

Anti-HA 标签 (YPYDVPDYA) 快速免疫沉淀套装

Cat#: KIP0063

(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) 快速免疫沉淀套装, 由 Anti-HA 亲和凝胶 (Cat#: IP0063), Mouse IgG 亲和凝胶 (Cat#: Q9001), HA-Tag Rabbit pAb 一抗 (Cat#: 3063), HRP 标记的羊抗兔二抗 (特异性吸附, Cat#: Q1002X) 四个成分组成, 用于快速、高效、特异的 HA 标签融合蛋白的免疫 (共) 沉淀。

Anti-HA 亲和凝胶, 由高品质的 HA-Tag Mouse mAb (小鼠单抗) 与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (至少为 0.6mg protein/ml 凝胶悬液), 高特异性, 性质稳定的特点; Mouse IgG 亲和凝胶作为 CoIP 实验对照, 性质稳定; HA-Tag Rabbit pAb 抗体具有高特异性, 高亲和力, 高效价的优点; HRP 标记的羊抗兔二抗经过交叉吸附纯化, 仅识别 HA-Tag Rabbit pAb, 与小鼠单抗的重链轻链没有交叉反应。三个成分均经严格质检, 可单独使用; 三者组合的套装则具有快速, 简便, 无干扰条带的优点。

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) 的免疫 (共) 沉淀。
- 抗体属性:** HA-Tag Mouse mAb: 小鼠 IgG2a 亚型; HA-Tag Rabbit pAb: 兔 IgG 亚型。
- 载量:** 0.5ml Sepharose 4B 琼脂糖颗粒, 共价偶联 4mg HA-Tag Mouse mAb, 可纯化或沉淀至少 0.6mg HA 融合蛋白。
- 保存方法:** -20°C 可保存 1 年。

三. 产品组成

| 名称 | 货号 | 成分 | 保存 |
|-------------------|--------|---|---------------|
| Anti-HA 标签亲和凝胶 | IP0063 | 共价偶联 Anti-HA 单抗的琼脂糖颗粒, 0.5ml 溶于 1ml PBS (含 50%甘油) | -20°C 可保存 1 年 |
| Mouse IgG 亲和凝胶 | Q9001 | 共价偶联小鼠 IgG 的琼脂糖颗粒, 0.5ml 溶于 1ml PBS (含 50%甘油) | -20°C 可保存 1 年 |
| HA-Tag Rabbit pAb | 3063 | 100ug 溶于 100μl PBS (含 50%甘油) | -20°C 可保存 1 年 |
| HRP 标记的羊抗兔二抗 | Q1002X | 100ug 溶于 100μl PBS (含 50%甘油) | -20°C 可保存 1 年 |

四. 使用方法

(一) 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 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°C 离心 10min。取上清, -80°C 冷冻保存。

备注: 如果待检测的 HA 标签蛋白质是分泌表达, 不需要上述处理, 浓缩后即可进行以下步骤。

(二) 免疫 (共) 沉淀 HA 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-HA 标签亲和凝胶至均一, 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。对照组也按照相同的操作, 只需将 Anti-HA 标签亲和凝胶换成小鼠 IgG 凝胶。以下步骤实验条件在对照组和实验组中同步进行。
- 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°C 孵育过夜。
- 3) 加入 10 倍凝胶体积 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 PBST 预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 4) 加入 5x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。
- 5) 取上清进行 SDS-PAGE, 转膜及后续的 Western Blotting 检测。

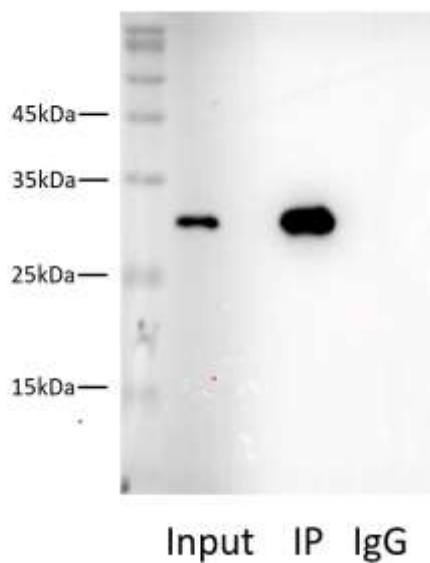
(三) Western Blotting 检测 HA 标签蛋白质

- 1) 电转结束后, 取膜置于膜处理液中 1 分钟, 取出, 室温平衡 30 分钟。
- 2) 用抗体稀释液稀释 HA-Tag Rabbit pAb 一抗, 稀释度 1:10000, 加在膜上, 37°C 摇床孵育 1 小时。
- 3) 摇床内用 PBST 洗膜, 4 次 x 5 mins。
- 4) 用抗体稀释液稀释 HRP 标记的羊抗兔二抗, 稀释度 1:10000, 加在膜上, 37°C 摇床孵育 1 小时。
- 5) 摇床内用 PBST 洗膜, 4 次 x 5 mins。
- 6) 将膜平摆在一干净平面上, 取等体积的 ECL 液 A 和 ECL 液 B 混合后均匀地加到膜上, 避强光反应 1min, 取膜, 弃去 ECL 液置于暗盒中显影。可根据背景, 目的条带的强度选择不同的曝光时间。

五. 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) |
| 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) |
| PBST | PBS 溶液中加入 0.2% Tween-20 |
| 膜处理液 | 甲醇 |
| 抗体稀释液 | PBST + 5% 脱脂奶粉 |



Western Blotting of HA-Tag-fused GFP by Anti-HA
FAST IP kit.

Exposure time: 5 Sec.