Anti-Flag Tag COIP 磁珠

产品规格

产品货号	规格
SB-PR002S	0.4 ml
SB-PR002M	1 ml
SB-PR002L	5 ml (5*1 ml)

产品描述

Anti-Flag COIP 磁珠在大小为 2 μm 的纳米磁珠上共价结合了大量的小鼠 Anti- Flag tag 单克隆抗体，与传统的 Anti- Flag COIP 琼脂糖凝胶比较，抗体结合能力相同，背景更低，由于采用磁性分离，使得每次 COIP 可以节省 40%的时间。

产品特性

项目	特性
抗体亚型	鼠源 IgG3a
抗体纯化方法	Protein A 纯化制备
适用范围	免疫共沉淀（IP）， Flag-tag 蛋白纯化
推荐使用体积	COIP: 500 μl 细胞裂解液使用 10 μl 磁珠
融合蛋白结合容量	大于 0.6 mg protein/ml 磁珠
储存条件	4 ℃，避光

储存条件

pH 6-8， 4 ℃ 长期稳定，切勿产品冻结。

使用说明

1 . 磁珠的准备

重悬 Anti- Flag 免疫磁珠，取 10 μl 入到 500 μl PBST，洗涤 3 次，分离磁珠，弃上清。

2. 样品的结合（binding）

在上述沉淀中加入 500 μl 细胞裂解液，室温缓慢孵育 2 小时或者 4°C 条件下过夜，分离磁珠，弃上清。

注意：结合过程中，磁珠可能会出现聚团或呈片状，属于正常现象，不会影响实验结果。

3. 洗涤（washing）：0.5 ml PBST 缓冲液洗涤四次，每次 5 min，

分离磁珠，弃上清。

4. 洗脱（elution）根据下游用途选择不同的洗脱方法，进行免疫共沉淀可直接进行变性洗脱（4.1）；进行蛋白纯化可根据后续实验，低 pH 洗脱（4.2）。

4.1 变性洗脱: 上述所得沉淀中加入 50 μl 1×蛋白上样缓冲液，煮沸 5 min，冷却后分离磁珠，吸取上清液，进行 SDS-PAGE 检测。（适用于利用 anti-Flag 磁珠进行免疫共沉淀实验）

4.2 低 pH 洗脱：将 0.1 M glycine HCl (pH 3.0)洗脱液加入步骤 3 中的产物中，洗脱液体积为磁珠使用量的 5 倍，摇床孵育洗脱 5 min，洗脱时间不得超过 20 min。将上述产物进行磁力分离，取洗脱产物立即加入 1 M Tris (pH 8.0)进行中和，并调节 pH 直至中性。（适用于利用 anti-Flag 磁珠进行蛋白纯化实验）

缓冲液汇总

1、**细胞裂解液:** 正常 RIPA 细胞裂解缓冲液(一般是公司购买)

2、**binding buffer**：可以用 RIPA 代替。

3、**Washing buffer**：PBST(1*PBS + 1% Triton X-100)

4、**Elution buffer**：直接加入 1*蛋白 loading buffer, 98 ℃ 5 min 后弃去磁珠后，收集上清液检测。

常见问题及对策

常见问题	原因	解决方法
高的背景条带	蛋白非特异结合到抗体，磁珠或 EP 管上洗涤次数不够	对裂解液进行预处理去除非特异蛋白；在最后一次洗涤前，转移整个样品到新的 EP 管中然后进行离心。
	洗涤次数不够	增加洗涤的时间和次数。
无蛋白条带	Flag 标签蛋白没有表达	确保目的蛋白带有 Flag 标签；制备新鲜的裂解液；使用恰当的蛋白酶抑制剂。
	孵育时间不足	增加孵育时间。
	样品中存在干扰物质	裂解液中存在高浓度的 DTT，2-mercaptoethanol 或者其他的还原剂。