

## Anti-DYKDDDDK (Flag) Affinity Gel

### Anti-Flag 亲和纯化凝胶

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Anti-DYKDDDDK (Flag) Affinity Gel (Anti-Flag 亲和纯化凝胶)	20585ES01	100 $\mu$ L
	20585ES03	1 mL
	20585ES08	5 mL
	20585ES25	25 mL
	20585ES60	100 mL

#### 产品描述

Anti-Flag 亲和纯化凝胶 (Anti-DYKDDDDK (Flag) Affinity Gel) 由高质量的鼠源 IgG2b 单克隆抗体与 Sepharose 4B gel 通过供价偶联制备, 本产品具有较高的 Flag 标签融合蛋白加载容量 (至少为 1.1 mg protein/mL 凝胶), 杂蛋白非特异结合少, 可用于带有 Flag 标签的融合蛋白免疫沉淀 (IP) 和纯化。

Anti-DYKDDDDK (Flag) Affinity Gel (Anti-Flag 亲和纯化凝胶) 可结合 Met 修饰的 N 端 Flag 融合蛋白 (Met-FLAG-Protein), N 端 Flag 融合蛋白 (FLAG-Protein), C 端 Flag 融合蛋白 (Protein-FLAG)。

克隆号 (Clone)	1E6
亚型 (Isotype)	Mouse IgG2b
纯化方法 (Purity)	Protein A
抗体浓度 (Antibody Concentration)	7.5 g 抗体/L 凝胶
应用 (Application)	蛋白纯化, 免疫沉淀 (IP)
蛋白结合量 (Protein)	$\geq 1.1$ mg 蛋白/mL 凝胶
储存缓冲液 (Buffer)	10mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 150mM NaCl, 50%甘油, pH7.4, 含有 0.02% (w/v) 叠氮钠

#### 产品性质

#### 运输和保存方法

冰袋运输。未开封的产品在-20°C下可稳定保存 1 年。禁止在不含甘油的溶液中冻存!

#### 注意事项

- 1) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 2) 本产品仅作科研用途!

## 使用方法

### 一、制备细胞裂解液（以哺乳动物细胞为例）

**注意：**样品中不能含有颗粒不溶物，可以用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤或 10,000 $\times\text{g}$  离心 15 min；如有必要，可以加入蛋白酶抑制剂；如样品太粘稠，可以加入核酸酶处理。

细胞密度 70-90%，100 mm 培养皿（约  $10^6$ - $10^7$  细胞），加入 1mL 裂解液（50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100）。推荐加入蛋白酶抑制剂 Cocktail（Cat 20123ES）。

#### 1) 清洗细胞

贴壁细胞：去除生长培养基，用 PBS 洗 2 次，去除 PBS，加入裂解液（ $10^6$ - $10^7$  cells/mL）。

悬浮细胞：细胞转移到离心管中，420 $\times\text{g}$  离心 5 min，去除上清。用 PBS 重悬，420 $\times\text{g}$  离心 5 min，重复 1 次，去除上清，加入裂解液重悬（ $10^6$ - $10^7$  cells/mL）。

2) 加入裂解液后，孵育 15-30 min。

3) 离心，12,000 $\times\text{g}$ ，10 min。【贴壁细胞离心前先把细胞刮下来】

4) 收集上清到预冷的样品管中。上清可储存在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 二、应用

可以使用层析柱或免疫沉淀（IP）纯化目的蛋白。1-3 mL 凝胶层析柱可以纯化约 100 mL 细胞裂解液；如样品体积较小（1-2 mL 细胞裂解液），可以使用免疫沉淀（IP）法；如需处理较大体积细胞裂解液，推荐使用溶液体系。

#### 1 层析柱法

##### 1.1 装柱

1) 准备层析空柱（Cat 20520ES-20526ES）；用 2-3 倍柱体积的 TBS（50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl）或其他适合缓冲液洗柱 2 次。

