

Anti-Flag Affinity Resin 4FF (QS01016)

目录

I. 说明.....	1
II. 设备和试剂.....	1
III. 使用说明.....	2
IV. 试剂兼容性表.....	5
V. 问题处理.....	5
VI. 相关产品.....	6

一、说明

DYKDDDDK或FLAG标签是一种可以通过重组DNA技术添加到蛋白质中的八肽标签。它可以与目的蛋白的N-末端或C-末端融合,便于检测和纯化。千株松 **Anti-Flag Affinity Resin 4FF (QS01016)** 用于从常用的蛋白表达系统(包括细菌、酵母和哺乳动物细胞)中纯化含DYKDDDDK标签的蛋白。细胞裂解液中含DYKDDDDK标签的蛋白可以特异性地与偶联到填料上的抗DYKDDDDK标签的单克隆抗体结合。通过严格的洗涤步骤消除非特异性结合的杂蛋白,最终以高回收率洗脱目标蛋白。表1列出了Anti-Flag Affinity Resin 4FF的主要特征。

表 1. Anti-DYKDDDDK Affinity Resin 4FF的特征

基质	4% 交联琼脂糖
平均粒径	90 μm
配基	小鼠抗DYKDDDDK标签单克隆抗体,单克隆G1
结合能力	大约1mg DYKDDDDK标签蛋白/1 ml沉淀填料
储存条件和稳定性	在2-8°C下可保存12个月。不要冷冻填料。
填料重复使用	可循环使用至少4次。维护得当,可以重复使用10次,结合力几乎没有损失。
洗脱方法	酸性、碱性、中性、多肽竞争或SDS-PAGE上样缓冲溶液洗脱*
试剂的兼容性	与一定浓度的常用试剂相容

*如果用SDS-PAGE上样缓冲溶液洗脱,G1抗体重链变性并从填料中释放。

二、纯化需要的设备和试剂(本产品不提供)

- 蒸馏水
- 微量移液器
- 微量离心管

- 涡旋混合器
- 加样槽
- 空柱子
- 血清移液管(5 ml, 10 ml)
- 细胞裂解缓冲溶液
- 蛋白酶抑制剂试剂
- 缓冲溶液(表2列出了使用Anti-Flag Affinity Resin所需的缓冲溶液)

表2. 使用Anti-Flag Affinity Resin 4FF所需的缓冲溶液

用途	缓冲溶液	配方
平衡和洗涤	Tris缓冲盐水, TBS	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4
洗脱	碱性洗脱缓冲溶液 pH 12.0	0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 12.0
	碱性洗脱缓冲溶液 pH 10.5	0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 10.5
	酸性洗脱缓冲溶液	0.1 M glycine HCl, pH 3.5
	中性洗脱缓冲溶液	3-4 M NaCl in 去离子水
	竞争洗脱缓冲溶液	100-500 µg DYKDDDDK or FLAG® peptide /ml TBS溶液
	PAGE胶样品缓冲溶液	0.01 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glycerol, 0.016% 溴酚蓝
填料用后再生	再生缓冲溶液 1	0.1 M Tris HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0
	再生缓冲溶液 2	0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH 4.0

三、使用说明

1. 样品制备

为了获得最佳结果, 请遵循以下样品制备建议。

- 1) 根据蛋白特性制备样品, 优化裂解条件, 最大限度地减少干扰目标蛋白结合的因素(见试剂相容性表)。
- 2) 对于DYKDDDDK标签蛋白的结合步骤, 在中性pH下选用适当的盐(NaCl)浓度缓冲溶液溶解样品。
- 3) 样品不应含有不溶性颗粒。在进行上样结合步骤前, 先过滤样品或在4°C下高速离心10-15分钟, 以去除不溶性物质
- 4) 为了防止纯化过程中蛋白质的降解, 可以在细胞裂解过程中冰制样品和/或在样品中加入蛋白酶抑制剂。
- 5) 细胞裂解时, 加入内切酶, 降低因染色体DNA或RNA释放引起的样品粘度。
- 6) 避免频繁的冻融循环。将裂解液/样品分成等份, 并在-80°C下存储。

2. 准备填料

- 1) 将一根空柱子放在一个坚固的支撑物上;用TBS冲洗柱子一次。
- 2) 用轻柔的反转方法彻底重悬填料, 并立即将适量的浆液装入柱子内。为了方便填料浆液转移, 建议使用宽口径吸管头。
- 3) 用3倍柱体积的TBS洗涤平衡填料, 共重复3次。让缓冲溶液通过重力从柱子中流出;不要让填料变干。

