HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：003-101-003K

简介

HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒主要用于IP(immunoprecipitation)或者Co-IP实验。本试剂盒主要由HA tag Nanoselector® 磁性琼脂糖珠及相关配套试剂组成。

HA tag Nanoselector® 磁性琼脂糖珠是由一种抗HA tag蛋白（YPYDVPDYA）纳米抗体（VHH）与磁性琼脂糖珠共价结合组成，用于从哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等各种生物的细胞提取物中免疫沉淀HA tag-融合蛋白，具有载量高、无轻重链干扰等优势。

磁珠特性

配体	抗HA tag的纳米抗体（VHH）
特异性	与HA tag及其融合蛋白特异性结合
结合能力	每 10 µL 磁珠悬液结合 20 µg HA tag-mNeongreen 重组蛋白
珠粒大小	~ 40µm
储存缓冲液	10mM PBS (pH 7.5), 0.01% proclin300
储存条件	收货后于 4℃储存。 **请勿冷冻！**
稳定性	收货后 4℃可稳定保存 1 年。
装运	低温装运

试剂盒主要成分

缓冲液	成分	体积	储存条件
HA tag Nanoselector® Magnetic beads	50% 磁珠悬液, 10mM PBS pH 7.5, 0.01% proclin300（Code: 003-101-003）	500uL	4℃
Binding Control Magnetic beads	50% 磁珠悬液, 10mM PBS pH 7.5, 0.01% proclin300（Code: 100-100-200）	500uL	4℃
Lysis buffer	10mM Tris-HCl pH7.5,150mM NaCl, 0.5%NP40, 0.5mM EDTA	20mL	4℃
Wash buffer	10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.05% NP40, 0.5mM EDTA	120mL	4℃
Acidic elution buffer	0.2M Glycine-HCl pH 2.5	10mL	4℃
Neutralization buffer	1M Tris-HCl pH 10.4	1mL	4℃
2xSDS Sample buffer	120mM Tris-HCL pH6.8, 20% Glycerol, 4% SDS, 0.04% bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol	2.5mL	常温
5x TBST	0.1M Tris-HCl pH7.5, 2.5M NaCl, 0.5% Tween-20, 0.5% ProClin300	60mL	4℃
阳性参照(HA tag-mNeongreen)*	HA tag-mNeongreen in Lysis buffer	1 mL	4℃

HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：003-101-003K

AlpVHHs 临界点生物

*注：需使用阳性参照时，请每个IP反应加入500ul阳性参照/25 ul磁珠。

注：每次使用完请确保管盖紧闭，以免影响试剂性能。

注：各成分需要保存在合适的温度条件下。

Lysis buffer 及Wash buffer成分兼容性

缓冲液成分	最大兼容浓度
DTT	1 mM
Glycerol	30 %
Guanidine HCl	4 M
NaCl	2 M
Nonidet™ P40 Substitute	2 %
SDS	1 %
TCEP	0.2 mM
Triton™ X-100	1 %
Urea	8 M

*注：用户可根据实验目的适当调整或添加上述组分加入Lysis buffer 和Wash buffer中，请注意最大兼容浓度。

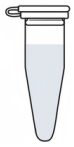
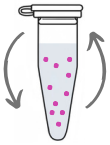
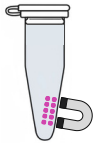
产品规格

产品	规格
HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	20X Test

HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：003-101-003K

流程预览

准备工作		所有步骤均 4℃ 操作； 准备细胞裂解缓冲液和细胞裂解条件
细胞裂解物		每10^6-10^7个细胞加入500μL 的 Lysis buffer; 裂解细胞并离心取上清
平衡磁珠		将25μL 磁珠悬浮液转移到1.5mL 的 EP 管中； 用500uL Wash buffer平衡3次
结合蛋白		向磁珠中加 500 μL 细胞裂解物； 4℃ 上下旋转 1 小时
洗磁珠		用Wash buffer洗涤磁珠3次，每次500μL; 在最后一次洗涤步骤中，将磁珠转移到一个新EP 管中
用 SDS Sample buffer 洗脱		吸干上清，80ul 2XSDS Sample bufer重悬磁珠； 95℃以上沸水浴10分钟； 上清可用于SDS-PAGE/WB分析

HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：003-101-003K

AlpVHHs 临界点生物

免疫沉淀流程

细胞材料

以下方案描述了哺乳动物细胞裂解物的制备。

对于其他类型的细胞，我们建议使用 500 µg 细胞提取物，并从磁珠平衡步骤开始实验。

哺乳动物细胞裂解

注意：使用预冷的缓冲液收获细胞并裂解细胞。强烈建议将蛋白酶抑制剂添加到裂解缓冲液中，以防止目标蛋白及其结合物降解。对于一次免疫沉淀反应，我们推荐使用约 10_6-10_7 个细胞。

1. 选择裂解缓冲液。

· 对于细胞质蛋白，通过上下吹打将细胞团重悬于 500 µL 预冷的 Lysis buffer 中。

注： Lysis buffer 使用前，需要额外添加蛋白酶抑制剂混合液和1mM PMSF（抑制目的蛋白降解）。

· 对于核/染色质蛋白，将细胞团重悬于 500 µL 预冷的 RIPA 缓冲液中。

注： RIPA缓冲液使用前需要额外添加 DNaseI（ 75- 150 Kunitz U/mL）， MgCl2（ 2.5 mM），蛋白酶抑制剂混合液和 PMSF（ 1 mM）。

