

ChainFree™ Anti-Flag Magnetic Beads

产品信息

| 产品名称 | 货号 | 储存条件 |
|-------------------------------------|---------------|-------------|
| ChainFree™ Anti-Flag Magnetic Beads | FI8201-0.5 mL | 4℃（避免冻存），2年 |
| ChainFree™ Anti-Flag Magnetic Beads | FI8201-1 mL | 4℃（避免冻存），2年 |
| ChainFree™ Anti-Flag Magnetic Beads | FI8201-5 mL | 4℃（避免冻存），2年 |

产品描述

ChainFree™ Anti-Flag 磁珠偶联了经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 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 ChainFree™ Anti-Flag 磁珠加入样本裂解液中，Flag 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。

产品属性

| | |
|-------|--|
| 磁珠直径 | 2 μm |
| 储存缓冲液 | 20 mM PBS, 5% BSA |
| 蛋白结合量 | ≥1.5 mg 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） |

注意事项和免责声明：本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

使用说明

建议的缓冲液配方

| 缓冲液 | 配方 |
|--------------------------|---|
| 裂解缓冲液 (辉骏产品货号 F18101) | 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40 (在 4°C 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°C 下调整 PH) |
| 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 |
| 洗脱缓冲液 (辉骏产品货号 F18103) | 3×Flag 多肽用 PBS 溶解成 400 ng/μL |

免疫沉淀操作方法 (参考)

*注意:

- (1) 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 (辉骏产品货号 F18105)**，RIP 实验还应添加**足量的 RNase 抑制剂 (辉骏产品货号 F18106)**，混合均匀，冰上保存，现配现用。
- (2) 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- (3) 由于煮沸会导致磁珠聚集并且失去结合能力，因此经煮沸的磁珠不应再次使用。
- (4) 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。
- (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 实验效果可能受到结合缓冲液和洗涤缓冲液的影响，如果操作者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。
- (7) 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。

1. 样本裂解

(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 | 1×10 ⁷ ~ 2×10 ⁷ 个 | 冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀 |
| 动物组织 | 100~200 mg | 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 | 200~300 mg | 无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨 |
| 微生物 | 50 μL 菌体沉淀 | 冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀 |

- (2) 样本加入 300~500 μL 预冷的裂解缓冲液，吹打混匀。
- (3) a. 动物细胞：置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀)；为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清。

b. 动物组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）。

c. 植物、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(4) 4℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，取 30 μL 作为 input，剩余用于 IP 实验，- 80℃ 保存。

***注意：**裂解缓冲液的最小使用体积为 300 μL，其体积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。

2. 免疫共沉淀

(1) 每组实验取 20 μL ChainFree™ Anti-Flag 磁珠，加入 200 μL 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(2) 再次加入 200 μL 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(3) 向上步磁珠中加入样本裂解液，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4℃ 过夜，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(4) 加入 500 μL 漂洗缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作两次。

3. 洗脱

(1) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：洗脱后的蛋白适合于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测。加入 50 μL 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃ 加热 5 分钟。放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。

(2) 3×Flag 竞争洗脱法（非变性洗脱法）：洗脱效率高，且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于各种检测（例如质谱实验、RNA 或 DNA 提取、SDS-PAGE、Western-blot）。加入 40-50 μL Flag 多肽洗脱液（400 ng/μL），涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s；1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，- 80℃ 保存或直接用于后续实验。

结果展示

