



Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	3
3. 注意事项.....	3
4. 参考信息.....	4
5. 常见问题与解答.....	5
6. 试剂盒组成.....	5
7. 订购信息.....	5
8. 相关产品.....	6

1. 产品介绍

1.1 Magneti-Q 商标

Magneti-Q 商标来自于磁性 (Magnetic) 的英文谐音, Q 为琼脂糖的汉语拼音的首字母, 因此带有这一商标的产品, 均为琼脂糖材质的磁性微球。这一商标主要用于一系列基于抗体亲和方法的标签蛋白纯化试剂盒, 目前已有 Anti-His-tag、Anti-Myc-tag、Anti-HA-tag、Anti-DYKDDDDK-tag 四种标签蛋白纯化试剂盒。后续将根据客户的需求, 基于 Magneti-Q 琼脂糖磁珠开发更多相关产品。

1.2 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。这一标签还具有一个优势: 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。

1.3 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。本公司目前有两株 Anti-DYKDDDDK 抗体, 亲和力都要高于 Anti-Flag M2 抗体, 更适合做 WB、IP 等蛋白互作实验。抗体带有 biotin 修饰的人源化恒定区 (hFc), 可以被 SA-HRP、SA-RPE 识别, 利于更高效的使用化学发光或者荧光方法进行检测。

1.4 组分特征

抗体与对应的标签之间有特异性的结合, 将抗体偶联在 Beads 上, 就可以把带有对应标签的融合蛋白结合到 Beads 上。经过缓冲液去除杂蛋白等步骤之后, 融合蛋白可以使用低 pH、高盐、多肽竞争、去垢剂或者变性剂从 Beads 上洗脱下来。具体的组份特征见表 1。

表1: 组份特征

成份	名称	特征
亲和纯化磁珠	Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads	偶联了标签抗体的磁性琼脂糖微球
	Elution Buffer A	酸性洗脱缓冲液, 含有甘氨酸
不同性质洗脱缓冲液	Elution Buffer B(DYKDDDDK多肽)	多肽竞争洗脱缓冲液, 含有DYKDDDDK多肽
	Elution Buffer C	高盐洗脱缓冲液, 中性pH
	Elution Buffer D	变性剂洗脱缓冲液, 含有离液剂
阳性对照	RFP阳性蛋白	带有DYKDDDDK标签的红色荧光蛋白

备注: Elution Buffer B(DYKDDDDK多肽)为自备试剂, 若有需求可单独购买DYKDDDDK多肽干粉配制, 货号为BR0044。



1.5 洗脱缓冲液

- 1) 四种洗脱液中,最广泛接受的是酸性 pH 洗脱(Elution Buffer A),pH3 的洗脱条件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 pH3 的甘氨酸缓冲液,可以进行预实验。**根据我们的经验,我们不推荐酸性 pH 洗脱,酸洗脱经常造成融合蛋白沉淀在填料孔隙中,洗脱后要尽快进行中和或者切换缓冲。**
- 2) 如果希望获得有活力的蛋白,可以优先选择多肽竞争洗脱(Elution Buffer B),但由于多肽成本较高且在 2-8 度保存时可能出现降解,试剂盒中不提供 Elution Buffer B,如需要可单独购买 DYKDDDDK 多肽配制。**根据我们的经验,多肽竞争洗脱的效率较低,通常仅有 50% 左右蛋白可以洗脱。**
- 3) 如果希望获得更高洗脱效率,可以优先选择高盐竞争洗脱(Elution Buffer C),洗脱液 C 也可以保留标签蛋白的活力,但有些蛋白可能在高盐条件下沉淀,且高盐条件可能抑制蛋白质之间相互作用或者干扰酶活,所以洗脱产物要及时进行透析处理,或者使用本公司的脱盐柱进行缓冲液切换。**根据我们的经验,高盐竞争洗脱效率高、成本低,值得优先考虑。**
- 4) 洗脱液 D 含有高浓度尿素以及去垢剂,可以充分洗脱标签蛋白,但大部分蛋白在这个条件下都会失去活力,仅适合不需要蛋白活力的质谱鉴定、WB 等实验。

表2:四种洗脱缓冲液比较

缓冲液名称	优势	可能存在的问题
Elution Buffer A	能够增加洗脱载量	蛋白可能沉淀和变性,迅速加入中和液在一定程度上能逆转
Elution Buffer B	条件温和,不影响蛋白原有性质	洗脱载量会略低于酸洗脱
Elution Buffer C	中性洗脱,其洗脱效率高于酸洗脱	蛋白可能沉淀,也可能会影响蛋白间的相互作用
Elution Buffer D	能够完全将蛋白洗脱下来	洗脱的蛋白完全变性,有少量配体脱落

