

HA 标签 (YPYDVPDYA) 融合蛋白纯化试剂盒

Cat#: KAP0063

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

1. 背景信息

HA-Tag (YPYDVPDYA), 常用于真核蛋白质重组表达标记。HA 标签 (YPYDVPDYA) 融合蛋白纯化试剂盒, 主要成分是 Anti-HA 亲和纯化凝胶 (Anti-HA Tag Affinity Gel), 由高品质的 **HA 小鼠单抗** 与 Sepharose 4B 琼脂糖颗粒共价偶联制成, 具有高载量 (1.2mg protein/ml 凝胶), 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。

2. 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), C 端 HA 融合蛋白 (Protein-HA) 及中部 HA 融合蛋白的亲和纯化。

载量: 1ml Sepharose 4B 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: 重力纯化柱, 可反复使用 3 次以上。

成分: 共价偶联 Anti-HA 单克隆抗体的琼脂糖颗粒, 1ml 溶于 2ml PBS。

保存方法: 亲和凝胶在加入了 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年。其它成分保存方法见下表。

3. 试剂盒组成

产品编号	组分	规格	保存
L1	细胞裂解液	50ml	4°C一年
/	纯化柱	1 个	室温
G1	Anti-HA 亲和纯化凝胶	2ml	-20°C一年
E1	酸性预洗液	25ml	4°C一年
E2	HA peptide 洗脱液	10mg	干粉 4°C一年, 溶液 -20°C一年
E3	酸性洗脱液	25ml	4°C一年
N1	中和液	25ml	4°C一年
P10	10xPBS (清洗液/储存液)	50ml	4°C一年

注意事项 (开箱前必读)

- 3.1 本试剂盒冷藏条件下运输, 如果暂时不用, 请将纯化柱 (空柱) 取出, 室温保存; 亲和纯化凝胶保存于 -20°C ; 试剂盒各成分保存于 4°C
- 3.2 **E2** (HA peptide) 溶解方法: 该多肽为轻质粉末, 开盖前应离心。建议将 1ml 1xPBS 溶液加至 10mg 多肽粉末中, 彻底溶解后, 制成 10mg/ml 储存液, -20°C 保存。使用时用 1xPBS 稀释至需要的工作浓度。建议工作浓度多为 2-5mg/ml, 可根据具体情况调整洗脱液浓度。
- 3.3 **P10** (10xPBS) 使用之前需用双蒸水稀释至 1xPBS 使用。
- 3.4 使用后凝胶柱需在含 0.2%叠氮钠的 1xPBS 中, 4°C 保存。
- 3.5 有文献显示, 与传统的 Glycine-HCl 洗脱液相比, 本试剂盒提供的 pH3.0 的 Arginine-HCl 做为洗脱液, 可以减少蛋白质变性, 延长抗体亲和纯化柱的使用寿命。客户也可以根据实际情况自行选用配制

4. 使用方法 (所有步骤尽可能在冰上进行, 以避免目标蛋白质降解。)

4.1 细胞裂解液制备

- 4.1.1 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。
- 4.1.2 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复一次。
- 4.1.3 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液 **L1**, (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。
- 4.1.4 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°C 离心 10min。取上清, -80°C 冷冻保存。

4.2 装柱及孵育

- 4.2.1 温和重悬 Anti-HA 亲和纯化凝胶 **G1**, 至均匀混合, 用剪去末端的枪头吸取适量的凝胶至空纯化柱中。
- 4.2.2 10ml 1xPBS (10 倍凝胶体积) 清洗 Anti-HA 亲和凝胶。
- 4.2.3 加入含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 4°C 摇床孵育过夜。
- 4.2.4 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)。
- 4.2.5 5ml 1xPBS (5 倍凝胶体积) 清洗亲和凝胶三次。
- 4.2.6 根据蛋白质性质选择竞争洗脱或酸性洗脱, 具体方法可参见第 5 部分问题和建议 5.1。

4.3 竞争洗脱

- 4.3.1 用 1xPBS 配制 HA peptide 洗脱液 **E2**, 终浓度为 2mg/ml, 也可根据具体情况自行调整工作浓度。
- 4.3.2 预冷的 5ml 酸性预洗液 **E1** (5 倍凝胶体积) 洗涤亲和凝胶, 除去非特异性结合蛋白。

- 4.3.3 加入 2 倍凝胶体积 HA peptide 洗脱液 **E2** (或 2 倍凝胶体积), 轻柔混匀, 4°C 摇床孵育 2 h 后洗脱 (为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱)。每次收集 1ml。如有必要, 再次加入 2 倍凝胶体积 HA peptide 洗脱液 **E2** (或 2 倍凝胶体积), 重复洗脱一次。
- 4.3.4 合并洗脱液。
- 4.3.5 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。

4.4 酸性洗脱

- 4.4.1 预冷的 5ml 酸性预洗液 **E1** (5 倍凝胶体积) 洗涤亲和凝胶, 除去非特异性结合蛋白。
- 4.4.2 预冷的 10ml 酸性洗脱液 **E3** (10 倍凝胶体积) 进行洗脱, 每次收集 1ml, 收集管中预先放入 50 μ l 中和液 **N1**。注意: 酸性环境放置太久会缩短亲和凝胶的使用寿命, 应尽量缩短亲和凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。
- 4.4.3 用紫外检测仪测定收集峰, 合并收集峰。
- 4.4.4 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。

4.5 亲和凝胶的清洗与再生 (洗脱后须立即进行亲和凝胶的清洗与再生)

- 4.5.1 10 倍凝胶体积 1xPBS 清洗亲和凝胶。
- 4.5.2 酸性洗脱液 **E3** 洗涤亲和凝胶, 每次三倍凝胶体积。注意: 酸性环境放置太久会缩短亲和凝胶的使用寿命, 应尽量缩短亲和凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。
- 4.5.3 中和液 **N1** 洗涤亲和凝胶三次, 每次三倍凝胶体积。
- 4.5.4 检测流穿液 pH, 如为中性, 则进行下一步; 如仍为酸性, 则重复 4.5.2 和 4.5.3。
- 4.5.5 用 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 清洗亲和凝胶, 再加入与凝胶等体积的 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 保存溶液至凝胶中, 混合均匀, 保存在-20°C。

4.6 纯化蛋白质保存

纯化产物加入 0.2%叠氮钠, 50%甘油保存在-80°C, 用于后续功能性实验。

5. 问题与建议

5.1 如何选择竞争性洗脱和酸性洗脱?

HA peptide 洗脱液与蛋白质上的 HA 标签竞争亲和纯化柱上的抗体, 使蛋白质与抗体的结合被取代而脱离纯化柱, 从而被洗脱下来。这种洗脱的特点有:

- 5.1.1 洗脱条件温和, 一般不会造成蛋白质变性; 有利于亲和纯化柱的保存和反复使用。
- 5.1.2 由于亲和吸附达到平衡比较慢, 所以往往需要较长的时间和较大的洗脱体积。
- 5.1.3 特异性强, 可以进一步消除非特异性吸附的影响, 从而得到较高的分辨率。基本上不会有 anti-HA 的抗体被洗脱下来。

酸性洗脱是通过改变环境 pH, 破坏抗原抗体的结合从而使蛋白质脱离亲和凝胶被洗脱下来, 这种洗脱方式的特点有:

- 5.1.4 成本低廉。
- 5.1.5 纯化速度较快。
- 5.1.6 酸性 pH 会造成部分蛋白质变性, 引起目的蛋白质沉淀, 降解或失活。

5.1.7 有时会有少部分 Anti-HA 抗体被洗脱，造成非特异性信号。

反复使用酸性洗脱，会造成抗体脱落，也会破坏亲和凝胶的理化性质，应减少亲和凝胶的反复使用次数。

5.2 常见的蛋白质的后续处理方法有哪些？

5.2.1 透析与超滤

透析法是利用半膜将分子大小不同的蛋白质分开。超滤法是利用高压或离心，强使水和其他小的溶质分子通过半透膜而蛋白留在超滤管内。两者都可以达到换液的目的。使用时需注意选择正确分子量的透析袋和超滤管。

5.2.2 过滤除菌

可采用微孔滤膜滤器操作，让蛋白质溶液通过 0.22um 滤膜，即可达到除菌的目的。

5.2.3 蛋白质定量鉴定浓度。

5.2.4 SDS-PAGE 鉴定纯度。

5.3 如何选择细胞/组织裂解液？

本试剂盒提供的细胞裂解液成分如下：

NaCl	150mM
Tris-HCL(PH8.0)	50 mM
TRITON X-100	1%
EDTA	1mM

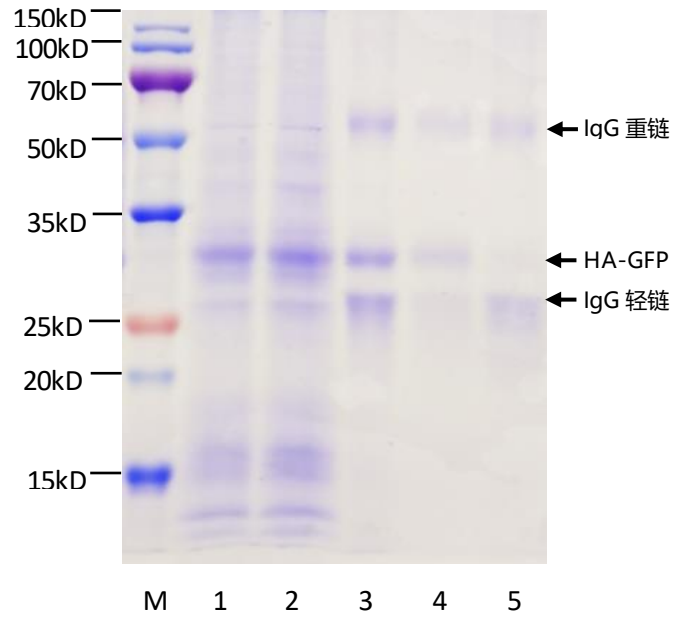
使用前可加入 1%PMSF 和 0.5%原钒酸钠，或其他蛋白酶抑制剂，避免蛋白质降解。

客户可根据目的蛋白的性质和后续用途，自行配制细胞裂解液及选择是否加入蛋白酶抑制剂。

5.4 本试剂盒各试剂成分如下

组分	内容物/配方
Anti-HA 亲和纯化凝胶 G1	1ml 共价偶联 Anti-HA 抗体的 Sepharose 4B 琼脂糖颗粒溶于 2ml PBS 中
细胞裂解液 L1	50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100 (说明见 5.3)
酸性预洗液 E1	0.15M PBS buffer, pH5.0
3×HA peptide 洗脱液 E2	HA peptide 干粉 (说明见 3.2)
酸性洗脱液 E3	0.15M Arginine-HCl 缓冲液, pH3.0
中和液 N1	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
10xPBS (清洗液/储存液) P10	10xPBS (1.5M PBS, 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)

6. 案例



M: Marker

1: Lysates (293 cell transfected with HA-GFP)

2: Lysates (293 cell transfected with HA-GFP)

3: HA affinity gel with lysates

4: Elute by HA peptide

5: Eluted HA affinity gel