

## Anti-Flag 纳米抗体磁珠

### F1373479

#### 产品描述

Anti-Flag 纳米抗体磁珠偶联了经过严格筛选、优化并重组表达的 Flag 纳米抗体，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 Anti-Flag 纳米抗体磁珠加入样本裂解液中，Flag 纳米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。

#### 稳定性和储存

在 2-8℃ 下储存，避免冻存，有效期 1 年。

#### 产品属性

|       |   |
|-------|---|
| 磁珠直径  | 2μm。  |
| 蛋白结合量 | ≥ 1.5mg 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。  |

#### 使用说明

##### 1. 所需主要仪器

磁力架、混匀仪、低温离心机、超声破碎仪。

##### 2. 建议的缓冲液配方

| 缓冲液              | 配方  |
|------------------|---|
| 裂解缓冲液            | 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40 (在 4℃ 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℃ 下调整 PH) |
| 洗脱缓冲液            | 3×Flag 多肽用 PBS 溶解成 400 ng/μL  |
| 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                            |

##### 3. 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)请勿使用 PBS 漂洗磁珠，否则会导致磁珠无法被磁力架吸附。
- 4)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，RIP 实验还应添加足量的 RNase 抑制剂，混合均匀，冰上保存，现配现用。
- 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)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。
- 7)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。
- 8)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。
- 9)为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 10)本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

## 4.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    | $1 \times 10^7$ 个 | 冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 500g 离心 5min 收集沉淀，尽量吸干液体  |
| 动物组织    | 100~200mg         | 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    | 200~300mg         | 无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨                                |
| 革兰氏阴性细菌 | 50 $\mu$ L 菌体沉淀   | 冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4°C 5000g 离心 5min 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 $\mu$ L 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 30min, 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°C 12000g 离心 15min, 收集上清至新的离心管中, 取 30 $\mu$ L 作为 input, 剩余置于冰上备用或-80°C 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 Anti-Flag 纳米抗体磁珠上下颠倒混匀，每组取 20~30 $\mu$ L 磁珠到新的离心管中。
- (2)加入 200 $\mu$ L 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 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 1~2h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- (5)放磁力架上静置 1min 并弃上清。
- (6)加入 500 $\mu$ L 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 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 (变性洗脱法)：加入 50 $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}$ C 加热 5~10min。放磁力架上静置 1min 或 5000g 离心 1min，收集上清至新的离心管中。洗脱后的蛋白-20 $^{\circ}$ C 保存，或直接用于 SDS-PAGE 和 Western Blot 实验，SDS-PAGE 胶条可以用于质谱检测。

(2)3 $\times$ Flag 肽竞争洗脱 (非变性洗脱法)：加入 40~50 $\mu$ L Flag 多肽洗脱液(400ng/ $\mu$ L)，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 10~15min，涡旋震荡 20s；1000g 离心 20s，放磁力架上静置 1min，收集上清至新的离心管中。洗脱后的蛋白-80 $^{\circ}$ C 保存，或直接用于 SDS-PAGE、Western Blot 和质谱等实验。

\*备注：Anti-Flag 纳米抗体磁珠没有抗体轻重链污染问题，建议首选变性洗脱法，洗脱效率更高。