1.6 阳性对照蛋白

试剂盒提供了带有 DYKDDDDK 标签的红色荧光蛋白 RFP,这一蛋白在自然光下带有肉眼可见的红光,可以用来验证 Beads 的结合载量,以及排除操作流程中可能出现的偏差。这一蛋白为真核表达,SDS-PAGE 上显示为 3 条具有不同分子量的条带,分子量最大的条带。带有 DYKDDDDK 标签的不同蛋白与 Beads 的结合时间、结合条件、洗脱条件具有类似性,可以平行参考。但是考虑到蛋白质与 Beads 的结合是浓度依赖的关系,阳性对照蛋白的操作条件不宜一成不变的照搬。

1.7 磁珠性质

来自于海藻的琼脂糖具有亲水性好、稳定性高、生物兼容性好、非特异性吸附低的优点,由这种材料制成的琼脂糖微球是最经典的蛋白质纯化填料,已经广泛应用半个多世纪。将二氧化硅包裹的磁性四氧化三铁颗粒分散到琼脂糖微球中,使其获得磁性分选的能力,便制成了磁性琼脂糖微球(Magneti-Q Beads)。Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 是利用生物素(Biotin)和链霉亲和素(SA)蛋白之间高亲和力的原理,首先将 SA 蛋白高密度偶联到 Magneti-Q 磁珠上,再将生物素化 Anti-DYDDDDK 抗体与 SA 琼脂糖磁珠非共价偶联制备而成,从而避免化学共价偶联造成抗体的失活,因此 Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 具有更高的抗体偶联密度以及抗体比活力。可用于原核和真核细胞裂解物或者培养上清中分泌表达的 DYKDDDDK 标签蛋白的纯化。也可以用于 IP、Co-IP 等蛋白质相互作用实验,通过磁力架或自动分离仪器对磁珠进行分离,方法简单、高效便捷。磁珠性能见表 2。

表3:Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads产品性能

项目	性能
微球基质	磁性琼脂糖微球
配体	Anti-DYKDDDDK重组标签抗体,人源化恒定区
粒径	30-100 μm
抗体偶联量	10 mg/ml
标签蛋白结合载量	≥2.5 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
储存缓冲液	1×Tris(pH=8.0),0.02% Tween20,0.02% NaN ₃

1.8 保存与运输

运输:冰袋运输,不可冻结。

保存:2-8 °C冷藏保存,不可冻结。



2. 使用方法

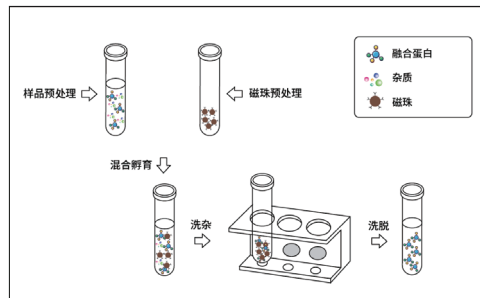


图1. Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒的使用流程图

2.1 计算磁珠使用量

本产品的结合载量 ≥ 2.5 mg/ml 磁珠, 用于标签蛋白纯化制备的实验, 可根据蛋白表达量的预估加入对应体积的磁珠; 也可以先取 1 ml 样本与 20 μ l 的磁珠孵育进行预实验, 后续可根据预实验的数据进行放大(注意: 磁珠体积是指磁珠固体的体积, 磁珠浓度为 20%, 如加入 20 μ l 磁珠, 实际需要吸取 100 μ l 总体积的悬浮液); 用于蛋白质相互作用的实验, 我们推荐单次使用 20 μ l 磁珠, 少于 10 μ l 磁珠将造成组内不同样本的偏差变大, 而过高磁珠用量不仅浪费, 还容易造成抗体脱落增多。

2.2 清洗磁珠

将磁珠置于磁力架上静置, 待磁珠完全吸附在离心管壁后吸去上清, 加入一定体积的 PBST (20 μ l 磁珠建议加入 500 μ l 的 PBST 清洗) 轻轻颠倒混匀 3-5 次, 再将悬液置于磁力架上, 同样待磁珠完全吸附在离心管壁后吸弃上清, 重复 3 次。在标签蛋白纯化实验中, 如果希望加快操作速度, 仅做 1 次磁珠清洗, 结果也不会有显著差异; 在蛋白质相互作用实验中, 因为样品中含有的抗原很少, 建议清洗三次, 充分洗涤磁珠。除了 PBST 缓冲液 (PBS+ 吐温 20), 其它常用缓冲液也可以接受, 比如 Tris 缓冲液, 醋酸钠缓冲液等。

