

Anti-HA Affinity Gel 亲和凝胶

货号: M2511

保存: -20°C保存, 一年有效, 冷藏条件运输

产品信息:

HA 标签亲和凝胶, 由高品质的 HA 小鼠单抗与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (至少为 1.2mg protein/ml 凝胶悬液), 高特异性, 性质稳定, 可反复使用的特点, 可用于 HA 标签融合蛋白的亲和纯化及免疫 (共) 沉淀。

性能指标

| | |
|------|--|
| 应用范围 | 可用于 Met 修饰的 N 端 HA 融合蛋白 (Met-HA-Protein), N 端 HA 融合蛋白 (HA-Protein) 和 C 端 HA 融合蛋白 (Protein-HA) 的亲和纯化及免疫 (共) 沉淀。 |
| 抗体属性 | 小鼠单克隆抗体。 |
| 载量 | 1ml 琼脂糖颗粒, 共价偶联 6mg Anti-HA 小鼠单克隆抗体, 可纯化或沉淀至少 1.2mg HA 融合蛋白。 |
| 强度 | 可反复使用 3 次以上。 |
| 成分 | 1ml 共价偶联 Anti-HA 单克隆抗体的琼脂糖颗粒, 溶于 2ml PBS 中。 |

使用说明 (仅供参考):

| 使用目的 | 使用要求 | 使用方法 |
|------------------|---|-------------------------------|
| IP/CoIP | | 见 应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 HA 标签蛋白质 |
| 亲和纯化 | 1. 目标蛋白遇酸不稳定 2. 要求纯化柱反复使用 3. 接受高成本纯化 | 见 应用二. HA 多肽亲和纯化 HA 标签蛋白质 |
| 亲和纯化 | 1. 目标蛋白比较稳定 2. 不要求纯化柱反复使用 3. 不接受高成本纯化 | 见 应用三. 酸洗脱亲和纯化 HA 标签蛋白质 |
| 细胞裂解液选择 | | |
| HA 标签蛋白质在细胞内表达 | | 见 细胞裂解液制备 也可使用其它细胞裂解液来裂解细胞 |
| HA 标签蛋白质在细胞外分泌表达 | | 表达量高可以直接纯化, 表达量低请浓缩后纯化 |

需自备试剂及设备

离心机, 1.5mL 离心管若干, 重力纯化柱 (大量纯化需要)

细胞裂解液, 酸性洗脱液, 中和液, PBS, 2x 蛋白上样缓冲液, HA 多肽

待测抗原样品及检测抗体

使用实例

应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 HA 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-HA 亲和凝胶至均一, 转移 20 μ L 混合液(约含 10 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 100 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 HA-tag 蛋白是否存在残留)。
- 4) 清洗凝胶, 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 5) 加入 100ul 2x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。

应用二. HA 多肽亲和纯化 HA 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-HA 标签亲和凝胶至均一, 转移 40 μ L 混合液(约含 20 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200 μ L) 1x PBS, 5000rpm x30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 HA-tag 蛋白是否存在残留)。
- 4) 加入 10 倍凝胶 1xPBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 5) 将 2 倍凝胶体积, 浓度为 2mg /mL HA 多肽溶液分几次加入上述沉淀, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h 后(为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱), 离心收集上清。如有必要, 重复本步骤 1-3 次。将几次分离的上清分管收集。合并洗脱液。

备注: 根据蛋白质洗脱难易程度, 调整 HA 多肽溶液, 最高可到 5mg/ml。

- 6) 亲和凝胶如需重复使用, 需依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 PBS 清洗, 再用适量 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 清洗, 最后加入与凝胶等体积的 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 至凝胶中, 混合均匀, 保存在-20 $^{\circ}$ C。

注意: 酸性环境会缩短凝胶的使用寿命, 应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。

- 7) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

应用三. 酸洗脱亲和纯化 HA 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-HA 标签亲和凝胶至均一, 转移 40 μ L 混合液(约含 20 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。

- 2) 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液，室温摇床孵育 2h 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 加入 10 倍凝胶 PBS，用上述离心法清洗凝胶三次；预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶，除去非特异性结合蛋白。离心，弃上清。
- 4) 预冷的 10 倍凝胶体积 pH 3.0 的酸性洗脱液进行洗脱，收集管中预先放入中和液 10 μ l。注意：酸性环境会缩短凝胶的使用寿命，应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间，不超过 10min。
- 5) 用紫外检测仪测定收集峰，合并收集峰。
- 6) 亲和凝胶如需重复使用，需依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 1xPBS 清洗，再用适量 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）清洗，最后加入与凝胶等体积的 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）至凝胶中，混合均匀，保存在-20 $^{\circ}$ C。
- 7) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度，并按照需求处理和保存蛋白质。

细胞裂解液制备

- 1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 2) 预冷的 1x PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，（例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约 $0.5-1 \times 10^7$ 细胞，需要加入 1ml 细胞裂解液）。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4 $^{\circ}$ C离心 10min。取上清，-80 $^{\circ}$ C冷冻保存。

推荐缓冲液配方

以下配方仅供参考，应根据具体情况进行调整。

| | |
|-------------------------|--|
| 细胞裂解液: | 150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂) |
| HA 多肽: | 该多肽为轻质粉末, 开盖前应离心。建议将 1ml ddH ₂ O 溶液加至 10mg 多肽粉末中, 彻底溶解后, 制成 10mg/ml 储存液, -20 $^{\circ}$ C 保存。使用时用 1xPBS 稀释至需要的浓度。按需求浓度稀释至工作浓度。 |
| 酸性预洗液液: | 0.15M PBS buffer, pH5.0 |
| 酸性洗脱液: | 0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH3.0 |
| 中和液: | 1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0 |
| 10xPBS (pH7.5) : | Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 35.8g; NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O 2.8g ; NaCl 89g 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 2% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍) |
| 2x 上样缓冲液 | 125mM Tris HCl , pH6.8, 含有 4% SDS, 20%甘油和 0.004% 溴酚蓝 |

注意事项:

- (1) 本产品含 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，需冷藏条件下运输。
- (2) 勿干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，勿使酸处理凝胶时间超过 10min。
- (3) 以上使用方法中的凝胶用量，均为少量制备的示范用量，具体用量请根据实际情况调整。
- (4) 本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗。