Anti-HA Magnetic Beads

产品包装：

产品编号	产品名称	产品形式	包装规格（V/V, 1/5）
HAK21042-1 mL	Anti-HA Magnetic Beads	20% 磁珠悬液	1 mL
HAK21042-5 mL	Anti-HA Magnetic Beads	20% 磁珠悬液	5 mL
HAK21042-25 mL	Anti-HA Magnetic Beads	20% 磁珠悬液	25 mL

产品描述:

Anti-HA 免疫磁珠来源于 Anti-HA [PSH01-92]重组兔单克隆抗体，与直径为 30-150μm 的琼脂糖磁珠共价偶联。[PSH01-92]抗体能识别包含 HA 多肽序列（YPYDVPDYA）的融合蛋白。[PSH01-92]可特异性地结合哺乳动物和细菌提取物中的 N 端 HA 融合蛋白、C 端 HA 融合蛋白。

Anti-HA 免疫磁珠可用于常用的免疫沉淀程序检测和捕获 HA 标记的融合蛋白。可以通过磁性吸附实现快速高效的分离，无需离心操作，以促进实验过程。

产品性能：

产品形式：Anti-HA 免疫磁珠保存在 PBS，pH7.4 添加防腐剂的缓冲液中，以 20%的悬浮液形式提供。

抗体浓度：每 1mL 纯磁珠结合 8mg HA 抗体。

结合能力：每 1mL 纯磁珠可结合≥0.6mg HA 融合蛋白。

辅助设备：磁力架、离心管、96 孔板。

注：不要使用磁力搅拌系统。磁力搅拌系统会破坏磁珠结构。

保存条件：

Anti-HA 免疫磁珠建议在 2-8℃下储存，可稳定保存 2 年。请勿-20℃保存，冷冻磁珠将不可逆转地损坏磁珠结构。

注意事项和免责声明

本产品仅限于科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。

使用说明：

一、样品制备

建议将蛋白裂解液控制在 pH6-8，NaCl 或 KCl 浓度≥0.15M 可获得较好的实验效果。

蛋白裂解液需要离心（10,000-20,000×g，15min）才能去除干扰蛋白质结合的细胞碎片和微粒。如想获得更好的实验效果，蛋白裂解液还可通过 0.45 μm 或 0.22 μm 滤器过滤。

二、使用 Anti-HA 免疫磁珠进行免疫沉淀(IP)

此程序推荐用于纯化少量 HA 融合蛋白。

以下方法是单个免疫沉淀(IP)反应的示例。对于多个 IP 反应，根据要处理的样品数量计算所需试剂的体积。对于 IP 反应，建议每个反应（1x10^6 细胞 或 100μL 裂解液）使用 10-20μL 的磁珠悬浮液。

注意：该方法推荐使用两个对照。第一个对照是 IP 与 HA 融合蛋白（阳性对照）。 第二个是不含蛋白质的试剂空白（阴性对照）。

1.通过颠倒混匀彻底重悬磁珠。确保 Anti-HA 免疫磁珠是均匀的悬浮液。取出适当的体积以供使用，加入到合适的离心管中。为减

少对磁珠的损坏，建议剪掉移液器吸头的末端。

2.将离心管放入适当的磁力架中以收集磁珠。吸出并丢弃存储缓冲液。

3.用 10 倍磁珠悬浮液体积的 TBS 清洗磁珠三次。确保去除大部分洗涤缓冲液并且没有磁珠被丢弃。

注意：对于多个 IP 样品，一起清洗所有样品的磁珠。洗涤后，将磁珠重新悬浮在 TBS 中，并根据测试的样品数量重新分配磁珠。将离心管放入适当的磁力架中以收集磁珠，吸出并丢弃 TBS。

4.将 100μL 处理好的细胞裂解液添加到洗涤过的磁珠中。（使用的细胞裂解液体积取决于转染细胞中 HA 融合蛋白的表达水平，可根据样品中目的蛋白丰度来调整裂解液的体积）。对于阳性对照，将 100uL TBS 和 2 μL 50 ng/μLHA 融合蛋白（~100ng）添加到洗涤过的磁珠中。对于阴性对照，仅添加 100uL 的裂解缓冲液，不含蛋白质。

5.轻轻摇动（推荐使用旋转混匀仪）所有样品和对照 1 小时。为了提高结合效率，可将结合步骤延长至 4℃过夜反应。

6.将离心管放在适当的磁力架中以收集磁珠。用移液器吸头（推荐使用细长的吸头或者 1mL 吸头上套 200μL 吸头来使用）去除上清液（注意防止吸头沾到磁珠）。

7.用 10 倍磁珠悬浮液体积的 TBS 清洗磁珠三次。

8.洗脱：

根据后续实验要求，可以选择如以下 3 种方法之一进行洗脱。

8.1 酸性洗脱法

本方法为非变性法，比较快速且高效。洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

8.1.1 溶液的配制：酸性洗脱液(0.1M 甘氨酸,0.2M 精氨酸，pH2.7)，中和液(1M Tris-HCl, pH9.0)。

8.1.2 每 10ul 原始磁珠悬浮液，加入 100ul 酸性洗脱，混匀后置于旋转混合仪上，室温孵育 5 分钟。注：孵育时间不宜超过 15 分钟。

8.1.3 孵育完毕后，置于磁力架上分离磁珠至溶液澄清，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入 10ul 中和液，混匀。

