

Anti-DYKDDDDK (Flag) Affinity Gel

Anti-Flag 亲和纯化凝胶

产品简介

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 4% 高度交联的琼脂糖凝胶通过供价偶联制备, 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 蛋白/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)。

产品信息

货号	20584ES03 / 20584ES08 / 20584ES25 / 20584ES60
规格	1 mL / 5 mL / 25 mL / 100 mL

注: 为了方便客户使用 1×Flag 多肽洗脱, 本产品包装搭配赠送 1×Flag 多肽 (Cat#20572ES)。

基于 1×Flag 多肽 (Cat#20572ES) 不同规格分装, 1mL 凝胶包装搭配 5mg 多肽, 其余凝胶规格均搭配为 1mL: 1mg 比例的 5mg 规格 1×Flag 多肽 (Cat#20572ES)。

产品性质

克隆号 (Clone)	1A3
亚型 (Isotype)	Mouse IgG2b
应用 (Application)	蛋白纯化, 免疫沉淀 (IP)
蛋白结合量 (Protein)	≥1.1 mg 蛋白/mL 凝胶
储存缓冲液 (Buffer)	TBS, 50%甘油, pH7.4, 含有 0.02% (w/v) 叠氮钠

储存条件

-25~-15°C 保存, 有效期 1 年。禁止在不含甘油的溶液中冻存!

使用说明

1. 制备细胞裂解液 (以哺乳动物细胞为例)

样品中不能含有颗粒不溶物, 可以用 0.22 μm 滤膜过滤或 10,000×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 cells), 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 (片剂装) 或 Cat# 20124ES (溶液装))。

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×g 离心 5 min, 去除上清。用 PBS 重悬, 420×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, $12,000\times g$, 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°C 。

2. 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

a. 装柱

a) 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。

b) 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)。

c) 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 2.7-3.0 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。

d) 用 10 倍体积 TBS 平衡凝胶柱, 直至流出液达到中性 pH。

b. 纯化

a) 上样 (可选以下 2 种方法之一):

A、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。

B、向 TBS 平衡的凝胶中加入蛋白裂解液, 28°C 旋转孵育 60-90 min, 凝胶需处于悬浮状态增加蛋白与凝胶的结合量。

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

c) 洗脱 (可选以下 3 种方法之一):

不同蛋白的最佳的洗脱方式略有差异, 优先推荐 1×Flag 多肽 (Cat#20572ES) 洗脱。

A、碱洗脱: 用 1 倍柱体积碱性洗脱液 (0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 12) 洗脱, 洗脱后及时加入洗脱体积 1/10 的 1 M HCl 中和洗脱样品, 重复 5 次。洗脱时间不超过 20 min。

B、酸洗脱: 收集管中加入柱体积 1/10 的 1 M Tris, pH 8.5, 用 1 倍柱体积 0.1 M Gly-HCl, pH 2.7-3.0 洗脱, 重复 5 次。洗脱时间不超过 20 min。

C、1×Flag 多肽 (Cat#20572ES) 洗脱: 用 TBS 配制 Flag 多肽溶液 (100 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 洗脱, 用 1 倍柱体积多肽溶液洗脱, 重复 5 次。

c. 填料再生与保存

a) 柱再生: 使用后立即再生, 用 3 倍柱体积 0.1 M Gly-HCl, pH 2.7-3.0 清洗, 立即用 TBS 平衡, 直至达到中性 pH。

b) 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°C 中。

2) 免疫沉淀 (IP)

a. 免疫沉淀 (IP)

a) 充分重悬 Anti-Flag 亲和纯化凝胶, 尽量形成均一的溶液。取 40 μL 混合液 (20 μL gel) 至新的离心管中。

b) $5,000-8,200\times g$ 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。

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

d) 可选步骤。为去除凝胶中痕量的未结合抗体, 可加入 500 μL 0.1 M Gly-HCl, pH 2.7-3.0 清洗凝胶, 离心去除上清, 加入 3 倍体积 TBS, 轻摇 2-3 分钟, $5,000-8,200\times g$ 离心 30 s, 弃上清, 重复洗涤至上清 pH 为中性。Gly-HCl 处理时间切勿超过 20 min。

e) 加入 200-1000 μL 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 μL 50 ng/ μL 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）。

f) 4°C缓慢孵育 2 小时。如需提高结合效率，可延长至过夜。

g) 5,000–8,200×g 离心 30 s，去除上清。

h) 上述沉淀用 0.5 mL TBS，轻摇混匀，5,000–8,200×g 离心 30 s 去尽上清，重复 3 次。

b. Flag 融合蛋白洗脱（可选以下 4 种方法之一）

不同蛋白的最佳的洗脱方式略有差异，优先推荐 1×Flag 多肽（Cat#20572ES）洗脱。

a) 碱性洗脱（0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 12）

加入 100 μL 碱性洗脱液，室温孵育 10 min（慢慢摇晃），5,000–8,200×g 离心 30 s，转移上清至新管中（含 10 μL 1 M HCl）。注意不要吸到凝胶。如立即使用，上清可保存在 4°C，–20°C 长期保存。

b) 酸性洗脱（0.1 M Gly-HCl, pH 2.7–3.0）

加入 100 μL 0.1 M Gly-HCl, pH 2.7–3.0，室温孵育 10 min（慢慢摇晃），5,000–8,200×g 离心 30 s，转移上清至新管中（含 10 μL 0.5 M Tris-HCl, pH 8.5, 1.5 M NaCl）。注意不要吸到凝胶。如立即使用，上清可保存在 4°C，–20°C 长期保存。

c) 竞争洗脱（1×Flag 多肽（Cat#20572ES））

分别加入 100 μL 1×Flag 多肽洗脱液（100 – 500 μg/mL），常温孵育 30 min（慢慢摇晃），5,000–8,200×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°C，–20°C 长期保存。

d) 用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱

加入 20 μL 2×上样缓冲液（125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝），煮沸 5 min，5,000–8,200×g 离心 30 s。上清可直接 SDS-PAGE 电泳，或 WB 检测。

c. 填料再生与保存

a) 再生：使用后立即再生，加入 3 倍凝胶体积 0.1 M Gly-HCl, pH 2.7–3.0，轻摇 3–5 min，5,000–8,200×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×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。

b) 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°C 或 –20°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°C 结冰。

3. 溶液体系

a) 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。

b) 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×g 离心 30 s，弃上清，重复洗涤至上清 pH 为中性。

c) 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。

d) 5,000–8,200×g 离心 5 min 收集凝胶-Flag 融合蛋白。

e) 用 10–20 倍柱体积的 TBS 清洗凝胶，以去除非特异蛋白。

f) 洗脱 Flag 融合蛋白【参照上述洗脱步骤】。

g) 填料再生和保存【参照上述步骤】。

实验提示：

a) 酸性洗脱或碱性洗脱时，缓冲液处理时间不要超过 20 min。

b) 上样缓冲液中不要加入还原剂（如 DTT），还原剂会破坏抗体。

- c) 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。
- d) 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。
- e) 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。
- f) 建议同时做阳性与阴性对照组。

注意事项

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