# Anti-Flag Affinity Gel

## 产品组分

| 组分 | Cat#: B23101 | Cat#: B23102 |
|---|---|---|
| 纯胶体积 | 1 mL | 5 mL |

## 储存方法

-20℃保存。未开封的产品可稳定保存2年，使用后需保存在储存溶剂（50%甘油，10 mM $Na_3PO_4$， 150 mM NaCl，0.02%叠氮化钠，pH 7.4）中。

## 使用方法

**凝胶预处理**

1、轻微重悬Anti-Flag Affinity Gel使均一，迅速转移10 μL混合液（约5 μL纯胶）至新的离心管中。

2、加入500 μL TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)，轻轻混匀，5,000 rpm离心30 sec，弃上清，重复上述步骤3-4次。

**样本的结合**

3、上述的凝胶中加入50-200 μL细胞裂解液，然后室温孵育2 h或者4 ℃条件下过夜。

4、5,000 rpm离心30 sec，将上清液转移到新的离心管中备用（上清液可用于检测Flag-tag蛋白是否存在残留）。

**洗涤**

5、向上述沉淀中加入500 μL PBST (NaCl 136.89 mM; KCl 2.67 mM; $Na_2HPO_4$ 8.1 mM; $KH_2PO_4$ 1.76 mM; 0.5% Tween 20)， 用移液器轻柔地吹打重新分散凝胶， 然后上下翻转样品5 min。5000 rpm离心30 sec，弃上清。

6、重复上述步骤两次。如遇到非特异性杂蛋白去除不干净的情况，请延长清洗时间、增加清洗次数或适当增加清洗液中去垢剂的含量。

**洗脱**

根据下游用途选择不同的洗脱方法，进行免疫共沉淀可直接进行7-8步；进行蛋白纯化可根据后续实验，选择多肽竞争性洗脱（9-10步）或低pH洗脱（11-12步）

变性洗脱（适用于利用Anti-Flag Affinity Gel进行免疫共沉淀实验）：

7、对于直接检测目的蛋白的情况，在上述所得沉淀中加入50 μL 1×蛋白上样缓冲液，煮沸5 min，冷却至室温并离心。

8、取上清进行SDS-PAGE检测。

Poly FLAG多肽竞争性洗脱（适用于利用Anti-Flag Affinity Gel进行蛋白纯化实验）：

9、将含有200 μg-1 mg/mL Poly Flag多肽（B23111）的TBS缓冲液加入步骤6的产物中，Poly FLag多肽缓冲液体积为凝胶使用量的5倍，4℃摇床孵育洗脱2 h（为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱）。

10、将上述步骤得到的产物进行离心（5000 rpm, 30 sec），将包含目的蛋白的上清转移到新的EP管中。凝胶如需重复使用，需用0.1 M glycine HCl（pH 3.0）进行清洗后再回收。

低pH洗脱（适用于利用Anti-Flag Affinity Gel进行蛋白纯化实验）：

11、将0.1 M glycine HCl（pH 3.0）洗脱液加入步骤6中的产物中，洗脱液体积为凝胶使用量的5倍，摇床孵育洗脱5 min，洗脱时间不得超过20 min。

12、将上述产物进行离心（5000 rpm, 30 sec），将洗脱产物立即加入1 M Tris（pH 8.0）进行中和，并调节pH直至中性。

## 常见问题及对策

**Q：检测结果无信号是什么原因?**

1） 样品中没有Flag融合蛋白。
   A. 用WB检测目的蛋白确实连接有Flag标签蛋白。
   B. 使用新鲜的蛋白提取物。
   C. 选用合适的蛋白酶抑制剂或提高抑制剂浓度以抑制Flag融合蛋白的降解。

2） 过分洗涤。
   A. 减少洗涤次数。
   B. 避免加入高浓度的NaCl。
   C. 使用无去垢剂或低浓度去垢剂的溶液。

3） 孵育时间不足。
   A. 延长与亲和介质的孵育时间，从几个小时至过夜。

4） 样品中有干扰物质。
   A. 蛋白提取物中若含有高浓度的DTT、2-巯基乙醇或其他还原性物质能够破坏抗体的功能，因而是必须要避免的。

5） 检测系统灵敏度不够。
   A. 设定合理的对照以确定所用的一抗与二抗的结合特性。
   B. 用丽春红染膜以检测蛋白转移的效率。
   C. 使用新鲜的检测底物或使用其他的检测方法。

**Q：检测结果背景高是什么原因?**

1） 杂蛋白非特异性地结合在anti-flag抗体、琼脂糖基质或离心管壁上。
   A. 使用鼠IgG-Agrose去除非特异性结合的蛋白。
   B. 最后一次洗涤时，重悬，转移至另一新的离心管后离心。
   C. 低速离心避免蛋白非特异性地结合到琼脂糖基质上。

2） 洗涤不足。
   A. 增加洗涤次数。
   B. 延长洗涤时间，每次洗涤至少15 min。
   C. 增加NaCl或去垢剂的浓度。