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取上清离心, 再进行后续步骤。磁珠纯化, 没有柱效的概念, 通常不需要进行过滤处理, 少量的固体物质对结果影响较小, 但由于核酸是强电性物质, 如果核酸吸附到磁珠上, 最终将造成杂蛋白变多。除去核酸有两个常用的方法: a) 充分超声可以打断核酸, 但过度超声也会造成蛋白降解。b) 使用伯仪生物超级核酸酶消化, 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

将样本和磁珠的混悬液在常温或者 4 $^{\circ}$ C 下摇晃孵育 30-60 分钟, 随后将离心管置于磁力架上, 直至磁珠完全吸附在离心管壁后, 将上清液转移到另外的管子中, 留样备检。在磁珠管中加入一定体积的缓冲液 (1ml 磁珠加入 5 ml 洗涤缓冲液), 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, 如此重复 3-5 次。蛋白纯化可以在常温下进行, 如果纯化的蛋白质性质不稳定, 推荐在较低温度下 (2-8 $^{\circ}$ C) 进行操作, 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。这里孵育结合时间不要小于 15 分钟, 也不要超过 60 分钟, 根据我们的经验, **抗体与标签的结合在 15-30 分钟内就接近饱和**, 更长的孵育时间也没有多少收益。磁珠每次洗涤, 加入洗杂缓冲液后可以冰上静置 3-5 分钟, 让杂蛋白从磁珠孔隙中充分溶出。

2.5 蛋白洗脱

试剂盒提供四种洗脱液, 客户可根据自己的实验需求进行选择, 洗脱时加入 1.5-2 倍磁珠含量体积的洗脱液 (20 μ l 磁珠含量加入 30-40 μ l 洗脱液, 1ml 磁珠加入 1.5-2ml 洗脱液), 常温或者 4 $^{\circ}$ C 摇晃洗脱, 每次洗脱 5-10 min, 重复洗脱两次。洗脱蛋白需要分管收集, 分别电泳确定纯度。推荐每一张电泳胶包含以下条带: 孵育前样品、孵育后的上清、洗杂上清、洗脱样品, 这样方便判断目的蛋白的结合效率以及洗涤效率。前面已经提到几种洗脱缓冲液的性质, 不同蛋白的结合效率, 洗脱效率会有极大差异, 每一步留样将有助于后续优化纯化条件。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱中, 不要冻结保存;
- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象, 可正常使用;
- 3) 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

4.1 分泌蛋白纯化:

- 1) 取 2ml 培养基上清,高速离心去除颗粒沉淀;
- 2) 加入 20 μ l 已经清洗过的磁珠(总体积 100 μ l),混合均匀后放置振荡器上,室温孵育 1 h;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上,分离磁珠和液体,用移液器吸走上清,留下磁珠;
- 4) 用 PBS 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;
- 5) 对洗脱产物进行 SDS-PAGE 电泳,结果请见图 2。

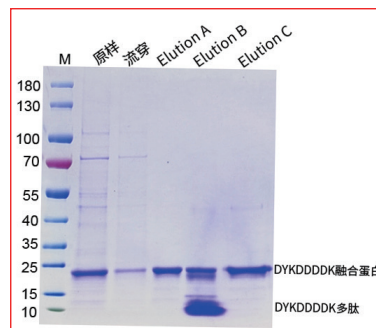


图2.Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒纯化分泌蛋白的SDS-PAGE电泳图

从电泳图中可以看出, 20 μ l 磁珠对 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填料的最大载量 (2.5 μ g/ μ l*20 μ l=50 μ g)。三种洗脱液的洗脱效率不同, 洗脱效率: Elution Buffer C>Elution Buffer A>Elution Buffer B。注意本案例使用的是 3 \times Flag 多肽洗脱, 电泳上会看到大量多肽残留, 实际使用过程中可以使用 1 \times Flag 多肽进行洗脱, 多次实验证明并不会影响洗脱效率, 电泳上也不会有多肽条带。

4.2 胞内蛋白纯化:

