3320
Lot 015FA~

Printed July 14, 2026
Version 9.0

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

HA-tagged Protein PURIFICATION KIT

(MoAb. clone 5D8)

CODE No.3320

PURIFICATION to Maintain Protein Activity
from eukaryote cell lysate and culture supernatant

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL https://ruo.mbl.co.jp e-mail support@mbl.co.jp

Product Description

The ability to isolate and study a purified protein lies at the heart of modern biochemistry. Researchers in many fields require highly purified, active proteins for studies involving signaling pathways, enzymology, receptor binding, DNA binding, post-transcriptional modifications, and much more. Thus, choosing a method of purification is an important aspect in maintaining protein structure and function.

Recombinant tagged protein purification methods and kits are now widely recognized. The HA epitope tag, YPYDVPDYA, is derived from Human influenza hemagglutinin (HA) 98-106 a.a. This HA-tag is also commonly used in such as mammalian cell expression vectors.

MBL's HA-tagged Protein PURIFICATION KIT is designed for the isolation of HA-tagged protein from cell culture supernatants containing serum and cell lysate under neutral pH condition. Severe conditions such as acidic or alkaline elution denature protein structure. However, a neutral pH elution can preserve protein activity and native conformation. MBL has developed the Anti-HA-tag Beads to purify HA-tagged proteins quickly and efficiently. As the Beads can be used at neutral pH, the purified proteins can maintain the activity and conformation. The elution of HA-tagged proteins from the Beads is achieved by the addition of the HA peptide. As the HA peptide competes with HA-tagged proteins on the Beads, the purified proteins do not lose the protein activity. Using a Spin Column resulting in high efficiency has optimized the simple procedure of this kit.

Kit Components

Components sufficient for conducting 20 times purifications of HA-tagged protein.

1. Anti-HA-tag Beads	25% slurry: 100 μL beads in 400 μL total volume in PBS with 0.09% sodium azide as preservative ***Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush plenty of water when disposing materials containing azide into drain.**
2. Elution Peptide	HA peptide, 2 mg in 1 mL PBS after reconstitution
3. Spin Columns Sets	20 columns with pre-inserted bottom plugs and top caps
4. Wash Concentrate	10 x concentrate, 6 mL

Storage

Store for up to 1 year from date of receipt at 2-8°C. Do not freeze.

Product Capacity

The purification capacity of the Anti-HA-tag Beads varies depending upon the HA-tagged protein. For examples, 1 mL of anti-HA-tag Beads purified ≧ 0.45 mg of HA-tagged protein (32kDa).

Materials Required but not Provided

1. Micro centrifuge capable of 15,000 x g

2. Sampling tube (1.5 mL)
3. End-over-end rotator
4. PBS
5. Lysis buffer

   Suitable Lysis buffer varies with cell type.

   Note: see Additional Information

   Homemade Lysis buffer

20-50 mM	Tris-HCl, pH 7.5 or HEPES-KOH, pH 7.5
50-250 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1%	NP-40 or Triton X-100
	If necessary add Protease Inhibitor Cocktail.
	(e.g. SIGMA code P8340, PIERCE code 78415).

The descriptions of the following protocols are examples. Each user should determine the appropriate condition.

Protocols

The following protocols are for the isolation of HA-tagged proteins produced in a 100-mm cell culture dish. The expression level of the HA-tagged protein may vary. If necessary, adjust the volume of Anti-HA-tag Beads and Elution Peptide Solution proportionally.