2. 冰上放置 30 分钟，然后每 10 分钟用移液管吸取一次。

3. 4℃， 17,000x g 离心细胞裂解液 10 分钟。将澄清的裂解物（上清液）转移到预冷 EP 管中。如果需要，可保存 50 µL 稀释的裂解物用于进一步分析（如进行 input 对照）。

注：产品用户可根据自己需求适当调整裂解液成分，注意不要破坏蛋白质结构，详情可参考: Lysis buffer 和Wash buffer成分兼容性。

植物组织裂解（例：拟南芥）：

1.用纸巾将液体培养的拟南芥幼苗吸干，称取0.7克，转移到研钵中。

2.用液氮冷冻，用杵研磨成细粉。

3.加入4ml提取缓冲液(PBS,0.5% Triton X-100,0.5 mM PMSF, 蛋白酶抑制剂)，缓慢解冻，进一步研磨样品。

4.将样品转移到1.5 ml微量离心管中，在4℃下以16000 x g离心20分钟。

5.将上清液通过0.20µm的过滤注射器，并将提取物置于冰上。如果需要， 可保存 50 µL 稀释的裂解物用于进一步分析（ 如进行 input 对照）。

磁珠平衡

1. 通过移液枪吹打或上下旋转 EP 管悬浮磁珠。 不要漩涡磁珠！

2. 将 25 µL 的磁珠悬浮液转移到 1.5 mL 的离心管中。

3. 加入 500 µL 预冷的Wash buffer。

4. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清。丢弃上清。

HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：003-101-003K

蛋白结合

1. 将稀释的裂解物加入到平衡的磁珠中。
2. 在 4℃ 上下旋转 1 小时。

洗涤

1. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清。
2. 如果需要，可保存 50 µL 上清液用于进一步分析（穿流液/非结合组分）。
3. 丢弃剩余的上层清液。
4. 加入 500 µL Wash buffer 重悬磁珠。
5. 用磁铁分离磁珠，直到上层溶液澄清，丢弃剩余的上清液。
6. 重复洗涤步骤（步骤 4 和 5）至少两次。
7. 在最后的洗涤步骤中，将磁珠转移到新管中。

可选： 为了增加洗涤缓冲液的强度，可添加非离子洗涤剂，如 Triton X-100。

2x SDS sample buffer洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
2. 加入 80 µL 2xSDS Sample buffer 重悬磁珠。
3. 在 95℃以上的 沸水浴磁珠10 分钟，以从磁珠上分离其中的免疫复合物。
4. 用磁铁分离磁珠。
5. 用 SDS-PAGE/WB 分析上清。

Acidic elution buffer 洗脱

1. 丢弃剩余的上清液。
2. 加入 50-100 µL Acidic Elution Buffer，在 4℃ 或室温不停吹打 30 - 60 秒。
3. 用磁铁分离磁珠直到上层溶液澄清。
4. 将上清液转移到新的离心管中。
5. 加入 5-10 µL Neutralization buffer 中和洗脱产物。
6. 至少重复洗脱步骤（步骤 2， 3， 4， 5）一次以提高洗脱效率。

注： 室温洗脱比 4℃ 效率更高。缓冲液要在室温下预温。

HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒

产品货号：003-101-003K

WB检测

1. 按照正常流程进行WB跑胶及转模实验。
2. 向1个体积的5x TBST中加入4个体积的纯水获得1x TBST；
3. 将膜放入5%牛奶(1x TBST稀释)或者5%BSA(1×TBST稀释)，4℃封闭过夜。
4. 将膜放入1;5000 稀释的Anti-HA tag, AlpHcAbs® Rabbit antibody(HRP) (1x TBST稀释或者同封闭液稀释)缓冲液中，室温孵育1h。*
5. 将膜放入1x TBST中洗涤20min；
6. 去除1x TBST，加入新的1x TBST中洗涤20min；
7. 重复步骤6一次。
8. 曝光。

*注：步骤4为直接孵育HRP标记抗体，此步骤也可以更换为孵育检测一抗-洗涤-孵育对应二抗。

Nanoselector® IP试剂盒其它产品

Code Number	Product Description	Applications	Size
019-101-003K	GFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
020-101-003K	RFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
013-101-003K	mNeongreen Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
014-101-003K	TurboGFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
015-101-003K	MBP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
010-101-003K	GST Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
011-101-003K	SNAP tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
012-101-003K	Halo Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
003-101-003K	HA tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
004-101-003K	His tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
049-101-003K	mWasabi Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
017-101-003K	TagFP Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
064-101-003K	V5 tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
082-101-003K	StayGold/mBaojin Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
016-101-003K	DYKDDDDK tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
026-101-003K	tdTomato Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
028-101-003K	mScarlet3-H/mYongHong Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
078-101-003K	Biotin Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
006-101-003K	SUMO tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
061-101-003K	mGold Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
002-101-003K	Myc tag Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	20X Test
025-101-003K	Rabbit IgG Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	40X Test
001-101-003K	Mouse IgG Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	40X Test
001-300-003K	Mouse IgG&Rabbit IgG Nanoselector® Magnetic beads IP试剂盒	IP,Co-IP	40X Test