



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)

产品编号	产品名称	包装
P2282-0.5ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	0.5ml
P2282-2ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	2ml
P2282-10ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	10ml

产品简介:

- 碧云天生产的Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶), 也称Anti-Flag IP Gel、Anti-Flag免疫沉淀凝胶或Anti-Flag琼脂糖凝胶, 由高质量的单克隆鼠源Flag抗体与琼脂糖共价偶联而成, 可与常规蛋白表达系统(如哺乳动物细胞、细菌或酵母)中含有Flag标签的蛋白结合, 从而用于带有Flag标签的融合蛋白或蛋白复合物的免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或纯化。
- Flag标签(Flag-tag)、Myc标签(Myc-tag)、HA标签(HA-tag)、His标签(His-tag)和GST标签(GST-tag)等是表达载体上最常见的一些标签, 通过与这些标签的融合表达可以非常方便地检测目的蛋白及与目的蛋白相互结合的蛋白, 也可以非常方便地用于目的蛋白的纯化。Flag-tag是8个氨基酸残基(DYKDDDDK)组成的多肽, 常用的形式有Flag和3X Flag, 通过基因重组技术把Flag-tag的核酸序列与目的基因的5'端或3'端连接, 就可以最终表达形成Flag-tag的目的蛋白。Flag-tag具有以下优点: Flag-tag通常不会与目的蛋白相互作用, 并且大多数情况下不会影响目的蛋白的功能; Flag-tag作为标签蛋白, 后续通过Flag抗体(AF519/AF2852)、Anti-Flag磁珠(P2115)或Anti-Flag亲和凝胶(P2271/P2282)即可对目的基因的表达、定位及功能进行检测或对目的蛋白进行纯化、免疫沉淀或免疫共沉淀等; 融合在N端的Flag标签, 可被肠激酶(Enterokinase, EK)切除(DDDK), 从而得到完美的没有标签的目的蛋白。基于以上优点, Flag标签已被广泛应用于蛋白表达、纯化、鉴定、相互作用和功能等多方面的研究。
- Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶), 也被称为Anti-DYKDDDDK Affinity Gel/Beads/Resin或Anti-DYKDDDDK IP Gel/Beads/Resin, 可特异性地结合Flag标签融合蛋白, 广泛应用于带有Flag标签的融合蛋白或蛋白复合物的免疫沉淀或纯化等实验。
- **本产品有较高的融合蛋白结合量、特异性强:** 每ml纯凝胶(settled gel)含有约8mg Flag抗体, 可结合约1mg融合蛋白, 且特异性强, 非特异的杂蛋白结合少。
- **本产品可结合多种形式的Flag标签蛋白:** 本产品可特异性地结合甲硫氨酸修饰的N端Flag融合蛋白(Met-Flag-Protein)、N端Flag融合蛋白(Flag-Protein)、C端Flag融合蛋白(Protein-Flag)或中间带有Flag的融合蛋白。
- **本产品可选择多种洗脱方法:** 本产品根据蛋白结构的完整性、生物功能及后续应用的要求等, 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。特别是Flag多肽洗脱后不包含抗体的轻链和重链, 可以有效解决免疫沉淀后Western实验中轻链和重链的干扰问题。
- **本产品可重复使用多次, 性价比高:** 在正常情况下, 本产品用于相同蛋白的纯化时可回收使用3-5次。如果用于免疫共沉淀检测蛋白-蛋白的相互作用, 不推荐重复使用。
- 本产品的主要指标如下表:

Cat. No.	P2282	P2271
Product name	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)
Product content	50% settled gel in 50% glycerol with 10 mM phosphate-buffered saline and preservative (pH7.4)	50% settled gel in TBS with preservative (pH7.6)
Matrix	4% agarose	4% cross-linked agarose
Average bead size	~90µm	
Antibody	Mouse monoclonal antibody against Flag-tag	
Isotype	IgG2b	
M.W. of antibody	Approximately 150kDa	
Antibody concentration	Approximately 8mg Flag antibody per ml settled gel	
Binding capacity	Approximately 1mg Flag-tagged protein per ml settled gel	
Elution method	Acid, alkaline, neutral, peptide competitive or SDS-PAGE loading buffer elution. Note: If elute with SDS-PAGE loading buffer, the light (~25kDa) and heavy (~50kDa) chain of antibody will be denatured and release from the gel.	
Reagent	Chaotropic reagents will denature the target Flag-tagged protein. Do not exceed 0.3M GuHCl or 1.5M	

compatibility	Urea.	
Application	Suitable for IP、Co-IP and protein purification.	
Storage	-20°C	4°C

➤ 本产品为50%凝胶悬液，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)。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2282-0.5ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	0.5ml
P2282-2ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	2ml
P2282-10ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	10ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。

