

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

FLAG 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白纯化试剂盒

DYKDDDDK-tagged Protein Purification Kit

产品货号: EA-TP-K001

产品规格: 1 T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：techsupport@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

背景信息

Flag-Tag (DYKDDDDK), 常用于真核蛋白质重组表达标记。Flag 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白纯化试剂盒, 主要成分是 Anti-Flag 亲和凝胶 (Anti-DYKDDDDK (Flag) Affinity Gel), 由高品质的 Flag 抗体与 Sepharose 4B 琼脂糖颗粒共价偶联制成, 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 标签融合蛋白的亲亲和纯化。

性能指标

1. 应用范围:

Flag 标签融合蛋白的亲纯化。

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）。

2. 凝胶属性:

琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 50 μ m。

3. 凝胶载量:

1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联 8mg Anti-Flag 单克隆抗体。

1mL 亲和凝胶可纯化至少 1.2mg Flag 融合蛋白。

4. 凝胶强度:

可反复使用 5 次以上。

5. 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。

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存方法
纯化柱 Purification column	C	6mL*1 个	室温，12 个月
Anti-Flag 亲和凝胶 Anti-DYKDDDDK Affinity Agarose	G1	2mL	-20℃，12 个月
细胞裂解液 Lysis buffer	L1	50mL	4℃，12 个月
酸性预洗液 Acid prewashing buffer	E1	25mL	4℃，12 个月
3×Flag peptide	E2	10mg	4℃，12 个月
酸性洗脱液 Acid elution buffer	E3	25mL	4℃，12 个月
中和液 Neutralizing buffer	N1	25mL	4℃，12 个月
PBS Buffer, pH7.4 (10×)	P10	50mL	4℃，12 个月
说明书一份			

注意事项

1. 运输和保存：

本试剂盒在冷藏条件下运输。

收货后，如果暂时不用，请将纯化柱 **C** 取出，室温保存；Anti-Flag 亲和凝胶 **G1** 保存于 -20℃；试剂盒其余组分保存于 4℃。

2. 安全防护：

本试剂盒中的酸性洗脱液对皮肤有刺激性，实验全程请注意佩戴手套等个人防护用具。

3. 试剂使用建议：

10×PBS 需要用去离子水稀释至 1×PBS 使用。

亲和凝胶 **G1**，使用之后需保存在凝胶保存液中，-20℃保存。

4. 凝胶悬液与亲和凝胶：

本试剂盒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。

例如：2mL 凝胶悬液中，含有 1mL 亲和凝胶。

5. 酸性洗脱液选择：

有文献显示，与传统的 Glycine-HCL 洗脱液相比，本试剂盒提供的 pH 3.0 的 Arginine-HCL 做为洗脱液，可以减少蛋白质变性，延长亲和凝胶的使用寿命。您也可以根据实际情况自行选用酸性洗脱液。

试剂配制

1. 竞争性洗脱液

3×Flag peptide E2 为轻质粉末, 开盖前需要离心。多肽本身为酸性化合物, 溶解难度较大, 建议先将 0.2mL 10×PBS 加至 10mg 多肽粉末中, 彻底溶解后, 再加入 1.8mL 去离子水, 制成 5mg/mL 储存液, -20°C 保存。使用时用 1×PBS 稀释至需要的工作浓度。

注: 建议工作浓度为 0.2mg/mL-0.5mg/mL。您也可以根据目标蛋白质的性质, 调整工作浓度, 一般来说, 多肽浓度越高, 洗脱能力越强。

2. 1×PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBS 稀释待用, 例如: 1mL P10 加入 9mL 去离子水, 混匀后即为 1×PBS。现用现配。

3. 凝胶保存液

按照 1:1 的比例用甘油与 1×PBS 混匀待用。现用现配。

注: 建议在凝胶保存液中添加一定浓度的防腐剂, 防止细菌滋生。

使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。以下试剂使用量以 1mL 凝胶体积计算，您也可以根据具体凝胶用量，按比例调整相应试剂用量。

1. 细胞裂解液制备

1) 收集细胞

悬浮细胞和半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。

贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

2) 用预冷至 4°C 的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。

3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液 L1，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，您可以酌情添加蛋白酶抑制剂。

4) 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°C 离心 10min。取上清即为蛋白样本。建议立即进行下一步实验，若时间不允许，置于 -80°C 保存。

5) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。

2. 装柱及孵育

1) 温和重悬 Anti-Flag 亲和凝胶 G1，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 2mL 凝胶悬液至纯化柱 C 中。

2) 待液体流尽后，向凝胶柱中加入 10 倍凝胶体积的 1xPBS，清洗亲和凝胶。

3) 待液体流尽后，加入含有目标蛋白的真核细胞裂解液。用管帽和堵头密封纯化柱，密封过程中，请先将管帽插入纯化柱上端，然后翻

转纯化柱，使得排液口朝上，轻轻敲击管壁，让柱中气泡上浮，推动管帽，使气体排出纯化柱，最后用堵头密封排液口。检查密封好的纯化柱，保证无漏液，4℃摇床过夜孵育。

- 4) 收集细胞裂解液，暂时保存于 4℃，用于可能的再次纯化。
- 5) 待细胞裂解液流尽后，加入 5 倍凝胶体积的 1xPBS，清洗结合了目标蛋白的亲凝胶。此步骤重复 3 次。
- 6) 根据蛋白质性质选择竞争洗脱或酸性洗脱，具体方法可参见[问题与建议](#)部分。
- 7) 如果目标蛋白较多，可用再生后的亲和凝胶再次纯化步骤 4) 中收集的细胞裂解液。多次纯化，可提高目标蛋白的得率。

3. 竞争洗脱

- 1) 用 1xPBS 配制 3xFlag peptide 竞争性洗脱液，终浓度为 0.2mg/mL，也可根据具体情况自行调整工作浓度(见[试剂配制部分](#))。
- 2) 待纯化柱中的 1xPBS 流尽后，加入预冷的 5 倍凝胶体积的酸性预洗液，洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。
- 3) 待纯化柱中的酸性预洗液 **E1** 流尽后，加入 2 倍凝胶体积的 3xFlag peptide 竞争性洗脱液。按照上一节描述的方法，用管帽和堵头密封纯化柱，保证无漏液，轻柔混匀，4℃摇床孵育 2h，收集洗脱液。如有必要，可以再次加入 2 倍凝胶体积的 3xFlag peptide 竞争性洗脱液，重复洗脱一次。

注：为了提高蛋白得率，可延长孵育时间。

- 4) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度，并按照需求处理和保存蛋白质。

4. 酸性洗脱

- 1) 准备至少 10 支 2mL 洗脱液收集管，每管加入 50μL 中和液 **N1**。
- 2) 待纯化柱中的 1xPBS 流尽后，加入预冷的 5 倍凝胶体积的酸性预洗液 **E1**，洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。

- 3) 待纯化柱中的酸性预洗液 **E1** 流尽后，加入 1mL 的酸性洗脱液 **E3** 进行洗脱，用步骤 **1)** 中准备的洗脱液收集管收集洗脱液。重复此步骤 10 次，得到 10 支 1mL 的洗脱液。

注：酸性环境放置太久会缩短亲和凝胶的使用寿命，应尽量缩短亲和凝胶与酸性洗脱液的接触时间，不超过 10min。

- 4) 合并收集到的洗脱液。

注：如果目标蛋白浓度较低，可以通过浓缩收集液提高目标蛋白浓度。

- 5) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度，并按照需求处理和保存蛋白质。

5. 亲和凝胶的清洗与再生

注：洗脱后须立即进行亲和凝胶的清洗与再生。

- 1) 10 倍凝胶体积的 1xPBS 清洗亲和凝胶。
- 2) 3 倍凝胶体积的酸性洗脱液 **E3** 洗涤亲和凝胶。
- 3) 3 倍凝胶体积的 **1×PBS** 洗涤亲和凝胶 3 次。
- 4) 检测流穿液 pH，如为中性，则进行下一步；如仍为酸性，则重复步骤 3)。
- 5) 用 **1×PBS**(含 50%甘油，0.2%叠氮钠)清洗亲和凝胶,留适当体积，混合均匀，保存在-20℃。

问题与建议

1. 如何选择竞争性洗脱和酸性洗脱？

1) 竞争性洗脱

竞争性洗脱，是通过 3xFlag peptide 与蛋白质上的 Flag 标签竞争亲和凝胶上的抗体，使蛋白质与抗体的结合被取代而脱离亲和凝胶，从而被洗脱下来。这种洗脱方式的特点有：

- a) 洗脱条件温和，一般不会造成蛋白质变性；有利于亲和凝胶的保存和反复使用。
- b) 由于亲和吸附达到平衡比较慢，所以往往需要较长的时间。
- c) 较小的洗脱体积。
- d) 特异性强，可以进一步消除非特异性吸附的影响，从而得到较高纯度的目标蛋白。基本上不会 anti-Flag 的抗体被洗脱下来。

2) 酸性洗脱

- a) 成本低廉。
- b) 纯化速度较快。
- c) 酸性 pH 会造成部分蛋白质变性，引起目的蛋白质沉淀，降解或失活。
- d) 有时会有少部分 Anti-Flag 抗体被洗脱，造成非特异性信号。
- e) 反复使用酸性洗脱，会造成抗体脱落，也会破坏亲和凝胶的理化性质，减少亲和凝胶的使用次数。

2. 常见的蛋白质的后续处理方法有哪些？

1) 透析与超滤

透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。超滤法是利用高压或离心，强使水和其他小的溶质分子通过半透膜而蛋白留在超滤管内。两者都可以达到换液的目的。使用时需注意选择正确分子量的透析袋和超滤管。

2) 过滤除菌

可采用微孔滤膜滤器操作，让蛋白质溶液通过 0.22 μ m 的滤膜，即可达到除菌的目的。

3) 蛋白质定量检测

BCA 法检测蛋白浓度；SDS-page 检测蛋白纯度。

4) 蛋白质理化性能检测

蛋白质免疫印迹 (Western Blot, WB) 和免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 检测蛋白的结合活性；质谱法 (Mass Spectrometry, MS) 检测蛋白结构。

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白纯化或者后续 IP 实验结果。
4. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同目标蛋白的性质，对孵育时间，竞争洗脱液的终浓度以及洗脱次数等条件进行优化，选择最合适的实验方案。