



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.....	2
3. 注意事项.....	3
4. 参考信息.....	4
5. 常见问题与解答.....	5
6. 订购信息.....	5
7. 相关产品.....	5

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, 因此本公司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。

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。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。

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。

1.4 磁珠性质

Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads 是将高浓度的 DYKDDDDK 抗体偶联至琼脂糖磁珠上, 可直接用于 DYKDDDDK 融合蛋白的纯化。磁珠性能见表 1。

表1: 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
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), 0.01% Tween20, 0.05% proclin300

1.5 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 (浓度约为 1mg/ml), 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。



1.6 试剂盒组分

本产适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，具体组分见表 2。

表2:试剂盒组份

试剂盒成分	规格/0.2 ml	规格/1 ml	规格/5 ml	规格/25 ml
Magneti-Q Anti-DYKDDDDK Beads	0.2 ml	1ml	5 ml	25ml
Elution Buffer A	1.5 ml	8 ml	40 ml	200 ml
Elution Buffer C	1.5 ml	8 ml	40 ml	200 ml
Elution Buffer D	1.5ml	8ml	40ml	200 ml
RFP 阳性蛋白	0.1mg	0.5mg	1.5mg	10 mg
Tris 中和液	0.1ml	0.5ml	2.5ml	12.5 ml
PBST 缓冲液(10×)	5ml	25ml	125ml	625 ml
说明书	1份			

注:表格中磁珠的体积是指磁珠固体的体积,磁珠浓度为20%,如0.2ml的磁珠,实际体积为**1ml磁珠混悬液(磁珠+保护液)**。

2. 使用方法

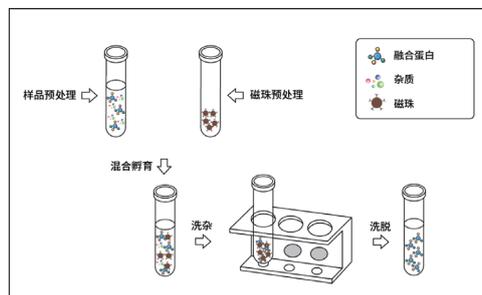


图1. Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒的使用流程图

2.1 缓冲液配制

1×PBST 配置: 将 PBST 缓冲液(10×)用 ddH₂O 稀释 10 倍使用。如: 配置 10ml 1×PBST, 具体操作为取 1ml PBST 缓冲液(10×), 加入 9ml ddH₂O, 充分混匀标记为 1×PBST 即可使用。实验未用完的 1×PBST 可稳定保存在 2-8°C 3 个月, 保存时间过久易长菌。

2.2 清洗磁珠

2.2.1 将磁珠充分混匀后取 100μl 磁珠混悬液置于离心管中放磁力架上静置, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;

2.2.2 加入 500μl 1×PBST 轻轻颠倒混匀 3 次;

2.2.3 将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;

2.2.4 重复上述操作重复 3 次。

注: 可根据样本量放大磁珠混悬液的体积(如: 1ml 样本加入 100μl 磁珠混悬液; 2ml 样本加入 200μl 磁珠混悬液)。

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离心取上清, 再进行后续步骤。若样品中含有核酸杂质会吸附在磁珠上, 导致杂蛋白变多。除去核酸常用两个方法:

1) 充分超声可以打断核酸, 但过度超声也会造成蛋白降解;

2) 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

- 2.4.1 向上述漂洗好的磁珠中加入 1ml 样品, 2-8°C 或常温下孵育 30-60min (建议在旋转混匀仪上孵育, 使样品和磁珠充分接触);
- 2.4.2 孵育结束后, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 将上清转移至新的离心管中, 留样备检;
- 2.4.3 向离心管中加入 500 μ l 1 \times PBST, 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;
- 2.4.4 重复上述操作重复 5 次。

注: 蛋白纯化需要控制温度, 在 2-8 °C 下孵育有助于防止蛋白降解。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。建议样品孵育时间不要超过 60 分钟, 磁珠每次洗涤, 加入洗杂缓冲液后可以冰上静置 3-5 分钟, 使杂蛋白从磁珠孔隙中充分溶出。

