

Anti-HA 标签 (YPYDVPDYA) 亲和凝胶

Cat#: IP0063

(本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

Anti- HA 标签 (YPYDVPDYA) 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 FLAG 标签融合蛋白的亲和纯化及免疫（共）沉淀。

二. 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：** Anti-HA (DYKDDDDK) **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。
- 保存方法：** 在加入了 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，-20℃可保存 1 年。

三. 说明书阅读指南

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 也可使用其它公司细胞裂解液裂解细胞
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

四. 用前必读

1. 以下试剂及设备，需要客户自备，试剂推荐配方见说明书附件 1，推荐蛋白质制备方案见附件 2。

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(货号 Q7008)
待测抗原样品及检测抗体

2. 注意事项（开箱前必读）

- 1) 本产品在含 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，-20℃可保存 1 年，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) 以下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。

五. 使用方法

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℃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 100 μ L 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 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℃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℃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℃。

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 2hr 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。

附件 1. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐，客户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, 使用说明见附件 2)
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:	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, with 4% SDS, 20% glycerol and 0.004% bromphenol blue

附件 2. 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 1xPBS 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 0.5-1x10⁷ 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。