

Anti-Flag 免疫磁珠

产品描述：

Anti-Flag免疫磁珠由高质量的鼠源IgG1重组抗体与纳米磁珠共价偶联制备，具有较高的Flag标签融合蛋白加载容量（至少为0.6 mg protein/mL）以及非特异结合低的特点，可用于蛋白质免疫共沉淀和少量蛋白质的纯化。

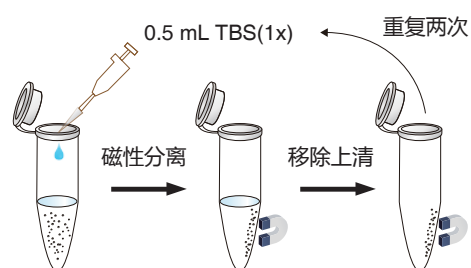
主要成分：

成分	Cat# : B26101	Cat# : B26102
免疫磁珠	1 mL	5 mL

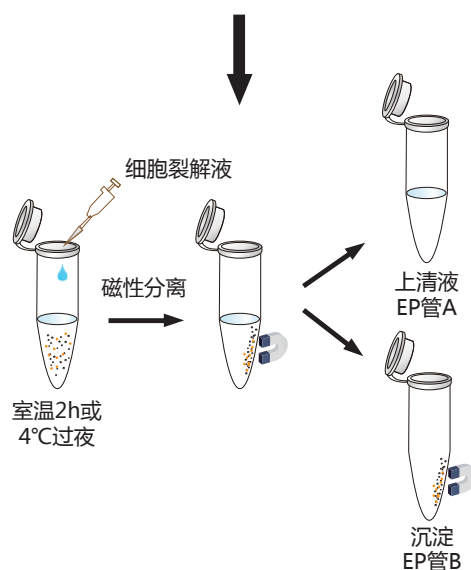
储存条件：

可于2-8℃储存2年。避免冻融或离心磁珠。

实验方案



磁珠的准备

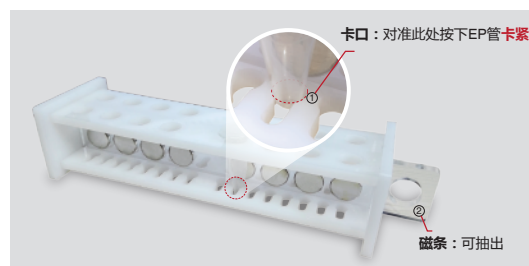


样品的结合

磁珠预处理

- 1、用移液枪轻柔吹打重悬Anti-Flag免疫磁珠，转移20 μL磁珠悬液到新的离心管中。
- 2、加入500 μL TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)，用移液枪轻柔吹打重悬磁珠，磁力架上静置1~2 min（也可适当延长至5min），去除上清，重复上述步骤两次。

注意：多个样品时，可磁珠预处理后再分装到各个反应管中。去除上清时，请用枪头轻轻吸取，吸力过大可能会导致部分磁珠损失。



磁力架使用说明

样品的结合

- 3、在上述沉淀中加入200 μL细胞裂解液，用移液枪轻柔吹打重悬磁珠，然后室温孵育2 h或者4 °C条件下过夜。
- 4、磁力架上静置1-2 min（可适当延长）后，将上清液转移到新的离心管中备用（上清液可用于检测Flag-tag蛋白是否存在残留）。

