

Anti-DYKDDDDK 8G6 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-Asp-Lys,简写为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,同时也可被肠激酶切除。OriGene Anti-DYKDDDDK 8G6 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标签融合蛋白或者免疫沉淀实验。

表1.Anti-DYKDDDDK 8G6 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0.45 μm 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

碱性洗脱缓冲溶液 pH 12.0: 0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH12.0 碱性洗脱缓冲溶液 pH 10.5: 0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH10.5

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 8G6 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:

a.将样品加到平衡好的 Anti-DYKDDDDK 8G6 Affinity Sepharose Beads 中,收集流出液,可以反复上样增加结合量。 b.将填料加入到样品中,室温孵育1h或4℃孵育2h,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个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 8G6 Affinity Sepharose Beads 在洗脱液中不可超过 20 min。

b.碱性洗脱:使用5个柱体积的碱性洗脱缓冲溶液(pH 12.0)洗脱,收集管中预先加好1M HCI中和液,分管收集。

c.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。

d.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 8G6 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℃保存。

4.免疫沉淀操作

1) 填料准备:

取 40μ l的 Anti-DYKDDDDK 8G6 Affinity Sepharose Beads(柱体积 20μ 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200-1000µl 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×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×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。

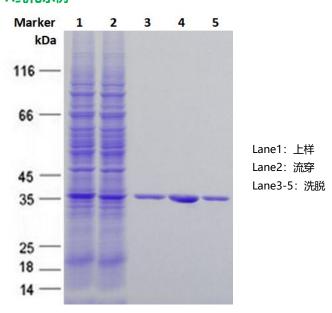
5.试剂兼容性

试剂名称	最大耐受浓度	备注
β-巯基乙醇	10 mM	
DTT	80 mM	使用后填料无法重复使用。
SDS	_	
EDTA	5 mM	浓度过高会降低蛋白回收率。
Tween-20	5%	
Triton X-100	5%	浓度过高会影响标签蛋白结合效率。
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		使用新配制的样品。
	目的蛋白不稳定	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
		优化蛋白表达量。
	目的蛋白表达量太低	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 8G6 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。