



MagHub Anti-D4DDDK Beads

目录

| | |
|---------|---|
| 1. 产品介绍 | 1 |
| 2. 使用方法 | 1 |
| 3. 注意事项 | 3 |
| 4. 参考信息 | 3 |
| 5. 订购信息 | 3 |
| 6. 相关产品 | 4 |

1. 产品介绍

1.1 DYK4DDDK 标签介绍

DYK4DDDK 是融合蛋白表达与纯化体系中应用极为广泛的亲和标签之一。该标签可灵活融合于目的蛋白的 N 端、C 端，也可以直接插入蛋白序列内部使用，具备优异的亲水性特性，在融合蛋白折叠过程中更易暴露于分子表面，因此对目的蛋白自身结构与生物学功能的干扰风险显著更低。尤为重要的是，当该标签被设计连接在目的蛋白 N 端时，可被肠激酶 (Enterokinase, EK protease) 特异性识别并在标签 C 端赖氨酸位点精准切割，切割后不会在目的蛋白末端残留多余氨基酸残基，从而最大程度保证重组蛋白的天然序列完整性。

1.2 MagHub Anti-D4DDDK Beads 介绍

MagHub Anti-D4DDDK Beads 是专为免疫沉淀 (IP) 与免疫共沉淀 (Co-IP) 实验设计的高聚物磁珠。微球表面通过共价偶联方式固定高亲和力和抗 DYK4DDDK 标签纳米抗体 (VHH)，可从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种细胞裂解液中，特异性富集 DYK4DDDK 标签融合蛋白。该磁珠采用无标签、无轻重链结构的纳米抗体，能有效降低非特异性结合，显著提升目的蛋白富集效率与检测信噪比，适用于蛋白互作分析、表达验证、蛋白功能研究等多种下游分子生物学实验。

表 1: MagHub Anti-D4DDDK Beads 产品性能

| 项目 | 性能 |
|-------|---|
| 微球基质 | 高聚物磁性微球 |
| 配体 | 抗 DYK4DDDK 标签纳米抗体 |
| 粒径 | 1 μm |
| 保存条件 | 2-8°C 可稳定保存 2 年 |
| 应用 | 适用于 IP 和 Co-IP 实验 |
| 储存缓冲液 | 20 mM Tris (pH8.0), 0.15 M NaCl, 0.01% Tween20, 0.1% proclin300 |

2. 使用方法

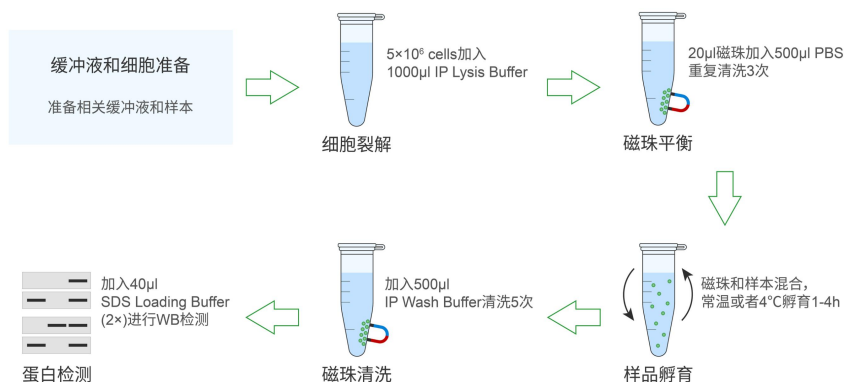


图 1. MagHub Anti-D4DDDK Beads 使用流程图



2.1 缓冲液配置

表 2: 缓冲液配方推荐

| 缓冲液名称 | 缓冲液成分 |
|------------------------------|---|
| 1× PBS 缓冲液 | 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4) |
| IP 裂解液(IP Lysis Buffer) | 25 mM Tris(pH=8.0), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 选择性加入蛋白酶抑制剂 |
| 磁珠洗杂液(IP Wash Buffer) | 1× PBS (pH 7.4), 0.05% Tween-20 |
| IP-MS 洗脱液 (Elution Buffer D) | 20 mM Tris (pH 8.0), 6M 尿素, 0.5% SDS |
| 2x SDS Loading Buffer | 125 mM Tris(pH 6.8), 4% SDS, 20% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 100 mM DTT |

