

Anti-FLAG (DYKDDDDK) -Sc 亲和凝胶

Cat# : IP0064S

(本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗)

一 . 背景信息

Anti-FLAG (DYKDDDDK) -Sc 亲和凝胶，由高品质的 FLAG **单链抗体**与琼脂糖胶共价偶联制成。由于单链抗体仅含有抗体分子的可变区，做免疫(共)沉淀时，不会有抗体的重链带和轻链带的信号干扰。该产品同时还具有高载量(至少为 1.2mg protein/ml 凝胶)，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)的亲纯化及免疫(共)沉淀。

抗体属性： Anti-FLAG (DYKDDDDK) 单链抗体。

载量： 1ml 亲和凝胶，共价偶联 6mg Anti-FLAG 单链抗体，可纯化或沉淀至少 1.2mg FLAG 融合蛋白。

强度： 可反复使用 5 次以上。

成分： 1ml 共价偶联 Anti-FLAG 单链抗体的琼脂糖颗粒，溶于 2ml PBS 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℃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. 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，蛋白质制备方案见附件 2。

离心机，1.5mL 离心管若干，重力纯化柱（大量纯化需要）
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 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，-20°C可保存 1 年，冷藏条件下运输。
- 2) 勿干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，勿使酸处理凝胶时间超过 10min。
- 3) 以下使用方法中的凝胶用量，均为少量制备的示范用量，具体用量请根据实际情况调整。

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 亲和凝胶至均一，转移 20 μ L 混合液(约含 10 μ L 凝胶)至离心管中，加入 10 倍凝胶体积（约 100 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°C孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶 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) 清洗凝胶，加入 10 倍凝胶 1xPBS，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。
- 5) 加入 2x 上样缓冲液，煮沸 5min，冷却至室温并离心。取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。
- 6) 亲和凝胶的保存：用 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）清洗，再加入与凝胶等体积的 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）至凝胶中，混合均匀，保存在-20°C。

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 40 μ L 混合液(约含 20 μ L 凝胶)至离心管中，加入 10 倍凝胶体积（约 200 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°C孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶 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) 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。
- 5) 将 2 倍凝胶体积，浓度为 200 μ g /mL 3x FLAG 多肽溶液加入上述沉淀，4°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）。离心收集上清液。如有必要，重复本步骤 1-3 次。将几次分离的上清分管收集。合并洗脱液。

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

- 6) 亲和凝胶如需重复使用，需依次用 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，再用适量 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）清洗，最后加入与凝胶等体积的 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）至凝胶中，混合均匀，保存在-20°C。

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 10min。

- 7) 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 40 μ L 混合液(约含 20 μ L 凝胶)至离心管中，加入 10 倍凝胶体积 (约 200 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 倍凝胶体积的 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，收集管中预先放入中和液 10 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。
- 5) 用紫外检测仪测定收集峰，合并收集峰
- 6) 亲和凝胶如需重复使用，需依次用 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，再用适量 1xPBS (含 50%甘油，0.2%叠氮钠) 清洗，最后加入与凝胶等体积的 1xPBS (含 50%甘油，0.2%叠氮钠) 至凝胶中，混合均匀，保存在-20 $^{\circ}$ C。
- 7) 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。

组分	内容物/配方
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 储存液，-20 $^{\circ}$ C 保存。
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)
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。