Material Preparation

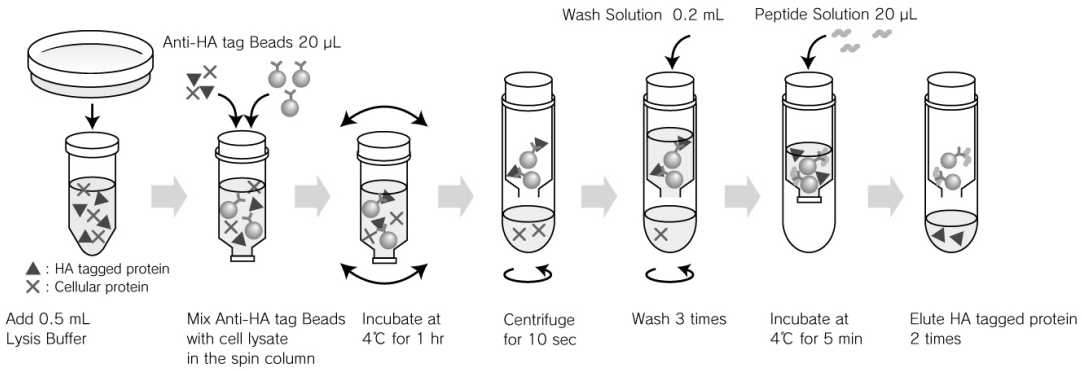
1. Wash Solution

   Dilute Wash Concentrate with 9 times its volume of distilled water.
   (e.g. Dilute 0.1 mL of Wash Concentrate with 0.9 mL of distilled water.)
   For each Spin Column, prepare 1 mL of Wash Solution.

2. Elution Peptide Solution

   Reconstitute the Elution Peptide with 1 mL of distilled water. If you want to store the reconstituted Elution Peptide, prepare appropriate aliquots (e.g. 45 µL x 20 tubes) and store at -20°C. Repeated freezing and thawing are not recommended.

Procedure Summary (Purification from mammalian cultured cell lysate)



A. Purification from mammalian cultured cell lysate

(HA-tagged protein is not secreted from the cells)

(Lysis of Mammalian or Insect Cells)

1. Detach the cells from the culture dish if necessary, and collect the cell suspension into the centrifuge tube.
2. Centrifuge the cell suspension at 400 x g for 5 minutes to pellet the cells. Carefully remove and discard the supernatant.
3. Wash cells by resuspending the cell pellet in ice-cold PBS.
4. Centrifuge the cell suspension at 400 x g for 5 minutes to pellet the cells. Carefully remove and discard the supernatant.
5. Add 0.5 mL of Lysis buffer to the cell pellet and vortex.
6. Sonicate the sample for 15 seconds.
7. Incubate the sample for 15 minutes on ice.
8. Remove cell debris by centrifugation at 15,000 x g for 5 minutes at 4°C.

(Purification of HA-tagged Protein)

9. Transfer the 0.5 mL of cell lysate (supernatant from step 8) to the Spin Column.
10. Resuspend the Anti-HA-tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispending. Don't vortex.
11. Dispense 20 µL Anti-HA-tag Beads suspension (5 µL Beads) into the Spin Column. Screw on the cap.
12. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C. If the Spin Column does not fit your end-over-end rotator, put it in a suitable tube (e.g. 15 mL centrifuge tube) that fits your end-over-end rotator.
13. Loosen the top cap on the column. Remove the bottom plug. Don't discard the bottom plug. Place the Spin Column in a sampling tube. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through (or save for future analysis).
14. Take off the top cap. Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube.

15. Add 0.2 mL of Wash Solution to each column. It is not necessary to stir the Spin Column. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through. Repeat this step two additional times.
16. Place the Spin Column in a new sampling tube.
17. For the first elution, screw the bottom plug on tightly. Add 20 µL Elution Peptide Solution to the Anti-HA-tag Beads, then screw the top cap on tightly. Tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at 4°C. Remove the top cap and bottom plug. Centrifuge for 10 seconds.
18. For the second elution, it is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Add 20 µL Elution Peptide Solution to the Anti-HA-tag Beads, then tap the tube gently several times. Incubate for 1 minute at 4°C. Centrifuge for 10 seconds.
    The two eluates (step 17 and 18) may be pooled in one sampling tube.

B. Purification from culture supernatant

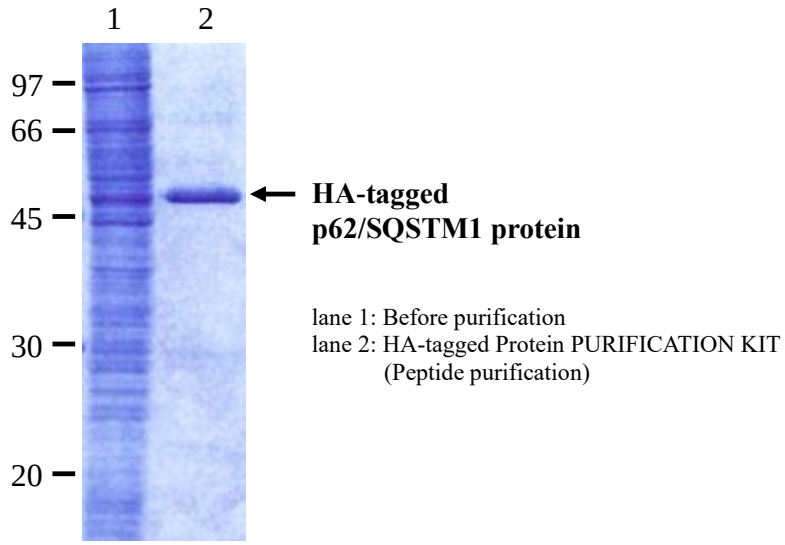
(HA-tagged protein is secreted into the culture supernatant)