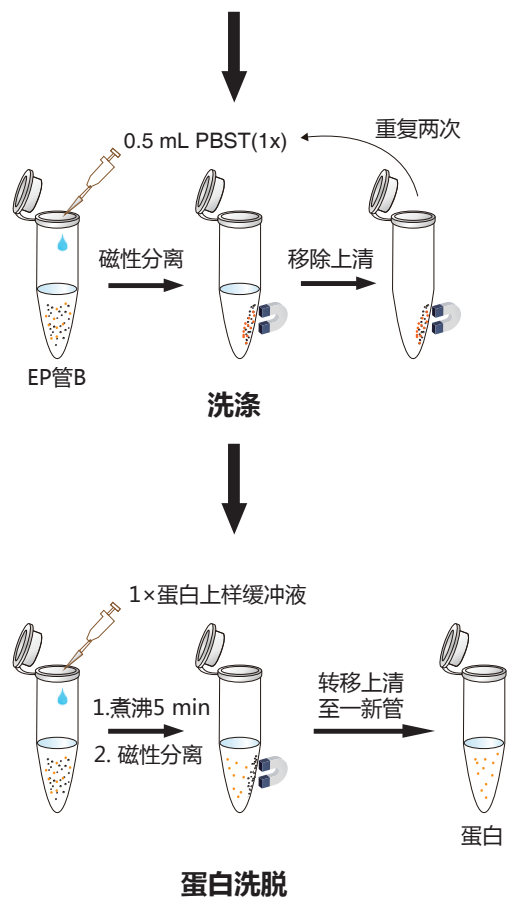
接下一页



订购 & 咨询

Tel: 400-668-6834

Email: info@selleck.cn



洗涤

5、向上述沉淀中加入500 μL PBST (NaCl 136.89 mM; KCl 2.67 mM; Na_2HPO_4 8.1 mM; KH_2PO_4 1.76 mM; 0.5% Tween20), 用手轻敲或轻柔地吹打重新分散磁珠, 然后上下翻转样品5 min。磁性分离后移除上清。

6、重复上述步骤两次。如遇到非特异性杂蛋白去除不干净的情况, 请延长清洗时间、增加清洗次数或适当增加清洗液中去垢剂的含量。

蛋白洗脱

根据下游用途选择不同的洗脱方法, 进行免疫共沉淀可直接进行7-8步; 进行蛋白纯化可根据后续实验, 选择多肽竞争性洗脱(9-10步)或低pH洗脱(11-12步)。

变性洗脱 (适用于利用anti-Flag beads进行免疫共沉淀实验):

7、对于直接检测目的蛋白的情况, 在上述所得沉淀中加入50 μL 1 \times 蛋白上样缓冲液, 煮沸5 min, 冷却至室温并在磁力架上静置1-2 min (可适当延长)。

8、取上清进行SDS-PAGE检测。

Poly FLAG多肽竞争性洗脱 (适用于利用anti-Flag beads进行蛋白纯化实验):

9、将含有200 μg -1 mg/mL Poly Flag多肽 (B23111) 的TBS缓冲液加入步骤6的产物中, Poly Flag多肽缓冲液体积为磁珠使用量的5倍, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育洗脱2 h (为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱)。

10、将上述步骤得到的产物进行磁性分离, 将包含目的蛋白的上清转移到新的EP管中。磁珠如需重复使用, 需用0.1 M glycine HCl (pH 3.0)进行清洗后再回收。

低pH洗脱 (适用于利用anti-Flag beads进行蛋白纯化实验):

11、将0.1 M glycine HCl (pH 3.0)洗脱液加入步骤6中的产物中, 洗脱液体积为磁珠使用量的5倍, 摇床孵育洗脱5 min, 洗脱时间不得超过20 min。

12、将上述产物进行磁力分离, 取洗脱产物立即加入1 M Tris (pH 8.0)进行中和, 并调节pH直至中性。

常见问题指南:

常见问题	可能的原因	建议方法
高的背景条带	蛋白非特异结合到抗体, 磁珠或EP管上	选择合适的裂解液、洗涤液去除非特异吸附的蛋白; 在最后一次洗涤前, 转移整个样品到新的EP管中然后进行磁性分离。
	洗涤次数不够	增加洗涤的时间和次数。(洗涤后的上清液OD280值应小于0.05)
无蛋白条带	Flag标签蛋白没有表达	确保目的蛋白带有Flag标签; 制备新鲜的裂解液; 使用恰当的蛋白酶抑制剂。
	孵育时间不足	增加孵育时间。
	样品中存在干扰物质	裂解液中存在高浓度的DTT, 2-mercaptoethanol或者其他的还原剂。

