

Anti-FLAG 琼脂糖磁珠

Anti-DYKDDDDK (Anti-FLAG) Magnetic Agarose Beads

货号	HXL-FLAG-mag-agro-1 / HXL-FLAG-mag-agro-4 / HXL-FLAG-mag-agro-20	规格	1 / 4 / 20 mL (40% slurry)
用途/方式	FLAG 蛋白 IP / Co-IP / 小规模纯化	推荐用量	标准用量 50 μ L slurry / 反应；3 $\times$ FLAG peptide 洗脱液 0.30 mg/mL
适用样本	细菌、酵母、昆虫及哺乳动物表达体系澄清样本	保存条件	2–8 $^{\circ}$ C 保存；禁止冷冻

仅供科研使用（RUO），不用于临床诊断或治疗。

核心参数	本产品规格
磁珠基质 / 粒径	磁性琼脂糖 / 1–5 μ m
产品浓度	40% slurry (v/v)
标准用量	50 μ L 磁珠悬液 / 次
实际沉降磁珠	约 20 μ L / 次
蛋白结合容量	>1 mg FLAG 标签蛋白 / mL settled beads
推荐洗脱	3 $\times$ FLAG peptide 竞争洗脱

Anti-DYKDDDDK (Anti-FLAG) 琼脂糖磁珠由识别 DYKDDDDK 标签的抗体固定于磁性琼脂糖载体上。样品中的 FLAG 标签融合蛋白与磁珠结合后，可利用磁力架完成快速固液分离；经洗涤去除非特异结合物，再用 3 $\times$ FLAG peptide 竞争洗脱，在接近中性条件下获得目的蛋白或蛋白复合物。

本产品适用于细菌、酵母、昆虫及哺乳动物表达体系中 FLAG 标签蛋白的免疫沉淀（IP）、共免疫沉淀（Co-IP）和小规模亲和纯化。标签位置、邻近序列和蛋白构象均可能影响标签暴露度，首次使用时应同时保留 Input、Flow-through、Wash 和 Elution 样品进行条件确认。

产品特性

项目	说明
产品名称	Anti-DYKDDDDK (Anti-FLAG) 琼脂糖磁珠
基质	磁性琼脂糖
粒径	1–5 μ m
磁珠浓度	40% slurry (v/v) ； 1 mL 产品约含 0.40 mL 沉降磁珠
蛋白结合容量	>1 mg FLAG 标签蛋白 / mL settled beads（按沉降磁珠体积计）
推荐使用量	50 μ L 磁珠悬液 / 反应；约 20 个标准反应 / mL 产品
推荐样品体积	0.20–1.00 mL 澄清裂解液；常用起始体积 0.50 mL
推荐洗脱	3 $\times$ FLAG peptide 竞争洗脱；保持目的蛋白接近天然状态

项目	说明
分离方式	磁力架分离；以溶液澄清为终点
储存	建议 2–8°C，禁止冻结；有效期及保存液组成以产品标签/批次 COA 为准

包装规格

货号	规格（40% slurry）	参考反应数*
HXL-FLAG-mag-agro-1	1 mL	约 20 次
HXL-FLAG-mag-agro-4	4 mL	约 80 次
HXL-FLAG-mag-agro-20	20 mL	约 400 次

2 使用前准备

2.1 推荐缓冲液

缓冲液	推荐组成	用途与说明
标准结合/洗涤液	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4–7.5	适用于多数纯化与 IP；PBS（pH 7.2–7.4）亦可作为起始条件。
哺乳动物 IP 裂解液	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, pH 7.4	使用前加入蛋白酶抑制剂；弱相互作用可将去污剂降至 0.1–0.3%。
低背景洗涤液	标准缓冲液 + 0.05–0.10% Tween-20 或 NP-40；必要时 NaCl 300–500 mM	用于高背景样品；盐或去污剂过强可能损失弱相互作用蛋白。
3×FLAG peptide 洗脱液	0.30 mg/mL 3×FLAG peptide，TBS 或 PBS, pH 7.2–7.6	标准起始条件；回收不足时可提高至 0.5–1.0 mg/mL 或进行二次洗脱。

避免直接使用 含高浓度 DTT、β-巯基乙醇或其他强还原剂的裂解液，以及含较高 SDS 的样品。若实验必须使用这些成分，应先做小规模兼容性验证；不要把“同类产品可用”当作本产品已验证。

2.2 样品准备

在低温条件下制备裂解液，并在使用前新鲜加入蛋白酶抑制剂；研究磷酸化蛋白时同时加入磷酸酶抑制剂。

将裂解液在 4°C、12,000–16,000 × g 离心 10 分钟，取澄清上清。黏稠样品应通过剪切或核酸酶处理降低核酸黏度。

测定总蛋白浓度并确认 FLAG 标签蛋白在 Input 中表达。推荐每次使用 0.20–1.00 mL 澄清裂解液，首次以 0.50 mL 为起点。

保留 Input（建议为总样品的 1–2%）并全程置于冰上，随后立即进入磁珠结合步骤。

3 标准操作流程（50 μL 磁珠悬液 / 反应）

标准流程一览 充分重悬 → 预洗 2 次 → 4°C 结合 2–4 小时 → 洗涤 4 次 → 0.30 mg/mL 3×FLAG peptide、50 μL、室温 30 分钟 → 磁分离收集洗脱液。

