



Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads

目录

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

1. 产品介绍

DYKDDDDK 是融合蛋白表达纯化过程中常用的标签之一。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，该标签很小，几乎不会干扰融合蛋白的功能，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，而不留下冗余残基。**Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads** 是将高浓度的 Anti-DYKDDDDK 抗体定向偶联至琼脂糖微球上，抗体特异性结合抗原，可一步纯化得到高纯度的标签融合蛋白。

表 1. Anti-DYKDDDDK HC 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	>3 mg DYKDDDDK 标签蛋白/ml 介质(25KDa 蛋白)
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	20mM Tris, 0.15M NaCl, 0.1%Proclin 300
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

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, pH8.0 或 1×PBS, 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, 0.5 mg/ml 3×Flag Peptide (SLR010, 常州天地人和), pH8.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.0

再生缓冲液: 20 mM Tris, 2 M MgCl_2 , pH 8.0

3. 样品纯化

3.1 柱层析纯化

- 1) 装柱: 将 Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads 装入合适的层析柱，用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡。
- 2) 上样: 将样品加到平衡好的 Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads 中，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 洗杂: 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) 洗脱: ①**酸性洗脱**: 使用 5 倍柱体积的酸性洗脱液洗脱，分管收集，每管收集 1 个柱体积，洗脱后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;
②**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，每管收集 1 个柱体积。

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





- 5) 填料再生：至少使用 30 倍柱体积的再生液再生，每分钟的流速不要超过柱体积，建议再生时间长一些，有助于填料的重复使用。
- 6) 保存：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 HC 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 30 -60min（建议在旋转混匀仪上孵育，使样品和填料充分接触），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)。

4. 问题及解决方案

- 1) 本产品保存在 2-8℃ 冰箱中，**不可冻结保存**；
- 2) 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；
- 3) 本产品能耐受≤2M 尿素，高浓度的尿素会导致抗体配体脱落；
- 4) 本产品不能够直接高温煮球，高温加热将造成抗体大量脱落，电泳检测条带较多，影响对实验结果的判断；
- 5) 本产品采用特殊的偶联方式制备，大幅度提高了填料结合和洗脱的载量，但是酸性洗脱可能会造成配体少量脱落，建议采用温和洗脱方式洗脱（3×Flag 多肽），温和洗脱能够避免填料上配体脱落，同时还能够最大程度保留目的蛋白的活性。

5. 参考信息

①原核蛋白纯化：

- 1) 使用铁锤裂解液（BR0005，常州伯仪生物）裂解菌体，步骤参考铁锤裂解液说明书，最终得到 20ml 裂解液；
- 2) 将 Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads 分别装入 2 根 12ml 重力柱中，每根重力柱 1ml 柱体积，加入 5ml 1×PBS 缓冲液平衡；
- 3) 每根重力柱加入 10ml 样本，缓慢上样，流速不超过 1ml/min，重复上样三次；
- 4) 每根重力柱加入 10ml 1×PBS 缓冲液洗杂；
- 5) 一根重力柱中加入 5ml 0.1 M Glycine HCl，pH3.0 进行洗脱，另一根重力柱中加入 0.5mg/ml 3×Flag 多肽洗脱液，pH8.0。
- 6) 对洗脱产物进行 SDS-PAGE 电泳，结果请见图 1。

