Anti-HA Affinity Beads

目录

1. 产品介绍.....1
2. 试剂准备.....1
3. 样品纯化.....1
4. 问题及解决方案.....2
5. 订购信息及相关产品.....3

1. 产品介绍

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）。

表 1. Anti-HA Affinity Beads 产品性能

指标	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	Anti-HA 鼠单克隆抗体
配体密度	>1 mg HA 标签蛋白/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大耐受压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	0.02%叠氮化钠，1×PBS
储存温度	2 - 8℃

2. 试剂准备

2.1 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。

2.2 缓冲液的准备

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：0.1M glycine HCl，pH2.0-2.8 或 3 M NaSCN 或者 50 mM NaOH
竞争性洗脱液：50 mM Tris，0.15 M NaCl，100-500 μg HA 多肽/ml，pH7.4
中和液：1 M Tris-HCl，pH8.5

表 2. 化学洗脱方法的优缺点

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

3. 样品纯化

3.1 柱层析

1）将 **Anti- HA Affinity Beads** 装入合适的层析柱，层析用 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 化学洗脱：**使用 5 倍柱体积的化学洗脱液洗脱，如果是甘氨酸溶液洗脱，收集管中预先加好中和液，加入量 10-20 μl 中和液/ml 洗脱液，分管收集。

注：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 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。

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) 然后保存在含有 0.02%叠氮化钠的 PBS 溶液中，2-8℃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℃或室温震荡孵育 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) 用化学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 20μl)混合液加入到 1.5 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，吸取上清，留样检测。

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 的化学洗脱液（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℃，长时间放置-20℃保存。

B:竞争性洗脱

加入 100μl 竞争性洗脱液洗脱。室温孵育 30 min, 5000×g 离心 1 min。小心取出上清，不要吸到填料，重复洗脱 1-2 次。洗脱样品放置 4℃，长时间放置-20℃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 20μl 2× Loading Buffer，95℃加热 5min。5000×g 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	填料过载	减少上样体积或增加填料体积。
	结合时间太短	延长样品和填料的结合时间。
	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HA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5-10 min。 增加洗杂液中盐离子浓度。

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Anti-DYKDDDDK Affinity Beads	SA042001	1 ml
	SA042005	5 ml
	SA042025	25 ml
	SA042100	100 ml
	SA042500	500 ml
	SA04201L	1 L
Anti-HA Affinity Beads	SA068001	1 ml
	SA068005	5 ml
	SA068025	25 ml
	SA068100	100 ml
	SA068500	500 ml
	SA06801L	1 L
Anti-c-Myc Affinity Beads	SA065001	1 ml
	SA065005	5 ml
	SA065025	25 ml
	SA065100	100 ml
	SA065500	500 ml
	SA06501L	1 L
Anti-GFP Affinity Beads 4FF	SA070001	1 ml
	SA070005	5 ml
	SA070025	25 ml
	SA070100	100 ml
	SA070500	500 ml
	SA07001L	1 L
Anti-YFP Affinity Beads 4FF	SA075001	1 ml
	SA075005	5 ml
	SA075025	25 ml
	SA075100	100 ml
	SA075500	500 ml
	SA07501L	1 L
Anti-RFP Affinity Beads 4FF	SA072001	1 ml
	SA072005	5 ml
	SA072025	25 ml
	SA072100	100 ml
	SA072500	500 ml
	SA07201L	1 L