3.1 磁珠重悬与预洗

将磁珠从 2–8°C 取出，轻柔翻转试剂瓶约 10 次，或用宽口吸头缓慢吹打，使磁珠完全均匀分散。避免剧烈涡旋和起泡。

立即吸取 50 μL 40% slurry 至 1.5 mL 低蛋白吸附管中。取样前后均应保持产品悬液均一。

加入 500 μL 标准结合/洗涤液，轻柔吹打或翻转混匀。

将管置于磁力架，待上清澄清后再吸弃上清。1–5 μm 磁珠在不同磁力架上的分离速度不同，通常约需 1–3 分钟；以澄清为准，不以固定秒数为准。

重复步骤 3–4 一次，共预洗 2 次。最后一次吸液时不要让磁珠干燥。

3.2 FLAG 标签蛋白结合

向预洗后的磁珠中加入 0.20–1.00 mL 澄清样品；首次建议使用 0.50 mL。样品体积过小时可用结合缓冲液补至至少 0.30 mL，以保证混合均匀。

轻柔吹打使磁珠均匀分散，置于翻转混合仪上 4°C 孵育 2 小时。低丰度目标可延长至 4 小时。

将反应管置于磁力架直至上清澄清，转移上清至新管并标记为 Flow-through (FT)，用于判断是否过载或结合不足。

若 FT 中仍有大量 FLAG 蛋白，不要直接通过过夜孵育解决；优先确认标签可及性、缓冲液兼容性，并按目标蛋白量增加磁珠用量。

不建议默认过夜 过夜可能提高非特异背景和蛋白降解风险。仅在 4°C 结合 2–4 小时仍不足且背景可接受时，才将过夜作为优化选项。

3.3 洗涤

向磁珠-蛋白复合物中加入 500 μL 洗涤液，轻柔吹打至完全重悬。

在 4°C 轻柔翻转 2–3 分钟；随后置于磁力架，待上清澄清后吸弃。

重复上述洗涤共 4 次。高背景样品可增加至 5 次，或在其中 1–2 次使用 300–500 mM NaCl / 0.05–0.10% 非离子去污剂的洗涤液。

最后一次洗涤重悬后，将全部磁珠转移至新的低蛋白吸附管再磁分离，以减少原管壁上非特异吸附蛋白。彻底移除残余洗液，但不要让磁珠变干。

3.4 3×FLAG peptide 竞争洗脱（推荐）

向洗涤后的磁珠加入 50 μL 新鲜配制的 0.30 mg/mL 3×FLAG peptide 工作液 (TBS/PBS, pH 7.2–7.6)。

轻柔吹打重悬，室温下持续轻柔混匀 30 分钟。若目的蛋白或复合物对温度敏感，可改为 4°C 混匀 60 分钟。

置于磁力架直至上清完全澄清，小心转移洗脱液至新的低蛋白吸附管，标记为 Elution 1 (E1)。

追求最大回收率时，再加入 50 μL 同浓度工作液重复洗脱一次，得到 Elution 2 (E2)；可分别分析，也可合并。

若 E1/E2 回收仍不足，可将肽提高至 0.5–1.0 mg/mL，或将洗脱体积提高至 100 μL 。优先做二次洗脱，不要仅靠无限延长孵育时间。

洗脱后立即复磁 1–5 μm 磁珠可能因吸液扰动带入洗脱液。将所得洗脱液在新管中再次放置磁力架 1–3 分钟，再转移上清，可显著减少磁珠残留。

3.5 洗脱液处理

短期使用：洗脱液置于 2–8°C 并尽快检测；长期保存应根据目标蛋白稳定性分装后冻存，避免反复冻融。

3×FLAG peptide 含芳香族氨基酸并可影响 A280、BCA 或其他蛋白定量。使用相同肽浓度的空白液校正，或先通过脱盐、透析、超滤/换液去除游离肽。

用于质谱、酶学或结构研究时，建议先去除游离肽并完成缓冲液置换。

用于 Western blot 时，建议按相同体积比例上样 Input、FT、最后一次 Wash、E1 和 E2，判断损失发生在哪一步。

4 条件优化与结果判读

实验目标	优先调整	代价 / 风险
提高总回收率	肽提高至 0.5–1.0 mg/mL；做二次洗脱；必要时增加磁珠	肽用量和洗脱体积增加；下游需脱盐。
提高洗脱液浓度	维持 50 µL 单次洗脱；先分析 E1，不立即合并 E2	可能牺牲部分总回收率。
降低非特异背景	缩短结合；洗 4–5 次；NaCl 300–500 mM；0.05–0.10% 非离子去污剂	弱相互作用蛋白可能丢失。
保留弱蛋白复合物	4°C 快速操作；NaCl 100–150 mM；低去污剂；减少洗涤时间	背景升高，需要阴性对照和后续验证。
捕获低丰度目标	结合延长至 2–4 小时；提高样品量；按目标量同步增加磁珠	非特异背景和蛋白降解风险上升。
减少磁珠带入	延长磁分离至上清澄清；转移后在新管中再次磁分离	多一次转移会带来少量体积损失。