

Anti-DYKDDDDK(Flag) G1 Affinity Resin {Anti-Flag 亲和纯化凝胶}

货号: BR00070

规格: 1mL/5mL

◆ 产品简介

DYKDDDDK 标签是一种八肽标签, 可通过重组 DNA 技术与目标蛋白连接, 既能融合在目标蛋白的 N 端, 也能融合在 C 端, 从而便于目标蛋白的检测与纯化。Anti-Flag 亲和纯化凝胶专为纯化带 DYKDDDDK 标签的蛋白设计, 适用于细菌、酵母、哺乳动物细胞等常用蛋白表达系统。细胞裂解液中带 DYKDDDDK 标签的蛋白可与树脂偶联的 Anti-DYKDDDDK 单克隆抗体特异性结合; 通过严格的洗涤步骤去除非特异性结合物后, 最终能以高回收率洗脱目标蛋白。

◆ 性能参数

产品组成 (Product content)	50% 沉降树脂悬浮于含 0.02% 叠氮钠的 Tris 缓冲盐水 (TBS) 中
基质 (Matrix)	4% 交联琼脂糖
平均粒径 (Average bead size)	90 μm
配体 (Ligand)	抗 DYKDDDDK 标签的小鼠单克隆抗体, clone G1
结合容量 (Binding capacity)	每毫升沉降树脂可结合约 1mg 带 DYKDDDDK 标签的蛋白
储存与稳定性 (Storage and stability)	自生产之日起, 在 2°C~8°C 条件下储存, 保质期 1 年; 请勿在 0°C 及以下储存, 以免树脂冻结
树脂复用 (Resin reuse)	至少可重复使用 4 次; 若维护得当, 可重复使用 10 次, 且结合能力损失极小
洗脱方法 (Elution method)	酸性洗脱、碱性洗脱、中性洗脱、肽竞争洗脱或 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱 *
试剂兼容性 (Reagents compatibility)	与特定浓度的常用试剂兼容

* 注: 若使用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱, G1 抗体的重链会变性并从树脂上脱落。

◆ 常用试剂兼容性

试剂	最大耐受浓度	说明
EDTA	5mM	螯合剂浓度过高会降低纯化效率，导致目标蛋白回收率下降
β- 巯基乙醇 (β-ME)	100mM	还原剂会破坏树脂上 G1 抗体的二硫键；应避免使用还原剂，或控制浓度低于 10mM
二硫苏糖醇 (DTT)	80mM	即使在本表格标注的最大耐受浓度下，SDS-PAGE 分析中仍会出现抗体重链条带（约 50kDa）；若样品中还原剂浓度超过该值，树脂无法复用
Tween 20	5%	去污剂浓度不得超过 5%
Triton X-100	5%	同上（去污剂浓度不得超过 5%）
十二烷基硫酸钠 (SDS)	不建议使用	该去污剂会导致树脂上的 G1 抗体变性
NP-40	4%	浓度过高会降低纯化效率，导致目标蛋白回收率下降
盐酸胍 (GuHCl)	0.3M	变性剂会导致带 DYKDDDDK 标签的目标蛋白变性；盐酸胍浓度不得超过 0.3M，尿素浓度不得超过 1.5M
尿素 (Urea)	1.5M	同上（会导致目标蛋白变性，浓度需严格控制）
甘油 (Glycerol)	20%	浓度过高会干扰带 DYKDDDDK 标签蛋白的结合
氯化钠 (NaCl)	0.5M	浓度过高会降低纯化效率，导致目标蛋白回收率下降

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格	保存条件
BR00070	Anti-DYKDDDDK(Flag) G1 Affinity Resin {Anti-Flag 亲和纯化凝胶}	1mL Resin (Total 2mL)	Store at 2-8°C
		5mL Resin (Total 10mL)	

