

Anti-FLAG (DYKDDDDK) 免疫磁珠

Cat#: MIP0064

(本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

Flag-Tag (DYKDDDDK)，常用于真核蛋白质重组表达标记。Anti-FLAG (DYKDDDDK) 免疫磁珠，由高品质的 FLAG 抗体与磁珠共价偶联制成，具有高载量（至少为 0.6mg protein/ml 磁珠），高特异性，操作迅速便捷，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。

磁珠属性： 琼脂糖包裹的超顺磁珠，平均粒径 50um。

载量： 0.5mL 纳米磁珠，共价偶联 2mg Anti-FLAG 单克隆抗体，可纯化或沉淀至少 0.6mg FLAG 融合蛋白。

强度： 竞争洗脱，可反复使用 5 次以上。

成分： 0.5mL 共价偶联 Anti-FLAG 单克隆抗体的磁珠，溶于 1ml PBS 中。

保存方法： 在加入了 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，4°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	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	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 附件 2 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. 用前必读

1. 以下试剂及设备, 需要客户自备, 试剂推荐配方见说明书附件 1, 推荐蛋白质制备方案见附件 2。

磁力架 1 个, 1.5mL 离心管若干

细胞裂解液, 酸性洗脱液, 中和液, PBS, 2x 蛋白上样缓冲液, 3xFLAG 多肽(货号 Q7007)

待测抗原样品及检测抗体

2. 注意事项 (开箱前必读)

- 1) 本产品存在加入了 0.2% 叠氮钠的 PBS 保存液中, 4°C 可保存 1 年, 冷藏条件下运输。
- 2) 勿离心、冷冻、干燥磁珠, 勿使用超声处理磁珠, 勿使酸处理磁珠时间超过 10min。
- 3) 混匀磁珠时, 请采用移液枪轻柔吹打, 柔和涡旋, 上下颠倒及摇床混匀等方法。勿使用超声等方法。
- 4) 以下使用方法中的磁珠用量, 均为少量制备的示范用量, 请根据实际情况, 调整磁珠用量。

五. 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 免疫磁珠至均一, 取 40 μ L 磁珠悬液(约含 20 μ L 磁珠)至 1.5mLEP 管中, 加入 500 μ L 1xPBS, 轻柔重悬清洗磁珠, 磁力架上静置 10 sec 后, 弃上清, 重复上述步骤两次。
注意: 多个样品时, 可将磁珠重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 轻柔重悬磁珠, 室温摇床孵育 2hr 或者 4°C 孵育过夜。
- 3) 磁力架上静置 10 sec 后, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 FLAG-tag 蛋白是否存在残留)。加入 500 μ L 1xPBS, 温和混匀, 清洗磁珠, 磁性分离, 弃上清。重复两次。
- 4) 加入 2x 上样缓冲液, 煮样 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 免疫磁珠至均一, 取 100 μ L 磁珠悬液(约含 50 μ L 磁珠)至 1.5mLEP 管中, 加入 900 μ L 1xPBS, 轻柔重悬清洗磁珠, 磁力架上静置 10 sec 后, 弃上清, 重复上述步骤两次。
- 2) 加入 50-800 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 轻柔重悬磁珠, 室温摇床孵育 2hr 或者 4°C 孵育过夜。
- 3) 磁力架上静置 10 sec 后, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 FLAG-tag 蛋白是否存在残留)。
- 4) 清洗磁珠, 加入 1mL 1xPBS, 温和混匀, 清洗磁珠, 磁性分离, 弃上清。重复四次。
- 5) 将 100 μ L 或 2 倍磁珠体积, 浓度为 200 μ g / mL 3xFLAG 多肽溶液加入上述沉淀, 4°C 摇床孵育洗脱 2 h (为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱)。磁性分离, 将包含目的蛋白的上清转移到新的 EP 管。如有必要, 重复本步骤 1-3 次。
备注: 根据蛋白质洗脱难易程度, 调整 3xFLAG 多肽溶液浓度, 最高可到 2mg/ml。
- 6) 合并纯化好的抗体。
- 7) 磁珠如需重复使用, 需依次用 10 倍磁珠体积的酸性洗脱液、10 倍磁珠体积的中和液、10 倍磁珠体积的 PBS 清洗, 再加入与磁珠等体积的 1xPBS (0.2% 叠氮钠) 至磁珠中, 混合均匀, 保存在 4°C。
- 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。

应用三. 酸洗脱亲和纯化 FLAG 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-FLAG 免疫磁珠至均一, 取 100 μ L 磁珠悬液(约含 50 μ L 磁珠)至 1.5mLEP 管中, 加入 900 μ L 1xPBS, 轻柔重悬清洗磁珠, 磁力架上静置 10 sec 后, 弃上清, 重复上述步骤两次。

- 2) 加入 50-800 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液，轻柔重悬磁珠，室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 磁力架上静置 10 sec 后，将上清液转移到新的 EP 管中备用（上清液可用于检测 FLAG-tag 蛋白是否存在残留）。加入 1mL 1xPBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复四次。
- 4) 预冷的 0.5mL 或 10 倍磁珠体积 pH 3.0 的酸性洗脱液进行洗脱，收集管中预先放入中和液 25 μ L。注意：酸性环境会缩短亲和纯化磁珠的使用寿命，应尽量缩短亲和纯化磁珠与酸性洗脱液的接触时间，不能超过 10min。
- 5) 磁性分离，将包含目的蛋白的上清转移到新的 EP 管。
- 6) 用紫外检测仪测定收集峰，合并收集峰。
- 7) 磁珠如需重复使用，需依次用 10 倍磁珠体积的酸性洗脱液、10 倍磁珠体积的中和液、10 倍磁珠体积的 PBS 清洗，再加入与磁珠等体积的 1xPBS (0.2%叠氮钠) 至磁珠中，混合均匀，保存在 4 $^{\circ}$ C。
- 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。

附件 1. 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, 使用说明见附件 2)
3xFLAG 多肽	该多肽为轻质粉末, 开盖前应离心。多肽本身为酸性, 建议将 100ul 10xPBS 溶液加至 5mg 多肽粉末中, 彻底溶解后, 加入 900ul 双蒸水, 制成 5mg/ml 储
酸性预洗液:	0.15M PBS buffer, pH5.0
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 ·12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·2H 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)
1xPBS (清洗液/储存液)	1xPBS, pH7.5
2x 上样缓冲液	125mM Tris HCl, pH6.8, with 4% SDS, 20%glycerol and 0.004% bromphenol blue

附件 2. 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 1xPBS 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 0.5-1x10⁷ 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 $^{\circ}$ C 离心 10min。取上清，-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。