2) 颠倒混匀 Anti-Flag 亲和纯化凝胶，保证凝胶均一。取 1-3 mL 凝胶装柱（纯化约 100 mL 细胞裂解液）。

3) 用 2-3 倍柱体积的 TBS 洗 2 次，待液体流尽后，用 3 倍体积的 0.1 M Gly-HCl, pH 3.5 冲洗，要保证凝胶平面平整。**Gly-HCl 缓冲液处理时间不要超过 20 min。**

4) 用 5 倍体积 TBS 平衡凝胶柱，直至流出液达到中性 pH。

##### 1.2 纯化

1) 上样：在层析柱中加满蛋白裂解液，重复上样 2-3 次可以尽可能增加蛋白与凝胶结合量。

2) 清洗：用 10-20 倍柱体积的 TBS 清洗，以去除非特异结合的蛋白。

3) 洗脱（可选以下 2 种方法之一）：

A、酸洗脱：收集管中加入 15-25  $\mu\text{L}$  1 M Tris, pH 8.0，分别用 1 mL 0.1 M Gly-HCl, pH 3.5 洗脱，再重复 5 次。

B、3 $\times$ Flag 多肽（Cat 20571ES）洗脱：用 TBS 配制 Flag 多肽溶液（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）洗脱，分别用 1 倍柱体积多肽溶液洗脱，重复 4 次。

##### 1.3 填料再生与保存

1) 柱再生：使用后立即再生，用 3 倍柱体积 0.1 M Gly-HCl, pH 3.5 清洗，立即用 TBS 平衡，直至达到中性 pH。

2) 保存：用 10 倍柱体积 TBS（含 50% 甘油，0.02% 叠氮钠）清洗，再加入 5 mL 该溶液至柱中，保存在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  或 -20 $^{\circ}\text{C}$  中。

#### 2 免疫沉淀（IP）

##### 2.1 免疫沉淀（IP）

1) 充分重悬 Anti-Flag 亲和纯化凝胶，尽量形成均一的溶液。取 40  $\mu\text{L}$  混合液（20  $\mu\text{L}$  gel）至新的离心管中。

2) 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s，使凝胶沉淀在离心管底部，在加入样品前，静置 1-2 min。去除上清，此时要小心操作，避免吸到凝胶。

3) 加入 500  $\mu\text{L}$  TBS，轻轻的重悬 Anti-Flag Affinity Gel，10,000 rpm 离心 30 s，弃上清，重复上述步骤 1 次。

4) **可选步骤。**为去除凝胶中痕量的未结合抗体，可加入 500  $\mu\text{L}$  0.1 M glycine HCl, pH 3.5 清洗凝胶，离心去除上清，加入 3 倍体积 TBS，轻摇 2-3 分钟，5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s，弃上清，重复洗涤至上清 pH 为中性。**Glycine HCl 处理时间切勿超过 20 min。**

- 5) 加入 200-1000  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 如有必要, 可用裂解液调整至终体积 1 mL。细胞裂解液的体积取决于 Flag 融合蛋白的表  
达量。阳性对照, 需要加入 1 mL TBS 和 4  $\mu\text{L}$  50 ng/ $\mu\text{L}$  Flag-BAP 融合蛋白 (约 200 ng); 阴性对照, 只要加入 1 mL 裂解  
缓冲液即可 (不含蛋白)。
- 6) 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢孵育 2 小时。如需提高结合效率, 可延长至过夜。
- 7) 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s, 去除上清。
- 8) 上述沉淀用 0.5 mL TBS, 轻摇混匀, 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s 去尽上清, 重复 3 次。

## 2.2 Flag 融合蛋白洗脱 (可选以下 3 种方法之一)

- 1) 非变性洗脱 (3 $\times$ Flag 多肽)
  - a. 配制 3 $\times$ Flag 多肽洗脱液: 用 0.5 M Tris-HCl 溶液, pH 7.5 (含 1M NaCl) 溶解 3 $\times$ Flag 多肽, 终浓度为 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。用 ddH<sub>2</sub>O  
稀释至 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 加入 3  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 3 $\times$ Flag 多肽, 加入到 100  $\mu\text{L}$  TBS 中 (终浓度 150 ng/ $\mu\text{L}$ )。
  - b. 分别加入 100  $\mu\text{L}$  3 $\times$ Flag 多肽洗脱液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min (慢慢摇晃), 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s, 转移上清至新管中 (不要吸  
到凝胶)。如立即使用, 上清可保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。
- 2) 酸性洗脱 (0.1 M Gly-HCl, pH 3.5)

