

Anti-FLAG 标签 (DYKDDDDK) 亲和凝胶

Cat#: IP0064

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

FLAG 标签 (DYKDDDDK) 亲和凝胶, 由高品质的 FLAG 小鼠单克隆抗体与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (至少为 1.2mg protein/ml 凝胶悬液), 高特异性, 性质稳定, 可反复使用的特点, 可用于 FLAG 标签融合蛋白的亲亲和纯化及免疫 (共) 沉淀。

二. 性能指标

应用范围: 可用于 Met 修饰的 N 端 FLAG 融合蛋白 (Met-FLAG-Protein), N 端 FLAG 融合蛋白 (FLAG-Protein) 和 C 端 FLAG 融合蛋白 (Protein-FLAG) 的亲亲和纯化及免疫 (共) 沉淀。

抗体属性: 小鼠单克隆抗体, IgG2a 亚型。

载量: 1ml Sepharose 4B 琼脂糖颗粒, 共价偶联 8mg Anti-Flag 小鼠单克隆抗体, 可纯化或沉淀至少 1.2mg Flag 融合蛋白。

成分: 共价偶联 Anti-Flag 抗体的琼脂糖颗粒, 1ml 溶于 2ml PBS (含 50%甘油中)。

保存方法: 在加入了 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年。

三. 说明书阅读指南

使用目的	使用要求	使用方法
IP/CoIP		见 应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 FLAG 标签蛋白质
亲和纯化	<ol style="list-style-type: none"> 1. 目标蛋白遇酸不稳定 2. 要求纯化柱反复使用 3. 接受高成本纯化 	见 应用二. 3xFLAG 多肽亲和纯化 FLAG 标签蛋白质
亲和纯化	<ol style="list-style-type: none"> 1. 目标蛋白比较稳定 2. 不要求纯化柱反复使用 3. 不接受高成本纯化 	见 应用三. 酸洗脱亲和纯化 FLAG 标签蛋白质
细胞裂解液选择		
FLAG 标签蛋白质在细胞内表达		见 细胞裂解液制备 也可使用其它公司细胞裂解液裂解细胞
FLAG 标签蛋白质在细胞外分泌表达		表达量高可以直接纯化, 表达量低请浓缩后纯化

四. 使用方法

应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 FLAG 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-FLAG 标签亲和凝胶至均一, 转移 30 μ L 混合液(约含 15 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 150 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 4) 加入 5x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。
- 5) 取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。

应用二. 3xFLAG 多肽亲和纯化 FLAG 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-FLAG 标签亲和凝胶至均一, 转移 30 μ L 混合液(约含 15 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 150 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。(如需处理较大体积细胞裂解液, 推荐使用柱纯化, 可取 1-3 mL 凝胶装柱纯化约 100 mL 细胞裂解液)。
- 3) 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 4) 将 10 倍凝胶体积, 浓度为 100 μ g /mL 3x FLAG 多肽溶液加入上述沉淀, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h 后洗脱 (为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱)。每次收集 1ml。

备注: 根据蛋白质洗脱难易程度, 调整 3x FLAG 多肽溶液, 最高可到 2mg/ml。

- 5) 亲和凝胶如需重复使用, 需用依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 PBS 清洗, 再用含 0.2% 叠氮钠、50% 甘油的 PBS 保存在 -20 $^{\circ}$ C。
- 5) 用紫外检测仪测定收集峰, 合并收集峰。
- 6) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

应用三. 酸洗脱亲和纯化 FLAG 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-FLAG 标签亲和凝胶至均一, 转移 30 μ L 混合液(约含 15 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 150 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 4) 预冷的 10 倍凝胶体积 pH 3.0 的酸性洗脱液进行洗脱, 每次收集 1ml, 收集管中预先放入中和液 50 μ L。注意: 酸性环境会缩短凝胶的使用寿命, 应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 20min。
- 6) 亲和凝胶如需重复使用, 需用依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 PBS 清洗, 再用含 0.2% 叠氮钠、50% 甘油的 PBS 保存在 -20 $^{\circ}$ C。
- 7) 用紫外检测仪测定收集峰, 合并收集峰。
- 8) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

细胞裂解液制备

- 1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 2) 预冷的 PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，（例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约 $0.5-1 \times 10^7$ 细胞，需要加入 1ml 细胞裂解液）。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4°C 离心 10min。取上清，-80°C 冷冻保存。

五. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐，客户应根据具体情况进行调整。

细胞裂解液:	150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂)
3×FLAG peptide 洗脱液:	3xFLAG peptide 干粉, 使用前溶于 10 ml 1xPBS, 工作浓度为 100μg/ml
酸性洗脱液:	0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH3.0
中和液:	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
10xPBS (pH7.5) :	Na ₂ HPO ₄ ·x12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·x2H ₂ O 2.8g, NaCl 89g 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
酸性预洗液:	0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH5.0