2.5 蛋白洗脱

- 2.5.1 每 100 μ l 磁珠混悬液加入 40 μ l 洗脱液, 常温或 4°C 洗脱 5-10min, 期间轻轻混匀 3-5 次;
- 2.5.2 孵育结束后将离心管置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸取上清至新的离心管中, 重复洗脱三次。洗脱蛋白需要分管收集, 分别电泳确定纯度。

2.6 洗脱缓冲液的选择

- 1) Elution Buffer A (pH3.0) 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 pH 3.0 的酸性缓冲液如甘氨酸缓冲液或者柠檬缓冲液, 可以进行预实验。根据我们的经验, 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 (试剂盒中配有 Tris 中和液)。
- 2) Elution Buffer B 洗脱可以获得有活力的蛋白, 但由于多肽成本较高且在 2-8°C 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。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) Elution Buffer C 为高盐竞争洗脱, 可以获得更高洗脱效率, 同时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。高盐竞争洗脱效率高、成本低, 可以优先考虑。
- 4) Elution Buffer 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3: 洗脱缓冲液特点

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

2.7 RFP 阳性蛋白

- 2.7.1 取 25 μ l RFP 阳性蛋白加入 25 μ l 1 \times PBST 稀释至 50 μ l;
- 2.7.2 取 10 μ l 磁珠按照说明书操作进行清洗, 清洗后将磁珠和 RFP 阳性蛋白常温下孵育 30min;
- 2.7.3 肉眼观察流穿中的颜色变化, 此时流穿中颜色变得很弱或者不带有颜色;
- 2.7.4 加入想验证的洗脱条件进行洗脱, 肉眼观察洗脱中的颜色变化, 此时洗脱液呈现淡红色, Elution Buffer A 洗脱不会有颜色, 酸性洗脱会破坏 RFP 蛋白的发光基团。

注: RFP 阳性蛋白是为了验证纯化体系而设置的, 只有在特殊情况下如试剂盒存放时间过久, 测定是否还能正常使用或者多次实验效果不理想, 验证纯化体系是否有问题等情况才会使用, 多次使用会造成磁珠和试剂的浪费。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8°C 冰箱中, 不可冻结保存;
- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象, 可正常使用;
- 3) 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;
- 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) 加入已经漂洗过的 100 μ l 磁珠悬浮液,混合均匀后放置旋转混匀仪上,室温孵育 1 h;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上,待磁珠完全吸附后,吸弃上清;
- 4) 用 1 \times PBST 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。

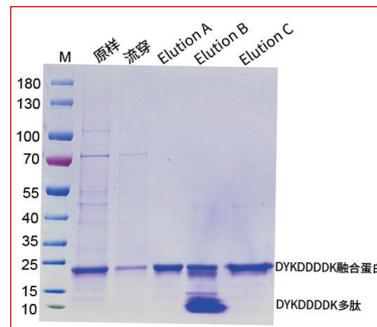


图2.Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒纯化分泌蛋白的SDS-PAGE电泳图

从电泳图中可以看出, 100 μ l 磁珠混悬液对 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磁珠的最大载量(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: 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, 电泳上也会有多肽条带。

4.2 胞内蛋白纯化:

- 1) 取 3 \times 10⁷ 细胞 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) 加入已经漂洗过的 100 μ l 磁珠混悬液, 混合均匀后放置旋转混匀仪上, 室温孵育 1 h;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 吸弃上清;
- 4) 用 1 \times PBST 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。

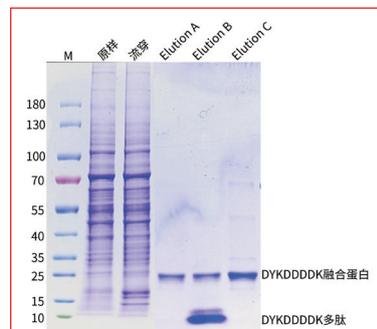


图3.Magneti-Q DYKDDDDK标签蛋白纯化试剂盒纯化胞内蛋白的SDS-PAGE电泳图

从电泳图中可以看出, 该蛋白在胞内表达条带不明显, 但 100 μ l 磁珠混悬液对 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。

注: 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, 电泳上也会有多肽条带。



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. 订购信息

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

7. 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