

HA-Nanoab-Agarose

货号: HNA

储存条件: -20℃保存, -80℃长期保存, 避免反复冻融。

产品描述

偶联 anti-HA-tag 纳米抗体的琼脂糖珠子用于免疫沉淀 HA-tag (YPYDVPDYA) 融合蛋白。

产品优势

- 没有普通抗体的轻链和重链, 背景干净;
- 即用型, 节约时间;
- 高亲和力, 高载量。

应用范围

可用于免疫沉淀 (IP) / 免疫共沉淀 (CoIP)、染色质免疫沉淀 (ChIP) / RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)、酶活性测定、质谱分析等。

特异性

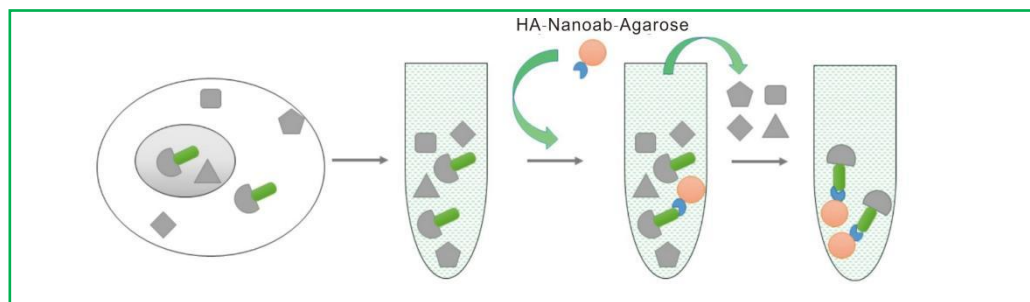
特异性结合位于融合蛋白 N-端、C-端及内部的 HA-tag。

产品特性

存储缓冲液: PBS(含有 20%乙醇)。

保存条件: 可在 4℃保存 1 年(确保完全密封), 或在 -80℃长期保存, 避免反复冻融。

实验原理



实验步骤:

植物组织裂解处理:

取适量植物组织样本 (叶片等) 放置于冷冻液氮中, 之后将冷冻后得植物组织样本放于研钵进行研磨, 尽可能充分研磨破坏其细胞壁。加入 500-1000ul RIPA 裂解液 (已加蛋白酶抑制剂 PMSF 等) 进行裂解, 为了提高裂解效率, 加入 200ul 玻璃粉充分震荡 30min, 裂解完成后 12000 rpm, 离心 30min, 吸取上清 置新的离心管中, 弃去沉淀。

收集细胞

每个免疫沉淀反应大约使用 10^6 - 10^7 个表达 HA-tag 融合蛋白的细胞, 可根据 HA-tag 融合蛋白表达量适当调整细胞数。吸出培养基, 向培养皿中加入预冷的 $1 \times$ PBS, 漂洗 2 次, 利用细胞刮或胰酶消化收集贴壁细胞, 细胞转移到离心管, 500g 离心 3 分钟并丢弃上清液。

细胞裂解

1. 在裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂, 用 500μl 预冷的裂解缓冲液重悬细胞。
2. 置于冰上 30 分钟, 可每 10 分钟充分吹打一次。



3. 4°C, 20,000g 离心 15 分钟, 将裂解产物 (上清) 转移到一个新的预冷管中, 丢弃沉淀。注意: 此时细胞裂解产物可长期保存于-80°C。

平衡珠子

4. 充分混匀 HA-Nanoab-Agarose, 吸取 20μl 该产品到 500μl 预冷的裂解缓冲液中, 4°C, 2,500g 离心 30 秒, 丢弃上清液。(此步骤可选)

结合蛋白

5. 将平衡好的 HA-Nanoab-Agarose 加入到细胞裂解产物中 (如果未做第 4 步, 可在细胞裂解产物中直接加入 20μl 该产品), 于 4°C 旋转混合结合 1 小时。根据实验需要可调整结合时间。如果需要, 留存 50μl 的裂解产物进行免疫印迹分析。

6. 4°C, 2,500g 离心 30 秒, 丢弃上清液。如果需要, 留存 50μl 上清液进行免疫印迹分析。

清洗珠子

7. 用 500μl 预冷的裂解缓冲液中重悬 6 中的 HA-Nanoab-Agarose, 4°C, 2,500g 条件下离心 30 秒, 丢弃上清液并重复清洗 3 次。尽量减少清洗时间。

洗脱蛋白

方法一:

8. 加入 20μl 2×SDS-sample buffer 重悬 HA-Nanoab-Agarose。95°C, 加热 10min 充分变性, 2,500g 离心 30 秒收集上清, 收集的产物可进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。

方法二:

9. 加入 50μl 0.2 M pH2.5 的甘氨酸洗脱结合的蛋白, 孵育时间 30 秒, 期间不断混匀, 2,500g 离心 30 秒收集上清, 立即加入 5μl 1.0 M Tris(pH10.4) 以中和酸性的甘氨酸。注意: 为了提高洗脱效率可以重复这一步。

可选实验方案

方案一:

如需进行 HA 融合酶的活性检测, 无需洗脱, 可以直接检测。

方案二:

如需进行染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验, 主要用于含有 HA 融合蛋白的蛋白质/DNA 相互作用的实验。染色质免疫沉淀一般包括细胞固定, 染色质断裂, 染色质免疫沉淀, 联反应的逆转, DNA 的纯化以及 DNA 的鉴定。其中前期细胞固定, 染色质断裂不变; 然后接着直接进入说明书的第 5 步, 加入细胞裂解产物后, DNA-蛋白质复合物结合到 HA-Nanoab-Agarose 上;

进入第 6 和 7 步, 分离得到复合物; 进入第 9 步, 得到洗脱的复合物; 后期交联反应的逆转, DNA 的纯化及 DNA 的鉴定等同于普通的 ChIP 实验。

RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 实验步骤同上。

方案三:

HA-Nanoab-Agarose 不仅可以用于在体内外检测和验证蛋白质之间的相互作用, 也可以结合质谱分析筛选与已知蛋白相互作用的未知蛋白。其操作步骤同免疫沉淀法, 得到洗脱的复合物后, 然后进行 SDS-PAGE 分析, 用考马斯亮蓝或者银染的方法染色后, 切下未知蛋白的条带, 用质谱技术鉴定未知蛋白。

