

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 μm , 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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。