3. 结合步骤

Anti-DYKDDDDK Affinity Resin 4FF可以通过柱色谱、批次结合或免疫沉淀(IP)等不同方法纯化DYKDDDDK标签蛋白。如果样品体积在50ml左右,且DYKDDDDK标签蛋白的含量小于4mg,则建议采用2-4ml沉淀填料的柱结合方式。对于更大的样本量,批量结合方式是推荐的快速和高效的纯化方法。对于小体积低蛋白表达的样本,采用免疫共沉淀的方法(见第III.7节DYKDDDDK标记蛋白的免疫共沉淀)

3.1 柱层析法

- 1)将制备好的样品在室温重力流速下加载到柱子上。在柱子的底部安装一个缓冲溶液储存器以便接收大量的液体。多次收集和重新加载样品流穿液以获得最大的结合载量。较低的流速可以促进更好的目标蛋白与填料结合。
- 2)用10-20柱体积的TBS清洗柱子,以减少非特异性结合。
- 3)让色谱柱完全排干,进入洗脱程序。(见第III.4节DYKDDDDK标记蛋白的洗脱)

3.2 批次结合

- 1)将柱子中准备好的填料(如第III.2节所述)与含有目的蛋白的制备样品充分混合重悬。
- 2)将重悬的树脂转移到剩余的样品溶液里。室温下样品与Anti-DYKDDDDK Affinity Resin 4FF旋转孵育至少30分钟。
- 3)孵育后,将样品与填料装入另一个柱子上收集填料。保存样品的流穿液,以供进一步使用。
- 4)用10~20倍体积的TBS清洗填料,以去除任何非特异性的结合杂质。
- 5)让色谱柱完全排干,进入洗脱程序。(见第III.4节DYKDDDDK标记蛋白的洗脱)

备注:

- 1.通过经验可以延长结合时间。孵育可以在4°C下进行过夜,并进行首尾相连的旋转。为防止蛋白质降解,应在样品中加入蛋白酶抑制剂。
- 2.通过SDS-PAGE分析或Western Blot检测,确定DYKDDDDK标签蛋白的结合效率。

4. DYKDDDDK标记蛋白的洗脱

根据蛋白质特性和下游应用推荐五种洗脱方法。所选择的洗脱方法应保持蛋白质结构的完整性和生物学功能,并与下游应用兼容。多种洗脱方法可联合使用,以达到最佳效果。所有方法均可在室温下进行;根据特殊要求,可能需要降低温度。在最后的清洗步骤后,立即将洗脱缓冲溶液装入柱上。关于推荐的洗脱缓冲溶液的配方,请参阅第二节,需要但不提供的设备和试剂。

4.1 用pH 12.0的碱性洗脱缓冲溶液洗脱

用6个柱体积的碱性洗脱缓冲溶液(pH 12.0)洗脱结合的DYKDDDDK标记的蛋白,洗脱液进入包含1/20柱床体积1M HCl的小瓶中以便中和pH值。以1ml沉淀填料为例,用6×1ml洗脱缓冲溶液依次洗脱,分别用6小瓶(含50 μl 1M HCl)收集洗脱液。不要将柱子放在碱性洗脱缓冲溶液中超过15分钟;洗脱后立即重新平衡色谱柱。(参见III.5的一节)

4.2 用pH 10.5的碱性洗脱缓冲溶液洗脱

该缓冲溶液的pH值(10.5)低于碱性洗脱缓冲溶液(pH 12),有助于保持靶蛋白的生物活性。在某些情况下,这一过程可能不能像碱性洗脱缓冲溶液(pH 12.0)那样回收较多的DYKDDDDK标签蛋白。用6倍柱床体积的碱性洗脱缓冲溶液(pH 10.5)将结合的目标蛋白洗脱到包含1/40床体积1M HCl的小瓶中。不要将柱放在碱性洗脱缓冲溶液中超过15分钟;洗脱后立即重新平衡色谱柱。(见第III.5节重新平衡)

4.3 用0.1 M酸洗脱缓冲溶液洗脱

用6个柱床体积的酸性洗脱缓冲溶液(pH 3.5)洗脱结合的目标蛋白, 进入包含1/20床体积1 M Tris的小瓶, pH 9.0。色谱柱在酸性洗脱缓冲溶液中停留时间不要超过15分钟;洗脱后立即重新平衡色谱柱。

4.4 用竞争洗脱缓冲溶液洗脱

与添加的DYKDDDDK或FLAG®肽竞争性结合可以洗脱结合的靶蛋白。竞争性洗脱缓冲溶液中DYKDDDDK或FLAG®肽的浓度在100-500 μ g/ml之间。通过重力流速将2-3柱床体积的竞争性洗脱缓冲溶液装入柱中;在填料上方留有约1倍柱床体积的洗脱缓冲溶液时, 封住柱子底部液体出口, 在室温下孵育30-60分钟;打开色谱柱的末端, 收集洗脱液。

