

ChainFree<sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads

## 产品信息

产品名称	货号	包装
ChainFree <sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads	FI8201-0.5 mL	0.5 mL
ChainFree <sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads	FI8201-1 mL	1 mL
ChainFree <sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads	FI8201-5 mL	1 mLx 5

## 产品描述

ChainFree<sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK (Flag) Magnetic Beads (ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠) 偶联了经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 抗体, 可用于捕获哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物细胞、组织提取物中的 Flag 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白及其相互作用蛋白。

实验前先将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达; 之后将 ChainFree<sup>®</sup> Anti-Flag 磁珠加入样本裂解液中, Flag 抗体与目标融合蛋白及其结合蛋白形成复合体; 去除未结合的蛋白后, 可以采用多种方法洗脱蛋白质, 并且 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

## 产品属性

磁珠直径	2 μm
蛋白结合量	≥1.5 mg 蛋白 / mL 磁珠
反应性	可特异性结合 1×或 3×Flag 标签 (DYKDDDDK), 对融合蛋白 N 端、C 端或中间的 Flag 标签均可以识别
应用	免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (CoIP)、染色质免疫沉淀 (CHIP)、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)
储存缓冲液	20 mM PBS, 5% BSA
储存条件	4℃ 储存, 避免冻存! 有效期 1 年

## 使用说明

## I 所需主要仪器

磁力架 (辉骏产品货号 FI7101)、混匀仪、低温离心机、超声破碎仪。

## II 建议的缓冲液配方

缓冲液	配方
裂解缓冲液 (辉骏产品货号 FI8101)	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40 (在 4°C 下调整 PH)
漂洗缓冲液	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % NP-40 (在 4°C 下调整 PH)
2×SDS-PAGE 上样缓冲液	125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝
洗脱缓冲液 (辉骏产品货号 FI8103)	3×Flag 多肽用 PBS 溶解成 400 ng/μL

## III 注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
3. 实验前应在裂解缓冲液和漂洗缓冲液中加入足量的蛋白酶抑制剂（辉骏产品货号 FI8105），RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂（辉骏产品货号 FI8106），混合均匀，冰上保存，现配现用。
4. 每次 IP 实验应设置阴性对照组，通常采用表达 Flag 标签空载体的样本作为对照。
5. IP 实验前，应先确认样本裂解液（input）中诱饵蛋白的表达水平。
6. 如果使用建议的缓冲体系不能获得很好的实验结果，可自行筛选、配制缓冲液进行实验。
7. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
9. 本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

## IV 操作步骤

### 1. 样本裂解（参考）

(1) 按如下方法收集样本：

样本类型	样本量 / 组	收集方法
动物细胞	1×10 <sup>7</sup> 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨
革兰氏阴性细菌	50 μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体

(2) 将样本置于冰上，每组样本加入 500 μL 预冷的裂解缓冲液，吹打混匀。

(3) a. 动物细胞：最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀。

b. 动物组织、植物组织、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(4) 4℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30 μL 作为 input，剩余置于冰上备用或 -80℃ 保存。

**\*注意：** i. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液、改善裂解方法或改善超声条件继续裂解，超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。 ii. 裂解缓冲液用量可随样本量增加而等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

## 2. 免疫共沉淀

- (1) 将 ChainFree® Anti-Flag 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20~40 μL 磁珠到新的离心管中。
- (2) 加入 200 μL 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 重复上步操作一次。
- (4) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4℃ 孵育过夜。
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (6) 加入 500 μL 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (7) 重复上步操作两次，共漂洗三次。

## 3. 洗脱

- (1) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：洗脱后的蛋白适合于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测。加入 50 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃ 加热 5 分钟。放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。
- (2) 3×Flag 竞争洗脱法（非变性洗脱法）：洗脱后的蛋白保持原有生物活性，可用于后期各种检测，例如质谱实验、RNA 或 DNA 提取、SDS-PAGE、Western-blot 等。加入 40~50 μL Flag 多肽洗脱液（400 ng/μL），涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s；1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80℃ 保存或直接用于后续实验。

\*备注：辉骏生物可以提供蛋白的质谱检测服务。

## 结果展示

