

Anti-FLAG (DYKDDDDK) Protein Purification Kit

Cat No: B10K2029

DESCRIPTION

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。

PRODUCT INFORMATION

组分编号	组分	规格	保存
1	细胞裂解液	50ml	4℃ 一年
2	纯化柱	1 个	室温
3	Anti-Flag 亲和纯化凝胶	2ml	-20℃ 一年
4	酸性预洗液	25ml	4℃ 一年
5	3×Flag peptide 洗脱液	5mg	干粉 4℃ 一年， 溶液-20℃ 一年
6	酸性洗脱液	25ml	4℃ 一年
7	中和液	25ml	4℃ 一年
8	10xPBS (清洗液 /储存液)	50ml	4℃ 一年

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。

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 400-669-8850 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

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℃可保存 1 年。其它成分保存方法见上表。

OPERATING PROCEDURES

注意: 所有步骤尽可能在冰上进行, 以避免目标蛋白质降解。

1 细胞裂解液制备

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。

1.2 预冷的 1xPBS 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复一次。

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。

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℃离心 10min。取上清, -80℃冷冻保存。

2 装柱及孵育

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。

2.2 10ml 1xPBS (10 倍凝胶体积) 清洗 Anti-Flag 亲和凝胶。

2.3 加入含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 4℃摇床孵育过夜。

2.4 5ml 1xPBS (5 倍凝胶体积) 清洗亲和凝胶三次。

2.5 根据蛋白质性质选择竞争洗脱或酸性洗脱。

3 竞争洗脱

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 400-669-8850 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

3.1 用 1xPBS 配制 3xFlag peptide 洗脱液 E2，终浓度为 200 μ g/ml，也可根据具体情况自行调整工作浓度。

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。

3.3 加入 2ml 3xFlag peptide 洗脱液 E2（或 2 倍凝胶体积），轻柔混匀，4 $^{\circ}$ 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。

3.4 合并收集液。

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 酸性洗脱

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。

4.2 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命，应尽量缩短亲和凝与酸性洗脱液的接触时间，不超过 20min。

4.3 用紫外检测仪测定收集峰，合并收集峰。

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。

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）

5.1 10 倍凝胶体积 1xPBS 清洗亲和凝胶

5.2 酸性洗脱液 E3 洗涤亲和凝胶，每次三倍凝胶体积

5.3 中和液 N1 洗涤亲和凝胶三次，每次三倍凝胶体积。

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 5.2 和 5.3。

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。

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。

NOTE

- 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 。
- 2 E2（ $3\times\text{Flag peptide}$ ）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 $10\times\text{PBS}$ 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 $1\times\text{PBS}$ 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 P10（ $10\times\text{PBS}$ ）使用之前需用蒸馏水稀释至 $1\times\text{PBS}$ 使用。
- 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。
- 5 有文献显示，与传统的 Glycine-HCl 洗脱液相比，本试剂盒提供的 $\text{pH}3.0$ 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。

Contact Us

Beijing Biotyscience Co. Ltd.

QQ: 499854788

3494243873

WeChat: 13681256816; 15511114213

Email: info@biotyscience.com

Tel: 400-669-8850

15511114213; 13681256816