

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

# **HA 标签 (YPYDVPDYA) 融合蛋白纯化试剂盒**

## **YPYDVPDYA -tagged Protein Purification Kit**

产品货号: EA-TP-K002

产品规格: 1 T

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

网址：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

HA-Tag (YPYDVPDYA)，常用于真核蛋白质重组表达标记。HA 标签 (YPYDVPDYA) 融合蛋白纯化试剂盒，主要成分是 Anti-HA 亲和纯化凝胶 (Anti-YPYDVPDYA (HA) Affinity Gel)，由高品质的 HA 单克隆抗体与 Sepharose 4B 琼脂糖颗粒共价偶联制成，具有高载量，高特异性，性质稳定，可反复使用的特点，可用于 HA 标签融合蛋白的亲和纯化。

## 性能指标

### 1. 应用范围:

HA 标签融合蛋白的亲纯化。

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

### 2. 凝胶属性:

琼脂糖凝胶颗粒, 平均粒径 50  $\mu\text{m}$ 。

### 3. 凝胶载量:

1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒, 共价偶联 6mg Anti-HA 单克隆抗体。

1mL 亲和凝胶可纯化至少 1.2mg HA 融合蛋白。

### 4. 凝胶强度:

可反复使用 5 次以上。

### 5. 主要成分:

1mL Anti-HA 亲和凝胶, 保存于 1mL 含防腐剂和 50%甘油的 PBS 中。

## 产品组分

| 组分名称                                                  | 组分编号 | 规格      | 保存方法       |
|-------------------------------------------------------|------|---------|------------|
| 纯化柱<br>Purification column                            | C    | 6mL*1 个 | 室温，12 个月   |
| Anti-HA 亲和凝胶<br>Anti-HA（YPYDVPDYA）Affinity<br>Agarose | G1   | 2mL     | -20℃，12 个月 |
| 细胞裂解液<br>Lysis buffer                                 | L1   | 50mL    | 4℃，12 个月   |
| 酸性预洗液<br>Acid prewashing buffer                       | E1   | 25mL    | 4℃，12 个月   |
| HA peptide                                            | E2   | 10mg    | 4℃，12 个月   |
| 酸性洗脱液<br>Acid elution buffer                          | E3   | 25mL    | 4℃，12 个月   |
| 中和液<br>Neutralizing buffer                            | N1   | 25mL    | 4℃，12 个月   |
| PBS Buffer, pH7.4 (10×)                               | P10  | 50mL    | 4℃，12 个月   |
| 说明书一份                                                 |      |         |            |

## 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, 请将纯化柱 **C** 取出, 室温保存; Anti-HA 亲和凝胶 **G1** 保存于 -20°C; 试剂盒其余组分保存于 4°C。

### 2. 安全防护:

本试剂盒中的酸性洗脱液对皮肤有刺激性, 实验全程请注意佩戴手套等个人防护用具。

### 3. 试剂使用建议:

P10 (PBS Buffer, pH7.4 (10×)), 需要用去离子水稀释至 1xPBS 使用。

亲和凝胶 **G1**, 使用之后需保存在凝胶保存液中, -20°C 保存。

### 4. 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。

### 5. 酸性洗脱液选择:

有文献显示, 与传统的 Glycine-HCL 洗脱液相比, 本试剂盒提供的 pH 3.0 的 Arginine-HCL 做为洗脱液, 可以减少蛋白质变性, 延长亲和凝胶的使用寿命。您也可以根据实际情况自行选用酸性洗脱液。

## 试剂配制

### 1. 竞争性洗脱液

HA E2 为轻质粉末，开盖前需要离心。建议先将 1mL 1xPBS 加至 10mg 多肽粉末中，彻底溶解后，制成 10mg/mL 储存液，-20℃保存。使用时用 1xPBS 稀释至需要的工作浓度。

注：建议工作浓度为 2mg/mL-5mg/mL。您也可以根据目标蛋白质的性质，调整工作浓度，一般来说，多肽浓度越高，洗脱能力越强。

### 2. 1×PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 P10(PBS Buffer, pH7.4 (10×))稀释待用，例如：1mL P10 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1×PBS。现用现配。

### 3. 凝胶保存液

按照 1:1 的比例用甘油与 1xPBS 混匀待用。现用现配。

注：建议在凝胶保存液中添加一定浓度的防腐剂，防止细菌滋生。

## 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。以下试剂使用量以 1mL 凝胶体积计算，您也可以根据具体凝胶用量，按比例调整相应试剂用量。

### 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 1xPBS 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 **L1**，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，您可以酌情添加蛋白酶抑制剂。

#### 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。

#### 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. 装柱及孵育

#### 1) 温和重悬 Anti-HA 亲和凝胶 **G1**，混合均匀，用剪去末端的枪头吸取 2mL 凝胶悬液至纯化柱 **C** 中。

#### 2) 待液体流尽后，向凝胶柱中加入 10 倍凝胶体积的 1xPBS，清洗亲和凝胶。

#### 3) 待液体流尽后，加入含有目标蛋白的真核细胞裂解液。用管帽和堵头密封纯化柱，密封过程中，请先将管帽插入纯化柱上端，然后翻

转纯化柱，使得排液口朝上，轻轻敲击管壁，让柱中气泡上浮，推动管帽，使气体排出纯化柱，最后用堵头密封排液口。检查密封好的纯化柱，保证无漏液，4℃摇床过夜孵育。

- 4) 收集细胞裂解液，暂时保存于4℃，用于可能的再次纯化。
- 5) 待细胞裂解液流尽后，加入5倍凝胶体积的1xPBS，清洗结合了目标蛋白的亲凝胶。此步骤重复3次。
- 6) 根据蛋白质性质选择竞争洗脱或酸性洗脱，具体方法可参见[问题与建议](#)部分。
- 7) 如果目标蛋白较多，可用再生后的亲和凝胶再次纯化步骤4)中收集的细胞裂解液。多次纯化，可提高目标蛋白的得率。