◆ 保存条件

自生产之日起，在 2°C~8°C 条件下储存，保质期 1 年；请勿在 0°C 及以下储存，以免树脂冻结。

◆ 产品特点

1. 快速、简单（一步纯化）；
2. 使用范围广、操作简单；
3. 多重选择，根据样品体积选择不同方法纯化，都可以实现高效纯化。

◆ 常用试剂

用途 (Purpose)	缓冲液名称 (Buffer)	配方 (Formulation)
平衡与洗涤	Tris 缓冲盐水 (TBS)	50mM Tris-HCl、150mM NaCl, pH 7.4
洗脱	碱性洗脱缓冲液 (pH 12.0)	0.1M Tris、0.5M NaCl, pH 12.0
	碱性洗脱缓冲液 (pH 10.5)	0.1M Tris、0.5M NaCl, pH 10.5
	酸性洗脱缓冲液	0.1M 甘氨酸 - HCl, pH 3.5
	中性洗脱缓冲液	蒸馏水中溶解 3-4M NaCl
	竞争洗脱缓冲液	TBS 中溶解 DYKDDDDK 或 FLAG® 肽, 浓度为 100-500µg/ml
	PAGE 凝胶上样缓冲液	0.01M Tris-HCl (pH 6.8)、10% 甘油、0.016% 溴酚蓝
树脂再生	再生缓冲液 1	0.1M Tris-HCl、0.5M NaCl, pH 8.0
	再生缓冲液 2	0.1M 醋酸钠、0.5M NaCl, pH 4.0

◆ 操作流程

1. 样品制备 (Sample Preparation)

为获得最佳纯化效果, 请按以下建议制备样品:

- 1.1 根据蛋白特性制备样品, 优化裂解条件, 尽量减少干扰蛋白结合的因素 (详见 “常用试剂兼容性”)。
- 1.2 进行带 DYKDDDDK 标签蛋白的结合步骤时, 需在中性 pH 条件下使用适宜浓度的 NaCl。
- 1.3 样品中不得含有不溶性颗粒; 结合步骤前, 需对样品进行过滤, 或在 4°C 下高速离心 10-15 分钟以去除不溶性物质。
- 1.4 为防止纯化过程中蛋白降解, 样品制备需在冰上进行, 或在细胞裂解时向样品中加入蛋白酶抑制剂。
- 1.5 细胞裂解时, 可加入核酸酶以降低染色体 DNA 或 RNA 释放导致的样品黏稠度。
- 1.6 避免样品反复冻融; 可将裂解液 / 样品分装后, 在 -80°C 下储存。

2. 树脂制备 (Resin Preparation)

- 2.1 将空层析柱固定在稳定支架上, 用 TBS 洗涤层析柱 1 次。
- 2.2 轻轻倒置树脂瓶使树脂充分重悬, 立即取适量树脂悬液加入层析柱中; 建议使用大口径移液器吸头, 以便于树脂悬液转移。
- 2.3 用 3 个柱体积的 TBS 洗涤树脂以平衡树脂, 重复该步骤 3 次; 通过重力作用使缓冲液从柱中自然流下, 注意不要让树脂干涸。

3. 结合步骤 (Binding Procedures)

本亲和树脂可通过层析柱法、批次法或免疫沉淀法 (IP) 纯化带 DYKDDDDK 标签的蛋白, 具体选择如下:

- (1) 若样品体积约为 50ml, 且带 DYKDDDDK 标签的蛋白含量低于 4mg, 建议使用 2-4ml 沉降树脂, 采用层析柱结合法。
- (2) 若样品体积较大, 建议采用批次结合法, 以实现快速高效纯化。

(3) 若样品体积小且蛋白表达量低，建议采用免疫沉淀法。

3.1 层析柱法 (Column Chromatography)

3.1.1 在室温下，通过重力流将制备好的样品上样到层析柱中；若样品体积大，可在层析柱底部连接试剂储液槽。收集流出液并多次上样，以实现最大程度的结合；降低流速有助于目标蛋白更好地结合。

