



Anti-HA Affinity Beads

Anti-HA亲和纯化凝胶

Cat. No. CW8304

产品简介

HA标签是人流感血凝素的第98-106氨基酸序列YPYDVPDYA，对外源靶蛋白的空间结构影响小，容易构建成标签蛋白融合到N端或者C端，因此常被用于重组蛋白的融合表达。Anti-HA Affinity Beads以4%琼脂糖凝胶为基质，杂蛋白非特异性结合少，可用于HA标签融合蛋白的纯化和免疫沉淀（IP）。

保存条件：

2-8°C保存

产品内容

Component	CW8304S 2 mL
Anti- HA Affinity Beads	2 mL

产品参数

项目	性能
基质	4%琼脂糖凝胶
配体	Anti-HA 鼠单克隆抗体
综合能力	>1 mg HA标签蛋白/mL 介质
粒径	45-165 μm
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	0.02%叠氮化钠, 1×PBS

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. 使用前一定要充分颠倒若干次, 使琼脂糖珠混合均匀。
3. 本产品仅限科研使用。

操作流程

1. 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用0.22 μm 或0.45 μm 滤膜过滤。

平衡液: 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.4

洗杂液: 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.05%Tween-20, pH7.4

化学洗脱液: 0.1 M glycine HCl, pH2.0-2.8或3 M NaSCN或者50 mM NaOH

竞争性洗脱液: 50 mMTris, 0.15 MNaCl, 100-500 μg HA多肽/mL, pH7.4

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.5

三种化学洗脱方法的比较

溶液	优点	缺点
0.1 M glycine HCl, pH2.0-2.8	如果目的蛋白在低pH下稳定, 不会破坏填料结合能力	洗脱效率低 蛋白可能变性
3 M NaSCN	洗脱效率高, 不会破坏填料结合能力	蛋白可能变性
50 mM NaOH	洗脱效率高	蛋白可能变性 减少填料使用寿命

2. 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和pH值, 可以用平衡液对样品或细胞培养液稀释, 或者用平衡液透析。

样品在上样前建议离心或用0.22 μm 或0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

3. 样品纯化

3.1 柱层析

1) 将Anti-HA Affinity Beads装入合适的层析柱, 用5倍柱体积的平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下。

2) 将样品加到平衡好的Anti-HA Affinity Beads中, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。

3) 用10-20倍柱体积的洗杂液进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。

4) a. 酸性洗脱: 使用5倍柱体积的酸性洗脱液洗脱, 向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液, 调节pH值至7.0-8.0, 分管收集。

注意: 酸性洗脱后填料要立即用平衡液平衡, Anti-HA Affinity Beads在洗脱液中不要超过20 min。

b. 竞争性洗脱: 使用5倍柱体积的竞争性洗脱液洗脱。分管收集。

c. 化学洗脱: 使用5倍柱体积的化学洗脱液洗脱, 分管收集。

注意: 化学洗脱后填料要立即用平衡液平衡, Anti-HA Affinity Beads在洗脱液中不要超过20min。

5) 使用3倍柱体积的化学洗脱液(甘氨酸洗脱液)再生, 然后用平衡液平衡至中性。

6) 保存在含0.02%叠氮化钠的PBS溶液中, 2-8°C保存。

3.2 静态吸附

1) 填料准备: 取适量的Anti-HA Affinity Beads加入层析柱中, 流干保护液。加入5倍柱体积的平衡液清洗。

2) 加入样品溶液, 4°C或室温震荡孵育至少30 min(不能磁力搅拌), 确保填料与样品溶液充分混合。

3) 孵育完毕后, 将填料混合液离心(5000×g离心1 min)或过滤收集填料。

4) 将填料装入层析柱中, 用平衡液清洗直至紫外稳定。

5) 用酸性洗脱液或竞争性洗脱液洗脱, 参考3.1中4)。

6) 填料再生和保存参考3.1中5)和6)。

3.3 免疫沉淀操作流程

1) 填料准备: 取40 μL的Anti-HA Affinity Beads(柱体积20 μL)混合液加入到2 mL离心管中, 5000×g离心1 min, 吸弃上清。

2) 填料加入0.5 mL平衡液, 悬浮填料(使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用), 5000×g离心1 min, 吸弃上清。重复一次。

3) 加入200-1000 μL样品裂解液到处理好的填料中, 混合均匀, 在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管, 促使样品和填料充分接触并吸附, 室温至少1 h。5000×g离心1 min, 吸弃上清。

4) 洗杂: 加入0.5 mL的洗杂液, 悬浮填料, 轻轻混匀, 5000×g离心1 min, 吸弃上清。再重复三次。确保去除非特异性吸附。

5) 样品洗脱: 可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

a. 化学洗脱

加入100 μL化学洗脱液(0.1 M glycine HCl, pH2.0-2.8, 3 M NaSCN或者50 mM NaOH), 悬浮填料, 室温孵育5 min, 5000×g离心1 min。小心取出上清, 不要吸到填料, 用中和液中和。洗脱样品放置4°C, 长时间放置-20°C保存。

b. 竞争性洗脱

加入100 μ L竞争性洗脱液洗脱。室温孵育30 min,5000 \times 离心1 min。小心取出上清,不要吸到填料。洗脱样品放置4 $^{\circ}$ C,长时间放置-20 $^{\circ}$ C保存。

c. 变性洗脱

实验室常规蛋白上样缓冲液(Loading Buffer)中含有 β -巯基乙醇和DTT,可以使填料中抗体重链和轻链断开。含有SDS的样品缓冲液可以使Anti-HA抗体变性,洗脱后的Anti-HA Affinity Beads没办法重复使用。

每管中加入20 μ L 2 \times Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C加热5 min。5000 \times 离心1 min,吸取上清SDS-PAGE电泳检测。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
流穿中有目的蛋白	过载	减少上样体积或增加磁珠体积
	结合时间太短	延长样品和磁珠的结合时间
	标签未暴露	可以加入低浓度的变性剂,上样前透析
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行透析
洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品 低温操作 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂
	样品中无标签融合蛋白	纯化前Western检测是否有c-Myc标签融合蛋白
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量 增加上样量 减少NaCl浓度
背景太杂	非特异性吸附	减少上样量
	洗杂不充分	增加洗杂次数,每次清洗孵育5-10min 增加洗杂液中盐离子浓度