

Anti-His (HHHHHH) 亲和凝胶

Catalog Number: EA-IP-008

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

性能指标

	His 标签融合蛋白的亲和纯化及免疫（共）沉淀等。
应用范围	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）。
抗体属性	仅适用于分泌蛋白的亲和纯化。
凝胶属性	His-Tag Mouse mAb：小鼠 IgG。
凝胶载量	琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100~200 μm。
主要成分	1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联 6mg 小鼠来源的 IgG。
	1mL 亲和凝胶可纯化或沉淀至少 1.2mg His 融合蛋白。
	1mL Anti-His 亲和凝胶，保存于 1mL 含防腐剂和 50% 甘油的 PBS 中。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品为凝胶悬液形式，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。
4. IP-WB 样品现配现用，避免影响实验结果。
5. 勿干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，勿使酸处理凝胶时间超过 10min。

使用方法

1. 目标蛋白样品制备

1) 血清及分泌表达目标蛋白样品处理

收集血清或培养基上清，检测目标蛋白浓度。如果目标蛋白质浓度较高，建议用 1×PBS 稀释至蛋白质终浓度为 10~100μg/mL，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 将悬浮细胞或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。
- b. 用预冷至4℃的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心3min，弃上清。重复 1 次。
- c. 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）。

- d. 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℃离心 10min。取上清，可立即进行下一步实验或置于-80℃冻存。

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。

2. 对照组设置（仅供参考，实验过程中请按实际需要调整）

1) 阴性对照

- a. 抗体的阴性对照：以凝胶偶联Mouse IgG 亚型标签抗体为例，选择Mouse IgG 亲和凝胶（货号：IP100）做为抗体的阴性对照，使用方法与凝胶偶联抗体相同。
- b. 蛋白的阴性对照：使用不表达靶蛋白 X 但表达无关蛋白 Y 的蛋白样品做对照，处理方法与待对照靶蛋白相同。

2) 阳性对照

- a. 以稀释至 10~100μg/mL 未添加磁珠凝胶偶联抗体处理的蛋白样品作为阳性对照，即Input 组。上样缓冲液制备方法与实验组相同。

3. 免疫（共）沉淀法检测 His 标签蛋白质

- a. 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

For Research Use Only

- 入5 倍凝胶体积（约 100 μ 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。
- b. 加入 50-200 μ L 含有目标蛋白的样本溶液，室温摇床孵育2h 或者4 $^{\circ}$ C孵育过夜。
- c. 加入 10 倍凝胶体积（约200 μ 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。
- d. 加入预冷至4 $^{\circ}$ C的5 倍凝胶体积（约 100 μ 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。
- e. 加入20 μ L 1 $\times$ PBS 和5 μ L 5 $\times$ 上样缓冲液，煮沸5min，冷却至室温并离心。
- f. 取上清进行 SDS-PAGE 实验，以备后续的 Western Blotting 检测。

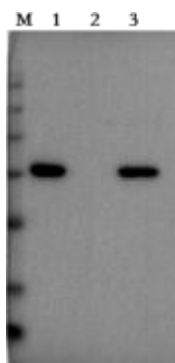


图 1 Anti-His (HHHHHH) 亲和凝胶免疫沉淀效果图。泳道 M: Marker; 泳道 1: 实验组; 泳道 2: 阴性对照组; 泳道 3: Input 组。

背景信息

Anti-His (HHHHHH) 亲和凝胶，由高品质的His 标签抗体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，可反复使用的特点，可用于亲和纯化、免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(Co-IP)等免疫沉淀相关实验。

储存方法

-20 $^{\circ}$ C可保存 12 个月。