

Anti-Flag 免疫凝胶

Anti-Flag Affinity Gel

本产品 4°C 运输; 保存于 4°C, 禁止产品冻结, 长期存放请保证试剂管竖立向上, 保质期 24 个月。

货号规格

YJ108 1 mL

产品简介

Anti-Flag 免疫凝胶是由高质量的鼠源 IgG 单克隆抗体与琼脂糖凝胶 4B 通过共价偶联制备而成, 主要用于带有 Flag 标签的融合蛋白免疫沉淀 (IP) 和纯化。

产品参数

项目	参数
抗体亚型	鼠源 IgG 单克隆抗体
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
粒径	90 μm
结合能力	每毫升凝胶可结合的 Flag 标签蛋白大于 1 mg
凝胶浓度	50% (贮存液为 1×TBS, 含有 0.02% NaN ₃)

操作步骤

◆ 凝胶预处理

1. 用移液器轻柔吹打 **Anti-Flag 免疫凝胶**, 使其充分混悬, 迅速吸取 10 μL 混合液置于新的离心管中;
2. 加入 500 μL 1×TBS 缓冲液 (货号: PS121), 用移液器轻柔吹打重悬 **Anti-Flag 免疫凝胶**, 5,000 rpm 离心 30 s, 吸弃上清;
3. 重复步骤 2 两次;

◆ 蛋白与凝胶的结合

4. 在预处理后的凝胶中加入 500 μL 细胞裂解液, 置于翻转混合仪上孵育 (常温 2 h, 4°C 过夜);
5. 将上述混合液 5,000 rpm 离心 30 s, 然后把上清液转移到新的离心管中备用 (上清液可用于检测 Flag 标签蛋白是否存在残留), 原离心管中剩余的即为 **蛋白-凝胶复合物**;

◆ 漂洗

6. 向步骤 5 所得的 **蛋白-凝胶复合物** 中加入 500 μL 1×TBST 缓冲液 (货号: PS103), 用移液器轻柔吹打, 重新分散凝胶, 然后上下翻转使其彻底重悬。5000 rpm 离心 30 s, 吸弃上清;
7. 重复步骤 6 大约三次, 直至漂洗后的上清液 OD280 小于 0.05 为止;

注意: 如上清液的 OD280 仍大于 0.05, 则可适当增加漂洗次数, 延长漂洗时间或提高漂洗液中去垢剂的含量。

◆ 蛋白洗脱

根据下游不同的应用选择相应的洗脱方法: 免疫沉淀可直接进行步骤 8 和 9; 蛋白纯化则可根据后续实验, 选择多肽竞争性洗脱 (步骤 10 和 11) 或低 pH 洗脱 (步骤 12 和 13)。

● 变性洗脱 (适用于免疫沉淀)

8. 如需直接检测目的蛋白, 则在步骤 7 漂洗过的 **蛋白-凝胶复合物** 中加入 50 μL 1×蛋白上样

缓冲液(货号: LT101), 煮沸 5 min;

9. 取上清进行 SDS-PAGE 检测;

● Poly Flag 多肽竞争性洗脱(适用于蛋白纯化)

10. 将 5 倍凝胶体积的 1×TBS (含有 200~1000 μg/mL Poly Flag 多肽)加入步骤 7 的产物中, 置于翻转混合仪上孵育(4°C 2h), 为提高洗脱效率, 可适当延长孵育时间;

11. 将步骤 10 得到的产物进行离心(5000 rpm, 30 s), 将含有目的蛋白的上清液转移到新的离心管中。凝胶如需重复使用, 需用 0.1 M Glycine-HCl 缓冲液 (pH 3.0) 进行清洗后再回收;

● 低 pH 洗脱(适用于蛋白纯化)

12. 将 5 倍凝胶体积的 0.1 M Glycine-HCl 缓冲液 (pH 3.0) 加入步骤 7 的产物中, 置于翻转混合仪上孵育洗脱 5 min, 洗脱时间不得超过 20 min;

13. 将步骤 12 得到的产物进行离心(5000 rpm, 30 s), 将洗脱产物立即加入 1 M Tris (pH 8.0) 进行中和, 调节 pH 直至中性。

注意事项

1. Anti-Flag 免疫凝胶应保存在储存溶液中, 防止干燥;
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
3. 本产品仅限科研使用。