



Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作说明.....	1
3. 注意事项.....	2
4. 参考信息.....	2
5. 常见问题与解答.....	3
6. 订购信息.....	3
7. 相关产品.....	3

1. 产品介绍

1.1 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。

1.2 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, 亲和力都要高于 Anti-Flag M2 抗体, 更适合做 WB、IP 等蛋白互作实验。

1.3 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	技术参数
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

2. 操作说明

本操作流程主要为蛋白互作实验, 每次反应使用 20 μl Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads, 使用流程可参考图 1。

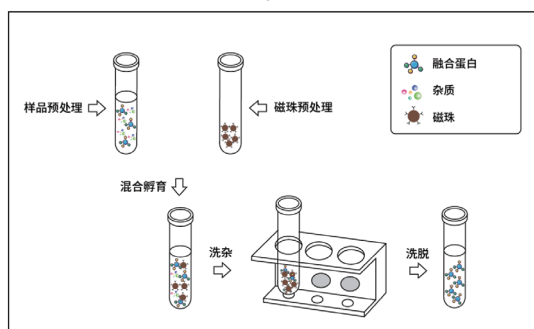


图1. Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads使用流程图



2.1 推荐缓冲液(自备)

表2: 缓冲液配置

缓冲液名称	试剂配置
洗杂缓冲液	20mM Na ₂ HPO ₄ , 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20, pH=7.4
洗脱液	0.1M Gycine, 0.15M NaCl, pH=3.0
中和缓冲液	1 M Tris-HCl, pH 8.0

2.2 磁珠漂洗

- 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 洗杂缓冲液, 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 500μl 洗杂缓冲液, 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。

2.3 样品孵育

- 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) 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 500μl 洗杂缓冲液, 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: 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, 加入洗杂缓冲液后可以冰上静置 3-5 分钟。

2.4 蛋白洗脱

- 1) 洗脱液洗脱:

每 20μl 原始磁珠体积加入 40μl 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, 加入少量的中和缓冲液将 pH 调至中性, 最后进行 Western 检测。

- 2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱:

每 20μl 原始磁珠体积加入 60-100μl 的 1×SDS Loading Buffer, 轻摇摇晃混匀后 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。

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 ≤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

- 1) DYKDDDDK tag IP 实验: 样品为胞内表达蛋白, 含有 His 和 DYKDDDDK 标签。
- 2) 取 0.5ml 悬浮细胞 (≈1.5×10⁶ 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 30min;
- 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) 用洗杂缓冲液清洗 5 次后加入 1×SDS Loading Buffer 99°C 高温处理 10min 后进行 WB;
- 6) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb, 阴性对照 (-) 为不带有 DYKDDDDK 抗体的磁珠和样本孵育, 结果请见图 2。

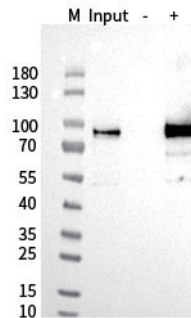


图2.通过Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads进行IP后的WB图

图 2 表明 Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads 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

1) 聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别?

a) 琼脂糖磁珠是带孔微球,粒径在 30-100 μm ,交联时会有一部分配体会进入球孔内部,所以偶联载量相对较高,适用于蛋白的快速纯化;而聚合物磁珠通常粒径为 1-3 μm 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,适用于蛋白互作实验,但其载量不高;

b) 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。

2) 为何结合不到目的蛋白?

a) 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;

b) 样本中有高浓度的还原剂等干扰物质,建议选用合适的裂解液。

6. 订购信息

名称	货号	规格
Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads	MP5101-01	0.2ml
	MP5101-02	1ml
	MP5101-03	5ml
	MP5101-04	25ml
	MP5101-05	100ml

7. 相关产品

类型	名称	货号
Magnet-G 标签抗体磁珠	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



类型	名称	货号
Magneti-G 蛋白标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	Magneti-G DYKDDDDK标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	BK0048
	Magneti-G His标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	BK0049
	Magneti-G Myc标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	BK0050
	Magneti-G HA标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	BK0051
	Magneti-G GFP标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	BK0052
	Magneti-G RFP标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	BK0053