注意事项：

- 本产品使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。
- 本产品含有微量的防腐剂，不会影响常规的蛋白或蛋白复合物的纯化和免疫沉淀。但如果后续涉及酶活性测定，使用本产品前宜先用TBS等适当溶液洗涤凝胶3次，以充分消除防腐剂可能产生的干扰。
- 在免疫沉淀或纯化时，建议设计阳性和阴性对照组。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型)、P1048/P1049蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型，质谱兼容, 50X)、P1010/P1011蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X)、P1050/P1051蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X)等，或P1025/P1026蛋白酶抑制剂混合物(细菌抽提用)。
- 高浓度的DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对本产品与标签蛋白的结合可能有一定影响，但Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液(P0013B/C/D)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全适用。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异，以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45μm的滤膜过滤。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的制备。

- a. 选择合适的裂解液，用于制备细胞或组织的裂解液。优先推荐选择碧云天生产的P0013 Western及IP细胞裂解液用于细胞或组织样品的裂解。根据特定的实验目的，如有必要，也可以使用碧云天生产的P0013B RIPA裂解液(强)、P0013C RIPA裂解液(中)或P0013D RIPA裂解液(弱)用于样品的制备。如果使用自行配制的或其它公司生产的裂解液，需要确保裂解液的pH为6-8。
- b. 具体的细胞或组织样品裂解的制备步骤请参考裂解液的使用说明。制备好的裂解液上清宜置于冰上或4°C存放，随后即可用于免疫沉淀或免疫共沉淀、标签蛋白的纯化等操作。新鲜制备好的样品，建议尽量当天完成免疫沉淀等后续操作，但如果样品不能当天使用，可以适当分装后-80°C冻存。

2. Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)的准备。

由于Anti-Flag Affinity Gel储存在含50%甘油的保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。

- a. 轻轻重悬Anti-Flag Affinity Gel，尽量形成均匀的凝胶悬液，按照通常每100μl细胞裂解液中加入20μl混合均匀的凝胶悬液(以下免疫沉淀法中都以20μl凝胶悬液为例)，取适量Anti-Flag Affinity Gel至一洁净离心管中(FTUB015)，加入1X TBS (ST661/ST665)至最终体积为约0.5ml。**注：**使用大孔径吸头(如用剪刀剪去部分吸头)吸取凝胶悬液会比较方便。
- b. 轻轻重悬Anti-Flag Affinity Gel，6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复上述步骤两次。
- c. 按照初始体积的量，用1X TBS (ST661/ST665)重悬Anti-Flag Affinity Gel。

3. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)。

- 1) **加入凝胶与孵育。**按照每100μl蛋白样品加入20μl凝胶悬液的比例加入Anti-Flag Affinity Gel，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，4°C孵育1-2小时。如需提高结合效率，可4°C孵育过夜。
- 2) **离心分离。**孵育完毕后，6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。**注：**可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。
- 3) **洗涤。**加入500μl的1X TBS，轻轻重悬Anti-Flag Affinity Gel，冰浴并置于摇床上5分钟，然后6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复洗涤三次。样品置于冰上用于洗脱。

4. 洗脱：

根据标签蛋白的特点及后续实验要求，可以选择如下3种方法之一进行洗脱。

- 1) **3X Flag竞争洗脱法：**本方法为非变性法，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。

- a. 3X Flag多肽洗脱液的配制：取适量3X Flag多肽(P9801)溶解于1X TBS中，使其终浓度为150μg/ml，或稀释5mg/ml的3X Flag多肽溶液(P9801)至150μg/ml。
- b. 每20μl原始凝胶悬液体积，加入100μl 3X Flag多肽洗脱液(150μg/ml)，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，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。3X Flag多肽洗脱液体积一般为凝胶悬液的5倍。
- c. 孵育完毕后，6000×g在4°C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。
- d. 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。
- 2) **酸性洗脱法**：本方法为非变性法，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。
- a. 溶液的配制：酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH3.0)，中和液(0.5M Tris-HCl, pH7.4, 1.5M NaCl)。
- b. 每20μl原始凝胶悬液体积，加入100μl酸性洗脱液，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育5分钟。酸性洗脱液体积一般为凝胶悬液的5倍。**注**：孵育时间不宜超过15分钟。
- c. 孵育完毕后，6000×g在4°C离心30秒，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入10μl中和液，适当混匀。
- d. 为了获得最大的洗脱效率，可重复步骤b和c，并将相同样品合并。
- e. 洗脱并中和的Flag标签蛋白置于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，但仍可能低于竞争洗脱法或SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法。
- 注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，例如100μl酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH2.8)和15μl中和液(1M Tris-HCl, pH8.5)。
- 3) **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WB检测。
- a. SDS-PAGE上样缓冲液的配制：可以直接使用碧云天生产的P0015B SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(2X)，但含有DTT等还原剂，用该上样缓冲液洗脱得到的样品中含有Flag抗体的轻链和重链。也可以自行参考《分子克隆》等配制不含DTT的2X SDS-PAGE蛋白上样缓冲液。
- b. 每20μl原始凝胶悬液体积，加入20μl 2X SDS-PAGE上样缓冲液，95°C加热5分钟。
- c. 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。