1. Collect the culture supernatant from the cell culture dish into a 15 mL centrifuge tube.
2. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes to remove cell debris.
3. Transfer the supernatant to a new 15 mL centrifuge tube.
4. Resuspend the Anti-HA-tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispending. Don't vortex.
5. Dispense 20 µL Anti-HA-tag Beads suspension (5 µL beads) into the 15 mL centrifuge tube with culture supernatant. Screw on the cap.
6. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C.
7. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes. Discard the supernatant (or save for future analysis), but leave 100-400 µL supernatant above the Anti-HA-tag Beads.
8. Resuspend the Anti-HA-tag beads in the 100-400 µL supernatant by pipetting up and down several times.
9. Transfer the resuspended Anti-HA-tag Beads in 100-400 µL supernatant to the Spin Column.
10. Keep the top cap off. Remove the bottom plug. Don't discard the bottom plug. Place the Spin Column in a sampling tube. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through (or save for future analysis). Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube.
11. Add 0.2 mL of Wash Solution to each column. It is not necessary to stir the Spin Column. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through. Repeat this step two additional times.
12. Place the Spin Column in a new sampling tube.
13. For the first elution, screw the bottom plug on tightly. Add 20 µL Elution Peptide Solution to the Anti-HA-tag Beads, then screw the top cap on tightly. Tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at 4°C. Remove the top cap and bottom plug. Centrifuge for 10 seconds.
14. For the second elution, it is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Add 20 µL Elution Peptide Solution to the Anti-HA-tag Beads, then tap the tube gently several times. Incubate for 1 minute at 4°C. Centrifuge for 10 seconds. The two eluates (step 13 and 14) may be pooled in one sampling tube.

(**Note**: Steps 11-14 of this protocol are identical to steps 15-18 of the first protocol.)

Example of Purification Results 1

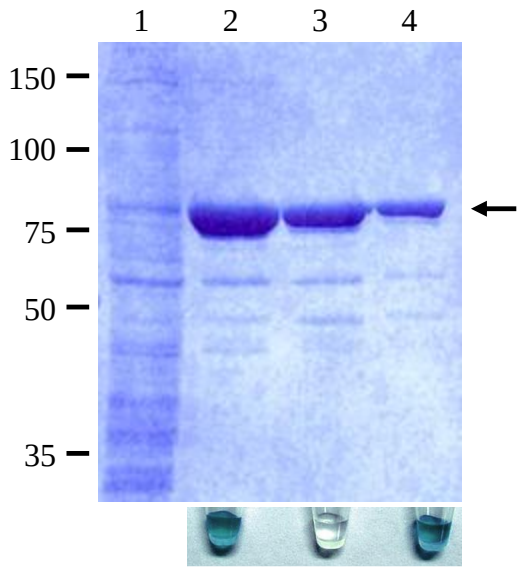
Purification of HA-tagged p62/SQSTM1 protein from cell lysate.



SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)
Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pCMV-HA-p62 and cultured for 60 hours. Cells were then lysed in the Lysis buffer (0.5 mL/100-mm dish) and purified according to the preceding protocol A.

Example of Purification Results 2

Purification and enzymatic activity of HA-tagged β-galactosidase



HA-tagged β-Galactosidase

lane 1: Before purification
lane 2: HA-tagged Protein PURIFICATION KIT (Peptide purification)
lane 3: Acid purification
lane 4: Alkali purification

X-gal staining

SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining) & X-gal staining
Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pcDNA-HA-β-galactosidase and cultured for 60 hours. Cells were then lysed in the Lysis buffer (0.5 mL/100-mm dish) and purified according to the preceding protocol A. For comparison, elution was carried out not only with peptide solution but also with acid solution and alkaline solution. Each purification was conducted with the same amount of Anti-HA-tag Beads (5 μL) and the same amount of elution solution (20 μL x 2 times and then pooled).

