



Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads

1. 产品介绍

DYKDDDDK或FLAG标签是专门为蛋白的纯化和检测设计的亲水性短肽，有八个氨基酸组成（Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys，简称为DYKDDDDK），分子量大小大约为1kD，也称为DDK标签。标签可定位在融合蛋白表面，便于纯化和检测，因此易与抗体结合，同时也可被胰凝乳蛋白酶切除。OriGene Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads是以抗 Flag(DYKDDDDK)抗体为亲和配体，可用于一步纯化原核、酵母或哺乳动物细胞表达的 Flag标签融合蛋白。

表1.Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	抗DYKDDDDK抗体
结合能力	>1mg 含DYKDDDDK标签的蛋白/ml填料
粒径范围	45~165 um
最大流速	0.1Mpa
储存缓冲液	50%甘油, 1*PBS, 0.02%NaN3
储存温度及稳定性	-20°C稳定保存1年

2. 试剂准备

2.1 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的盐浓度和 pH 值，可以用平衡液对样品进行透析。样品在上样前建议离心或用0.45μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞。

2.2 缓冲液的准备

纯化用水及缓冲液在使用之前建议用0.45μm 滤膜过滤。

常规平衡/洗杂液：50 mM Tris,0.15 M NaCl,pH7.4

酸性洗脱液：0.1 M glycine HCl,pH3.0

中和液：1 M Tris-HCl,pH8.0

竞争性洗脱液：50 mM Tris,0.15 M NaCl,100-500 μg/ml的flag多肽,pH7.4

3. 样品纯化

1) 平衡填料：

将Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads 装入合适的层析柱，层析用5倍柱体积的平衡液进行平衡，使填料处于与样品相同的缓冲液中。

2) 结合：

- 将样品加到平衡好的 Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads 中，收集流出液，可以反复上样增加结合量。
- 将填料加入到样品中，室温孵育30min或4°C孵育1h，可根据实验需要延长孵育时间。

3) 洗杂：

用10倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的蛋白，收集洗杂液。

4) 洗脱:

a.酸性洗脱: 使用5倍柱体积的酸性洗脱液洗脱, 收集管中预先加好中和液, 分管收集。

注 酸性洗脱后, 填料需立即用平衡液平衡, Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads 在洗脱液中不可超过20 min。

b.竞争性洗脱: 使用5倍柱体积的竞争性洗脱液洗脱。分管收集。

c.变性洗脱: 实验室常规蛋白样品中若含有还原剂, 会使填料中抗体重链和轻链断开; 若样品中含有 SDS 会使抗DYKDDDDK抗体变性, 洗脱后的 Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads 没办法再次使用。

5) 再生:

使用3倍柱体积的洗脱液再生, 然后用平衡液平衡至中性。

6) 保存:

填料可短期保存在含0.02% NaN₃的 PBS 溶液中, 2-8°C保存。

4.免疫沉淀操作

1) 填料准备:

取40 μ l的 Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads(柱体积20 μ l)混合液加入到2ml 离心管中, 5000 \times g 离心1 min, 吸弃上清; 填料加入0.5ml 平衡液, 悬浮填料(使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用), 5000 \times g 离心1min, 吸弃上清。重复一次。

2) 结合:

加入200-1000 μ l 样品裂解液到处理好的填料中, 混合均匀, 在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管, 促使样品和填料充分接触并吸附, 室温至少1 h。5000 \times g 离心1 min, 吸弃上清。

3) 洗杂:

加入0.5 ml 的洗杂液, 悬浮填料, 轻轻混匀, 5000 \times g 离心1 min, 吸弃上清。再重复三次。确保去除非特异性吸附。

4) 样品洗脱:

可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

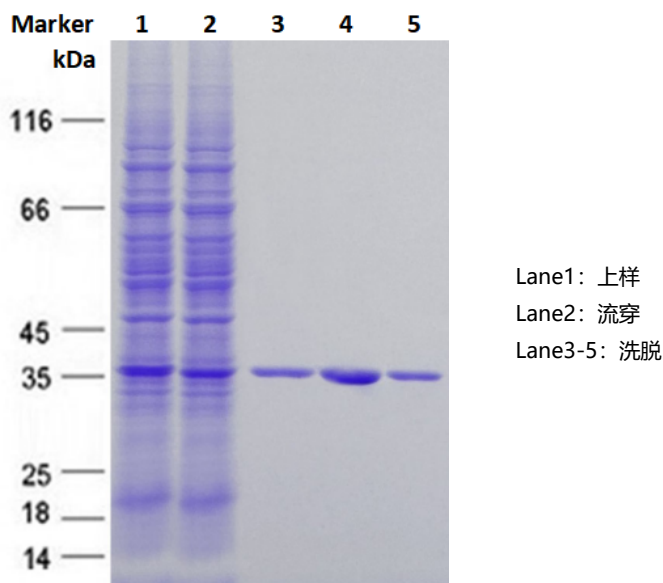
5.试剂兼容性

试剂名称	最大耐受浓度	备注
β -巯基乙醇	10 mM	使用后填料无法重复使用。
DTT	80 mM	
SDS	—	
EDTA	5 mM	浓度过高会降低蛋白回收率。
Tween-20	5%	浓度过高会影响标签蛋白结合效率。
Triton X-100	5%	
NP-40	4%	
盐酸胍	0.3 M	可能使填料上的抗体变性, 不建议重复使用。
尿素	1.5 M	
甘油	20%	过高浓度会影响标签蛋白结合。
氯化钠	1 M	减少非特异性吸附

6.问题及解决方案

	原因分析	推荐解决方案
流穿中有目的蛋白	过载	减少上样体积或增加填料体积。
	结合时间过短	延长样品和填料的结合时间。
	标签未暴露	可以加入低浓度的变性剂。
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行透析。
洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品。 低温操作。 样品中加入蛋白酶抑制剂。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前Western检测是否有flag标签融合蛋白
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。 增加上样量。 降低NaCl浓度。
背景太杂	非特异性吸附	减少上样量
	洗杂不充分	增加洗杂次数，每次清洗填料时孵育5-10min。 增加洗杂液中盐浓度。

7.纯化示例



Anti-DYKDDDDK S1 Affinity Sepharose Beads对于DYKDDDDK标签都有较好的识别效果，纯化的蛋白纯度可达到90%(SDS-PAGE纯)以上。