

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## **Anti-His 标签 (HHHHHH) 快速免疫沉淀套装**

### **Anti-His(HHHHHH)-tag FAST IP Kit**

产品货号: EA-IP-K004

产品规格: 50 Tests

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [techsupport@elabscience.cn](mailto:techsupport@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 背景信息

Anti-His 标签 (HHHHHH) 快速免疫沉淀套装, 由 Anti-His 亲和凝胶, Mouse IgG 亲和凝胶, His-Tag Rabbit pAb 和 HRP 标记的羊抗兔二抗, 这四个组分组成, 用于快速、高效、特异的 His 标签融合蛋白的免疫 (共) 沉淀。

Anti-His 亲和凝胶, 由高品质的 His-Tag Mouse mAb 与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量, 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; His-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 His-Tag Rabbit pAb, 与小鼠单抗的重链轻链没有交叉反应。四个组分均经严格质检, 可单独使用; 四者组合的套装则具有快速, 简便, 无干扰条带的优点。

## 性能指标

### 1. 应用范围:

His 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀。

His 标签可以位于蛋白的 N 端, C 端或中间, 如 N 端 His 融合蛋白 (His-Protein)、C 端 His 融合蛋白 (Protein-His) 和 Met 修饰的 N 端 His 融合蛋白 (Met-His-Protein)。

### 2. 抗体属性:

His-Tag Mouse mAb: 小鼠 IgG2a 亚型; His-Tag Rabbit pAb: 兔 IgG。

### 3. 凝胶属性:

琼脂糖凝胶颗粒, 平均粒径 100 $\mu$ m。

### 4. 凝胶载量:

0.5mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒, 共价偶联 4mg Anti-His 小鼠单克隆抗体。可纯化或沉淀至少 0.6mg His 融合蛋白。

## 产品组分

组分名称	组分编号	规格/浓度	保存方法
细胞裂解液 Lysis buffer	L1	30mL	4°C, 12 个月
Anti-His 标签亲和凝胶 Anti-HHHHHH Affinity Agarose	G1	2mL (0.5mL/mL) *	-20°C, 12 个月
Mouse IgG 亲和凝胶 Mouse IgG affinity agarose	G2	2mL (0.5mL/mL) *	-20°C, 12 个月
His-Tag Rabbit pAb	E1	100µg (1mg/mL) *	-20°C, 12 个月
HRP 标记的羊抗兔二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(peroxidase/HRP conjugated)	E2	100µg (1mg/mL) *	-20°C, 12 个月
说明书一份			

\*注释: 缓冲液为含有 50%甘油的 PBS。

## 注意事项

### 1. 运输和保存:

本试剂盒在冷藏条件下运输。

收货后, 如果暂时不用, 请将裂解液取出, 于 4°C 保存; 试剂盒其余组分保存于 -20°C。

### 2. 凝胶悬液与亲和凝胶

本试剂盒以凝胶悬液形式提供亲和凝胶, 凝胶悬液中亲和凝胶的含量为 50%, 使用前先温和重悬凝胶悬液, 然后按照需求取用。

例如: 2mL 凝胶悬液中, 含有 1mL 亲和凝胶。

## 自备试剂

### 1. 抗体稀释液

1×PBST 配制终浓度为 5%的脱脂奶粉。现用现配。

### 2. 1×PBST

按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBST 稀释待用。例如：1mL 10×PBST 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBST。现用现配。

### 3. 1×PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBS 稀释待用。例如：1mL 10×PBS 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBST。现用现配。

### 4. 化学发光显影液（ECL）

化学发光底物 ECL 液 A 和 ECL 液 B 按照 1:1 比例等体积混匀。现用现配。

## 使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。

### 1. 细胞裂解液制备

#### 1) 收集细胞

悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

#### 2) 用预冷至 4°C 的 1×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，反复吹打后冰上放置 10-20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约  $0.5\sim 1\times 10^7$  个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

#### 4) 用超声破碎仪处理细胞裂解液，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。取上清即为蛋白样本。建议立即进行下一步实验，若时间不允许，置于 -80°C 保存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

#### 5) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。

### 2. 免疫（共）沉淀 His 标签的蛋白

#### 1) 实验组亲和凝胶预处理。温和重悬 Anti-His 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 40μL 凝胶悬液（约含 20μL 亲和凝胶）至离心管中。加入 10 倍凝胶体积（约 200μL）的 1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。

- 2) 对照组亲和凝胶预处理。温和重悬 Mouse IgG 亲和凝胶，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 40 $\mu$ L 凝胶悬液（约含 20 $\mu$ L 亲和凝胶）至离心管中。加入 10 倍凝胶体积（约 200 $\mu$ L）的 1 $\times$ PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。

**注：以下步骤在对照组和实验组中同步进行。**

- 3) 加入 50-200 $\mu$ L 含有目标蛋白的蛋白样本溶液，室温摇床孵育 2h 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 4) 加入 10 倍凝胶体积（约 200 $\mu$ L）的 1 $\times$ PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。
- 5) 加入预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 5 倍凝胶体积（约 100 $\mu$ L）的 PBST 预洗液洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。5000rpm 离心 30sec，弃上清。
- 6) 加入 4 $\mu$ L 5 $\times$ 上样缓冲液，煮沸 5min，冷却至室温并离心。
- 7) 取上清进行 SDS-PAGE 实验，以备后续的 Western Blotting 检测。

### 3. Western Blotting 检测 His 标签蛋白质

- 1) 用 WB 转膜仪将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转移到膜上。
- 2) 电转结束后，取膜置于膜处理液中 1min，取出，室温平衡 30min。
- 3) 加适量抗体稀释液封闭膜上的非特异性结合位点，完全覆盖膜即可，37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1h。
- 4) 用抗体稀释液稀释 His-Tag Rabbit pAb 一抗，稀释度 1:10000，加在膜上，保证完全覆盖膜，37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1h。
- 5) 用 PBST 洗膜，37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 5min，此步骤重复 4 次。
- 6) 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，保证完全覆盖膜，37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1h。
- 7) 用 PBST 洗膜，37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 5min，此步骤重复 4 次。
- 8) 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，避光反应 1min。
- 9) 将膜取出，弃去 ECL 液，置于暗盒中显影。可根据背景和目的条带的强度，选择不同的曝光时间。

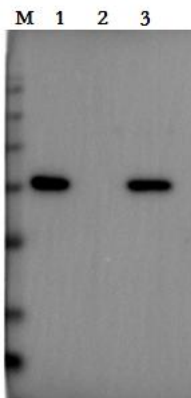


图1 Anti-His (HHHHHH) 亲和凝胶免疫沉淀效果图。

泳道 M: Marker; 泳道 1: 实验组; 泳道 2: 阴性对照组; 泳道 3: Input 组

## 声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白共沉淀或者后续 IP 实验结果。
4. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同目标蛋白的性质，优化实验条件，选择最合适的实验方案。