDDDK 重组标签抗体 |
| 粒径 | 1 μm |
| 磁珠浓度 | 10 mg/ml |
| 储存缓冲液 | Tris (pH8.0), 0.01% Tween20, 0.1% proclin300 |

1.5 阳性对照蛋白

试剂盒提供了带有多标签的红色荧光蛋白 RFP, 这一蛋白在自然光下带有肉眼可见的红光, 可以用来验证 Beads 的结合载量, 以及排除操作流程中可能出现的偏差。这一蛋白为真核表达, SDS-PAGE 上显示为 3 条具有不同分子量的条带。带有 DYKDDDDK 标签的不同蛋白与 Beads 的结合时间、结合条件、洗脱条件具有类似性, 可以平行参考。



1.6 试剂盒组分

本产品适用于原核和真核细胞裂解物或者培养上清中分泌表达的 DYKDDDDK 标签蛋白的 IP、Co-IP 等蛋白质相互作用实验, 具体组分见表 2。

表2: 试剂盒组份

| 试剂盒成分 | 规格/10T | 规格/50T |
|-------------------------------|--------|--------|
| Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads | 0.2ml | 1ml |
| Magneti-G Control IgG Beads | 0.1ml | 0.5ml |
| IP Lysis Buffer A (5×) | 4ml | 20ml |
| IP Lysis Buffer B | 0.2ml | 1ml |
| IP Wash Buffer (10×) | 8ml | 40ml |
| Elution Buffer D | 0.8ml | 4ml |
| 2×SDS Loading Buffer | 0.4ml | 2ml |
| RFP 蛋白 | 0.1mg | 0.5mg |
| 说明书 | 1份 | |

2. 使用方法

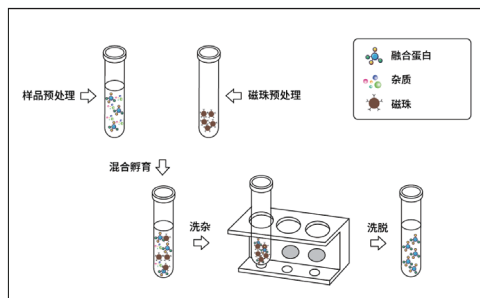


图1. Magneti-G DYKDDDDK标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒使用流程图

2.1 缓冲液配制

2.1.1 **1×Lysis Buffer(A+B) 配置:** 使用前将 IP Lysis Buffer A (5×) 用 ddH₂O 稀释成 1×IP Lysis Buffer A, 并补加终浓度为 0.1% 的 IP Lysis Buffer B (1ml 1×IP Lysis Buffer A 中加 1μl IP Lysis Buffer B), 标记为 1×Lysis Buffer (A+B) 备用。稀释后的缓冲液建议 4°C 保存;

2.1.2 **1×IP Wash Buffer 配置:** 将 IP Wash Buffer (10×) 用 ddH₂O 稀释 10 倍使用。如: 配置 10ml 1×IP Wash Buffer, 具体操作为取 1ml IP Wash Buffer, 加入 9ml ddH₂O, 充分混匀标记为 1×IP Wash Buffer 即可使用。实验未用完的 1×IP Wash Buffer 可稳定保存在 2-8°C 3 个月, 保存时间过久易长菌。

2.1.3 PBS 为自备试剂。

2.2 样品前处理

2.2.1 悬浮细胞样品裂解

- 1) 1000×g 室温离心 5min, 弃上清, 收集细胞;
- 2) 用适量 PBS 将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 弃上清, 收集细胞。重复三次;
- 3) 向细胞团块中加入预冷 1×Lysis Buffer(A+B), 每 1×10⁶-5×10⁶ cells 使用 1000μl;
- 4) 将上述加了 1×Lysis Buffer(A+B) 的样品上下颠倒混匀 5-10 次, 随后置于冰上裂解 5-10min, 期间混匀 2-3 次;
- 5) 13,000 ×g 离心 10 min, 去除细胞碎片;
- 6) 将上清转移至新的离心管中, 标记为细胞裂解样品。

2.2.2 贴壁细胞样品裂解

- 1) 小心除去单层细胞的培养基;
- 2) 用适量预冷的 PBS 细胞清洗三次;



- 3) 根据表 3 中推荐体积将 1×IP Lysis Buffer (A+B) 慢慢滴加至细胞孔板中, 滴加时尽量覆盖整个平皿, 随后置于冰上裂解 5-10min, 期间混匀 2-3 次;
- 4) 将上述裂解好的样品转移至新的离心管中, 约 13,000 ×g 离心 10 min, 去除细胞碎片;
- 5) 将上清转移至新的离心管中, 标记为细胞裂解样品。

