



## Anti-Flag Nanobody Agarose Beads

### ● 产品规格

货号: KTSM1308

规格: 500  $\mu$ L (50% anti-Flag tag nanobody conjugated agarose beads)

储存条件: 4°C (避免冻存)

保质期: 12 个月

运输: 冰袋运输

### ● 产品说明

Anti-Flag Nanobody Agarose Beads (以下称 anti-Flag beads) 是将抗 Flag 标签 (DYKDDDDK) 纳米抗体共价偶联到琼脂糖珠上, 用于抓取哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物的细胞提取物中的含 Flag 标签的蛋白及与其紧密相互作用的蛋白。

### ● 产品应用

应用于: 免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(CoIP)、RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)、酶活性检测、质谱分析 (MS) 等。

### ● 产品属性

珠子直径: 45-165  $\mu$ m (4%交联琼脂糖珠)

储存液: 1xPBS, 25% glycerol 和 0.02% NaN<sub>3</sub>

结合能力: 每 10  $\mu$ L anti-Flag beads (包含悬浮液) 结合 15-20  $\mu$ g 含 Flag 标签的融合蛋白

配基: 抗 Flag 标签 (DYKDDDDK) 纳米抗体 (融合 6 $\times$ his 标签)

反应性: 结合 Flag 标签的融合蛋白及与其紧密相互作用的蛋白

### ● 推荐使用溶液

Buffer	Composition
Lysis buffer (CoIP)	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% Triton-100; 1 mM EDTA
RIPA buffer	10 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 1% Deoxycholate
Dilution/Wash buffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA
loading buffer	120 mM Tris-HCl pH 6.8; 20% glycerol; 4% SDS; 0.04% Bromophenol blue; 10% $\beta$ -mercaptoethanol



Glycine-elution buffer	200 mM glycine pH 2.5
Neutralization buffer	1 M Tris-HCl pH 10.4

注意: 对于其它细胞类型, 如酵母、植物、昆虫、细菌, 请使用等效的细胞溶解缓冲液。

## ● 操作说明

### ➤ 收集细胞

对于一个免疫共沉淀反应, 推荐使用  $10^6$ - $10^7$  个表达 Flag 标签融合蛋白的哺乳动物细胞。吸出生长培养基, 向培养皿中加入 2 mL 预冷的 1X PBS 洗涤细胞 2 次, 利用细胞刮或胰酶消化的方法收集贴壁细胞, 细胞转移到离心管,  $1200 \times g$  离心 3-5 分钟并丢弃上清液。

### ➤ 裂解细胞

1. 对于细胞质蛋白, 用 200  $\mu$ L 预冷 Lysis buffer 重悬细胞。

注: 在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂和 1 mM PMSF。

对于核蛋白可选择: 在 RIPA buffer 中加入 1 mg/mL DNase、2.5 mM  $MgCl_2$ 、蛋白酶抑制剂和 1 mM PMSF。

2. 将离心管放在冰上 30-40 分钟, 每隔 10 分钟重悬细胞一次。

3.  $4^\circ C$ ,  $12000 \times g$  离心 10 分钟, 将上清液转移到一个新的预冷离心管中, 加入 300  $\mu$ L dilution buffer(可用 1xPBS 代替), 弃沉淀(如需要, 保存 50  $\mu$ L 裂解液进行进一步分析)。

注: 此步骤获得的细胞溶解物可置于  $-80^\circ C$  下长期保存。

可选做: 在稀释液中加入 1 mM PMSF 和蛋白酶抑制剂。

### ➤ 平衡 Beads

1. 混匀 anti-Flag beads, 吸取 25  $\mu$ L (包含 50%混悬液) 放在 1.5 mL 离心管中。

2. 加入提前预冷的 500  $\mu$ L Dilution buffer 或 1xPBST (0.05% Tween-20)。

3.  $4^\circ C$ ,  $1200 \times g$  离心 3 分钟, 去掉上清, 重复 2 次。

### ➤ 结合蛋白

1. 将细胞裂解后获得的上清液加入平衡后的 anti-Flag beads 中,  $4^\circ C$  上下颠倒孵育 1-3 小时。

2.  $4^\circ C$ ,  $1200 \times g$  离心 3 分钟, 去掉上清。

### ➤ 洗涤

1. 加入 500  $\mu$ L Dilution buffer 或 1xPBST 重悬 anti-Flag beads。

2.  $4^\circ C$ ,  $1200 \times g$  离心 3 分钟, 去掉上清, 重复 2-5 次。

可选做: 在第二次洗涤的步骤中增加 NaCl 浓度到 500 mM。



➤ 检测

1. 30  $\mu$ L loading buffer 重悬 anti-Flag beads。
2. 将 anti-Flag beads 在 95°C 水浴中加热 10 分钟，使免疫沉淀复合物和 anti-Flag beads 分离。
3. 4°C，1200  $\times$  g 离心 3 分钟，取上清样品通过 SDS-PAGE 或 western blot 检测。

➤ 选做步骤：洗脱（需跳过上述检测步骤）

1. 加 50  $\mu$ L 200 mM glycine pH 2.5，重悬 anti-Flag beads，保持混匀状态孵育 3-10 分钟。
2. 4°C，1200  $\times$  g 离心 3 分钟后，将上清液转移至新的离心管中，加入 25  $\mu$ L 1M Tris-HCl, pH 10.4 中和 glycine。
3. 为了提高洗脱效率可重复上述步骤 1 和 2 以增加洗脱效率。

声明：本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序等。