



MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒

目录

1. 产品介绍	1
2. 使用方法	2
3. 注意事项	3
4. 参考信息	3
5. 订购信息	4
6. 相关产品	4

1. 产品介绍

1.1 DYKDDDDK 标签介绍

DYKDDDDK 肽段是融合蛋白表达与纯化体系中应用极为广泛的亲和标签之一。该标签可灵活融合于目的蛋白的 N 端、C 端，也可以直接插入蛋白序列内部使用，具备优异的亲水性特性，在融合蛋白折叠过程中更易暴露于分子表面，因此对目的蛋白自身结构与生物学功能的干扰风险显著更低。尤为重要的是，当该标签被设计连接在目的蛋白 N 端时，可被肠激酶 (Enterokinase, EK protease) 特异性识别并在标签 C 端赖氨酸位点精准切割，切割后不会在目的蛋白末端残留多余氨基酸残基，从而最大程度保证重组蛋白的天然序列完整性。

1.2 MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒介绍

MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒专为免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 等蛋白互作研究而设计。该试剂盒以聚合物磁性微球为核心，配套完整的专用缓冲体系，可直接用于蛋白互作实验。微球表面共价键合了高浓度的抗 DYKDDDDK 标签纳米抗体 (VHH)，能够特异性从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种来源的细胞裂解液中高效富集 DYKDDDDK 标签融合蛋白。该体系具有非特异性吸附低、结合载量高、无抗体轻重链干扰等优势，可显著提升目的蛋白的富集效率与检测信噪比，适用于蛋白质相互作用、表达鉴定、功能分析等下游研究。

表 1: MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒组成

试剂盒组分	规格/10 T	规格/50 T	保存温度
MagHub Anti-DDDDK Beads	0.2 ml	1 ml	2-8°C
MagHub Control Nb Beads	0.2 ml	1 ml	2-8°C
IP Lysis Buffer	20 ml	100 ml	2-8°C
IP Wash Buffer (10×)	8 ml	40 ml	2-8°C
Elution Buffer D	0.8 ml	4 ml	2-8°C
SDS Loading Buffer (2×)	0.5 ml	2.5 ml	2-8°C
说明书		1 份	

表 2: MagHub Anti-DDDDK Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	高聚合物磁性微球
配体	抗 DYKDDDDK 标签纳米抗体
粒径	1 μm
储存缓冲液	20 mM Tris (pH 8.0), 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20, 0.1% proclin 300



2. 使用方法

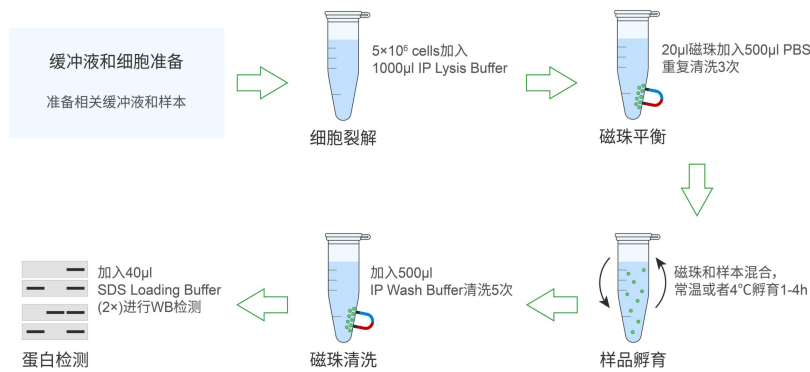


图 1. MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒的使用流程图

2.1 缓冲液配制

- 1) 1× IP Wash Buffer 配置: 将 IP Wash Buffer (10×) 用 ddH₂O 稀释 10 倍使用。如: 配置 10 ml 1× IP Wash Buffer, 具体操作为取 1 ml IP Wash Buffer, 加入 9 ml 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) 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 5 min, 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 5 min, 弃上清, 收集细胞。重复三次;
- 3) 向细胞团块中加入预冷 IP Lysis Buffer, 每 1×10⁶-5×10⁶ cells 使用 1000 µl;
- 4) 将上述加了 IP Lysis Buffer 的样品上下颠倒混匀 5-10 次, 随后置于冰上裂解 5-10 min, 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 清洗细胞三次;
- 3) 根据表 3 中推荐体积将 IP Lysis Buffer 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 5-10 min, 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. IP Lysis Buffer 推荐体积

培养皿大小/细胞数量	IP Lysis Buffer	备注
100×100 mm	500-1000 µl	
60×60 mm	250-500 µl	贴壁细胞
6 孔板	200-400 µl	
24 孔板	100-200 µl	
1×10 ⁶ -5×10 ⁶ cells	500-1000 µl	悬浮细胞