4.5 中性洗脱缓冲溶液洗脱

高浓度的NaCl可以洗脱DYKDDDDK标记蛋白。依次将5x1床体积的3M NaCl缓冲溶液(pH 7.4)加载到柱上, 收集洗脱液。当3M NaCl不能完全洗脱靶蛋白时, NaCl浓度可提高到4M。

5. 重新再平衡

洗脱后, 用TBS缓冲溶液清洗填料, 去除残留的洗脱缓冲溶液, 可能使固定在填料上的G1抗体变性。建议每次用5-10倍柱床体积的TBS缓冲溶液清洗填料3次。在最后一次洗涤后, 让TBS缓冲溶液完全排干, 然后在填料中加入2倍柱床体积的TBS以备下次使用。

6. Anti-DYKDDDDK Affinity Resin 4FF的再生

Anti-DYKDDDDK Affinity Resin可以重复使用多次来纯化相同的蛋白而不需要再生。如果要纯化的目标DYKDDDDK标签蛋白不同, 则必须使用以下方案再生填料:

6.1 用0.1 M Tris HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0的2倍柱床体积洗涤填料。

6.2 用0.1 M醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH 4.0的2倍柱床体积洗涤填料。

6.3 用3-5倍柱床体积的TBS重新平衡填料。

6.4 为了长期储存, 填料应储存在含有0.02%叠氮化钠的TBS中, 温度为2-8 $^{\circ}$ C。

7. DYKDDDDK标签蛋白的免疫沉淀

对于从少量起始样品(例如1-2毫升细胞裂解液)中纯化的目的蛋白, 可以应用免疫沉淀程序。

7.1 重悬填料形成均匀的浆液, 将40-100 μ l浆液转移到1.5 ml小瓶中。

备注: 建议使用大口径吸液头转移填料浆液。

7.2 在小瓶中加入500 μ l TBS, 轻轻混合填料。6000 \times g离心30秒, 小心吸走上清液, 重复这个步骤两次。每次清洗后, 小心地尽可能多地吸走上清液, 而不要干扰沉淀的填料。

7.3 向洗涤后的填料中加入样品。如样品体积小于1ml, 加入裂解缓冲溶液或TBS使样品总体积为1ml。

7.4 在室温条件下, 用管式旋转器首尾相连旋转混合至少1小时。

备注: 为了达到最佳的洗脱效果, 可延长孵育时间, 也可降低孵育温度。

7.5 离心6,000 \times g 30秒。仔细清除上清液, 加入TBS清洗填料三次。在不干扰填料的情况下尽可能多地清除上清液, 进入洗脱程序。

7.6 极端pH条件或DYKDDDD八肽可以洗脱DYKDDDDK标签蛋白。与目的蛋白结合的填料也可以直接用于SDS-PAGE分析。根据目的蛋白的特性及下游应用选择以下两种洗脱方法之一。

1) 用pH 12.0的碱性洗脱缓冲溶液洗脱

将120-300 μ l(3个柱体积)的碱性洗脱缓冲溶液加入到清洗后的填料中, 使用一个宽孔吸液管

头轻轻重悬填料。在室温下孵育5分钟，孵育期间轻轻拍打试管1-2次。培养后，6000×g离心30秒。小心地将上清液转移到一个含有5-15 μl 1m HCl的新瓶中以供进一步使用。

2)用酸洗脱缓冲溶液洗脱

在清洗后的填料中加入120-300 μl(3个柱体积)的酸洗脱缓冲溶液，使用一个宽孔吸液管尖端轻轻重悬填料。在室温下孵育5分钟，孵育期间轻轻拍打试管1-2次。培养后，6000×g离心30秒。小心地将上清液转移到含有5-15 μl 1m Tris, pH为9.0的新瓶中继续使用。

3)用竞争洗脱缓冲溶液洗脱

将120-300 μl(3个柱体积)的100 μg/ml DYKDDDDK八肽洗脱缓冲溶液加入到洗涤后的填料中，使用宽孔吸液管顶端轻轻重悬填料。在室温下孵育5分钟，孵育期间轻轻拍打试管1-2次。培养后，6000×g离心30秒。小心地将上清液转移到一个新的小瓶中以便进一步使用。

