

# Anti-DYKDDDDK Affinity Gel

## 产品包装:

产品编号	产品名称	产品形式	包装规格 (V/V, 1/2)
HAK21024-500 ul	Anti-DYKDDDDK Affinity Gel	50% 凝胶悬液	500 uL
HAK21024-2 mL	Anti-DYKDDDDK Affinity Gel	50% 凝胶悬液	2 mL
HAK21024-10 mL	Anti-DYKDDDDK Affinity Gel	50% 凝胶悬液	10 mL

## 产品描述:

Anti-DYKDDDDK 亲和凝胶来源于 Anti-DYKDDDDK[A2-A4]重组鼠单克隆抗体, 与直径为 45-165 $\mu$ m 的琼脂糖凝胶共价偶联。[A2-A4]可特异性地结合哺乳动物和细菌提取物中的甲硫氨酸修饰的 N 端 Flag 融合蛋白、C 端 Flag 融合蛋白。

Anti-DYKDDDDK 亲和凝胶可用于常用的免疫沉淀程序检测和捕获 Flag 标记的融合蛋白。可以通过离心或层析柱实现快速高效的分离, 以促进实验过程。

## 产品性能:

产品形式: Anti-DYKDDDDK 亲和凝胶保存在 PBS, pH7.4 添加防腐剂的缓冲液中, 以 50%的悬浮液形式提供。包装体积为总体积, 每毫升本产品中共含有 0.5ml 纯凝胶(沉淀物)。

结合能力: 每 1ml 纯凝胶可结合 0.8mg 融合蛋白, 测试蛋白 C 端融合 Flag 标签, 分子量为 70KDa 的蛋白。

## 保存条件:

Anti-DYKDDDDK 亲和凝胶采用蓝冰运输。建议在 2-8 $^{\circ}$ C 下储存, 可稳定保存 2 年。请勿 -20 $^{\circ}$ C 保存。

## 注意事项和免责声明:

本产品仅限于科学研究使用, 不得用于临床诊断或治疗。

## 使用说明:

### 一、样品制备

1. 建议将蛋白裂解液控制在 pH6-8, NaCl 或 KCl 浓度 $\geq$ 0.15M 可获得较好的实验效果。
2. 蛋白裂解液需要离心 (10000 $\times$ g, 15min) 才能去除干扰蛋白质结合的细胞碎片和微粒。如想获得更好的实验效果, 蛋白裂解液还可通过 0.45  $\mu$ m 或 0.22  $\mu$ m 滤器过滤。

### 二、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)

对于 IP 反应, 建议每个反应 (1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞 或 500 $\mu$ L 裂解液) 使用 20-30 $\mu$ L 的亲凝胶悬浮液。

1. 轻轻重悬凝胶, 取出适当的体积到合适的离心管中。6000 $\times$ g 离心 30 秒以收集亲和凝胶, 弃上清。
2. 用 10 倍凝胶悬浮液体积的 TBST 清洗亲和凝胶, 6000 $\times$ g 离心 30 秒, 弃上清, 重复该步骤三次。
3. 将 500 $\mu$ L 处理好的细胞裂解液添加到洗涤过的亲和凝胶中。(可根据样品中目的蛋白丰度来调整裂解液的体积)。对于阳性对照, 将 500 $\mu$ L TBST 和 4  $\mu$ L 50 ng/ $\mu$ L Flag 融合蛋白 (~200ng) 添加到洗涤过的亲和凝胶中。对于阴性对照, 仅添加 500 $\mu$ L 的裂解缓冲液, 不含蛋白质。
4. 轻轻摇动(推荐使用旋转混匀仪)所有样品和对照 1 小时。为了提高结合效率, 可将结合步骤延长至 4 $^{\circ}$ C 过夜反应。
5. 将离心管 6000 $\times$ g 离心 30 秒以收集亲和凝胶。用移液器吸头(推荐使用细长的吸头或者 1mL 吸头上套 200 $\mu$ L 吸头来使用)去除上清液(注意防止吸头沾到亲和凝胶)
6. 用 10 倍凝胶悬浮液体积的 TBST 清洗亲和凝胶三次。

