

FLAG 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白纯化试剂盒

Cat# : KAP0064

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

1. 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 亲和纯化凝胶 (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 (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 标签融合蛋白的亲和纯化。

2. 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。

强度: 可反复使用 5 次以上。

成分: 共价偶联 Anti-Flag 抗体的琼脂糖颗粒, 1ml 溶于 2ml 含 0.2% 叠氮钠和 50% 甘油的 PBS 中。

保存方法: 亲和凝胶在加入了 50% 甘油和 0.2% 叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C 可保存 1 年。其它成分保存方法见下表。

3. 试剂盒组成

产品编号	组分	规格	保存
L1	细胞裂解液	50ml	4°C 一年
/	纯化柱	1 个	室温
G1	Anti-Flag 亲和纯化凝胶	2ml	-20°C 一年
E1	酸性预洗液	25ml	4°C 一年
E2	3×Flag peptide 洗脱液	5mg	干粉 4°C 一年, 溶液 -20°C 一年
E3	酸性洗脱液	25ml	4°C 一年
N1	中和液	25ml	4°C 一年
P10	10xPBS (清洗液/储存液)	50ml	4°C 一年

注意事项（开箱前必读）

- 3.1 本试剂盒冷藏条件下运输，如果暂时不用，请将纯化柱（空柱）取出，室温保存；Anti-Flag 亲和纯化凝胶保存于-20°C；试剂盒各成分保存于 4°C。
- 3.2 **E2**（3×Flag peptide）溶解方法：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°C 保存。使用时用 1xPBS 稀释至需要的工作浓度。使用工作浓度多为 200ug/ml-500ug/ml，有些蛋白质难于洗脱，可将工作浓度调整至 1mg/ml。
- 3.3 **P10**（10xPBS）使用之前需用蒸馏水稀释至 1xPBS 使用。
- 3.4 使用后凝胶柱需保存在含 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，-20°C 保存。
- 3.5 有文献显示，与传统的 Glycine-HCl 洗脱液相比，本试剂盒提供的 pH3.0 的 Arginine-HCl 做为洗脱液，可以减少蛋白质变性，延长抗体亲和凝胶的使用寿命。客户也可以根据实际情况自行选用配制洗脱液。

4. 使用方法（所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。）

4.1 细胞裂解液制备

- 4.1.1 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。
- 4.1.2 预冷的 1xPBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 4.1.3 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液 **L1**，（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。
- 4.1.4 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。

4.2 装柱及孵育

- 4.2.1 温和重悬 Anti-Flag 亲和纯化凝胶 **G1**，至均匀混合，用剪去末端的枪头吸取适量的凝胶至空纯化柱中。
- 4.2.2 10ml 1xPBS（10 倍凝胶体积）清洗 Anti-Flag 亲和凝胶。
- 4.2.3 加入含有目标蛋白的真核细胞裂解液，4°C 摇床孵育过夜。
- 4.2.4 5ml 1xPBS（5 倍凝胶体积）清洗亲和凝胶三次。
- 4.2.5 根据蛋白质性质选择竞争洗脱或酸性洗脱，具体方法可参见第 5 部分问题和建议 5.1。

4.3 竞争洗脱

- 4.3.1 用 1xPBS 配制 3xFlag peptide 洗脱液 **E2**，终浓度为 200μg/ml，也可根据具体情况自行调整工作浓度（见 3.2）。
- 4.3.2 预冷的 5ml 酸性预洗液 **E1**（5 倍凝胶体积）洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。
- 4.3.3 加入 2ml 3xFlag peptide 洗脱液 **E2**（或 2 倍凝胶体积），轻柔混匀，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）。每次收集 1ml。如有必要，再次加入 2ml 3xFlag peptide 洗脱液 **E2**（或 2 倍凝胶体积），重复洗脱一次。
- 4.3.4 合并收集液。

4.3.5 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。

4.4 酸性洗脱

4.4.1 预冷的 5ml 酸性预洗液 **E1** (5 倍凝胶体积) 洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。

4.4.2 预冷的 10ml 酸性洗脱液 **E3** (10 倍凝胶体积) 进行洗脱，每次收集 1ml，收集管中预先放入 50 μ l 中和液 **N1**。注意：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 20min。

4.4.3 用紫外检测仪测定收集峰，合并收集峰。

4.4.4 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。

4.5 亲和凝胶的清洗与再生 (洗脱后须立即进行亲和凝胶的清洗与再生)

4.5.1 10 倍凝胶体积 1xPBS 清洗亲和凝胶。

4.5.2 酸性洗脱液 **E3** 洗涤亲和凝胶，每次三倍凝胶体积。

4.5.3 中和液 **N1** 洗涤亲和凝胶三次，每次三倍凝胶体积。

4.5.4 检测流穿液 pH，如为中性，则进行下一步；如仍为酸性，则重复 4.5.2 和 4.5.3。

4.5.5 用 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 清洗亲和凝胶，再加入与凝胶等体积的 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 保存溶液至凝胶中，混合均匀，保存在 -20 $^{\circ}$ C。

4.6 纯化蛋白质保存

纯化产物加入 0.2%叠氮钠，50%甘油保存在 -80 $^{\circ}$ C，用于后续功能性实验。

5. 问题与建议

5.1 如何选择竞争性洗脱和酸性洗脱？

3xFlag peptide 洗脱液与蛋白质上的 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。这种洗脱的特点有：

5.1.1 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。

5.1.2 由于亲和吸附达到平衡比较慢，所以往往需要较长的时间和较大的洗脱体积。

5.1.3 特异性强，可以进一步消除非特异性吸附的影响，从而得到较高的分辨率。基本上不会有 anti-Flag 的抗体被洗脱下来。

酸性洗脱是通过改变环境 pH，破坏抗原抗体的结合从而使蛋白质脱离亲和凝胶被洗脱下来，这种洗脱方式的特点有：

5.1.4 成本低廉。

5.1.5 纯化速度较快。

5.1.6 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。

5.1.7 有时会有少部分 Anti-Flag 抗体被洗脱，造成非特异性信号。

5.1.8 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，减少亲和凝胶的反复使用次数。

5.2 常见的蛋白质的后续处理方法有哪些？

5.2.1 透析与超滤

透析法是利用半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。

5.2.2 过滤除菌

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

5.2.3 蛋白质定量鉴定浓度。

5.2.4 SDS-PAGE 鉴定纯度。

5.3 如何选择细胞/组织裂解液？

本试剂盒提供的细胞裂解液成分如下：

NaCl	150mM
Tris-HCL(pH7.4)	50 mM
TRITON X-100	1%
EDTA	1mM

使用前可加入 1%PMSF 和 0.5%原钒酸钠, 或其他蛋白酶抑制剂，避免蛋白质降解。

客户可根据目的蛋白的性质和后续用途，自行配制细胞裂解液及选择是否加入蛋白酶抑制剂。

5.4 本试剂盒各试剂成分如下

组分	内容物/配方
Anti-Flag 亲和纯化凝胶 G1	1ml 共价偶联 Anti-Flag 抗体的 Sepharose 4B 琼脂糖颗粒,溶于 2ml PBS 中
细胞裂解液 L1	50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100 (说明见 5.3)
酸性预洗液 E1	0.15M PBS buffer, pH5.0
3×Flag peptide 洗脱液 E2	3×Flag peptide 干粉 (说明见 3.2)
酸性洗脱液 E3	0.15M Arginine-HCl 缓冲液, pH3.0
中和液 N1	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
10xPBS (清洗液/储存液) P10	1.5M PBS buffer, pH7.5, with 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)