Anti-DYKDDDDK Affinity Beads

目录

1. 产品介绍.....1
2. 试剂准备.....1
3. 样品纯化.....1
4. 试剂兼容性.....2
5. 问题及解决方案.....2
6. 订购信息及相关产品.....3

1. 产品介绍

Flag 标签是一个由八个亲水氨基酸组成的多肽片段，定位在融合蛋白表面，因此更易与抗体结合以及被肠激酶分解。**Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** 是以抗 Flag(DYKDDDDK)抗体为亲和配体，一步纯化原核、酵母或哺乳动物细胞表达的 Flag 标签融合蛋白。

Anti-DYKDDDDK Affinity Beads 以 4%琼脂糖凝胶为基质，杂蛋白非特异性结合少，可用于 Flag 标签融合蛋白的纯化和免疫沉淀（IP）。

表 1. Anti-DYKDDDDK Affinity Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	Anti-DYKDDDDK Antibody
结合能力	>1 mg DYKDDDDK 标签蛋白/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.1 MPa，1 bar
储存缓冲液	0.1%Proclin 300
储存温度	2-8℃

2. 试剂准备

2.1 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡液对样品或细胞培养液稀释，或者用平衡液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.2 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 50 mM Tris，0.15 M NaCl，pH7.4

酸性洗脱液: 0.1 M glycine HCl，pH3.0

竞争性洗脱液：50 mM Tris，0.15 M NaCl，100-500 μg flag 多肽/ml，pH7.4

中和液：1 M Tris-HCl，pH8.0

3. 样品纯化

3.1 柱层析

1) 将 **Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** 装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下。

2) 将样品加到平衡好的 **Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** 中，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。

3) 用 10 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

4) **A 酸性洗脱：**使用 5 倍柱体积的酸性洗脱液洗脱，向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 值至 7.0-8.0，分管收集。

注：酸性洗脱后填料要立即用平衡液平衡，**Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** 在洗脱液中不要超过 20 min。

B 竞争性洗脱：使用 5 倍柱体积的竞争性洗脱液洗脱。分管收集。

5) 使用 3 倍柱体积的洗脱液再生，然后用平衡液平衡至中性。

6) 然后保存在储存缓冲液中，2-8℃保存。

3.2 静态吸附

1) 填料准备：取适量的 **Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** 加入层析柱中，流干保护液。加入 5 倍柱体积的平衡液清洗。
2) 加入样品溶液，4℃或室温震荡孵育至少 30 min(不能磁力搅拌)，确保填料与样品溶液充分混合。
3) 孵育完毕后，将填料混合液离心（5000×g 离心 1 min）或过滤收集填料。
4) 将填料装入层析柱中，用平衡液清洗直至紫外稳定。
5) 用酸性洗脱液或竞争性洗脱液洗脱，参考 3.1 中 4）。
6) 填料再生和保存参考 3.1 中 5)和 6)。

3.3 免疫沉淀操作流程

1) 填料准备：取 40 µl 的 **Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** (柱体积 20 µl)混合液加入到 2 ml 离心管中，5000×g 离心 1 min，吸弃上清。
2) 填料加入 0.5 ml 平衡液，悬浮填料（使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用），5000×g 离心 1 min，吸弃上清。重复一次。
3) 加入 200-1000 µl 样品裂解液到处理好的填料中，混合均匀，在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管， 促使样品和填料充分接触并吸附，室温至少 1 h。5000×g 离心 1 min，吸弃上清。
4) 洗杂：加入 0.5 ml 的洗杂液，悬浮填料，轻轻混匀，5000×g 离心 1 min，吸弃上清。再重复三次。确保去除非特异性吸附。
5) 样品洗脱：可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

A:酸性洗脱

加入 100 µl 酸性洗脱液，悬浮填料。室温孵育 5 min, 5000×g 离心 1 min。小心取出上清，不要吸到填料，用中和液中和。洗脱样品放置 4℃，长时间放置-20℃保存。

B:竞争性洗脱

加入 100 µl 竞争性洗脱液洗脱。室温孵育 30 min, 5000×g 离心 1 min。小心取出上清，不要吸到填料。洗脱样品放置 4℃，长时间放置-20℃保存。

C:变性洗脱

实验室常规蛋白上样缓冲液（Loading Buffer）中含有β-巯基乙醇和 DTT,可以使填料中抗体重链和轻链断开。含有 SDS 的样品缓冲液可以使 Anti-DYKDDDDK 抗体变性，洗脱后的 **Anti-DYKDDDDK Affinity Beads** 没办法重复使用。

每管中加入 20 µl 2× Loading Buffer，95℃加热 5min。5000×g 离心 1 min，吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测。

4. 试剂兼容性

表 2. Anti-DYKDDDDK Affinity Beads 试剂兼容性

试剂名称	最大耐受浓度	备注
β-巯基乙醇	10 mM	纯化过程中应避免使用，如果在 IP 中使用，填料不能回收重复利用。
DTT	80 mM	
SDS	--	
EDTA	5 mM	过高的 EDTA 会降低蛋白回收率。
Tween-20	5%	过高浓度会影响标签蛋白结合效率。
Triton X-100	5%	
NP-40	4%	
盐酸胍	0.3 M	过高浓度会使抗体变性。
尿素	1.5 M	
甘油	20%	过高浓度会影响标签蛋白结合。
氯化钠	1 M	减少非特异性吸附

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
流穿中有目的蛋白	过载	减少上样体积或增加磁珠体积。
	结合时间太短	延长样品和磁珠的结合时间。
	标签未暴露	可以加入低浓度的变性剂，上样前透析。
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行透析。

（续表）

洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品。 低温操作。 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前 Western 检测是否有 flag 标签融合蛋白
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。 增加上样量。 减少 NaCl 浓度。
背景太杂	非特异性吸附	减少上样量
	洗杂不充分	增加洗杂次数，每次清洗孵育 5-10min。 增加洗杂液中盐离子浓度。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Anti-DYKDDDDK Affinity Beads	SA042001	1 ml
	SA042005	5 ml
	SA042025	25 ml
	SA042100	100 ml
	SA042500	500 ml
	SA04201L	1 L
Anti-HA Affinity Beads	SA068001	1 ml
	SA068005	5 ml
	SA068025	25 ml
	SA068100	100 ml
	SA068500	500 ml
	SA06801L	1 L
Anti-c-Myc Affinity Beads	SA065001	1 ml
	SA065005	5 ml
	SA065025	25 ml
	SA065100	100 ml
	SA065500	500 ml
	SA06501L	1 L
Anti-GFP Affinity Beads 4FF	SA070001	1 ml
	SA070005	5 ml
	SA070025	25 ml
	SA070100	100 ml
	SA070500	500 ml
	SA07001L	1 L
Anti-YFP Affinity Beads 4FF	SA075001	1 ml
	SA075005	5 ml
	SA075025	25 ml
	SA075100	100 ml
	SA075500	500 ml
	SA07501L	1 L
Anti-RFP Affinity Beads 4FF	SA072001	1 ml
	SA072005	5 ml
	SA072025	25 ml
	SA072100	100 ml
	SA072500	500 ml
	SA07201L	1 L