

HA 标签亲和层析介质

Anti-HA Affinity Beads

货号	规格
BDTL0046-1	1ml
BDTL0046-5	5ml

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。HA 标签亲和层析介质以 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）。主要性能见下表。

表 1.HA 标签亲和层析介质性能表

性能	指标
基质	4%琼脂糖凝胶
配体	Anti-HA 鼠单克隆抗体
配体密度	>1mg anti-HA antibody/ml 介质
粒径 (μm)	45-165
最大耐受压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	1XPBS ,防腐剂
储存温度	2-8℃

2. 纯化流程

2.1 Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤。

平衡 Buffer: 10mM Tris,0.15M NaCl, pH7.4

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

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

温和洗脱液: 50mM Tris,0.15M NaCl, 100-500ug HA 多肽/ml , pH7.4

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.5

表 2. 化学洗脱方法的优缺点

溶液	优点	缺点
0.1M 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
3M NaSCN	洗脱效率高, 不会破坏填料结合能力	蛋白可能变性
50mM NaOH	洗脱效率高	蛋白可能变性 减少填料使用寿命

2.2 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 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3 样品纯化

1. 将 Anti- HA 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 倍柱体积的洗脱液, 如果是甘氨酸溶液洗脱, 收集管中预先加好中和液 10-20 μ l 中和液/ml 洗脱液, 分管收集。

注: 化学洗脱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。

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 度保存。

2.4 静态吸附

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。

- 1.加入样品溶液，4 度或室温震荡孵育 30min(不能磁力搅拌)，确保填料与样品溶液充分混合。
- 2.孵育完毕后，将填料混合液离心（5000× g 离心 1min）或过滤收集填料。
- 3.将填料装入层析柱中，用平衡液清洗直至紫外稳定。
- 4.用洗脱液或竞争性洗脱液洗脱，参考 2.3 中 4。
- 5.填料再生和保存参考 2.3 中 5 和 6。

2.5 免疫共沉淀操作流程

- 1.填料准备：取 40 μ l 的 Anti-HA Affinity Beads （柱体积 20 μ l）混合液加入到 1.5ml 离心管中，5000Xg 离心 1 分钟，吸弃上清。
- 2.填料加入 0.5ml 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 分钟，吸弃上清。重复一次。
- 3.加入 200-1000 μ l 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 小时。5000×g 离心 1 分钟，吸取上清，留样检测。
- 4.洗杂：加入 0.5ml 的洗杂液，悬浮填料，轻轻混匀，5000×g 离心 1 分钟。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 μ l 的洗脱液（0.1M glycine HCl, pH2.0-2.8, 3M NaSCN 或者 50mM NaOH），悬浮填料，室温孵育 5min。5000×g 离心 1 分钟。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 度，长时间放置-20 度保存。

B:竞争性洗脱 加入 100 μ l 竞争性洗脱液洗脱。室温孵育 30min, 5000×g 离心 1min。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 度，长时间放置-20 度保存。

C:变性洗脱 样品缓冲液中含有 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 $\times$ 样品缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 加热 5min。5000 $\times$ g 离心 1min, 吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测。

3. 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 5-10min 增加洗杂液盐离子浓度