

Anti-FLAG (DYKDDDDK) 亲和凝胶

Catalog Number: EA-IP-001

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

性能指标

	Flag 标签融合蛋白的亲和纯化及免疫（共）沉淀。
应用范围	Flag 标签可以位于蛋白的 N 端，C 端或中间，如 N 端 Flag 融合蛋白（Flag-Protein）、C 端 Flag 融合蛋白（Protein-Flag）和 Met 修饰的 N 端 Flag 融合蛋白（Met-Flag-Protein）。 仅适用于分泌蛋白的纯化。
抗体属性	小鼠单克隆抗体，IgG2a 亚型。
凝胶属性	琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100~200 μm。
凝胶载量	1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联 8mg Anti-Flag 小鼠单克隆抗体。 1mL 亲和凝胶可纯化或沉淀至少 1.2mg Flag 融合蛋白。
使用强度	可反复使用 5 次以上。
主要成分	1mL Anti-Flag 亲和凝胶，保存于 1mL 含防腐剂和 50% 甘油的 PBS 中。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品以凝胶悬液形式提供亲和凝胶，凝胶悬液中亲和凝胶的含量为50%，使用前先温和重悬凝胶悬液，然后按照需求取用。
4. 配套使用的相关试剂，需实验室自备。

使用方法

1. 目标蛋白样品制备

1) 血清及分泌表达目标蛋白样品处理

收集血清或培养基上清，检测目标蛋白浓度。如果目标蛋白质浓度较高，建议用1×PBS 稀释至蛋白质终浓度为10~100μg/mL，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 将悬浮细胞或贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心5min，弃上清。
- b. 用预冷至4℃的1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心3min，弃上清。重复1次。
- c. 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，反复吹打后冰上放置10~20min。

注：一般1mL 细胞裂解液可以处理约 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

- d. 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置30min 之后，12000rpm，4℃离心10min。取上清，可立即进行下一步实验或置于-80℃冻存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

2. 对照组设置（仅供参考，实验过程中请按实际需要调整）

1) 阴性对照

- a. 抗体的阴性对照：以凝胶偶联 Mouse IgG 亚型标签抗体为例，选择 Mouse IgG 亲和凝胶（货号：IP100）做为抗体的阴性对照，使用方法与凝胶偶联抗体相同。
- b. 蛋白的阴性对照：使用不表达靶蛋白 X 但表达无关蛋白 Y 的蛋白样品做对照，处理方法与待对照靶蛋白相同。

2) 阳性对照

- a. 以稀释至10~100μg/mL 未添加磁珠凝胶偶联抗体处理的蛋白样品作为阳性对照，即 Input 组。上样缓冲液制备方法与实验组相同。

3. 应用一 免疫（共）沉淀法检测 Flag 标签蛋白质

- a. 温和重悬 Anti-Flag 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取40μL 凝胶悬液（约含20μL 亲和凝胶）至离心管中。加入10

For Research Use Only

倍凝胶体积（约200μL）的1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心30sec，弃上清，重复此步骤3次。

- b. 加入50-200μL 含有目标蛋白的样本溶液，室温摇床孵育2h 或者4℃孵育过夜。
- c. 加入 10 倍凝胶体积（约200μL）的1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心30sec，弃上清，重复此步骤3次。
- d. 加入预冷至4℃的5 倍凝胶体积（约 100μL）的PBST 预洗液洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。5000rpm 离心30sec，弃上清。
- e. 加入 20μL 1×PBS 和5μL 5×上样缓冲液，煮沸5min，冷却至室温并离心。f. 取上清进行SDS-PAGE 实验，以备后续的Western Blotting 检测。

4. 应用二 亲和纯化Flag 标签蛋白质

1) 凝胶预处理与样品孵育

- a. 温和重悬Anti-Flag 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取40μL 凝胶悬液（约含20μL 亲和凝胶）至离心管中。加入 10 倍凝胶体积（约 100μL）的1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心30sec，弃上清，重复此步骤3次。
- b. 加入50-200μL 含有目标蛋白的样本溶液，室温摇床孵育2h 或者4℃孵育过夜。
注：如需处理较大体积的样本溶液，推荐使用柱纯化(货号：KAP0064)
- c. 加入 10 倍凝胶体积（约200μL）的1×PBS，用上述离心法清洗凝胶3次；
- d. 加入预冷至4℃的 5 倍凝胶体积（约 100μL）的酸性预洗液洗涤凝胶，除去非特异性结合蛋白。5000rpm 离心30sec，弃上清。
- e. 根据蛋白质性质以及后续实验要求，可以选择竞争洗脱或酸性洗脱。

2) 竞争性洗脱

竞争性洗脱方式，洗脱效率高，特异性强，不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- a. 将2 倍凝胶体积（约40μL），浓度为 100μg/mL 的3×Flag 多肽（货号：Q7007）溶液加入上述沉淀，悬浮亲和凝胶，4℃摇床孵育2h。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。

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

- b. 孵育结束后，4℃条件下，5000rpm 离心30sec，转移上清到新的离心管中。上清即为洗脱的Flag 标签蛋白。
- c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

3) 酸性洗脱

酸性洗脱方式，成本低，操作时间短，一般不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- a. 将预冷的 10 倍凝胶体积（约200μL），pH 3.0 的酸性洗脱液加入上述沉淀，悬浮亲和凝胶，室温孵育5min。

注：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，建议不超过 10min。

- b. 孵育结束后，4℃条件下，5000rpm 离心 30sec，转移上清到新的离心管中，并立即加入 1/10 体积的 pH 8.0 的中和液，混匀。上清即为洗脱的Flag 标签蛋白。
- c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

For Research Use Only

4) 凝胶的清洗与再生

亲和凝胶如需重复使用，洗脱后须立即进行清洗与再生。

- a. 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 1×PBS 清洗 1 次。
- b. 再用 3 倍体积含防腐剂和 50%甘油的PBS 清洗 1 次。
- c. 保存于凝胶等体积的含防腐剂和 50%甘油的 PBS 中，-20℃密封存放。

背景信息

Anti-Flag (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，高特异性，性质稳定，可反复使用的特点，可用于Flag 标签融合蛋白的亲和纯化及免疫（共）沉淀。

储存方法

-20℃可保存 12 个月。