加入 100  $\mu\text{L}$  0.1 M Gly-HCl, pH 3.5, 室温孵育 5 min (慢慢摇晃), 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s, 转移上清至新管中 (含 10  $\mu\text{L}$   
0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)。注意不要吸到凝胶。如立即使用, 上清可保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。
- 3) 用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

加入 20  $\mu\text{L}$  2 $\times$ 上样缓冲液 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝), 煮沸 3 min, 5,000-8,200 $\times\text{g}$   
离心 30 s。上清可直接 SDS-PAGE 电泳, 或 WB 检测。

## 2.3 填料再生与保存

- 1) 再生: 使用后立即再生, 加入 3 倍凝胶体积 0.1 M Gly-HCl, pH3.5, 轻摇 3-5 min, 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s, 弃上清。立  
即用 TBS 平衡: 加入 3 倍体积 TBS, 轻摇 2-3 min, 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s, 收集上清测定 pH, 如为中性 (原 TBS 加入前  
pH), 则进行下一步, 如仍为酸性, 则重复平衡步骤。
- 2) 保存: 用 10 倍凝胶体积 TBS (含 50%甘油, 0.02%叠氮钠) 清洗, 再加入适量该保存溶液至填料中, 保存在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 或-20 $^{\circ}\text{C}$   
中。保存缓冲液添加量, 恢复至纯化前即可, 体积比胶:缓冲液=1:1, 可以增大缓冲液体积, 缓冲液主要是提供必要的 pH 值  
和避免-20 $^{\circ}\text{C}$ 结冰。

## 3 溶液体系

- 1) 调整蛋白裂解液 pH 至 pH 7-8, 含有 0.15 M 盐离子, 如 NaCl, 可以降低非特异性蛋白结合。需去除 Flag 融合蛋白裂解  
液中的不溶成分。
- 2) 重悬 Anti-Flag 亲和纯化凝胶, 转移至新离心管中。3 倍体积 TBS, 轻摇 2-3 min, 5,000-8,200 $\times\text{g}$  离心 30 s, 弃上清, 重  
复洗涤至上清 pH 为中性。
- 3) Flag 融合蛋白裂解液与 Anti-Flag 亲和纯化凝胶孵育 1 h, 在孵育过程中轻摇, 以保证蛋白与凝胶充分接触。可根据情况,  
调整孵育时间。
- 4) 1,000 $\times\text{g}$  离心 5 min 收集凝胶-Flag 融合蛋白;
- 5) 用 10-20 倍柱体积的 TBS 清洗凝胶, 以去除非特异蛋白。
- 6) 洗脱 Flag 融合蛋白【参照上述洗脱步骤】。
- 7) 填料再生和保存【参照上述步骤】。

### 实验提示:

- 1) 酸性洗脱时, Gly-HCl 缓冲液处理时间不要超过 20 min。
- 2) 上样缓冲液中不要加入还原剂 (如 DTT), 还原剂会破坏抗体, 如必须要加还原剂, 则 2 $\times$ 上样缓冲液中还原剂不能超过  
10%或 100 mM。
- 3) 上样缓冲液中 SDS 会破坏抗体, 所以 Anti-Flag 亲和纯化凝胶不能重复使用。
- 4) 纯化推荐将凝胶装入层析柱中, 所有溶液可以直接流过。若在管中, 需反复离心除去溶液, 操作繁琐。
- 5) 除样本和裂解液外, 其它溶液建议 3 倍体积, 重复 3 次。可在保证纯化效果基础上适当缩减重复次数。
- 6) 建议同时做阳性与阴性对照组。