Peptide elution solution: neutral pH

0.1 M Glycine-HCl: pH 3.0 (Neutralize the elution immediately with 1 M Tris-HCl, pH 8.0)
(Acid elution solution)

0.1 M NH_3: pH 11.3 (Neutralize the elution immediately with 1 N acetic acid)
(Alkali elution solution)

Enzymatic activity of each purification was performed using standard X-gal staining method.

Additional Information

The “Yes” indicates the reagents can be used in the Lysis buffer for this kit up to the indicated concentration. The “No” indicates the reagents cannot be used in the Lysis buffer for this kit at the indicated concentration

Chaotropic agents			
	Urea	1 M	Yes
	Guanidine-HCl	1 M	No

Reducing agents			
	DTT	10 mM	Yes
	2-Mercaptoethanol	10 mM	Yes

Surfactants			
Nonionic	Tween-20	5%	Yes
	Triton X-100	5%	Yes
	NP-40	1%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-D-gulcoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.05%	No
	Sodium Deoxycholate	0.5%	Yes

Others			
	NaCl	1 M	Yes
	Glycerol	10%	Yes
	EDTA	10 mM	Yes

For more information, please visit our website at **https://ruo.mbl.co.jp/.**

はじめに

さまざまな研究分野で、活性のあるタンパク質、構造を保ったタンパク質を精製することは大変重要です。活性や構造を保ったままでタンパク質を精製するためには、酸、アルカリなどの過酷な条件下ではなく、中性条件下で精製できることが理想です。このキットは、有血清培養上清中や哺乳動物細胞内に強制発現させた HA-tag 融合タンパク質（以下 HA-tag タンパク質）を中性条件下で、スピンカラムを使い簡便に精製可能にしたキットです。

HA-tag はヒトインフルエンザウィルス A のヘマグルチニン由来の 9 アミノ酸配列（YPYDVPDYA）で、哺乳動物細胞の発現ベクターによく使用されています。

本キットには HA-tag を特異的に認識する抗 HA-tag 抗体が結合した抗 HA-tag ビーズを使用しています。マイクロスピンカラム内で HA-tag タンパク質を含む溶液と抗 HA-tag ビーズを混合します。インキュベーション後の洗浄で HA-tag タンパク質以外を洗い流します。その後、抗 HA-tag ビーズに過剰量の HA ペプチドを含む溶液を加えることで、HA-tag タンパク質と HA ペプチドの競合を生じさせ、抗 HA-tag ビーズから HA-tag タンパク質を解離させて回収します。

キット構成

哺乳動物細胞などに発現させた HA-tag タンパク質を 20 回分精製するための試薬類が含まれます。

1. **Anti-HA-tag Beads** 400 µL（25%スラリー：保存剤として 0.09%のアジ化ナトリウムを含有する PBS に 100 µL のビーズが入っています。）
   ***アジ化ナトリウムは配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流してください。**
2. **Elution Peptide** HA ペプチド, 2 mg（凍結乾燥品）
3. **Spin Columns Sets** カラム 20 個とキャップ 20 個
4. **Wash Concentrate** 6 mL（10 倍濃縮品）

保存

製品有効期限は、出荷後 1 年間です。2-8°C で保存して下さい。凍結は避けて下さい。

精製のキャパシティー

精製のキャパシティーは HA-tag タンパク質の種類によって異なります。

32 kDa の HA-tag タンパク質を 1 mL の抗 HA-tag ビーズを用いて精製した例では、0.45 mg 以上の HA-tag タンパク質を回収する事ができました。

必要なもの（Kit 以外）

1. マイクロ遠心機（15,000 x g まで遠心できるもの）
2. 1.5 mL マイクロチューブ
3. ローテーター
4. PBS
5. 細胞溶解バッファー

   細胞によって最適な細胞溶解バッファーの種類は異なります。

   試薬の使用可否表をご覧下さい。

   自家製の例

20-50 mM	Tris-HCl (pH 7.5) 又は HEPES-KOH (pH 7.5)
50-250 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1 %	NP-40 又は Triton X-100