3.1.2 用 10-20 个柱体积的 TBS 洗涤层析柱，以减少非特异性结合。

3.1.3 待层析柱完全流干后，进行洗脱步骤。

3.2 批次结合法 (Batch Binding)

3.2.1 将制备好的树脂在层析柱中完全重悬，然后与含目标蛋白的制备样品混合。

3.2.2 将重悬的树脂转移到剩余样品中，在室温下将样品与亲和树脂一起旋转孵育至少 30 分钟。

3.2.3 孵育后，将含树脂的样品转移到另一根层析柱中，收集树脂；保留样品流出液以备后续使用。

3.2.4 用 10-20 个柱体积的 TBS 洗涤树脂，去除非特异性结合物。

3.2.5 待层析柱完全流干后，进行洗脱步骤。

注意事项 (Notes) :

(1) 结合时间可根据实验需求延长；也可在 4°C 下进行端到端旋转孵育过夜，但需向样品中加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白降解。

(2) 结合后需保留流出液，通过 SDS-PAGE 分析或 Western Blot 检测，以判断带 DYKDDDDK 标签蛋白的结合效率。

4. 带 DYKDDDDK 标签蛋白的洗脱 (Elution of DYKDDDDK-tagged Protein)

◆ 根据蛋白特性及下游应用，推荐 5 种洗脱方法。所选洗脱方法需保证蛋白结构完整和生物活性不受破坏，且与下游应用兼容；为获得最佳效果，可将多种洗脱方法组合使用。所有方法均可在室温下进行，若有特殊需求，可适当降低温度。最后一次洗涤后，需立即将洗脱缓冲液上样到层析柱中。推荐洗脱缓冲液的配方见“常用试剂”。

4.1 用 pH 12.0 碱性洗脱缓冲液洗脱

用 6 个柱体积的 pH 12.0 碱性洗脱缓冲液洗脱结合的带 DYKDDDDK 标签蛋白，洗脱液收集到含 1/20 柱体积 1M HCl 的离心管中（用于中和洗脱液）。例如：若树脂为 1ml 沉降体积，需依次用 6 份 1ml 洗脱缓冲液洗脱，洗脱液分别收集到 6 个含 50 μ l 1M HCl 的离心管中。注意：层析柱在碱性洗脱缓冲液中的浸泡时间不得超过 15 分钟；洗脱后需立即平衡层析柱。

4.2 用 pH 10.5 碱性洗脱缓冲液洗脱

该缓冲液 pH (10.5) 低于 pH 12.0 碱性洗脱缓冲液，更有利于保留目标蛋白的生物活性，但在部分情况下，目标蛋白的回收率可能低于 pH 12.0 碱性洗脱缓冲液。用 6 个柱体积的 pH 10.5 碱性洗脱缓冲液洗脱结合的目标蛋白，洗脱液收集到含 1/40 柱体积 1M HCl 的离心管中。注意：层析柱在碱性洗脱缓冲液中的浸泡时间不得超过 15 分钟；洗脱后需立即平衡层析柱。

4.3 用 0.1M 酸性洗脱缓冲液洗脱

用 6 个柱体积的酸性洗脱缓冲液 (pH 3.5) 洗脱结合的目标蛋白, 洗脱液收集到含 1/20 柱体积 1M Tris (pH 9.0) 的离心管中。注意: 层析柱在酸性洗脱缓冲液中的浸泡时间不得超过 15 分钟; 洗脱后需立即平衡层析柱。

4.4 用竞争洗脱缓冲液洗脱

通过加入 DYKDDDDK 或 FLAG® 肽进行竞争结合, 可洗脱结合的目标蛋白。竞争洗脱缓冲液中 DYKDDDDK 或 FLAG® 肽的浓度可在 100-500µg/ml 范围内调整。通过重力流将 2-3 个柱体积的竞争洗脱缓冲液上样到层析柱中; 当树脂上方剩余约 1 个柱体积的洗脱缓冲液时, 封闭层析柱底部, 在室温下孵育 30-60 分钟; 打开层析柱底部, 收集洗脱液。

