

MagHub Anti-DDDDK Beads

目录

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

1. 产品介绍

1.1 DYKDDDDK 标签介绍

DYKDDDDK 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 Anti-DDDDK Beads 介绍

MagHub Anti-DDDDK Beads 是专为免疫沉淀（IP）与免疫共沉淀（Co-IP）实验设计的高聚物磁珠。微球表面通过共价偶联方式固定高亲和力和抗 DYKDDDDK 标签纳米抗体（VHH），可从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多物种细胞裂解液中，特异性富集 DYKDDDDK 标签融合蛋白。该磁珠采用无标签、无轻重链结构的纳米抗体，能有效降低非特异性结合，显著提升目的蛋白富集效率与检测信噪比，适用于蛋白互作分析、表达验证、蛋白功能研究等多种下游分子生物学实验。

表 1: MagHub Anti-DDDDK Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	高聚物磁性微球
配体	抗 DYKDDDDK 标签纳米抗体
粒径	1 μm
保存条件	2-8°C 可稳定保存 2 年
应用	适用于 IP 和 Co-IP 实验
储存缓冲液	20 mM Tris (pH8.0), 0.15 M NaCl, 0.01% Tween20, 0.1% proclin300

2. 使用方法

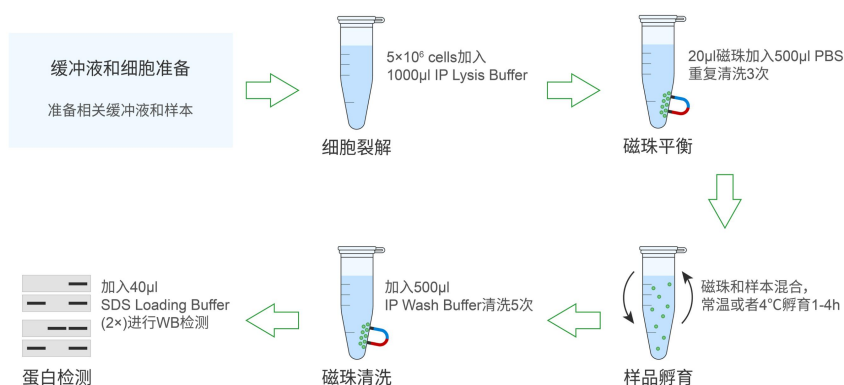


图 1. MagHub Anti-DDDDK Beads 使用流程图



2.1 缓冲液配置

表 2: 缓冲液配方推荐

缓冲液名称	缓冲液成分
1× PBS 缓冲液	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
IP 裂解液(IP Lysis Buffer)	25 mM Tris(pH=8.0), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 选择性加入蛋白酶抑制剂
磁珠洗杂液(IP Wash Buffer)	1× PBS (pH 7.4), 0.05% Tween-20
IP-MS 洗脱液 (Elution Buffer D)	20 mM Tris (pH 8.0), 6M 尿素, 0.5% SDS
2x SDS Loading Buffer	125 mM Tris(pH 6.8), 4% SDS, 20% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 100 mM DTT

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 1×10^6 - 5×10^6 cells 使用 1000 μ l;
- 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 μ l	贴壁细胞
60×60 mm	250-500 μ l	
6 孔板	200-400 μ l	
24 孔板	100-200 μ l	
1×10^6 - 5×10^6 cells	500-1000 μ l	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 μ l 磁珠置于离心管中, 向管中加入 500 μ l 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 μ l 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℃ 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 μ l 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℃ 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 μ l 原始磁珠体积加入 60 μ l 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 μ l 原始磁珠体积加入 40 μ l 的 2 $\times$ SDS Loading Buffer，摇晃混匀后 100 $^{\circ}$ 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 μ l 以内，剩余的样本可冻存于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 $^{\circ}$ 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 细胞内表达蛋白，含有 His 和 DYKDDDDK 标签。
- 2) 取 1 ml 悬浮细胞 ($\approx 3 \times 10^6$ 个) 常温下 1 $\times$ PBS (pH=7.4) 清洗三次后快速进行裂解、离心；
- 3) 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 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 $\times$ IP Wash Buffer 清洗 5 次后加入 2 $\times$ SDS Loading Buffer 99 $^{\circ}$ 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。

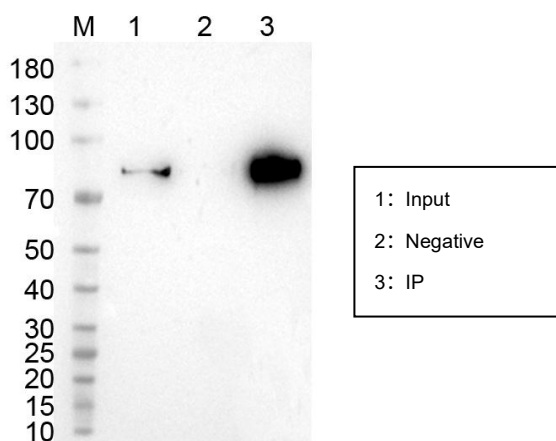


图 2. MagHub Anti-DDDDK Beads 进行 IP 实验后的 WB 图

图 2 表明 MagHub Anti-DDDDK Beads 能够高效捕获样品中的 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 Anti-DDDDK Beads	MP6201-01	0.2 ml
	MP6201-02	1 ml
	MP6201-03	5 ml
	MP6201-04	25 ml
	MP6201-05	100 ml



6. 相关产品

类型	名称	货号
Magnet-G 蛋白标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	Magnet-G His 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0049
	Magnet-G Myc 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0050
	Magnet-G HA 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0051
	Magnet-G GFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0052
	Magnet-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒	BK0053
	Magnet-G Strep-tag II IP 试剂盒	BK0071
	Magnet-G MBP-tag IP 试剂盒	BK0075
MagHub 蛋白标签 IP 试剂盒	MagHub HA-tag IP 试剂盒	BK0072
	MagHub Myc-tag IP 试剂盒	BK0074
	MagHub V5-tag IP 试剂盒	BK0076
	MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒	BK0073
Magnet-G 标签抗体磁珠	Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads	MP5101
	Magnet-G Anti-His Beads	MP5201
	Magnet-G Anti-Myc Beads	MP5301
	Magnet-G Anti-HA Beads	MP5401
	Magnet-G Anti-GFP Beads	MP5501
	Magnet-G Anti-RFP Beads	MP5601
	Magnet-G Control IgG Beads	MP5801
	Magnet-G Anti Strep-tag II Beads	MP6001
MagHub 标签抗体磁珠	Magnet-G Anti MBP Beads	MP6401
	MagHub Anti-HA Beads	MP6101
	MagHub Anti-Myc Beads	MP6301
	MagHub Anti-V5 Beads	MP6501
	MagHub Control Fab Beads	MP6601
	MagHub Control Nb Beads	MP6701