   必要に応じて Protease Inhibitor Cocktail を加えて下さい。

   （例：SIGMA code P8340, PIERCE code 78415）

データシート中のプロトコールは参考例です。研究によって最適な条件は異なりますので、事前に条件検討を行うことを推奨します。

プロトコール

以下のプロトコールは 100-mm dish で培養した哺乳動物細胞で発現させた HA-tag タンパク質を精製する場合の例です。HA-tag タンパク質の発現のレベルはさまざまです。発現させるタンパク質の種類、発現系、細胞種、遺伝子導入用試薬あるいは培養日数などに影響されます。必要に応じて、哺乳動物細胞の培養量や、抗 HA-tag ビーズの量、溶出ペプチド溶液の量を調整して下さい。

試薬の準備

1. 洗浄液

   Wash Concentrate（10 倍濃縮品）を超純水で 10 倍希釈して下さい。

   （例：0.1 mL の Wash Concentrate に 0.9 mL の超純水を加えて下さい。）

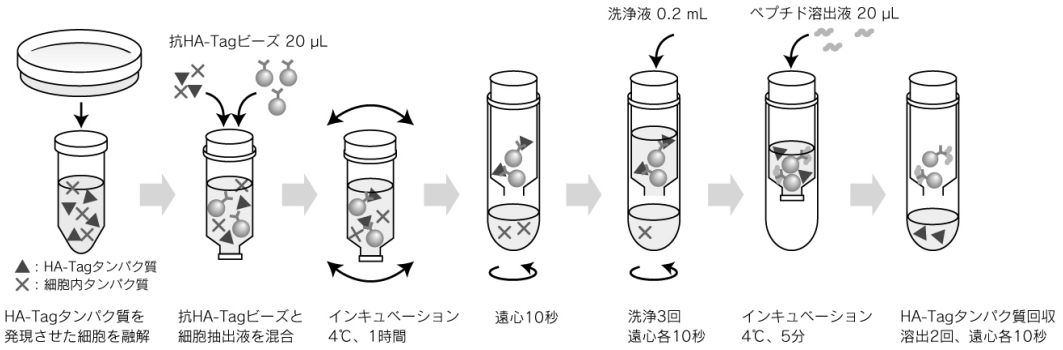
   1 回の精製につき 1 mL の洗浄液を用意して下さい。

2. 溶出ペプチド溶液

   Elution Peptide（2 mg の HA ペプチドを 1 mL の PBS に溶解後、凍結乾燥してあります）に 1 mL の超純水を加えて数回ピペッティングして溶解して下さい。

   溶解後の溶出ペプチド溶液を保存する場合は適切な量に分注（例：45 µL x 2 チューブ）して、-20°C に保存して下さい。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

精製法の概略図（哺乳動物培養細胞からの精製）



A. 培養細胞からの精製（HA-tag タンパク質が細胞外に分泌されない場合）

（細胞抽出液の調製）

1. HA-tag タンパク質を発現させた細胞を 1.5 mL マイクロチューブに移します。
   （必要に応じて、培養皿から細胞を剥がして下さい。）
2. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
3. 冷却した PBS に細胞を懸濁します。
4. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
5. 0.5 mL の細胞溶解バッファーを細胞ペレットに加え、ボルテックスします。
6. 15 秒超音波処理を行います。
7. 15 分間、氷の上に静置して下さい。
8. 15,000 x g、4°C で 5 分間遠心します。（上清を使用します。）

（HA-tag タンパク質の精製）

9. 細胞抽出液（8. 遠心上清）0.5 mL をスピンカラムに入れます。
10. 使用直前に抗 HA-tag ビーズの容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにして下さい。
    ボルテックスはかけないで下さい。
11. スピンカラムに抗 HA-tag ビーズのサスペンジョン 20 µL (5 µL ビーズ) を加え、キャップをします。
12. スピンカラムをローテーターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。
    ご使用のローテーターにスピンカラムがセットできない場合は、ローテーターにセットできる適当なチューブ（15 mL の遠心チューブなど）にスピンカラムを入れてセットして下さい。