表3: 1×IP Lysis Buffer (A+B) 推荐体积

| 培养皿大小/细胞数量 | 1×IP Lysis Buffer (A+B) 体积 | 备注 |
|--|----------------------------|------|
| 100×100 mm | 1ml | |
| 60×60 mm | 0.5ml | 贴壁细胞 |
| 6 孔板 | 0.4ml | |
| 24 孔板 | 0.2ml | |
| 1×10 ⁶ -5×10 ⁶ cells | 1ml | 悬浮细胞 |

2.2.3 注意事项

真核表达的分泌蛋白可直接取培养上清离心。真核表达的胞内蛋白先用 1×PBS (pH=7.4) 清洗 3-5 次, 随后用裂解液裂解细胞后离心取上清, 再进行后续步骤。核酸是强电性物质, 如果核酸吸附到磁珠上, 最终将造成杂蛋白变多。除去核酸有两个常用的方法:

- 1) 充分超声可以打断核酸, 但过度超声也会造成蛋白降解。
- 2) 使用伯仪生物超级核酸酶 (SLP008) 消化, 这一方法需要注意缓冲液的选择。低浓度非离子型表面活性剂, 如吐温 -20、曲拉通 -100 可以帮助分散脂类团块, 有助于获得更纯的目的蛋白。

2.3 磁珠漂洗

- 2.3.1 将磁珠充分混匀后取 20μl 磁珠置于离心管中, 向管中加入 500μl 1×IP Wash Buffer, 上下颠倒混匀 5-10 次;
- 2.3.2 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清;
- 2.3.3 向管中加入 500μl 1×IP Wash Buffer, 上下颠倒混匀 5-10 次, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清;
- 2.3.4 重复操作 3 次。

注: 本试剂盒中提供适量阴性对照 (Magneti-G Control IgG Beads), 免疫沉淀实验时建议设置阴性对照组。使用方法与 Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads 完全一致。若有更多需求, 可以订购本公司的 Magneti-G Control IgG Beads (货号: MP5801)。

2.4 样品孵育

- 2.4.1 向上述漂洗好的磁珠中加入 500-1000μl 的细胞裂解样品, 常温或 4°C 下孵育 60min (建议在旋转混匀仪上孵育, 使样品和磁珠充分接触);
- 2.4.2 孵育结束后, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 将上清转移至新的离心管中, 留样备检;
- 2.4.3 向离心管中加入 500μl 1×IP Wash Buffer, 轻轻颠倒混匀 5-10 次后将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后弃去上清;
- 2.4.4 重复操作 5 次。

注: 蛋白互作需要控制温度, 我们推荐在较低温度下 (2-8 °C) 进行操作, 防止蛋白降解。操作时间也至关重要, 有时候快速进行实验比加入蛋白酶抑制剂更能保护目的蛋白。建议样品孵育时间不要超过 60 分钟, 磁珠每次洗涤, 加入 IP Wash Buffer 后可以冰上静置 3-5 分钟。

2.5 蛋白洗脱

2.5.1 洗脱液洗脱

每 20μl 原始磁珠体积加入 40ul 洗脱液, 常温或 4°C 洗脱 5-10min, 期间轻轻混匀 3-5 次。孵育结束后将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸取上清至新的离心管中, 进行 Western 检测。

注: Elution Buffer D 可以充分洗脱标签蛋白, 且能保证磁珠上的抗体只有很少量的脱落, 但是磁珠上可能有少量目的蛋白残留。

2.5.2 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

每 20μl 原始磁珠体积加入 30μl 的 PBS (自备) 重悬磁珠, 再加入 30μl 的 2×SDS Loading Buffer, 轻轻摇晃混匀后 95-100°C 高温处理 5-10min。将离心管置于磁力架上分离 10s, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或进行 Western 检测。

注: SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱会使目的蛋白能够完全从磁珠上脱离, 但是抗体也会完全脱落。后续 WB 实验时建议选择鼠抗。Western 检测的上样量建议控制在 20μl 以内, 剩余的样本可冻存于 -20°C 保存。