### 三、洗脱:

示本产品根据不同的下游应用要求等, 可使用多种洗脱方法, 包括 Flag 多肽、酸性和 SDS-PAGE 上样缓冲液等洗脱液进行洗脱。

1、**酸性洗脱法:** 本方法为非变性的, 比较快速且高效。洗脱后的蛋白保持原有的生物活性, 便于后续分析检测。

每 10uL 原始凝胶悬浮液, 加入 100ul 酸性洗脱液(0.1M 甘氨酸,0.2M 精氨酸, pH2.7), 混匀后置于旋转混合仪上, 室温孵育 5 分钟。孵育完毕后, 将离心管 6000×g 离心 30 秒, 将上清转移到新的离心管中, 并立刻加入 10uL 中和液(1M Tris-HCl, pH9.0), 混匀。为了获得最大的洗脱效率, 可重复上述步骤, 并将相同样品合并。

洗脱并中和的目的蛋白置于 4°C 待用, 或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

注: 1) 酸性洗脱法虽然高效, 但仍可能低于 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

2) 由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响, 如果对洗脱效率的要求比较高, 可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整, 相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整。

2、**SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法:** 本方法为变性法, 得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 检测。每 20μL 原始凝胶悬浮液体积, 加入 20μL 2X SDS-PAGE 上样缓冲液, 95°C 加热 5 分钟。6000×g 在 4°C 或室温离心 30 秒, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 WB 检测。

注: 由于上样缓冲液中 SDS 会破坏 Flag 抗体, 所以洗脱后的凝胶不能重复使用。

3、**3X Flag 竞争洗脱法:** 本方法为非变性的, 洗脱效率高, 且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性, 便于后续分析检测。

3X Flag 多肽洗脱液的配制: 取适量 3X Flag 多肽溶解于 1XTBS+1%Triton+0.1%SDS 中, 使其终浓度为 300μg/mL。

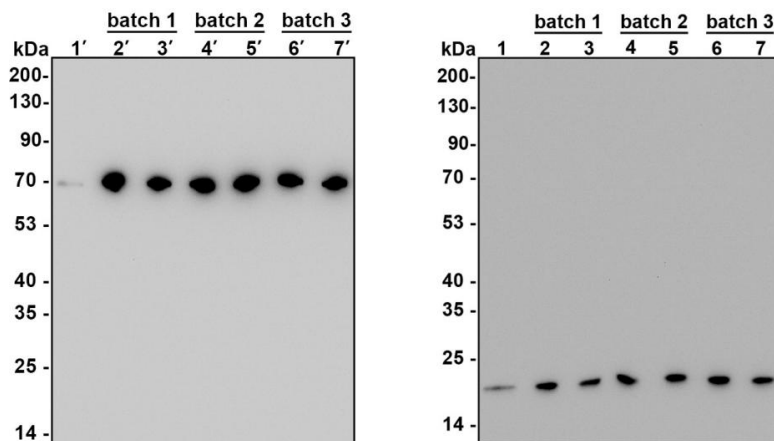
每 10ul 原始凝胶体积, 加入 100ul 3X Flag 多肽洗脱液(300μg/ml), 混匀后置于旋转混合仪上, 室温摇晃孵育 30-60 分钟, 或 4°C 孵育 1-2 小时。为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱。

孵育完毕后, 将离心管 6000×g 离心 30 秒, 将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的 Flag 标签蛋白。

洗脱的 Flag 标签蛋白置于 4°C 待用, 或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

注: 结合的 Flag 融合蛋白作为 SDS-PAGE 样品的洗脱会导致 Anti-DYKDDDDK 凝胶损坏。凝胶不能再次使用, 因为样品缓冲液中的 SDS 会使抗体变性。煮沸还会破坏凝胶结构。

### 四、结果展



### Immunoprecipitation

Anti-DYKDDDDK [A2-A4] Affinity Gel: Purification of Two Different FLAG-tagged fusion protein from HeLa transfected with Flag-fusion protein expression vector. 10ul Anti-FLAG [A2-A4] Affinity Gel was used for IP per lane.

Lane 1' Input: HeLa transfected with fusion protein vector containing an **C-terminal** Flag tag, whole cell lysate

Lane 2', 3' replicates of batch 1; Lane 4', 5' replicates of batch 2; Lane 6', 7' replicates of batch 3.

Lane 1 Input: HeLa transfected with fusion protein vector containing an **N-terminal** Flag tag, whole cell lysate

Lane 2, 3 replicates of batch 1; Lane 4, 5 replicates of batch 2; Lane 6, 7 replicates of batch 3.