

Flag 标签亲和层析介质

Anti-flag Affinity Beads

货号	规格
BDTL0045-1	1ml
BDTL0045-5	5ml

1. 产品介绍

Flag 标签是一个由八个亲水氨基酸组成的多肽片段，定位在融合蛋白表面，因此更易与抗体结合以及被肠激酶分解。Anti-flag Affinity Beads 是以抗 flag(DYKDDDDK)抗体为亲和配体，一步纯化原核、酵母或哺乳动物细胞表达的 flag 标签融合蛋白。Anti-flag Affinity Beads 以 4%琼脂糖凝胶为基质，杂蛋白非特异性结合少，可用于 flag 标签融合蛋白的纯化和免疫沉淀 (IP)。

表 1. Anti-flag Affinity Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	Anti-flag 鼠单克隆抗体
载量	>1mg flag 标签蛋白/ml 介质
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	0.02%叠氮化钠, 1XPBS
储存温度	2°C - 8°C

2. 试剂准备

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡和洗杂液: 50mM Tris,0.15M NaCl, pH7.4

洗脱液: 0.1M glycine HCl, pH3.5

竞争性洗脱液: 50mM Tris,0.15M NaCl, 100-500ug flag 多肽/ml , pH7.4

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.0

再生液 1: 0.1M Tris-HCl,0.5M NaCl,pH8.0

再生液 2: 0.1M NaAc,0.5M NaCl,pH4.0

2.2 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡液对样品或细胞培养液稀释, 或者用平衡液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

3. 样品纯化

3.1 柱层析

1. 将 Anti-flag Affinity Beads 装入合适的层析柱, 层析用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下。
2. 将样品加到平衡好的 Anti-flag Affinity Beads 中, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
3. 用 10 倍柱体积的洗杂液进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
4. **A 酸性洗脱:** 使用 5 倍柱体积的洗脱液 0.1M glycine HCl,pH3.5, 收集管中预先加好中和液 15-25 μ l 中和液/ml 洗脱液, 分管收集。注: 酸性洗脱后填料要立即用平衡液平衡, Anti-flag Affinity Beads 在洗脱液中不要超过 20min。
B 竞争性洗脱: 使用 5 倍柱体积的竞争性洗脱液 flag 多肽 100 μ g/ml 洗脱。
5. 使用 3 倍柱体积的洗脱液再生, 然后用平衡液平衡至中性
6. 然后保存在含 0.02%叠氮化钠的 PBS 溶液中, 2-8 度保存。

3.2 静态吸附

1. 填料准备: 取适量的 Anti-flag Affinity Beads 加入层析柱中, 流干保护液。加入 5 倍柱体积的平衡液清洗。
2. 加入样品溶液, 4 度或室温震荡孵育至少 30min(不能磁力搅拌), 确保填料与样品溶液充分混合。
3. 孵育完毕后, 将填料混合液离心 (1000x g 离心 5min) 或过滤收集填料。
4. 将填料装入层析柱中, 用平衡液清洗直至紫外稳定。
5. 用酸性洗脱液或竞争性洗脱液洗脱, 参考 3.1 中 4. 。
6. 填料再生和保存参考 3.1 中 5. 和 6. 。

3.3 免疫共沉淀操作流程

1. 填料准备: 取 40 μ l 的 Anti-flag Affinity Beads(柱体积 20 μ l)混合液加入到 2ml 离心管中, 5000Xg 离心 30 秒, 吸弃上清。
2. 填料加入 0.5ml 平衡液, 悬浮填料 (使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到

保护蛋白的作用), 5000Xg 离心 30 秒, 吸弃上清。重复一次。

3. 加入 200-1000 μ l 样品裂解液到处理好的填料中, 混合均匀, 在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管, 促使样品和填料充分接触并吸附, 室温至少 1 小时。5000Xg 离心 30 秒, 吸弃上清。

4. 洗杂: 加入 0.5ml 的洗杂液, 悬浮填料, 进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 5000Xg 离心 30 秒。再重复三次。确保去除非特异性吸附。

5. 变性洗脱: 每管中加入 20 μ l 2X 电泳样品缓冲液, 煮 3-5min。5000Xg 离心 30 秒, 吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测。

注: 样品缓冲液中含有 β -巯基乙醇和 DTT, 可以使填料中抗体重链和轻链断开 (55 和 25KD)。含有 SDS 的样品缓冲液可以使 Anti-Flag 抗体变性, 洗脱后的 Anti-flag Affinity Beads 没办法重复使用。

4. 试剂兼容性

表 2、Anti-flag Affinity Beads 试剂兼容性

试剂名称	最大耐受浓度	备注
β -巯基乙醇	10mM	纯化过程中应避免使用, 如果在 IP 中使用, 填料不能回收重复利用
DTT	80mM	
SDS	--	
EDTA	5mM	过高的 EDTA 会降低蛋白回收率
Tween-20	5%	过高浓度会影响标签蛋白结合效率
Triton X-100	5%	
NP-40	4%	
盐酸胍	0.3M	过高浓度会使抗体变性
尿素	1.5M	
甘油	20%	过高浓度会影响标签蛋白结合
氯化钠	1M	减少非特异性吸附

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
流穿中有目的蛋白	填料过载	减少上样体积或增加填料体积
	结合时间太短	延长样品和填料的结合时间
	标签未暴露	可以加入低浓度的变性剂, 上样前透析
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行透析

洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品 低温操作 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂
	样品中无标签融合蛋白	纯化前 Western 检测是否有 flag 标签融合蛋白
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量 增加上样量 减少 NaCl 浓度
洗脱组分中没有目的蛋白	非特异性吸附	减少上样量
	洗杂不充分	增加洗杂次数，每次清洗孵育 5-10min。 增加洗杂液中盐离子浓度。