4.5 用中性洗脱缓冲液洗脱

高浓度 NaCl 可用于洗脱带 DYKDDDDK 标签的蛋白。将 5 份 1 个柱体积的 3M NaCl 缓冲液 (pH 7.4) 依次上样到层析柱中, 收集洗脱液。若 3M NaCl 无法完全洗脱目标蛋白, 可将 NaCl 浓度提高至 4M。

5. 平衡步骤 (Re-equilibration)

洗脱后, 需用 TBS 缓冲液洗涤树脂, 以去除残留的洗脱缓冲液 (残留洗脱缓冲液可能导致树脂上固定的 G1 抗体变性)。建议用 5-10 个柱体积的 TBS 缓冲液洗涤树脂, 重复 3 次。最后一次洗涤后, 待 TBS 缓冲液完全流干, 向树脂中加入 2 个柱体积的 TBS, 以备下次使用。

6. 亲和树脂的再生 (Regeneration of Anti-DYKDDDDK(Flag) G1 Affinity Resin)

若纯化同一种蛋白, 亲和树脂可重复使用多次, 无需再生; 若需纯化不同的带 DYKDDDDK 标签蛋白, 则需按以下步骤再生树脂:

6.1 用 2 个柱体积的 0.1M Tris-HCl (含 0.5M NaCl, pH 8.0) 洗涤树脂。

6.2 用 2 个柱体积的 0.1M 醋酸钠 (含 0.5M NaCl, pH 4.0) 洗涤树脂。

6.3 用 3-5 个柱体积的 TBS 平衡树脂。

6.4 若需长期储存, 需将树脂置于含 0.02% 叠氮钠的 TBS 中, 在 2-8°C 条件下保存。

7. 带 DYKDDDDK 标签蛋白的免疫沉淀 (Immunoprecipitation of DYKDDDDK-tagged Protein)

若需从少量样品 (如 1-2ml 细胞裂解液) 中纯化目标蛋白, 可采用免疫沉淀法, 步骤如下:

7.1 重悬树脂以形成均匀悬液, 取 40-100µl 悬液加入 1.5ml 离心管中。注: 建议使用大口径移液器吸头转移树脂悬液。

7.2 向离心管中加入 500µl TBS, 轻轻混匀树脂; 在 6000×g 条件下离心 30 秒, 小心去除上清液; 重复该步骤 2 次, 每次洗涤后尽量去除上清液, 但不要扰动沉降的树脂。

7.3 向洗涤后的树脂中加入样品; 若样品体积小于 1ml, 需加入裂解缓冲液或 TBS, 使样品总体积达到 1ml。

7.4 将离心管置于旋转仪上, 在室温下进行旋转孵育至少 1 小时。注: 为实现最佳洗脱效果, 可延长孵育时间, 或根据需求降低孵育温度。

7.5 在 6000×g 条件下离心 30 秒, 小心去除上清液, 加入 TBS 洗涤树脂 3 次; 尽量去除上清液 (不扰动树脂), 随后进行洗脱步骤。

7.6 可采用极端 pH 条件或 DYKDDDDK 肽洗脱带 DYKDDDDK 标签的蛋白，也可将结合目标蛋白的树脂直接用于 SDS-PAGE 分析。根据目标蛋白特性及下游应用，选择以下洗脱方法之一：

(1) 用 pH 12.0 碱性洗脱缓冲液洗脱

向洗涤后的树脂中加入 120-300 μ l (3 个柱体积) 的碱性洗脱缓冲液，用大口径移液器吸头轻轻重悬树脂；在室温下孵育 5 分钟，孵育期间轻敲离心管 1-2 次以混匀；孵育后，在 6000 $\times$ g 条件下离心 30 秒，小心将上清液转移到含 5-15 μ l 1M HCl 的新离心管中，以备后续使用。

