

简介

DYKDDDDK tag Nanoselector® 琼脂糖珠是由一种抗DYKDDDDK tag (Flag tag)纳米抗体 (VHH) 与琼脂糖珠共价结合组成, 用于从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等各种生物的细胞提取物中免疫沉淀 DYKDDDDK tag-融合蛋白, 具有载量高、无轻重链干扰等优势。

特性

配体	抗DYKDDDDK tag的纳米抗体 (VHH)
特异性	与DYKDDDDK tag融合蛋白特异性结合
结合能力	每 10 μ L 琼脂糖珠悬液结合 20 μ g DYKDDDDK tag融合重组蛋白
珠粒大小	~ 40 μ m
储存缓冲液	20% 乙醇
储存条件	收货后于 4°C储存。请勿冷冻!
稳定性	收货后 4°C可稳定保存 1 年。
装运	低温装运

缓冲液成分建议

缓冲溶液要求

缓冲液	成分
Lysis buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP40
RIPA buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % TritonX-100, 1 % deoxycholate
Dilution buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA
Wash buffer	10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % NP40, 0.5mM EDTA
2xSDS Sample buffer	120 mM Tris-HCL pH 6.8, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0.04 % bromophenol blue, 10 % β -mercaptoethanol
Acidic elution buffer	200 mM glycine pH 2.5
Neutralization buffer	1 M Tris-HCL pH 10.4

注: 对于其他细胞类型如酵母、植物、昆虫、细菌, 请使用相应的细胞裂解缓冲液。

注: 考虑使用无去垢剂的洗涤缓冲液进行免疫共沉淀。

DYKDDDDK tag Nanoselector® 琼脂糖珠

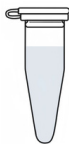
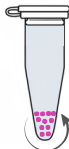
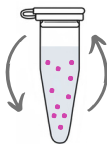
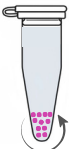
产品货号：016-101-002



产品规格

产品	规格
DYKDDDDK tag Nanoselector® 琼脂糖珠	20 个反应（500 μL 悬浮液）
	200 个反应（5 mL 悬浮液）

流程预览

准备工作		所有步骤均 4℃ 操作； 准备细胞裂解缓冲液和细胞裂解条件
细胞裂解物		每 10 ⁶ -10 ⁷ 个细胞加入 200 μL 的 lysis buffer； 裂解细胞并离心取上清； 混合 200 μL 上清样品和 300 μL dilution buffer
平衡磁珠		将 25 μL 磁珠悬浮液转移到 1.5 mL 的 EP 管中； 用 500 μL dilution buffer 平衡 3 次
结合蛋白		向磁珠中加 500 μL 细胞裂解物； 4℃ 上下旋转 1 小时
洗磁珠		用 wash buffer 洗涤磁珠 3 次，每次 500 μL ； 在最后一次洗涤步骤中，将磁珠转移到一个新 EP 管中
用 SDS Sample buffer 洗脱		80 μL 2X SDS sample buffer 重悬磁珠； 95℃ 以上沸水浴 5 分钟； 上清可用于 SDS-PAGE /WB 分析

免疫沉淀流程

细胞材料

以下方案描述了哺乳动物细胞裂解物的制备。

对于其他类型的细胞，我们建议使用 500 µg 细胞提取物，并从琼脂糖珠平衡步骤开始实验。

哺乳动物细胞裂解

注意：使用预冷的缓冲液收获细胞并裂解细胞。强烈建议将蛋白酶抑制剂添加到裂解缓冲液中，以防止目标蛋白及其结合物降解。对于一次免疫沉淀反应，我们推荐使用约 10^6 - 10^7 个细胞。

1. 选择裂解缓冲液。

· 对于细胞质蛋白，通过上下吹打将细胞团重悬于 200 µL 预冷的 Lysis buffer 中。

注：Lysis buffer 使用前，需要额外添加蛋白酶抑制剂混合液和 1mM PMSF。

· 对于核/染色质蛋白，将细胞团重悬于 200 µL 预冷的 RIPA 缓冲液中。

注：RIPA 缓冲液使用前需要额外添加 DNaseI (75-150 Kunitz U/mL)，MgCl₂ (2.5 mM)，蛋白酶抑制剂混合液和 PMSF (1 mM)。

2. 冰上放置 30 分钟，然后每 10 分钟用移液管吸取一次。

3. 4°C，17,000x g 离心细胞裂解液 10 分钟。将澄清的裂解物（上清液）转移到预冷 EP 管中，并加入 300 µL Dilution buffer（Dilution buffer 使用前需要额外添加蛋白酶抑制剂混合液和 1mM PMSF）。如果需要，可保存 50 µL 稀释的裂解物用于进一步分析（如进行 input 对照）。

植物组织裂解（例：拟南芥）：

1. 用纸巾将液体培养的拟南芥幼苗吸干，称取 0.7 克，转移到研钵中。

2. 用液氮冷冻，用杵研磨成细粉。

3. 加入 4ml 提取缓冲液 (PBS, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 蛋白酶抑制剂)，缓慢解冻，进一步研磨样品。