2.2.3 植物样本的裂解

- 1) 剪取植物叶片 1-2 克;
- 2) 转移到研钵中加入少量液氮, 用杵研磨成细粉;
- 3) 加入 1 ml IP Lysis Buffer, 再次研磨 10 min;
- 4) 13,000× g 离心 10 min, 去除植物碎片;
- 5) 将上清转移至新的离心管中, 标记为植物裂解样品。

2.3 磁珠漂洗

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



注: 本试剂盒中提供适量阴性对照 (MagHub Control Nb Beads), 免疫沉淀实验时建议设置阴性对照组, 使用方法与 MagHub Anti-DDDDK Beads 完全一致。若有更多需求, 可以订购本公司的 MagHub Control Nb Beads (货号: MP6701)。

2.4 样品孵育

- 1) 向上述漂洗好的磁珠中加入细胞裂解样品, 室温或 4 °C 下孵育 60 min (建议在旋转混匀仪上孵育, 使样品和磁珠充分接触);
- 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;
- 3) 向离心管中加入 500 μl 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;
- 4) 重复操作 5 次。

注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温 1 h 或者 4 °C 4 h, 根据实际的结合效果适当调整孵育时间, 一般情况下不建议过夜孵育, 过夜孵育可能会引起过多的非特异性吸附。磁珠每次洗涤, 加入 IP Wash Buffer 后可以冰上静置 3 分钟。

2.5 蛋白洗脱

1) 洗脱液洗脱

该方法适用于 IP-MS 应用。每 20 μl 原始磁珠体积加入 60 μl Elution Buffer D 洗脱液, 常温洗脱 5-10 min, 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 或质谱检测。

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) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

该方法适用于 IP-WB 应用。每 20 μl 原始磁珠体积加入 40 μl 的 SDS Loading Buffer (2×), 混匀后 100 °C 高温处理 10 min, 将离心管置于磁力架上分离 10 s, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或进行 Western 检测。

注: Western 检测的上样量建议控制在 20 μl 以内, 剩余的样本可冻存于 -20 °C 保存。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 °C, 不可冻结保存;
- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象, 可正常使用;
- 3) 本产品能耐受 ≤ 1 mM DTT, 不建议在样本中加入过高浓度的还原剂;
- 4) 本产品能耐受 ≤ 2 M 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

- 1) DYKDDDDK tag IP 实验: 样品为 293 细胞胞内表达蛋白, 含有 His 和 DYKDDDDK 标签。
- 2) 取 1 ml 悬浮细胞 (≈3×10⁶ 个) 常温下 1×PBS (pH=7.4) 清洗三次后快速进行裂解、离心;
- 3) 加入 20 μl 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 60 min;
- 4) 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;
- 5) 用 1×IP Wash Buffer 清洗 5 次后加入 SDS Loading Buffer 99 °C 高温处理 10 min 后进行 WB;
- 6) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb, 阴性对照(-)为 MagHub Control Nb Beads 和样本孵育, 结果请见图 2。

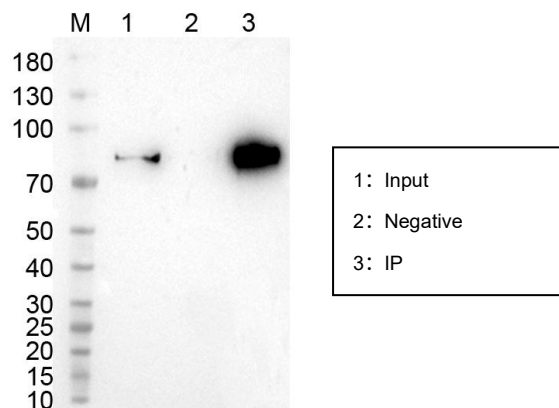


图 2. MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒进行 IP 后的 WB 图

图 2 表明 MagHub DDDDK-tag IP 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. 订购信息

名称	货号	规格
MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒	BK0073-01	10 T
	BK0073-02	50 T

6. 相关产品

类型	名称	货号
Magneti-G 蛋白标签免疫沉淀/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 Strep-tag II IP 试剂盒	BK0071
MagHub 蛋白标签 IP 试剂盒	Magneti-G MBP IP 试剂盒	BK0075
	MagHub HA-tag IP 试剂盒	BK0072
	MagHub Myc-tag IP 试剂盒	BK0074
Magneti-G 标签抗体磁珠	MagHub V5-tag IP 试剂盒	BK0076
	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
Magneti-G Anti Strep-tag II Beads	MP6001	
MagHub 标签抗体磁珠	Magneti-G Anti MBP Beads	MP6401
	MagHub Anti-HA Beads	MP6101
	MagHub Anti-DDDDK Beads	MP6201
	MagHub Anti-Myc Beads	MP6301
	MagHub Anti-V5 Beads	MP6501
	MagHub Control Fab Beads	MP6601
	MagHub Control Nb Beads	MP6701