(2) 用酸性洗脱缓冲液洗脱

向洗涤后的树脂中加入 120-300 μ l (3 个柱体积) 的酸性洗脱缓冲液，用大口径移液器吸头轻轻重悬树脂；在室温下孵育 5 分钟，孵育期间轻敲离心管 1-2 次以混匀；孵育后，在 6000 $\times$ g 条件下离心 30 秒，小心将上清液转移到含 5-15 μ l 1M Tris (pH 9.0) 的新离心管中，以备后续使用。

(3) 用竞争洗脱缓冲液洗脱

向洗涤后的树脂中加入 120-300 μ l (3 个柱体积) 的 100 μ g/ml DYKDDDDK 肽洗脱缓冲液，用大口径移液器吸头轻轻重悬树脂；在室温下孵育 5 分钟，孵育期间轻敲离心管 1-2 次以混匀；孵育后，在 6000 $\times$ g 条件下离心 30 秒，小心将上清液转移到新离心管中，以备后续使用。

(4) 用中性洗脱缓冲液洗脱

向洗涤后的树脂中加入 120-300 μ l (3 个柱体积) 的 3M NaCl (pH 7.4)，用大口径移液器吸头轻轻重悬树脂；在室温下孵育 5 分钟，孵育期间轻敲离心管 1-2 次以混匀；孵育后，在 6000 $\times$ g 条件下离心 30 秒，小心将上清液转移到新离心管中，以备后续使用。

(5) 用 PAGE 凝胶上样缓冲液洗脱

为减少树脂上固定的 G1 抗体变性和脱落，上样缓冲液中不得含有还原剂(如 β -巯基乙醇或 DTT)，还原剂会导致 G1 抗体的重链和轻链解离。若必须使用还原条件，可加入还原剂（详见“常用试剂兼容性”）。向洗涤后的树脂中加入 40-100 μ l (1 个柱体积) 的 PAGE 凝胶上样缓冲液，充分混匀；煮沸 3 分钟后，在 8000 $\times$ g 条件下离心 30 秒，小心将上清液转移到新离心管中。

◆ 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
流出液中检测到大量带 DYKDDDDK 标签的蛋白	结合时间不足	若采用批次法，可通过实验延长结合时间；若采用层析柱法，上样时降低流速
	层析柱过载	减少上样量，或增加树脂用量
	DYKDDDDK 标签无法与树脂接触（标签不可及）	向蛋白提取物中加入少量变性剂以暴露表位标签（上样前可能需透析），或将 DYKDDDDK 标签融合到目标蛋白的另一端
	树脂自上次纯化后未再生	结合前先执行树脂再生步骤
	试剂兼容性问题	纯化前用 TBS 透析样品
洗脱液中几乎无或无带 DYKDDDDK 标签的蛋白	目标蛋白已降解	1. 使用新鲜制备的样品；2. 在较低温度（如 4 $^{\circ}$ C）下进行纯化；3. 细胞裂解和结合步骤中向样品加入蛋白

		酶抑制剂
	蛋白未完全洗脱	按“带 DYKDDDDK 标签蛋白的洗脱” 更换洗脱方法
	目标蛋白未表达	纯化前通过 Western Blot 检测细胞裂解液中是否存在带 DYKDDDDK 标签的目标蛋白
	蛋白表达量极低	1. 使用更大体积的细胞裂解液; 2. 优化表达条件以提高蛋白表达量
洗脱液中出现多条蛋白条带 (非特异性条带)	蛋白在室温下不稳定	在较低温度 (如 4°C) 下纯化目标蛋白
	纯化过程中蛋白酶活性导致蛋白降解	向细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂
	非特异性结合	1. 重新制备细胞裂解液; 2. 增加洗涤步骤

◆ 注意事项

1. 进行操作前请仔细阅读说明书。
2. 为了您的健康和安全, 操作时请穿实验服并佩戴一次性手套。
3. 本产品仅供科研用途, 不用于临床诊断。