常见问题：

Problem	Possible Causes	Solution
Large amount of tagged protein found in the flow through.	Binding time is not enough.	If using batch method, increase the binding time experimentally; If using column method, use a lower flow rate when loading samples.
	Column is overloaded.	Reduce the amount of the sample added to the gel or increase the amount of gel.
	Tag is not accessible to gel.	Expose the epitope tag by adding low amount of denaturant to the protein extract (dialysis may be needed before applying onto gel), or fuse the tag to the other terminus of the target protein.
	Gel has not been regenerated since last purification.	Perform gel regeneration procedure prior to binding.
	Reagent compatibility problem.	Dialyze the sample against TBS before purification procedure.
	The target protein has been degraded.	1. Prepare fresh lysates. Avoid using frozen lysates. 2. Perform purification at lower temperature, such as 4°C. 3. Use appropriate protease inhibitors in the lysate or increase their concentrations to prevent degradation of the fusion protein.
Very few or no tagged protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	Change elution methods.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the tag by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	1. Reduce the number of washes. 2. Avoid adding high concentrations of NaCl to the mixture. 3. Use solutions that contain less or no detergent
	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation times with the affinity gel (from several hours to overnight).
	Interfering substance is present in sample.	1. Lysates containing high concentrations of DTT, 2-mercaptoethanol, or other reducing agents may destroy antibody function, and must be avoided. 2. Excessive detergent concentrations may interfere with the antibody-antigen interaction. Detergent levels in buffers may be reduced by dilution.
	Detection system is inadequate.	If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity.

		2. Verify that the transfer was adequate by staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.
Multiple protein bands found in the eluate.	The protein is not stable at room temperature.	Purify the target protein at lower temperature, such as 4°C.
	Protein degradation due to proteases activity during purification process.	Add protease inhibitors to cell lysate.
	Non-specific binding.	1. Prepare cell lysate again. 2. Add additional wash steps.
Background is too high.	Proteins bind nonspecifically to the monoclonal antibody, the gel beads, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Mouse IgG-Agarose (P2055+A7028) to remove nonspecific binding proteins. 2. After suspending beads for the final wash, transfer entire sample to a clean microcentrifuge tube before centrifugation.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Increase the salt and/or detergent concentrations in the wash solutions. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins from the lysate during the initial centrifugation of the affinity gel complexes.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2006	Protein A Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2009	Protein G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2012	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2051-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)	2ml
P2051-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)	10ml
P2051-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)	50ml
P2053-2ml	Protein G Agarose (Fast Flow, for IP)	2ml
P2053-10ml	Protein G Agarose (Fast Flow, for IP)	10ml
P2053-50ml	Protein G Agarose (Fast Flow, for IP)	50ml
P2055-2ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)	2ml
P2055-10ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)	10ml
P2055-50ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)	50ml
P2265	Mouse IgG Agarose (小鼠IgG琼脂糖凝胶)	1ml/5ml
P2267	Rabbit IgG Agarose (兔IgG琼脂糖凝胶)	1ml/5ml
P2271-0.5ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	0.5ml
P2271-2ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	2ml
P2271-10ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	10ml
P2282-0.5ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	0.5ml
P2282-2ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	2ml
P2282-10ml	Anti-Flag Affinity Gel (Anti-Flag亲和凝胶)	10ml
P2285-0.5ml	Anti-Myc Affinity Gel (Anti-Myc亲和凝胶)	0.5ml
P2285-2ml	Anti-Myc Affinity Gel (Anti-Myc亲和凝胶)	2ml
P2285-10ml	Anti-Myc Affinity Gel (Anti-Myc亲和凝胶)	10ml
P2287-0.5ml	Anti-HA Affinity Gel (Anti-HA亲和凝胶)	0.5ml
P2287-2ml	Anti-HA Affinity Gel (Anti-HA亲和凝胶)	2ml
P2287-10ml	Anti-HA Affinity Gel (Anti-HA亲和凝胶)	10ml
P2289-0.5ml	Anti-V5 Affinity Gel (Anti-V5亲和凝胶)	0.5ml
P2289-2ml	Anti-V5 Affinity Gel (Anti-V5亲和凝胶)	2ml
P2289-10ml	Anti-V5 Affinity Gel (Anti-V5亲和凝胶)	10ml

Version 2021.07.21