13. スピンカラムの上のキャップをゆるめ、下のプラグを折り取ってください。（折り取った部分はカラムの下のプラグになりますので捨てないでください。）スピンカラムをマイクロチューブに入れて Flash で 10 秒間遠心します。マイクロチューブの液を捨てます（必要に応じて、後の分析のために取っておきます）。
14. スピンカラムの上のキャップを取ります。下のプラグは外したままにしておきます。
    スピンカラムをマイクロチューブに入れます。
15. スピンカラムに洗浄液を 0.2 mL 入れます。スピンカラムをゆすったりする必要はありません。
    Flash で 10 秒間遠心しマイクロチューブの液を捨てます。これを 3 回繰り返します。
16. スピンカラムを新しいマイクロチューブに移します。
17. 下のプラグを閉めます。20 µL の溶出ペプチド溶液を抗 HA-tag ビーズに加えます。上のキャップを閉めます。マイクロチューブの外から、数回、軽く指で弾いて溶出ペプチド溶液と抗 HA-tag ビーズをなじませた後、**4°C に 5 分間**に置きます。その後、上のキャップ、下のプラグをはずし、Flash で 10 秒間遠心し、溶出した HA-tag タンパク質をマイクロチューブに回収します。
18. 2 回目の溶出を行います。再度 20 µL の溶出ペプチド溶液を抗 HA-tag ビーズに加えます。マイクロチューブの外から、数回、軽く指で弾いて溶出ペプチド溶液と抗 HA-tag ビーズをなじませた後、**4°C に 1 分間**置きます。（このときは上のキャップ、下のプラグははずしたままでかまいません。）Flash で 10 秒間遠心し、溶出した HA-tag タンパク質をマイクロチューブに回収します。
    17 と 18 のステップで溶出した HA-tag タンパク質は 1 つのチューブに合わせて回収してもかまいません。

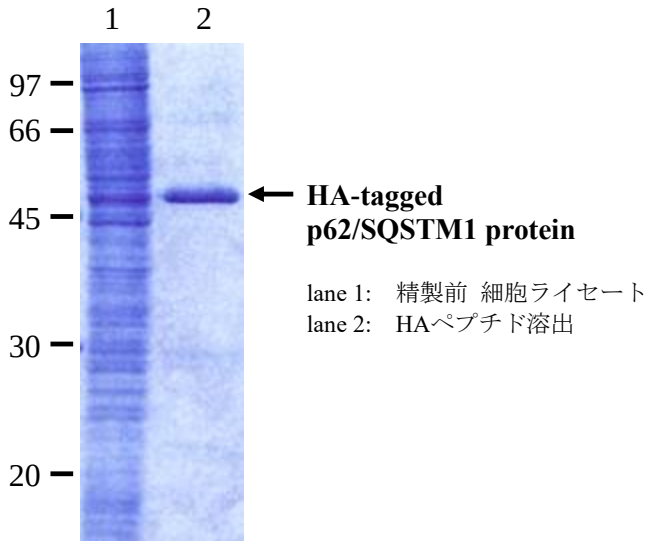
B. 培養上清からの精製（HA-tag タンパク質が培養上清に分泌されている場合）

1. HA-tag タンパク質を発現させた細胞の培養上清を 15 mL 遠心チューブに集めます。
2. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心して細胞を沈殿させます。
3. 培養上清を新しい 15 mL 遠心チューブに移します。
4. 使用直前に抗 HA-tag ビーズの容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにして下さい。ボルテックスはかけないで下さい。
5. 抗 HA-tag ビーズのサスペンジョン 20 µL（5 µL ビーズ）を培養上清の入った遠心チューブに加えます。キャップをします。
6. ローテーターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。

7. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心します。上清を捨てますが（必要に応じて、後の分析のために取っておきます）、上清を完全に除去しないで、100～400 µL は抗 HA-tag ビーズといっしょに遠心チューブの中に残しておきます。
8. 遠心チューブの中に残した 100～400 µL の培養上清と抗 HA-tag ビーズを、ピペッティングを数回繰り返すことによって懸濁します。
9. 抗 HA-tag ビーズと 100～400 µL の培養上清の懸濁液を下のプラグを折り取ったスピンカラムに移します。（折り取った部分はカラムの下のプラグになりますので捨てないでください。）
10. スピンカラムの上のキャップはしません。スピンカラムをマイクロチューブに入れて Flash で 10 秒間遠心します。マイクロチューブの液を捨てます（必要に応じて、後の分析のために取っておきます）。スピンカラムの下のプラグは外したままで、マイクロチューブに入れます。
11. 以下、**A. 培養細胞からの精製 15～18** に従い、精製を行います。

