

Anti-Flag 纳米抗体免疫磁珠

Catalog Number: EA-IP-001MN

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

性能指标

应用范围	Flag 标签融合蛋白的免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (Co-IP)、染色质免疫沉淀 (ChIP)、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)。 Flag 标签可以位于蛋白的 N 端, C 端或中间, 如 N 端 Flag 融合蛋白 (Flag-Protein)、C 端 Flag 融合蛋白 (Protein-Flag)。
抗体属性	Anti-Flag 纳米抗体。
凝胶属性	磁性琼脂糖珠, 平均粒径 2 μm 。
凝胶载量	1 mL Anti-Flag 免疫磁珠, 可沉淀至少 1.5 mg Flag 融合蛋白。
储存缓冲液	20 mM PBS, 5% BSA。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品以悬液形式提供亲和磁珠, 使用前通过反复颠倒、轻微涡旋温和混匀磁珠悬液。
4. 请勿使用 PBS 漂洗磁珠, 否则会导致磁珠无法被磁力架吸附。
5. 使用前应在裂解液中加入足量蛋白酶抑制剂 (PMSF), RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂, 混匀后冰上放置, 现配现用。
6. 配套使用的相关试剂, 需实验室自备。

使用方法

1. 目标蛋白样品制备

1) 血清及分泌表达目标蛋白样品处理

收集血清或培养基上清, 检测目标蛋白浓度。如果目标蛋白质浓度较高, 建议用 1×PBS 稀释至蛋白质终浓度为 10~100 $\mu\text{g/mL}$, 以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 将悬浮细胞或贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中, 1000rpm 离心 5min, 弃上清。
- b. 用预冷至 4°C 的 1×PBS 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复 1 次。
- c. 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液, 反复吹打后冰上放置 10~20min。

注: 一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 $0.5\sim 1\times 10^7$ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解, 您可以添加蛋白酶抑制剂 (PMSF 工作浓度: 0.1~1.0mmol/L)。

- d. 用超声破碎仪处理细胞裂解液, 直至细胞裂解液透明, 不再粘稠。冰上放置 30min 之后, 12000rpm, 4°C 离心 10min。取上清, 可立即进行下一步实验或置于 -80°C 冻存。

注: 若无超声破碎仪, 也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸, 直至细胞裂解液透明, 不再粘稠。

For Research Use Only

2. 对照组设置（仅供参考，实验过程中请按实际需要调整）

1) 阴性对照

- 抗体的阴性对照：以凝胶偶联 Mouse IgG 亚型标签抗体为例，选择 Mouse IgG 亲和凝胶（货号：EA-IP-100）做为抗体的阴性对照，使用方法与凝胶偶联抗体相同。
- 蛋白的阴性对照：使用不表达靶蛋白 X 但表达无关蛋白 Y 的蛋白样品做对照，处理方法与待对照靶蛋白相同。

2) 阳性对照

- 以稀释至 10~100μg/mL 未添加磁珠凝胶偶联抗体处理的蛋白样品作为阳性对照，即 Input 组。上样缓冲液制备方法与实验组相同。

3. 免疫（共）沉淀

- 温和重悬 Anti-Flag 免疫磁珠，混合均匀，取 20~30 μL 磁珠悬液至离心管中。加入 200μL 的 1×PBST 轻柔重悬清洗磁珠，磁力架上静置 1 min 后，弃上清，重复上述步骤 2 次。

注：多个样品时，可将磁珠重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。

- 加入 50-200μL 含有目标蛋白的样本溶液，轻柔重悬磁珠，室温摇床孵育 2h 或者 4℃孵育过夜。
- 磁力架上静置 1 min 后，将上清液转移到新的离心管中备用（上清液可用于检测 Flag-tag 蛋白是否存在残留）。加入 500μL 1×PBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复 2 次。

4. 目标蛋白洗脱

1) 变性洗脱法

- 向磁珠中加入 20μL 1×PBS 和 5μL 5×上样缓冲液，混合均匀，95℃煮样 5min。
- 磁性分离，收集上清至新的离心管中。 -20℃保存或直接用于 SDS-PAGE 和 Western-Blot 实验。

2) 酸性洗脱法

- 向磁珠中加入 50~100μL 酸性洗脱液，轻柔混匀 20s，室温孵育 10min；

注：酸性环境会缩短免疫磁珠的使用寿命，应尽量缩短磁珠与酸性洗脱液的接触时间，建议不超过 10min。

- 分离磁珠，收集上清至新的离心管，并立即滴入总体积 1/10 体积的 10×PBST Buffer 中和，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品可用于后期功能分析。

背景信息

Anti-Flag（DYKDDDDK）纳米抗体免疫磁珠，由高品质的 Flag 纳米抗体与磁珠共价偶联制成，具有高载量，高特异性，性质稳定，可反复使用的特点，可用于 Flag 标签融合蛋白的亲纯化及免疫（共）沉淀、染色质免疫沉淀、RNA 结合蛋白免疫沉淀。

储存方法

4℃可保存 12 个月。