

ABM®Anti-FLAG Fab Agarose

货号: MA100-25T



产品信息

.....

规格: 500 μ L 悬浮液

固含量: 50%

类型: Flag Tag (Fab 片段) 琼脂糖珠

配体: 抗 Flag Tag 的 (Fab 片段), 小鼠来源

分子量: 15 KDa

结合力: 1 μ L Flag 琼脂糖微珠混匀液结合约 2 μ g 靶蛋白

反应性: 识别 N 端和 C 端 Flag 或 Flag 标记融合蛋白

亲和力: 1 pM

应用: IP, CoIP, RIP, ChIP, MS, Purification

储存液: 1x10 mM PBS, 25%甘油, 和 0.03% Proclin 300

微珠粒径: $\sim$ 40 μ m (4%交联琼脂糖珠)

运输温度: 冰袋或常温运输

储存温度: 4°C (避免冻存) 有效期 1 年

产品说明

.....

Flag-Fab Agarose 是用于抓取或纯化 Flag-Tag 融合蛋白的优势工具, 由抗 Flag tag

(DYKDDDDK) 的小鼠单克隆 Fab 片段, 重组表达后共价结合在琼脂糖珠上, 抗体和糖珠不易分离且没有重轻链的影响, 广泛应用于: 动物、植物、细菌、真菌、组织细胞等中靶蛋白的捕获与检测。

产品优势

.....

高特异性: 条带单一, 背景干净, 没有普通抗体的重轻链影响

孵育时间短: 通常 4°C 孵育 1~2 小时, 容易降解的蛋白可 4°C 结合 5-30 min

高载量：1 μL slurry 可结合约 2 μg 靶蛋白

推荐缓冲液表 （以 4-10℃ PH 值为准）

Buffer	Composition
Lysis buffer （ColIP）	50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton-100, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP40
RIPA buffer	10 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholate
Dilution/Wash buffer	50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5mM EDTA
2×SDS loading buffer	120 mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol
Glycine-elution buffer	200 mM glycine pH2.5
Neutralization buffer	1 M Tris pH10.4

缓冲液兼容表

Buffer ingredients	Max. concentration
DTT	5 mM
EDTA	5 mM
Glycerole	30%
NaCl	3 M
Gua-Hcl	3 M
NP40	2 %
SDS	0.1 %
Triton X-100	2 %
Urea	8 M

产品使用步骤

一、样品准备

注：细胞裂解时应使用提前预冷的缓冲液。我们强烈建议在裂解缓冲液中添加蛋白酶抑制剂，以防止您的靶蛋白及其相互作用蛋白降解；细菌如大肠杆菌的裂解可采用化学法、机械法和超声波法等，此处省略。

1.1 植物组织细胞裂解步骤:

取适量植物组织样本放置于冷冻液氮中, 将冷冻后的植物组织样本研磨成粉末, 尽可能充分研磨破坏其细胞壁。加入 0.5-3 mL RIPA 裂解液 (已加蛋白酶抑制剂 PMSF 等) 进行裂解, 为了提高裂解效率, 加入 200 μ L 玻璃粉充分震荡 30 min, 裂解完成后 14000x g, 离心 10 min, 吸取上清至新的离心管中, 丢弃沉淀。

1.2 哺乳动物细胞收集步骤:

每 10 cm² 培养皿约可收集 10⁶-10⁷ 个哺乳动物细胞, 吸出生长培养基、向培养皿中加入 2 mL 提前预冷的 PBS (pH7.5) 洗涤细胞 2 次, 利用胰酶消化的方法收集贴壁细胞, 细胞转移到离心管, 500x g 离心 5 min 并丢弃上清液, 获得 10⁶-10⁷ 个细胞。

1.3 哺乳动物细胞裂解

1. 在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂, 用 200-500 μ L 预冷 Lysis buffer 重悬细胞。

注: 对于细胞质蛋白在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂和 1 mM PMSF。

对于核染色质蛋白可选择: 在 RIPA buffer 中加入 DNase (75- 150 KunitzU/mL)、MgCl₂ (2.5 mM)、蛋白酶抑制剂和 PMSF (1 mM)

2. 冰上放置 30 分钟, 每 10 分钟重悬细胞充分混匀一次。
3. 4°C, 16000x g 离心 10 分钟, 将上清液转移到预冷 EP 管中加入 300 μ L Dilution buffer (Dilution buffer 使用前需要添加蛋白酶抑制剂和 1mM PMSF), 丢弃沉淀 (如需, 可保存 50 μ L 稀释的裂解物用于进一步分析, 如做为 input 对照)。

注: 此步骤获得的细胞溶解物可置于 -80°C 下保存

二、平衡微珠

1. 通过移液枪吹吸或上下旋转重悬微珠, 将 20 μ L 的微珠混匀液转移到至 1.5 mL 的离心管中。
2. 加入 500 μ L 预冷的稀释缓冲液 (Dilution buffer), 混匀。
3. 4°C, 2500x g 离心 3-5 分钟收集微珠, 丢弃上清。