精製の例 ①

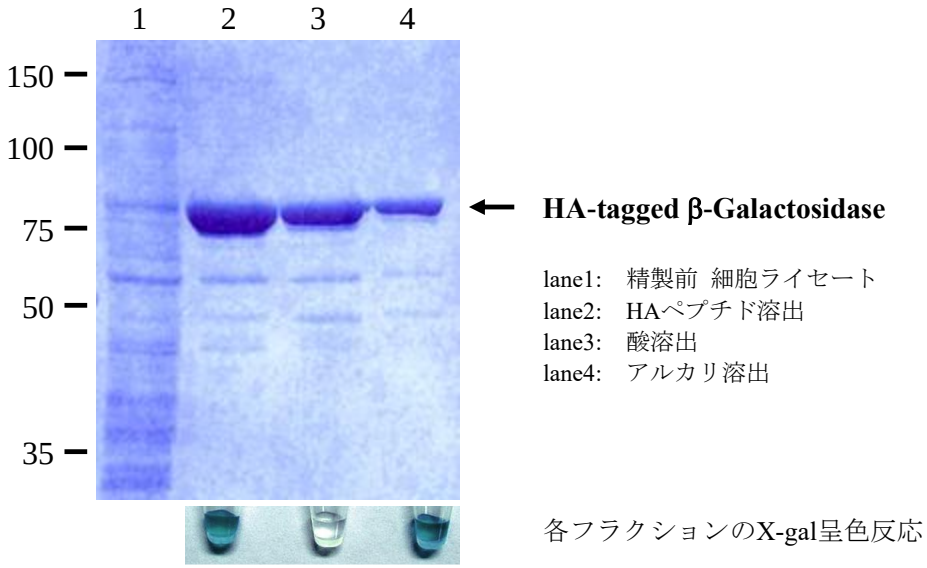
HA-tagged p62/SQSTM1 タンパク質の精製（SDS-PAGE クマシー染色）



ヒト胎児腎由来細胞株（293T）に pCMV-HA-p62 プラスミド DNA をトランスフェクションし、60 時間培養しました。細胞を細胞溶解バッファー（0.5 mL/100-mm dish）に溶解させ、プロトコール A に記載した方法で精製しました。

精製の例 ②

HA-tagged β-Galactosidase の精製（SDS-PAGE クマシー染色）と酵素活性の確認



ヒト胎児腎由来細胞株（293T）に pcDNA-HA-β-Galactosidase プラスミド DNA をトランスフェクションし、60 時間培養しました。細胞を細胞溶解バッファー（0.5 mL/100-mm dish）に溶解させ、プロトコールに記載した方法で精製しました。比較のために、酸およびアルカリでの溶出も行いました。各々の精製は同じ量の抗 HA-tag ビーズ（5 µL）と同じ量の溶出液（20 µL x 2 回溶出をプール）を用いました。

ペプチド溶出液（本キット）　：中性
0.1 M Glycine-HCl（酸溶出液）：pH 3.0 （溶出後ただちに 1 M Tris-HCl, pH 8.0 で中和）
0.1 M NH_3（アルカリ溶出液）：pH 11.3（溶出後ただちに 1 N CH_3COOH で中和）

タンパク質の活性は精製後の HA-tagged β-Galactosidase の酵素活性を X-gal 呈色反応で検定しました。

試薬の使用可否

下記の試薬を細胞溶解バッファーの成分に加えた場合、本キットで使えるか調べました。

Chaotropic agents			
	Urea	**1 M**	**Yes**
	Guanidine-HCl	**1 M**	**No**
Reducing agents			
	DTT	**10 mM**	**Yes**
	2-Mercaptoethanol	**10 mM**	**Yes**
Surfactants			
Nonionic	**Tween-20**	**5%**	**Yes**
	Triton X-100	**5%**	**Yes**
	NP-40	**1%**	**Yes**
	Digitonin	**1%**	**Yes**
	n-Octyl-β-D-gulcoside	**1%**	**Yes**
Zwitterionic	**CHAPS**	**1%**	**Yes**
	CHAPSO	**1%**	**Yes**
Anionic	**SDS**	**0.05%**	**No**
	Sodium Deoxycholate	**0.5%**	**Yes**
Others			
	NaCl	**1 M**	**Yes**
	Glycerol	**10%**	**Yes**
	EDTA	**10 mM**	**Yes**

Yes：表に示した濃度まで細胞溶解バッファーに加えて使用できます。
No：表に示した濃度で細胞溶解バッファーに加えると使用できません。

技術資料や関連する情報は、ホームページ（https://ruo.mbl.co.jp/.）から利用できます。
最新の情報をご利用ください。

発売元

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL https://ruo.mbl.co.jp e-mail support@mbl.co.jp