### 3. 竞争洗脱

- 1) 用1xPBS配制HA peptide竞争性洗脱液，终浓度为2mg/mL，也可根据具体情况自行调整工作浓度([见试剂配制部分](#))。
- 2) 待纯化柱中的1xPBS流尽后，加入预冷的5倍凝胶体积的酸性预洗液E1，洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。
- 3) 待纯化柱中的酸性预洗液E1流尽后，加入2倍凝胶体积的HA peptide竞争性洗脱液。按照上一节描述的方法，用管帽和堵头密封纯化柱，保证无漏液，轻柔混匀，4℃摇床孵育2h，收集洗脱液。如有必要，可以再次加入2倍凝胶体积的HA peptide竞争性洗脱液，重复洗脱一次。

**注：为了提高蛋白得率，可延长孵育时间。**

- 4) SDS-PAGE鉴定蛋白质纯度，并按照需求处理和保存蛋白质。

### 4. 酸性洗脱

- 1) 准备至少10支2mL洗脱液收集管，每管加入50μL中和液N1。
- 2) 待纯化柱中的1xPBS流尽后，加入预冷的5倍凝胶体积的酸性预洗液E1，洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。



- 3) 待纯化柱中的酸性预洗液 E1 流尽后, 加入 1mL 的酸性洗脱液 E3 进行洗脱, 用步骤 1) 中准备的洗脱液收集管收集洗脱液。重复此步骤 10 次, 得到 10 支 1mL 的洗脱液。

注: 酸性环境放置太久会缩短亲和凝胶的使用寿命, 应尽量缩短亲和凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。

- 4) 合并收集到的洗脱液。

注: 如果目标蛋白浓度较低, 可以通过浓缩收集液提高目标蛋白浓度。

- 5) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

## 5. 亲和凝胶的清洗与再生

注: 洗脱后须立即进行亲和凝胶的清洗与再生。

- 1) 10 倍凝胶体积的 1xPBS 清洗亲和凝胶。
- 2) 3 倍凝胶体积的酸性洗脱液 E3 洗涤亲和凝胶。
- 3) 3 倍凝胶体积的 1xPBS 洗涤亲和凝胶 3 次。
- 4) 检测流穿液 pH, 如为中性, 则进行下一步; 如仍为酸性, 则重复步骤 3)。
- 5) 用 1xPBS(含 50%甘油, 0.2%叠氮钠)清洗亲和凝胶, 留适当体积, 混合均匀, 保存在-20℃。

## 问题与建议

### 1. 如何选择竞争性洗脱和酸性洗脱？

#### 1) 竞争性洗脱

竞争性洗脱，是通过 HA peptide 与蛋白质上的 HA 标签竞争亲和凝胶上的抗体，使蛋白质与抗体的结合被取代而脱离亲和凝胶，从而被洗脱下来。这种洗脱方式的特点有：

- a) 洗脱条件温和，一般不会造成蛋白质变性；有利于亲和凝胶的保存和反复使用。
- b) 由于亲和吸附达到平衡比较慢，所以往往需要较长的时间。
- c) 较小的洗脱体积。
- d) 特异性强，可以进一步消除非特异性吸附的影响，从而得到较高纯度的目标蛋白。基本上不会 anti-HA 的抗体被洗脱下来。

#### 2) 酸性洗脱

- a) 成本低廉。
- b) 纯化速度较快。
- c) 酸性 pH 会造成部分蛋白质变性，引起目的蛋白质沉淀，降解或失活。
- d) 有时会有少部分 Anti-HA 抗体被洗脱，造成非特异性信号。
- e) 反复使用酸性洗脱，会造成抗体脱落，也会破坏亲和凝胶的理化性质，减少亲和凝胶的使用次数。

## 2. 常见的蛋白质的后续处理方法有哪些？

### 1) 透析与超滤

透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。超滤法是利用高压或离心,强使水和其他小的溶质分子通过半透膜而蛋白留在超滤管内。两者都可以达到换液的目的。使用时需注意选择正确分子量的透析袋和超滤管。

### 2) 过滤除菌

可采用微孔滤膜滤器操作,让蛋白质溶液通过 0.22 $\mu$ m 的滤膜,即可达到除菌的目的。

### 3) 蛋白质定量检测

BCA 法检测蛋白浓度; SDS-page 检测蛋白纯度。

### 4) 蛋白质理化性能检测

蛋白质免疫印迹 (Western Blot, WB) 和免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 检测蛋白的结合活性; 质谱法 (Mass Spectrometry, MS) 检测蛋白结构。

## 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纯化或者后续 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，对孵育时间，竞争洗脱液的终浓度以及洗脱次数等条件进行优化，选择最合适的实验方案。