4. 重复上述步骤 2 次。

三、结合蛋白

1. 将收取的细胞裂解物加入到平衡好的微珠中。（如需,可保存 30 μL 裂解产物用于免疫印迹分析）
2. 4°C, 上下旋转孵育 1-2 小时。

四、洗杂

1. 4°C, 2500x g 离心 3-5 分钟, 沉淀珠子（如需,可保存 30 μL 上清液用于进一步分析（流穿液 / 非结合组分））。
2. 丢弃剩余上清液。
3. 加入 500 μL Dilution buffer 重悬微珠。
4. 4°C, 2500xg 离心 3-5 分钟沉淀微珠, 丢弃剩余上清液。
5. 重复上述洗涤步骤（步骤 3 和 4）2-3 次。
6. 洗涤完成后, 将微珠转移至新的 EP 管中。

可选 : 清洗液 (Dilution buffer) 可按照需要测试多种盐离子浓度, 如 150 mM-500 mM, 或添加非离子洗涤剂, 如 TritonX-100（见缓冲液兼容性表中的最大浓度）。

五、洗脱蛋白

5.1 2×SDS loading buffer 洗脱

1. 丢弃剩余上清液。
2. 加入 10~80 μL 2×SDS loading buffer 重悬微珠（根据样品情况选择 loading buffer 用量）。
3. 在 95°C 以上煮沸水浴 5-10 分钟, 从微珠上分离免疫复合物。
4. 4°C, 2500x g 离心 2 分钟, 沉淀珠子, 收集上清液。
5. 用 SDS-PAGE 或 WB 分析上清液。

5.2 甘氨酸缓冲液洗脱

1. 丢弃剩余上清液。
2. 加入 50–100 μL Glycine-elution buffer (pH2.5), 在 4°C或室温用移液枪吹吸 30 - 60 秒。
3. 4°C, 2500 $\times$ g 离心 5 分钟, 沉淀微珠, 收取上清液。
4. 将上清液转移至新的离心管中。
5. 立即加入 5-10 μL Neutralization buffer (pH10.4) 中和洗脱产物。
6. 重复洗脱步骤 (步骤 2, 3, 4, 5) 2 次以提高洗脱效率。

注：室温洗脱比 4°C效率更高，如靶蛋白较稳定，缓冲液可提前置于室温预热。

5.3 Flag peptide 缓冲液洗脱 (竞争肽洗脱)

1. 每 10 μL 微珠加 20~30 μL 0.2 mM Flag peptide, 重悬 Flag-Agarose , 保持混匀状态孵育 10 分钟, 4°C, 2500 $\times$ g 离心 3-5 分钟。
2. 将上清液转移至新的离心管中, 重复上述步骤 1-2 次以增加洗脱效率。
3. 微珠再生: 加入 5-10 倍微珠体积的 200mM 甘氨酸 (pH2.5), 保持混匀状态孵育 3-5 分钟, 2500 $\times$ g 离心 3-5 分钟, 丢弃上清, 立即用 5-10 倍微珠体积的 PBS (pH7.5) 洗涤微珠 3 次。

六、酶活检测/ CHIP/ RIP/ MS 实验步骤

6.1 酶活检测

如需进行酶的活性检测, 无需洗脱, 可以直接检测。

6.2 染色质免疫沉淀 (CHIP RIP)

如需进行染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验, 用于含有 Flag Tag 融合蛋白的蛋白质/DNA 相互作用实验。染色质免疫沉淀包括细胞固定, 染色质断裂, 染色质免疫沉淀, 交联反应的

逆转，DNA 纯化以及 DNA 鉴定。其中细胞固定，染色质断裂步骤不变。然后进入说明书的第二步，加入细胞裂解产物后，DNA-蛋白质复合物结合到平衡好的微珠上。接着进入第三和第四步（结合蛋白，洗涤微珠），分离得到复合物。用甘氨酸缓冲液洗脱，得到洗脱复合物。后期交联反应的逆转，DNA 纯化及 DNA 鉴定等同普通的 ChIP 实验。RNA 结合蛋白免疫沉淀（RIP）实验步骤同上。

6.3 质谱分析(MS)

Flag-Agarose 不仅用于检测和验证蛋白质之间的相互作用，也可以用于质谱分析筛选与 Flag Tag 融合蛋白相互作用的蛋白。操作步骤同免疫沉淀法一样，得到洗脱的复合物后，然后进行 SDS-PAGE 分析，用考马斯亮蓝或者银染的方法染色后，切下未知蛋白的条带，用质谱分析技术鉴定相互作用的蛋白。

注意事项：

1. 使用本产品进行实验，需先确认样品中目的蛋白的表达情况。
2. 为了预防目的蛋白降解，请添加合适的蛋白酶抑制剂。
3. 请勿离心或冷冻磁珠，以免引起磁珠聚团，板结。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品不能用于诊断医疗或其它用途仅用于科学实验研究。