4)中性洗脱缓冲溶液洗脱

向洗涤后的填料中加入120-300 μl(3柱体积)3M NaCl, pH 7.4，使用一个宽孔吸液器尖端轻轻重悬填料。在室温下孵育5分钟，孵育期间轻轻拍打试管1-2次。培养后，6000×g离心30秒。小心地将上清液转移到一个新的小瓶中以便进一步使用。

5) PAGE凝胶样品缓冲溶液洗脱

为了尽量减少填料固定化的G1抗体的变性和洗脱，样品缓冲溶液中不应包含还原试剂(β-巯基乙醇或DTT)。还原试剂将分解G1抗体的重链和轻链。如果还原条件绝对必要，可以加入还原剂。试剂相容性见表3。

在洗涤后的填料中加入40-100 μl(1柱体积)的PAGE凝胶样品缓冲溶液，混匀。煮沸3分钟，8000 × g离心30秒。小心地将上清液倒入一个新的小瓶中。

四、试剂相容性表

所列试剂的耐受浓度是通过在指示浓度下添加所列试剂来检测的。

试剂	最大耐受浓度	注释
EDTA	5 mM	螯合剂浓度越高，纯化效率越低，目标蛋白回收率越低。
β-ME	100 mM	还原剂将减少填料上G1抗体中的二硫键。在纯化过程中避免使用还原剂或保持低浓度(<10mM)。当还原剂达到此处提到的最大耐受浓度时，SDS-PAGE分析中将出现抗体重链条带(~50 kDa)。如果样品中含有高浓度的还原试剂，则填料不能重复使用。
DTT	80 mM	
Tween 20	5%	洗涤剂的浓度不得超过5%。
Triton X-100	5%	
SDS	不建议使用	这种清洁剂会使填料上的G1抗体变性。
NP-40	4%	浓度越高，纯化效率越低，目标蛋白回收率越低。
GuHCl	0.3 M	Chaotropic 试剂将使DYKDDDDK-标记的靶蛋白变性。不超过0.3 M盐酸或1.5 M尿素。
Urea	1.5 M	
Glycerol	20%	高浓度会干扰DYKDDDDK标记蛋白的结合。
NaCl	0.5 M	浓度越高，纯化效率越低，目标蛋白回收率越低。

五、问题处理

问题	可能原因	解决方法
----	------	------

在流穿液中发现大量DYKDDDDK-标签蛋白	结合时间不足	如果采用批次处理的方法，可通过实验增加结合时间；如果采用柱层析法，则在上样时使用较低的流速。
	柱子过载	减少样品加入填料的量或增加填料的量。
	DYKDDDDK-tag 内包接触不到填料	在蛋白提取液中加入少量变性剂暴露抗原表位标签(在与填料结合前可能需要透析)，或将DYKDDDDK标签融合到靶蛋白的另一端。
	自上次纯化后，填料没有再生。	在上样结合前进行填料再生。
洗脱液中DYKDDDDK-标签蛋白极少或不存在。	试剂的兼容性问题	纯化前对样品进行TBS透析。
	目标蛋白已被降解。	1. 使用刚准备好的样品 2. 在较低温度下进行净化，如4°C 3. 包括蛋白酶抑制剂的样品在细胞裂解和结合步骤。
	蛋白质没有被完全洗脱	根据第三章第四节的说明改变洗脱方法。
	无靶蛋白表达	在纯化前，用 Western blot 方法确认DYKDDDDK-标记的靶蛋白在细胞裂解液中存在。
	蛋白表达水平极低	1.使用更大体积的细胞裂解液。 2.优化表达条件，提高蛋白表达水平。
洗脱液中发现多条蛋白条带。	这种蛋白质在室温下不稳定。	在低温条件下纯化目标蛋白，例如在4 °C条件下
	在纯化过程中，由于蛋白酶活性引起的蛋白质降解	添加蛋白酶抑制剂到细胞裂解液中
	非特异性结合	1.再次制备细胞裂解液。 2.增加额外的洗涤步骤。

六、相关产品

产品名称	货号
Anti-Flag Affinity Resin 4FF	QS01016
Anti-GFP Affinity Resin 4FF	QS01017
Anti-HA Affinity Resin 4FF	QS01018
Anti-His Affinity Resin 4FF	QS01019
Anti-MyC Affinity Resin 4FF	QS01020
Anti-Calnexin Affinity Resin 4FF	QS01021
Anti-CD9 Affinity Resin 4FF	QS01022
Anti-CD63 Affinity Resin 4FF	QS01023
Anti-CD81 Affinity Resin 4FF	QS01024
Anti-Hsp70 Affinity Resin 4FF	QS01025
Anti-TSG101 Affinity Resin 4FF	QS01026
3*Flag-Tag	QS02096