- 1) 取 3 $\times 10^7$ 细胞加入 1ml, 加入含有超级核酸酶 (1 μ g/ml) 的细胞裂解液, 裂解 10min, 离心取上清;
- 2) 加入 20 μ l 已经清洗过的磁珠(总体积 100 μ l), 混合均匀后放置振荡器上, 室温孵育 1 h;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上, 分离磁珠和液体, 用移液器吸走上清, 留下磁珠;
- 4) 用 PBS 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;
- 5) 对洗脱产物进行 SDS-PAGE 电泳, 结果请见图 3。

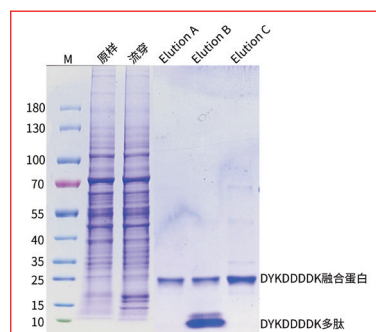


图3.Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒纯化胞内蛋白的SDS-PAGE电泳图

从电泳图中可以看出, 该蛋白在胞内表达条带不明显, 但 20 μ l 磁珠对 1 ml 裂解液样品进行纯化, 可有效捕获目的蛋白。三种洗脱液的洗脱效率不同, 洗脱效率: Elution Buffer C>Elution Buffer B>Elution Buffer A。多肽洗脱将引入大量的 DYKDDDDK 多肽。



5. 常见问题与解答

5.1 聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别?

- 1) 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, 非常适合于蛋白互作实验, 但其载量不高;
- 2) 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。

5.2 为何纯化不到目的蛋白?

- 1) 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;
- 2) 可能由于洗脱方式不正确造成, 建议根据自己的实验目的以及参考表 2 进行洗脱, 如果多肽竞争洗脱 (Elution Buffer B) 检测不到目的蛋白可以尝试 Elution Buffer C 进行洗脱;
- 3) 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。

5.3 为什么不建议高温加热磁珠?

- 1) 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;
- 2) 为了解决煮球的问题, 我们推荐 Elution Buffer D 缓冲液, 这个缓冲液会导致少量配体的脱落, 但不会影响后续结果的判断, 适用于考马斯亮蓝或者 WB 检测。

6. 试剂盒组成

试剂盒成分	规格 /0.2ml	规格 /1ml	规格 /5ml	规格 /25ml
Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads	0.2ml	1ml	5ml	25ml
Elution Buffer A	1ml	3ml	15ml	75ml
Elution Buffer C	1ml	3ml	15ml	75ml
Elution Buffer D	1ml	3ml	15ml	75ml
RFP 阳性蛋白	0.05mg	0.1mg	0.2mg	0.5mg
说明书	1 份			

备注: Elution Buffer B (DYKDDDDK 多肽) 为自备试剂, 若有需求可单独购买 DYKDDDDK 多肽干粉配制, 货号为 BR0044。

7. 订购信息

名称	货号	规格
Magneti-Q DYKDDDDK 标签蛋白纯化试剂盒	BK1001-01	0.2ml
	BK1001-02	1ml
	BK1001-03	5ml
	BK1001-04	25ml



8. 相关产品

类型	名称	货号
Magneți-Q标签蛋白纯化试剂盒	Magneți-Q His 标签蛋白纯化试剂盒	BK1002
	Magneți-Q Myc 标签蛋白纯化试剂盒	BK1003
	Magneți-Q HA 标签蛋白纯化试剂盒	BK1004
竞争洗脱多肽	DYKDDDDK 多肽	BR0044
	His 多肽	BR0045
	Myc 多肽	BR0046
	HA 多肽	BR0047
Magneți-Q抗体磁珠	Magneți-Q Anti-Myc Beads	MA0101
	Magneți-Q Anti-DYKDDDDK Beads	MA0201
	Magneți-Q Anti-His Beads	MA0301
	Magneți-Q Anti-HA Beads	MA0401
生物素化抗体	Anti-Myc Antibody(Biotin)	BP0111
	Anti-DYKDDDDK Antibody (Biotin)	BP0112
	Anti-His Antibody(Biotin)	BP0113
	Anti-GFP Antibody(Biotin)	BP0114
	Anti-HA Antibody(Biotin)	BP0115
	Anti-RFP Antibody(Biotin)	BP0116
Streptavidin (SA) 蛋白相关	SA Magarose Beads	MA0501
	Streptavidin-HRP	BP5001
	Streptavidin-PE	BP5002