



Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	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

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。另外这一标签具有的优势是连接在目的蛋白的 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 DYKDDDK 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。本公司的 Anti-DYKDDDDK 抗体，亲和力都要高于 Anti-Flag M2 抗体。

1.3 磁珠性质

Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 是将高浓度的 DYKDDDDK 抗体偶联至琼脂糖磁珠上，可直接用于 DYKDDDDK 融合蛋白的纯化。磁珠性能见表 1。

表 1. Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	琼脂糖磁性微球
配体	Anti-DYKDDDDK 标签抗体
粒径范围	30-100 μm
标签蛋白结合载量	$\geq 2.5 \text{ mg/ml}$ 磁珠体积 (标签融合蛋白分子量 20 kDa)
磁珠浓度	磁珠占总体积的 20%，即 1 ml 磁珠固体，总体积为 5 ml

2. 使用方法

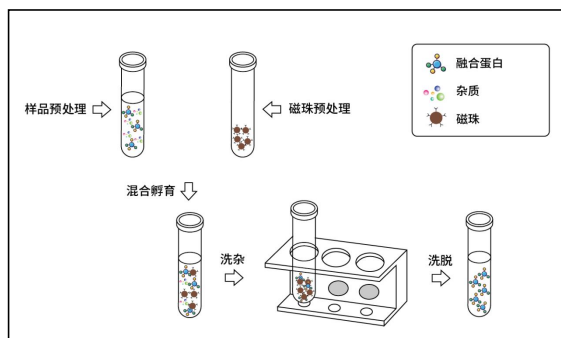


图 1. Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 的使用流程图

2.1 缓冲液准备

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：PBST (1×PBS+0.02%Tween-20, 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





2.2 清洗磁珠

- 1) 将磁珠充分混匀后取 100 μ l 磁珠混悬液置于离心管中放磁力架上静置, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;
- 2) 加入 500 μ l 平衡液轻轻颠倒混匀 3 次;
- 3) 将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;
- 4) 重复上述操作重复 3 次。

注: 可根据样本量增加磁珠混悬液的体积 (如: 1ml 样本加入 100 μ l 磁珠混悬液; 2ml 样本加入 200 μ l 磁珠混悬液)。

2.3 样品前处理

真核表达的分泌蛋白可直接取培养上清离心。真核或原核表达的胞内蛋白可用裂解液或超声的方法破碎细胞后离心取上清, 再进行后续步骤。若样品中含有核酸杂质会吸附在磁珠上, 导致杂蛋白变多。除去核酸常用两个方法:

- 1) 充分超声可以打断核酸, 但过度超声也会造成蛋白降解;
- 2) 使用超级核酸酶消化, 这一方法需要注意缓冲液的选择。低浓度非离子型表面活性剂, 如吐温-20、曲拉通-100 可以帮助分散脂类团块, 有助于获得更纯的目的蛋白。

2.4 样品孵育

- 1) 向上述漂洗好的磁珠中加入 1ml 样品, 2-8 $^{\circ}$ C 或常温下孵育 30-60min (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 500 μ l 洗杂液, 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) 重复上述清洗操作 5 次。

注: 蛋白纯化需要控制温度, 在 2-8 $^{\circ}$ C 下孵育有助于防止蛋白降解。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, 使杂蛋白从磁珠孔隙中充分溶出。

2.5 蛋白洗脱

- 1) 每 100-200 μ l 磁珠混悬液加入 100 μ l 洗脱液, 常温或 4 $^{\circ}$ C 洗脱 5-10min, 期间轻轻混匀 3-5 次;
- 2) 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, 重复洗脱三次。洗脱蛋白需要分管收集, 分别电泳确定纯度。

2.6 蛋白洗脱液的选择

- 1) 酸性洗脱: 一般为 pH=2.5-3.0 的甘氨酸或者柠檬酸, 酸洗脱可有效打开抗体与标签之间的相互作用, 但由于大部分蛋白仅能耐受 pH5.5 以上的条件, 酸洗脱对保持标签蛋白的活性有害, 如果不确定融合蛋白可以耐受酸性缓冲液可以进行预实验, 洗脱后的蛋白加入 1-2 M Tris(pH=8.0-8.5)快速调节 pH 恢复中性;
- 2) 多肽竞争洗脱: 多肽洗脱可以获得高活力的蛋白, 但多肽竞争洗脱的效率较低, 磁珠上会有目的蛋白的残留。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱中, **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 $\leq$ 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;
- 6) **本产品不能够直接高温加热磁珠, 高温加热磁珠将造成抗体大量脱落, 后进行电泳条带较多, 影响对实验结果的判断。**

4. 参考信息

- 1) 分泌蛋白纯化:
 - a. 取 2ml 培养基上清, 高速离心去除颗粒沉淀;
 - b. 加入已经漂洗过的 100 μ l 磁珠悬浮液, 混合均匀后放置旋转混匀仪上, 室温孵育 1 h;
 - c. 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;
 - d. 用 PBST 清洗 5 次后加入不同的洗脱液, 每次洗脱孵育 10 min, 重复洗脱三次;
 - e. 对洗脱产物进行 SDS-PAGE 电泳, 结果请见图 2。



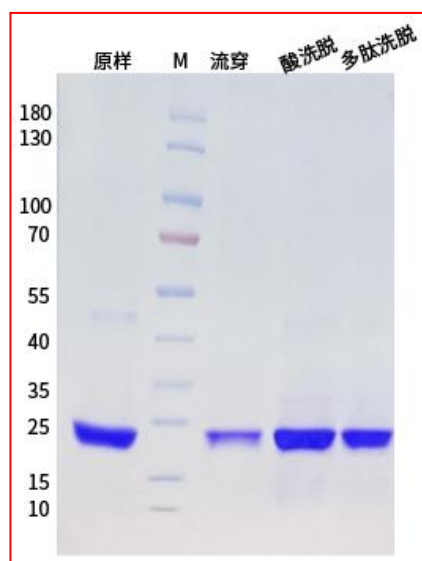


图 2. Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 纯化分泌蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

从电泳图中可以看出，100ul 磁珠混悬液对 2 ml 样品进行纯化，并不能完全捕获目的蛋白，主要原因是培养上清中的标签蛋白总量超过了磁珠的最大载量。

5. 常见问题与解答

1) 聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别？

- 琼脂糖磁珠是带孔微球，粒径在 30-100 μm ，交联时很大一部分配体会进入球孔内部，所以偶联载量相对较高，非常适用蛋白的快速纯化；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，非常适用于蛋白互作实验，但其载量不高；
- 我们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) 为何纯化不到目的蛋白？

- 可能是由于蛋白表达量低造成的，建议在纯化前用 WB 或者 SDS-PAGE 检测下蛋白原始表达量，如果 WB 信号很弱或者无信号，目的蛋白很难纯化到；
- 可能由于洗脱方式不合适造成，建议根据自己的实验目进行洗脱；
- 样本中有高浓度的还原剂等干扰物质，建议用合适的裂解液。

3) 为什么不建议高温加热磁珠？

- 本产品由生物素化抗体与 SA 琼脂糖磁珠偶联制备而成，如果直接煮球会造成 SA、抗体失活脱落，在 SDS-PAGE 胶上出现很多条带，从而影响目的条带的判断；

6. 订购信息

名称	货号	规格
Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads	SM054000	0.2 ml
	SM054001	1 ml
	SM054005	5 ml
	SM054025	25 ml