4. 将样品转移到 1.5 ml 微量离心管中，在 4°C 下以 16000 x g 离心 20 分钟。

5. 将上清液通过 0.20 µm 的过滤注射器，并将提取物置于冰上。如果需要，可保存 50 µL 稀释的裂解物用于进一步分析（如进行 input 对照）。

琼脂糖珠平衡

1. 通过移液枪吹打或上下旋转 EP 管，重悬微珠。不要漩涡微珠！

2. 将 25 µL 的微珠悬浮液转移到 1.5 mL 的离心管中。

3. 加入 500 µL 预冷的稀释缓冲液。

4. 4°C，2500x g 离心 5 分钟收集珠子；丢弃上清。

DYKDDDDK tag Nanoselector® 琼脂糖珠

产品货号：016-101-002



蛋白结合

1. 将稀释的裂解物加入到平衡的琼脂糖珠中。
2. 在 4°C 上下旋转 1 小时。

洗涤

1. 在 4°C 下 2500x g 离心 5 分钟，沉淀珠子。
 2. 如果需要，可保存 50 µL 上清液用于进一步分析（穿流液 / 非结合组分）。
 3. 丢弃剩余的上层清液。
 4. 加入 500 µL wash buffer 重悬微珠。
 5. 4°C，2500x g 离心 5 分钟沉淀微珠，丢弃剩余的上清液。
 6. 重复上述洗涤步骤（步骤 4 和 5）至少两次。
 7. 在最后的洗涤步骤中，将微珠转移到新管中。
- 可选：为了增加 wash buffer 的强度，可测试各种盐浓度，如 150 mM-500 mM，和 / 或添加非离子洗涤剂，如 Triton™X-100。

2x SDS sample buffer洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
2. 加入 80 µL 2x SDS sample buffer 重悬微珠。
3. 在 95°C 以上沸水浴 5 分钟，从微珠上分离免疫复合物。
4. 4°C，2500x g 离心 2 分钟，沉淀珠子。
5. 用 SDS-PAGE /WB 分析上清。

Acidic elution buffer 洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
 2. 加入 50-100 µL Acidic elution buffer，在 4°C 或室温不停吹打 30 - 60 秒。
 3. 4°C，2500x g 离心 5 分钟，沉淀微珠。
 4. 将上清液转移到新的离心管中。
 5. 加入 5-10 µL Neutralization buffer 中和洗脱产物。
 6. 至少重复洗脱步骤（步骤 2，3，4，5）一次以提高洗脱效率。
- 注：室温洗脱比 4°C 效率更高。缓冲液要在室温下预温。

DYKDDDDK tag(Flag tag)相关产品

Code Number	Product Description	Applications	Size
016-303-001	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse IgG2b antibody	WB,ICC/IF,ELISA,IP,Flow Cyt	100µg
016-303-005	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse antibody(HRP)	WB,ELISA	100µg
016-203-001	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Rabbit antibody	WB,ICC/IF,ELISA,IP,Flow Cyt	100µg
016-323-001	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse IgG1 antibody	WB,ICC/IF,ELISA,IP,Flow Cyt	100µg
016-313-001	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse IgG2a antibody	WB,ICC/IF,ELISA,IP,Flow Cyt	100µg
016-303-007	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse IgG2b antibody(iFluor488)	WB,ICC/IF,ELISA,Flow Cyt	100µg
016-303-008	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse IgG2b antibody(iFluor594)	WB,ICC/IF,ELISA,Flow Cyt	100µg
016-303-009	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Mouse IgG2b antibody(iFluor647)	WB,ICC/IF,ELISA,Flow Cyt	100µg
016-503-001	Anti-DYKDDDDK tag, AlpHcAbs® Human antibody	WB,ELISA,IP,ICC/IF,Flow Cyt	100µg

Nanoselector相关产品

Code Number	Product Description	Applications	Size
002-101-002	Myc tag Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
002-101-003	Myc tag Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
019-101-002	GFP Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
019-101-003	GFP Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
016-101-002	DYKDDDDK tag Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
016-101-003	DYKDDDDK tag Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
003-101-002	HA tag Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
003-101-003	HA tag Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
015-101-002	MBP Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
015-101-003	MBP Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
010-101-002	GST Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
010-101-003	GST Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
011-101-002	SNAP tag Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
012-101-002	Halo Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
013-101-002	mNeongreen Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
014-101-002	TurboGFP Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
004-101-002	c-His tag Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
004-101-003	c-His tag Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)

Nanoselector相关产品

Code Number	Product Description	Applications	Size
049-101-002	mWasabi Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
017-101-002	TagFP Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
025-101-002	Rabbit IgG Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
025-101-003	Rabbit IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-101-002	Mouse IgG Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-101-003	Mouse IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-300-002	Mouse IgG&Rabbit IgG Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
001-300-003	Mouse IgG&Rabbit IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
067-101-003	Streptavidin Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	1mL(40 rxns)
064-101-002	V5 tag Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
064-101-003	V5 tag Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
086-101-003	Spycatcher Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
086-101-002	Spycatcher Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
082-101-002	StayGold/mBaojin Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
082-101-003	StayGold/mBaojin Nanoselector Magnetic	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
020-101-002	RFP Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
020-101-003	RFP Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
023-101-003	Human IgG Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
026-101-002	tdTomato Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
026-101-003	tdTomato Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
028-101-002	mScarlet Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
028-101-003	mScarlet Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
078-101-003	Biotin Nanoselector Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	0.5mL(20 rxns)
100-100-100	Binding Control Nanoselector Agarose	IP,CHIP,MS,Purification	1mL(40 rxns)
100-100-200	Binding Control Magnetic beads	IP,CHIP,MS,Purification	1mL(40 rxns)