

货号	名称	规格	存储
F1001-0.5mL	Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads	0.5mL	4℃
F1001-1mL	Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads	1mL	4℃
F1001-5mL	Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads	5mL	4℃

产品简介

Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads(Anti-Flag 纳米抗体磁珠)偶联了经过严格筛选、优化并重组表达的 Flag 纳米抗体,可用于捕获哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物细胞、组织提取物中的 Flag 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白及其相互作用蛋白。

实验前先将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达;之后将 Anti-Flag 磁珠加入样本裂解液中,Flag 纳米抗体与目标融合蛋白及其结合蛋白形成复合体;去除未结合的蛋白后,可以采用多种方法洗脱蛋白质,并且 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

产品属性

磁珠直径	2 μm
蛋白结合量	≥1.5mg 蛋白/mL 磁珠
反应性	可特异性结合 1×或 3×Flag 标签 (DYKDDDDK), 对融合蛋白 N 端、C 端或中间的 Flag 标签均可以识别
应用	免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (CoIP)、染色质免疫沉淀 (CHIP)、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)
储存缓冲液	20 mM PBS, 5% BSA
储存条件	4℃储存, 避免冻存! 有效期 1 年

使用说明

I 所需主要仪器

磁力架、混匀仪、低温离心机、超声破碎仪。

II 建议的缓冲液配方

缓冲液	配方
裂解缓冲液	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40 (在 4℃下调整 PH)
漂洗缓冲液	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % NP-40 (在 4℃下调整 PH)
洗脱缓冲液	3×Flag 多肽用 PBS 溶解成 400 ng/μL
2×SDS-PAGE 上样缓冲液	125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝

III 注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠, 禁止长时间置于磁场, 可能会引起磁珠聚团, 降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布, 请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
3. 请勿使用 PBS 漂洗磁珠, 否则会导致磁珠无法被磁力架吸附。
4. 实验前应在裂解缓冲液和漂洗缓冲液中加入足量的蛋白酶抑制剂, RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂, 混合均匀, 冰上保存, 现配现用。
5. IP 实验前, 应先确认样本裂解液 (input) 中诱饵蛋白的表达水平。
6. IP 实验应设置阴性对照组, 通常采用表达 Flag 标签空载体的样本作为对照。
7. 如果使用建议的缓冲体系不能获得很好的实验结果, 可自行筛选、配制缓冲液进行实验。
8. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系, 可能需要优化才能得到最大产量。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

10. 本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

IV 操作方法

1. 样本裂解（参考）

(1) 按如下方法收集样本：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	1×10^7 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4℃ 500 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨
革兰氏阴性细菌	50 μ L 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4℃ 5000g 离心 5min 收集沉淀，尽量吸干液体

(2) 将样本置于冰上，每组加入 500 μ L 预冷的裂解缓冲液，吹打混匀；

(3) a. 动物细胞：最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀。

b. 动物组织、植物组织、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(4) 4℃ 12000g 离心 15min，收集上清至新的离心管中；取 30 μ L 作为 input，剩余置于冰上备用或 -80℃ 保存。

***注意：** i. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液、改善裂解方法或改善超声条件继续裂解，超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。

ii. 裂解缓冲液用量可随样本量增加而等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. 免疫共沉淀

(1) 将 Anti-Flag 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20~30 μ L 磁珠到新的离心管中。

(2) 加入 200 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清。

(3) 重复上步操作一次。

(4) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液，放混匀仪上室温孵育 1h 或 4℃ 孵育 4h。

(5) 放磁力架上静置 1min 并弃上清。

(6) 加入 500 μ L 漂洗液缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清。

(7) 重复上步操作两次，共漂洗三次。

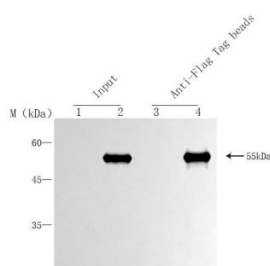
3. 洗脱

(1) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱（变性洗脱法）：加入 50 μ L 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃ 加热 5~10 min。放磁力架上静置 1min 或 5000 g 离心 1min，收集上清至新的离心管中。洗脱后的蛋白 -20℃ 保存，或直接用于 SDS-PAGE 和 Western Blot 实验，SDS-PAGE 胶条可以用于质谱检测。

(2) 3×Flag 肽竞争洗脱（非变性洗脱法）：加入 40~50 μ L Flag 多肽洗脱液（400 ng/ μ L），涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s；1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1min，收集上清至新的离心管中。洗脱后的蛋白 -80℃ 保存，或直接用于 SDS-PAGE、Western Blot 和质谱等实验。

***备注：** Anti-Flag 磁珠没有抗体轻重链污染问题，建议首选变性洗脱法，洗脱效率更高。

结果展示



结果说明：

泳道 1：转染 Flag 空载体的 HEK-293T 细胞裂解液

泳道 2：转染 Flag-诱饵蛋白的 HEK-293T 细胞裂解液

泳道 3：转染 Flag 空载体的 HEK-293T 细胞裂解液采用 20 μ L Anti-Flag 磁珠 IP 后的洗脱液

泳道 4：转染 Flag-诱饵蛋白的 HEK-293T 细胞裂解液采用 20 μ L Anti-Flag 磁珠 IP 后的洗脱液

一抗：Anti-Flag 小鼠单克隆抗体 1:2000 稀释

二抗：羊抗鼠 IgG (H+L)-HRP : 1:8000 稀释