

## Flag 抗体亲和凝胶

中文名称： Flag 抗体亲和凝胶

英文名称： Anti-Flag Affinity gel

相关类别： 抗体相关支持试剂

储 存： 冷藏（2-8℃） 不可冻存

### 概述

Flag 抗体亲和凝胶是以小鼠抗 Flag 单克隆抗体和高交联度的琼脂糖凝胶结合而成，杂蛋白非特异性结合少，可用于 Flag 标签融合蛋白的纯化和免疫沉淀。

### 特点

5-165  $\mu\text{m}$  , 1ml 凝胶最少可结合 1mg Flag 标签蛋白

### 应用

纯化，免疫沉淀

### 使用说明

#### 1. 纯化

1.1 填料准备：取适量的凝胶加入层析柱中，流干保存液，加入 5 倍柱体积（凝胶体积）的平衡液清洗。

1.2 加入样品溶液，室温震荡孵育 30 分钟(不能用磁力搅拌器搅拌)，确保填料与样品溶液充分混合。

1.3 孵育完毕后，将填料混合液离心：1000g，5 分钟，或过滤收集填料。

1.4 将填料装入层析柱中，用平衡液清洗 4-5 次，直至紫外检测值稳定。

#### 1.5 洗脱

1.5.1 酸性洗脱：加入 5 倍柱体积的酸性洗脱液，收集管中预先加好中和液 20  $\mu$ l 中和液/ml 洗脱液，分管收集。注意：酸性洗脱后填料要立即用平衡液平衡，Anti-flag Affinity gel 在洗脱液中不要超过 20 分钟。

1.5.2 竞争性洗脱：使用 5 倍柱体积的竞争性洗脱液 flag 多肽 0.5 mg/ml 洗脱，30 $^{\circ}$ C 孵育 10-15 分钟，重复 1-2 次，分管收集。

1.6 使用 3 倍柱体积的酸性洗脱液再生凝胶，然后用平衡液平衡至中性。 1.7 加入保存液，2-8 $^{\circ}$ C 保存。

2. 免疫沉淀 2.1 取 20-100  $\mu$ l 的 Anti-flag Affinity gel 加入到 2ml 离心管中，离心：5000g，30 秒，弃去上清。

2.2 加入 0.5ml 平衡液，悬浮填料，离心：5000g，30 秒，弃去上清。重复一次。

2.3 加入 200-1000  $\mu$ l 样品裂解液，与填料混合均匀，置于旋转混合仪上轻轻旋转离心管，使样品和填料充分接触并吸附，室温 1 小时。混匀后离心：5000g，30 秒，吸取上清，留样检测。

2.4 洗涤：加入 0.5ml 的洗涤液，悬浮填料，进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，离心：5000g，30 秒，弃去上清。重复 3 次。

2.5 变性洗脱：加入 5  $\mu$ l 5X 变性洗脱液，沸水浴煮沸 5 分钟。离心：5000g，30 秒，吸取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

注意：变性洗脱液中含有 SDS，会使偶联的 Flag 抗体变性，洗脱后的凝胶不可重复使用。