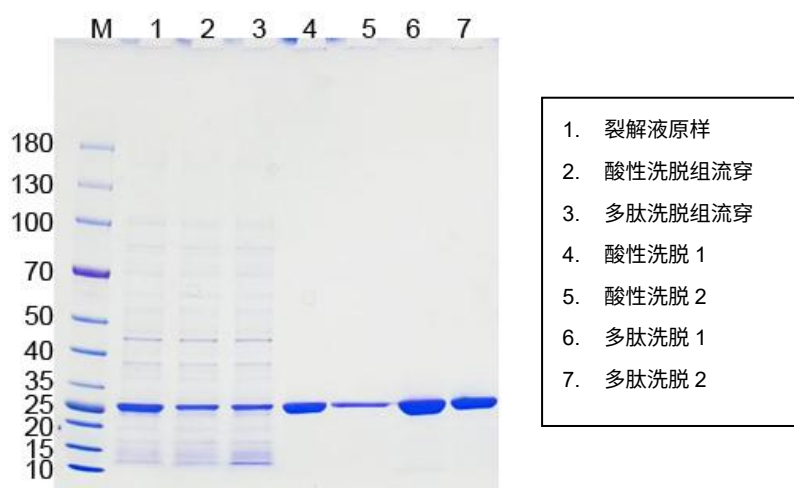


图 1.原核表达样本使用铁锤裂解液裂解后 Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads 纯化的 SDS-PAGE 电泳图

从电泳图中可以看出，1ml 填料对 10 ml 铁锤裂解液样本进行纯化，并不能完全捕获目的蛋白，主要原因是原核表达样本中标签蛋白总量超过了填料的_{最大}载量，一步纯化后的 Flag 标签蛋白 SDS-PAGE 电泳纯度≥95%，经分析统计，0.1 M Glycine HCl 洗脱载量为 4.1mg/ml 填料，而 0.5mg/ml 3×Flag 多肽洗脱载量为 3.7mg/ml 填料。





②真核蛋白纯化：

- 1) 293 细胞瞬转表达 100ml 含有 Flag 标签的融合蛋白；
- 2) 将 Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads 分别装入 2 根 12ml 重力柱中，每根重力柱 1ml 柱体积，加入 5ml 1×PBS 缓冲液平衡；
- 3) 每根重力柱加入 50ml 样本，缓慢上样，流速不超过 1ml/min；
- 4) 每根重力柱加入 10ml 1×PBS 缓冲液洗杂；
- 5) 一根重力柱中加入 5ml 0.1 M Glycine HCl, pH3.0 进行洗脱，另一根重力柱中加入 0.5mg/ml 3×Flag 多肽洗脱液，pH8.0；
- 6) 对洗脱产物进行 SDS-PAGE 电泳，结果请见图 2。

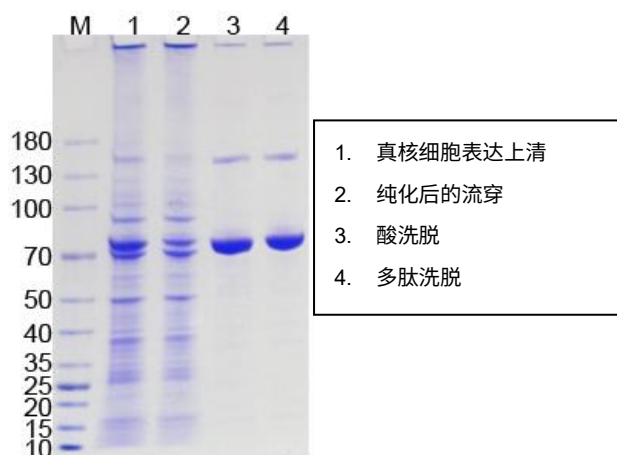


图 2.真核表达样本通过 Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads 纯化的 SDS-PAGE 电泳图

从电泳图中可以看出，1ml 填料对 100 ml 真核表达样本进行纯化，并不能完全捕获目的蛋白，主要原因是样本中标签蛋白总量超过了填料的最大载量，一步纯化后的 Flag 标签蛋白 SDS-PAGE 电泳纯度 $\geq 90\%$ （目的蛋白有二聚体，也含有 Flag 标签蛋白，同样会被纯化下来），经分析统计，0.1 M Glycine HCl 洗脱载量为 4.0mg/ml 填料，而 0.5mg/ml 3×Flag 多肽洗脱载量为 3.2mg/ml 填料。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Anti-DYKDDDDK HC Affinity Beads	SA145001	1 ml
	SA145005	5 ml
	SA145025	25 ml
	SA145100	100 ml
	SA145500	500 ml
	SA14501L	1 L

