

Anti-FLAG (DYKDDDDK) 免疫磁珠

Catalog Number: EA-IP-001M

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。**性能指标**

	Flag 标签融合蛋白的亲纯化及免疫（共）沉淀。
应用范围	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) 和 Met 修饰的 N 端 Flag 融合蛋白 (Met-Flag-Protein)。 仅适用于分泌蛋白的纯化。
抗体属性	小鼠单克隆抗体, IgG2a 亚型。
凝胶属性	磁珠, 平均粒径 3 μm。
凝胶载量	0.5mL 磁珠, 共价偶联 2mg Anti-Flag 小鼠单克隆抗体。 0.5mL Anti-Flag 免疫磁珠, 可沉淀至少 0.6mg Flag 融合蛋白。
使用强度	可反复使用 5 次以上。
主要成分	0.25mL Anti-Flag 免疫磁珠, 保存于 0.75mL 含防腐剂的 PBS 中。

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，使用前先温和重悬磁珠悬液，然后按照需求取用。
4. 勿离心、冷冻、干燥磁珠，勿使用超声处理磁珠，勿使酸处理磁珠时间超过 10min。
5. 混匀磁珠时，请采用移液枪轻柔吹打，柔和涡旋，上下颠倒及摇床混匀等方法。勿使用超声等方法。
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 10~100μg/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℃ 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℃离心 10min。取上清，可立即进行下一步实验或置于 -80℃ 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。

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

- a. 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：MIP100）做为抗体的阴性对照，使用方法与凝胶偶联抗体相同。
- b. 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

- a. 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. 应用— 免疫（共）沉淀法检测 Flag 标签蛋白质

For Research Use Only

- a. 温和重悬Anti-Flag 免疫磁珠，混合均匀，取40μL 磁珠悬液（约含 10μL 磁珠）至离心管中。加入500μL 的 1×PBS 轻柔重悬 清洗磁珠，磁力架上静置 10 sec 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。

- b. 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。
- c. 磁力架上静置 10 sec 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×PBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复2 次。
- d. 加入 20μL 1×PBS 和 5μL 5×上样缓冲液，煮样5min，冷却至室温并离心。
- e. 取上清进行 SDS-PAGE 实验，以备后续的Western Blotting 检测。

4. 应用二 亲和纯化Flag 标签蛋白质

1) 磁珠预处理与样品孵育

- a. 温和重悬Anti-Flag 免疫磁珠至均一，取 100μL 磁珠悬液(约含25μL 磁珠)至离心管中，加入900μL 1×PBS，轻柔重悬清洗磁珠，磁力架上静置 10 sec 后，弃上清，重复上述步骤2 次。
- b. 加入 50-800μL 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。
- c. 磁力架上静置 10 sec 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）。
- d. 加入 1mL 1×PBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复4 次。
- e. 根据蛋白质性质以及后续实验要求，可以选择竞争洗脱或酸性洗脱。

2) 竞争性洗脱

竞争性洗脱方式，洗脱效率高，特异性强，不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- a. 将 100μL 或4 倍磁珠体积，浓度为2mg/mL 的Flag 多肽（货号：E-PP-2101）溶液加入上述沉淀，温和重悬磁珠，4℃摇床 孵育洗脱 2h（为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱）。

注：根据蛋白质洗脱难易程度，调整HA 多肽溶液浓度，最高可到5mg/ml。

- b. 磁性分离，将包含目的蛋白的上清转移到新的离心管。如有必要，重复本步骤 1-3 次。
- c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

3) 酸性洗脱

酸性洗脱方式，成本低，操作时间短，一般不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- a. 将预冷的0.5mL 或20 倍磁珠体积，pH 3.0 的酸性洗脱液加入上述沉淀，悬浮磁珠，室温孵育5min。

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。

- b. 孵育结束后，磁性分离，转移上清到新的离心管中，并立即加入 1/10 体积的pH 8.0 的中和液，混匀。
- c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

4) 磁珠的清洗与再生

免疫磁珠如需重复使用，洗脱后须立即进行清洗与再生。

For Research Use Only

- a. 依次用 10 倍磁珠体积的酸性洗脱液、10 倍磁珠体积的中和液、10 倍磁珠体积的 1xPBS 清洗 1 次。
- b. 再用 3 倍体积含防腐剂的PBS 清洗 1 次。
- c. 保存于磁珠等体积的含防腐剂的PBS 中，4℃密封存放。

背景信息

Anti-Flag (DYKDDDDK) 免疫磁珠，由高品质的Flag 小鼠单克隆抗体与磁珠共价偶联制成，具有高载量，高特异性，操作迅速便捷，性质稳定，可反复使用的特点，可用于Flag 标签融合蛋白的亲和纯化及免疫（共）沉淀。

储存方法

4℃可保存 12 个月。