2.6 RFP 阳性蛋白的使用

- 2.6.1 取 25μl RFP 阳性蛋白加入 25μl 1×IP Wash buffer 稀释至 50μl;
 - 2.6.2 取 10μl 磁珠按照说明书操作进行清洗, 清洗后将磁珠和 RFP 阳性蛋白常温下孵育 30min;
 - 2.6.3 肉眼观察流穿中的颜色变化, 此时流穿中不带有颜色;
 - 2.6.4 加入 Elution D 进行洗脱, 肉眼观察洗脱中的颜色变化, 此时洗脱液呈现淡红色;
- 注:** RFP 阳性蛋白是为了验证免疫沉淀体系而设置的, 只有在特殊情况下如试剂盒存放时间过久, 测定是否还能正常使用或者多次实验效果不理想, 验证纯化体系是否有问题等情况才会使用, 多次使用会造成磁珠和试剂的浪费。



3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8°C 冰箱中, **不要冻结保存**;
- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象, 可正常使用;
- 3) 不要使用含有 DTT 等还原剂的细胞裂解液样品, DTT 可能会导致抗体配体的脱落;
- 4) 本产品能耐受 $\leq 2M$ 尿素, 高浓度的尿素会导致抗体配体脱落;
- 5) 在清洗和洗脱时避免吸取到磁珠, 清洗时吸取到磁珠会影响最终的载量, 洗脱时吸取到磁珠会影响目的蛋白的质量和电泳效果, 第一次洗脱后可以将洗脱液置于新的离心管中, 再次置于磁力架上进行吸附。

4. 参考信息

DYKDDDDK tag IP 实验: 样品为胞内表达蛋白, 含有 His 和 DYKDDDDK 标签:

- 1) 取 0.5ml 悬浮细胞 ($\approx 1.5 \times 10^6$ 个) 常温下 $1 \times$ PBS (pH=7.4) 清洗三次后快速进行裂解、离心;
- 2) 加入 20 μ l 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 30min;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上, 分离磁珠和液体, 用移液器吸走上清, 留下磁珠;
- 4) 用 $1 \times$ IP Wash buffer 清洗 5 次后加入 $2 \times$ SDS Loading Buffer 99°C 高温处理 10min 后进行 WB;
- 5) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb, 阴性对照 (-) 为不带 DYKDDDDK 标签的蛋白, 结果请见图 2。

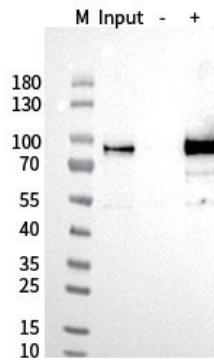


图2. Magneti-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒进行 IP 后的 WB 图

图 2 表明 Magneti-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒能够很好的捕获样品中的 DYKDDDDK 标签融合蛋白, 同时没有非特异性的蛋白结合。

5. 常见问题与解答

5.1 聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别?

- 1) 琼脂糖磁珠是带孔微球, 粒径在 30-100 μ m, 交联时很大一部分配体会进入球孔内部, 所以偶联载量相对较高, 非常适用蛋白的快速纯化; 而聚合物磁珠通常粒径为 1-3 μ m 以下, 配体主要分布在微球表面, 这种类型的磁珠能够快速结合蛋白, 空间位阻影响小, 非常适合于蛋白互作实验, 但其载量不高;
- 2) 推荐使用琼脂糖磁珠进行蛋白纯化实验; 使用聚合物磁珠进行蛋白互作实验如 IP、Co-IP 和 pull down 实验等。

5.2 为何结合不到目的蛋白?

- 1) 可能是由于蛋白无表达造成的, 建议在纯化前用 WB 检测下蛋白原始表达量, 如果 WB 无信号, 目的蛋白很难捕获;
- 2) 样本中有高浓度的还原剂等干扰物质, 建议用合适的裂解液。



6. 订购信息

| 名称 | 货号 | 规格 |
|--------------------------------------|-----------|-----|
| Magneti-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒 | BK0048-01 | 10T |
| | BK0048-02 | 50T |

7. 相关产品

| 类型 | 名称 | 货号 |
|--------------------------|---------------------------------|--------|
| Magneti-G标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | Magneti-G His 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒 | BK0049 |
| | Magneti-G Myc 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒 | BK0050 |
| | Magneti-G HA 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒 | BK0051 |
| | Magneti-G GFP 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒 | BK0052 |
| | Magneti-G RFP 标签免疫沉淀 / 免疫共沉淀试剂盒 | BK0053 |
| Magneti-G标签抗体磁珠 | Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads | MP5101 |
| | Magneti-G Anti-His Beads | MP5201 |
| | Magneti-G Anti-Myc Beads | MP5301 |
| | Magneti-G Anti-HA Beads | MP5401 |
| | Magneti-G Anti-GFP Beads | MP5501 |
| | Magneti-G Anti-RFP Beads | MP5601 |
| | Magneti-G Control IgG Beads | MP5801 |