

Anti-HA Affinity Gel

产品包装:

| 产品编号 | 产品名称 | 产品形式 | 包装规格 (V/V, 1/2) |
|-----------------|----------------------|----------|-----------------|
| HAK21043-500 ul | Anti-HA Affinity Gel | 50% 凝胶悬液 | 500 uL |
| HAK21043-2 mL | Anti-HA Affinity Gel | 50% 凝胶悬液 | 2 mL |
| HAK21043-10 mL | Anti-HA Affinity Gel | 50% 凝胶悬液 | 10 mL |

产品描述:

Anti-HA 亲和凝胶来源于 Anti-HA [PSH01-92]重组兔单克隆抗体,与直径为 46-165 μ m 的琼脂糖凝胶共价偶联。[PSH01-92]抗体能识别包含 HA 多肽序列 (YPYDVPDYA) 的融合蛋白。[PSH01-92]可特异性地结合哺乳动物和细菌提取物中的 N 端 HA 融合蛋白、C 端 HA 融合蛋白。

Anti-HA 亲和凝胶可用于常用的免疫沉淀程序检测和捕获 HA 标记的融合蛋白。可以通过磁性吸附实现快速高效的分离,无需离心操作,以促进实验过程。

产品性能:

产品形式: Anti-HA 亲和凝胶保存在 PBS, pH7.4 添加防腐剂的缓冲液中,以 50%的悬浮液形式提供。包装体积为总体积,每 mL 本产品中共含有 0.5ml 纯凝胶(沉淀物)。

抗体浓度: 每 1mL 纯凝胶结合 6mg HA 抗体。

结合能力: 每 1mL 纯凝胶可结合 \geq 1.1mg HA 融合蛋白。

保存条件:

Anti-HA 亲和凝胶建议在 2-8 $^{\circ}$ C 下储存,可稳定保存 2 年。请勿-20 $^{\circ}$ C 保存。

注意事项和免责声明:

本产品仅限于科学研究使用,不得用于临床诊断或治疗。

使用说明:

一、样品制备

- 建议将蛋白裂解液控制在 pH6-8, NaCl 或 KCl 浓度 \geq 0.15M 可获得较好的实验效果。
- 蛋白裂解液需要离心 (10000 \times g, 15min) 才能去除干扰蛋白质结合的细胞碎片和微粒。如想获得更好的实验效果,蛋白裂解液还可通过 0.45 μ m 或 0.22 μ m 滤器过滤。

二、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)

对于 IP 反应,建议每个反应 (1 \times 10⁶ 细胞 或 100 μ L 裂解液) 使用 20-30 μ L 的亲合凝胶悬浮液。

- 轻轻重悬凝胶,取出适当的体积到合适的离心管中。6000 \times g 离心 30 秒以收集亲和凝胶,弃上清。
- 用 10 倍凝胶悬浮液体积的 TBST 清洗亲和凝胶,6000 \times g 离心 30 秒,弃上清,重复该步骤三次。
- 将 100 μ L 处理好的细胞裂解液添加到洗涤过的亲和凝胶中。(可根据样品中目的蛋白丰度来调整裂解液的体积)。对于阳性对照,将 100 μ L TBST 和 4 μ L 50 ng/ μ L HA 融合蛋白 (~200ng) 添加到洗涤过的亲和凝胶中。对于阴性对照,仅添加 100 μ L 的裂解缓冲液,不含蛋白质。

4.轻轻摇动(推荐使用旋转混匀仪)所有样品和对照 1 小时。为了提高结合效率,可将结合步骤延长至 4 $^{\circ}$ C 过夜反应。

5.将离心管 6000×g 离心 30 秒以收集亲和凝胶。用移液器吸头（推荐使用细长的吸头或者 1mL 吸头上套 200μL 吸头来使用）去除上清液（注意防止吸头沾到亲和凝胶）

6.用 10 倍凝胶悬浮液体积的 TBST 清洗亲和凝胶三次。

三、洗脱：

本产品根据不同的下游应用要求等，可使用多种洗脱方法，包括 HA 多肽、酸性洗脱和 SDS-PAGE 上样缓冲液等洗脱液进行洗脱。

1、**酸性洗脱法：**本方法为非变性法，比较快速且高效。洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

每 10uL 原始凝胶悬浮液，加入 100ul 酸性洗脱液(0.1M 甘氨酸,0.2M 精氨酸, pH2.7)，混匀后置于旋转混合仪上，室温孵育 5 分钟。孵育完毕后，将离心管 6000×g 离心 30 秒，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入 10uL 中和液(1M Tris-HCl, pH9.0)，混匀。为了获得最大的洗脱效率，可重复上述步骤，并将相同样品合并。

洗脱并中和的目的蛋白置于 4°C 待用，或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

注：1) 酸性洗脱法虽然高效，但仍可能低于 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

2) 由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响，如果对洗脱效率的要求比较高，可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整，相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整。

2、**SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法：**本方法为变性法，得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 检测。每 20μL 原始凝胶悬浮液体积，加入 20μL 2X SDS-PAGE 上样缓冲液，95°C 加热 5 分钟。6000×g 在 4°C 或室温离心 30 秒，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 WB 检测。

注：由于上样缓冲液中 SDS 会破坏 Flag 抗体，所以洗脱后的凝胶不能重复使用。

3、**3X HA 竞争洗脱法：**本方法为非变性法，洗脱效率高，且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

3X HA 多肽洗脱液的配制：取适量 3X HA 多肽溶解于 1XTBS+1%Triton+0.1%SDS 中，使其终浓度为 300μg/mL。

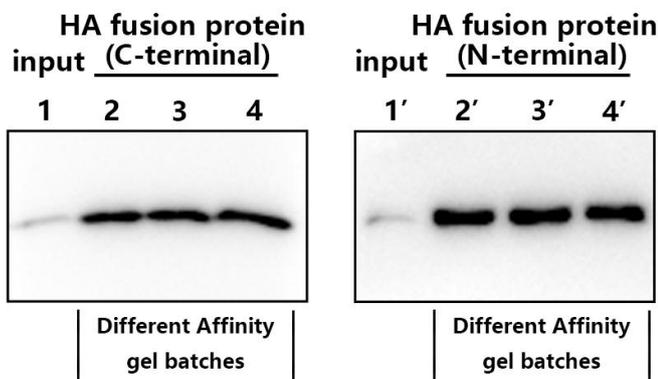
每 10ul 原始凝胶体积，加入 100ul 3X HA 多肽洗脱液(300μg/ml)，混匀后置于旋转混合仪上，室温摇晃孵育 30-60 分钟，或 4°C 孵育 1-2 小时。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。

孵育完毕后，将离心管 6000×g 离心 30 秒，将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的 Flag 标签蛋白。

洗脱的 HA 标签蛋白置于 4°C 待用，或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

注：SDS-PAGE 样品的洗脱会导致 Anti-HA 凝胶损坏。凝胶不能再次使用，因为样品缓冲液中的 SDS 会使抗体变性。煮沸还会破坏凝胶结构。

四、结果展示



Immunoprecipitation

Anti-HA [PSH01-92] Affinity Gel: Cat.No. HAK21043: Purification of Two Different HA-tagged fusion protein from 293T transfected with HA-fusion protein expression vector. 20ul Anti-HA [PSH01-92] Affinity Gel was used for IP per lane.

Lane 1-4: 293T transfected with HA-fusion protein expression vector containing an C-terminal HA tag, whole cell lysate

Lane 1'-4': 293T transfected with HA-fusion protein expression vector containing an N-terminal HA tag, whole cell lysate