2.2 样品前处理

2.2.1 悬浮细胞样品裂解

- 1) 1000× g 室温离心 5 min, 弃上清, 收集细胞;
- 2) 用适量 PBS 将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 1000× g 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞。重复三次;
- 3) 向细胞团块中加入预冷 IP Lysis Buffer, 每 1×10⁶-5×10⁶ cells 使用 1000 μl;
- 4) 将上述加了 IP Lysis Buffer 的样品上下颠倒混匀 5-10 次, 随后置于冰上裂解 5-10 min, 期间混匀 2-3 次;
- 5) 13,000× g 离心 10 min, 去除细胞碎片;
- 6) 将上清转移至新的离心管中, 标记为细胞裂解样品。

2.2.2 贴壁细胞样品裂解

- 1) 小心除去单层细胞的培养基;
- 2) 用适量预冷的 PBS 清洗细胞三次;
- 3) 根据表 3 中推荐体积将 IP Lysis Buffer 慢慢滴加至细胞孔板中, 滴加时尽量覆盖整个平皿, 随后置于冰上裂解 5-10 min, 期间混匀 2-3 次;
- 4) 将上述裂解好的样品转移至新的离心管中, 约 13,000× g 离心 10 min, 去除细胞碎片;
- 5) 将上清转移至新的离心管中, 标记为细胞裂解样品。

表 3. IP Lysis Buffer 推荐体积

| 培养皿大小/细胞数量 | IP Lysis Buffer | 备注 |
|--|-----------------|------|
| 100×100 mm | 500-1000 μl | |
| 60×60 mm | 250-500 μl | 贴壁细胞 |
| 6 孔板 | 200-400 μl | |
| 24 孔板 | 100-200 μl | |
| 1×10 ⁶ -5×10 ⁶ cells | 500-1000 μl | 悬浮细胞 |

2.2.3 植物样本的裂解

- 1) 剪取植物叶片 1-2 克;
- 2) 转移到研钵中加入少量液氮, 用杵研磨成细粉;
- 3) 加入 1 ml IP Lysis Buffer, 再次研磨 10 min;
- 4) 13,000× g 离心 10 min, 去除植物碎片;
- 5) 将上清转移至新的离心管中, 标记为植物裂解样品。

2.3 磁珠漂洗

- 1) 将磁珠充分混匀后取 20 μl 磁珠置于离心管中, 向管中加入 500 μl PBS, 上下颠倒混匀 5-10 次;
- 2) 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清;
- 3) 向管中加入 500 μl PBS, 上下颠倒混匀 5-10 次, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清;
- 4) 重复操作 3 次。

注: 本试剂盒中提供适量阴性对照 (MagHub Control Nb Beads), 免疫沉淀实验时建议设置阴性对照组, 使用方法与 MagHub Anti-DDDDK Beads 完全一致。若有更多需求, 可以订购本公司的 MagHub Control Nb Beads (货号: MP6701)。

2.4 样品孵育

- 1) 向上述漂洗好的磁珠中加入细胞裂解样品, 室温或 4℃ 下孵育 60 min (建议在旋转混匀仪上孵育, 使样品和磁珠充分接触);
- 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;
- 3) 向离心管中加入 500 μl 1× IP Wash Buffer, 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;
- 4) 重复操作 5 次。

注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温 1 h 或者 4℃ 4 h, 根据实际的结合效果适当调整孵育时间, 一般情况下不建议过夜孵育, 过夜孵育可能会引起过多的非特异性吸附。磁珠每次洗涤, 加入 IP Wash Buffer 后可以冰上静置 3 分钟。



2.5 蛋白洗脱

1) 洗脱液洗脱

该方法适用于 IP-MS 应用。每 20 μ l 原始磁珠体积加入 60 μ l Elution Buffer D 洗脱液，常温洗脱 5-10 min，期间轻轻混匀 3-5 次。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，进行 Western 或质谱检测。

注：Elution Buffer D 可以充分洗脱标签蛋白，且能保证磁珠上的抗体只有很少量的脱落，但是磁珠上可能有少量目的蛋白残留。

2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

该方法适用于 IP-WB 应用。每 20 μ l 原始磁珠体积加入 40 μ l 的 2 \times SDS Loading Buffer，摇晃混匀后 100 $^{\circ}$ C 高温处理 10 min，将离心管置于磁力架上分离 10 s，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或进行 Western 检测。

注：Western 检测的上样量建议控制在 20 μ l 以内，剩余的样本可冻存于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 $^{\circ}$ C，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) 本产品能耐受 \leq 1 mM DTT，不建议在样本中加入过高浓度的还原剂；
- 4) 本产品能耐受 \leq 2 M 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。

4. 参考信息

- 1) DYKDDDDK tag IP 实验：样品为 293 细胞内表达蛋白，含有 His 和 DYKDDDDK 标签。
- 2) 取 1 ml 悬浮细胞 ($\approx 3 \times 10^6$ 个) 常温下 1 \times PBS (pH=7.4) 清洗三次后快速进行裂解、离心；
- 3) 加入 20 μ l 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 60 min；
- 4) 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；
- 5) 用 1 \times IP Wash Buffer 清洗 5 次后加入 2 \times SDS Loading Buffer 99 $^{\circ}$ C 高温处理 10 min 后进行 WB；
- 6) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb，阴性对照(-)为 MagHub Control Nb Beads 和样本孵育，结果请见图 2。

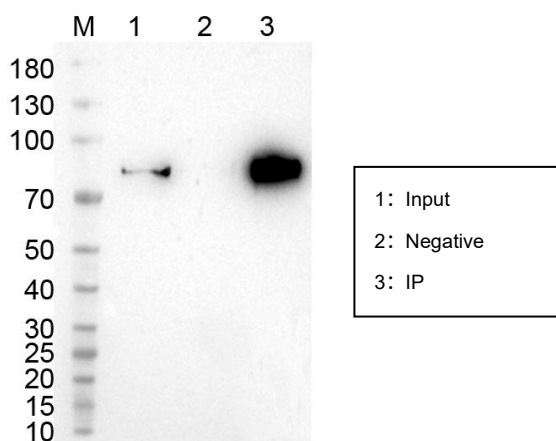


图 2. MagHub Anti-DDDDK Beads 进行 IP 实验后的 WB 图

图 2 表明 MagHub Anti-DDDDK Beads 能够高效捕获样品中的 DYKDDDDK 标签融合蛋白，同时没有非特异性的蛋白结合。

5. 订购信息

| 名称 | 货号 | 规格 |
|-------------------------|-----------|--------|
| MagHub Anti-DDDDK Beads | MP6201-01 | 0.2 ml |
| | MP6201-02 | 1 ml |
| | MP6201-03 | 5 ml |
| | MP6201-04 | 25 ml |
| | MP6201-05 | 100 ml |



6. 相关产品

| 类型 | 名称 | 货号 |
|-----------------------------|-----------------------------------|--------|
| Magneți-G 蛋白标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | Magneți-G His 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | BK0049 |
| | Magneți-G Myc 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | BK0050 |
| | Magneți-G HA 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | BK0051 |
| | Magneți-G GFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | BK0052 |
| | Magneți-G RFP 标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒 | BK0053 |
| | Magneți-G Strep-tag II IP 试剂盒 | BK0071 |
| | Magneți-G MBP-tag IP 试剂盒 | BK0075 |
| MagHub 蛋白标签 IP 试剂盒 | MagHub HA-tag IP 试剂盒 | BK0072 |
| | MagHub Myc-tag IP 试剂盒 | BK0074 |
| | MagHub V5-tag IP 试剂盒 | BK0076 |
| | MagHub DDDDK-tag IP 试剂盒 | BK0073 |
| Magneți-G 标签抗体磁珠 | Magneți-G Anti-DYKDDDDK Beads | MP5101 |
| | Magneți-G Anti-His Beads | MP5201 |
| | Magneți-G Anti-Myc Beads | MP5301 |
| | Magneți-G Anti-HA Beads | MP5401 |
| | Magneți-G Anti-GFP Beads | MP5501 |
| | Magneți-G Anti-RFP Beads | MP5601 |
| | Magneți-G Control IgG Beads | MP5801 |
| | Magneți-G Anti Strep-tag II Beads | MP6001 |
| Magneți-G Anti MBP Beads | MP6401 | |
| MagHub 标签抗体磁珠 | MagHub Anti-HA Beads | MP6101 |
| | MagHub Anti-Myc Beads | MP6301 |
| | MagHub Anti-V5 Beads | MP6501 |
| | MagHub Control Fab Beads | MP6601 |
| | MagHub Control Nb Beads | MP6701 |