8.1.4 为了获得最大的洗脱效率，可重复步骤 8.1.2 和 8.1.3，并将相同样品合并。

8.1.5 洗脱并中和的目的蛋白置于 4℃待用，或者-20℃或-80℃长期保存。

注：1）酸性洗脱法虽然高效，但仍可能低于 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

2）由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响，如果对洗脱效率的要求比较高，可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整，相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整。

8.2 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法

本方法为变性法，得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 检测。

8.2.1 每 10ul 原始磁珠体积的磁珠，加入 25ul 1X SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃加热 10 分钟。

8.2.2 置于磁力架上分离磁珠至溶液澄清，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 Western Blot 检测。

8.3 3X HA 竞争洗脱法

本方法为非变性法，洗脱效率高，且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

8.3.1 3X HA 多肽洗脱液的配制：取适量 3X HA 多肽溶解于 1X TBS+1%Triton+0.1%SDS 中，使其终浓度为 300μg/ml。

8.3.2 每 10ul 原始磁珠体积，加入 100ul 3X HA 多肽洗脱液(300μg/ml)，混匀后置于旋转混合仪上，室温摇晃孵育 30-60 分钟，或 4ºC 孵育 1-2 小时。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。

8.3.3 孵育完毕后，置于磁力架上分离至溶液澄清，将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的 HA 标签蛋白。

8.3.4 洗脱的 HA 标签蛋白置于 4ºC 待用，或者-20ºC 或-80ºC 长期保存。

注：作为 SDS-PAGE 样品的洗脱会导致 Anti-HA 磁珠损坏。磁珠不能再次使用，因为样品缓冲液中的 SDS 会使抗体变性。煮沸还会破坏磁珠结构。

以下方法是为小规模单个样品的亲和纯化实验编写的。

对于批量纯化实验，建议每次反应使用 250 μL 磁珠悬浮液（约 50 μL 纯磁珠）。对于 96 孔板的使用，建议每孔使用 10 μL 纯磁珠。磁珠用量可根据样品中目的蛋白丰度和使用磁力架的类型做出对应调整。

三、HA 标签蛋白纯化

纯化 HA 标签蛋白，磁珠可用于批量或以96 孔板的形式纯化。对于较大体积的蛋白质提取物，建议使用批量处理方式从大量提取物中快速捕获目标蛋白。

使用 Anti-HA 免疫磁珠纯化 HA 融合蛋白的处理方式：

Anti-HA 免疫磁珠储存在 20%悬浮液中。使用前可根据纯化体系大小选择是否去掉保存液，并用缓冲液平衡磁珠。平衡在室温下进行。

如果想让磁珠在 TBS（50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 7.4）缓冲液中停留较长时间（>24 小时），建议向磁珠缓冲液中添加抗菌剂（例如 0.05% ProClin 300）。

1.轻轻颠倒以彻底重悬磁珠。确保 Anti-HA 免疫磁珠是均匀的悬浮液状态。取出适当的体积以供使用。

2.将磁珠转移到合适大小的离心管中。用 5 倍磁珠悬浮液体积的 TBS（50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 7.4）重新悬浮来平衡磁珠，充分混合。将离心管放入适当的磁力架中以收集磁珠。取出并丢弃存储缓冲液/TBS 混合物。

3.再次添加 10 倍磁珠悬浮液体积的 TBS（50 mM Tris HCl，150 mM NaCl，pH 7.4）重悬来平衡磁珠，充分混合。将离心管放入适当的磁力架中以收集磁珠。取出并丢弃存储缓冲液，重复清洗 2 次。

4.在室温下将蛋白质提取物（参见样品制备）与平衡好的磁珠（步骤 3）孵育约 1 小时，同时轻轻混合以捕获 HA 融合蛋白。混合应在旋转混匀仪上进行。

5.结合步骤完成后，将离心管放入适当的磁力架中收集磁珠。移除上清液。

6.用 TBS 清洗磁珠以去除非特异性结合的蛋白质。洗涤应使用20 倍磁珠悬浮液体积的 TBS，共清洗 3 次。

注意：洗涤过程可以通过测量上清液在 280nm 处的吸光值来监测。继续洗涤磁珠，直到从磁珠吸出的洗涤液与洗涤液 (TBS) 空白之间的吸光值差异<0.05。

7.HA 融合蛋白可以通过低 pH 值方法或通过与3X HA 多肽竞争从磁珠上洗脱下来。

7. 1 在低 pH 条件下用甘氨酸洗脱：

用 10 倍磁珠悬浮液体积的（0. 1M 甘氨酸，0.2M 精氨酸，pH 2.7）的洗脱液加入到磁珠中，室温孵育 5 分钟，洗脱结合的 HA 融合蛋白，向洗脱液中加入适量的中和液（按每 100ul 洗脱液加入 10μL 1M Tris-HCl，pH 9.0 的中和液），孵育时间不要超过 15 分钟。洗脱后尽快将磁珠重新平衡至中性 pH 值。

7.2 通过与 3X HA 多肽的竞争洗脱：

使用 5 倍磁珠悬浮液的含有 3X HA 多肽（300 μg/mL）的 1X TBS + 1% Triton X-100 + 0.1% SDS 溶液竞争洗脱，洗脱结合的 HA 融合蛋白。

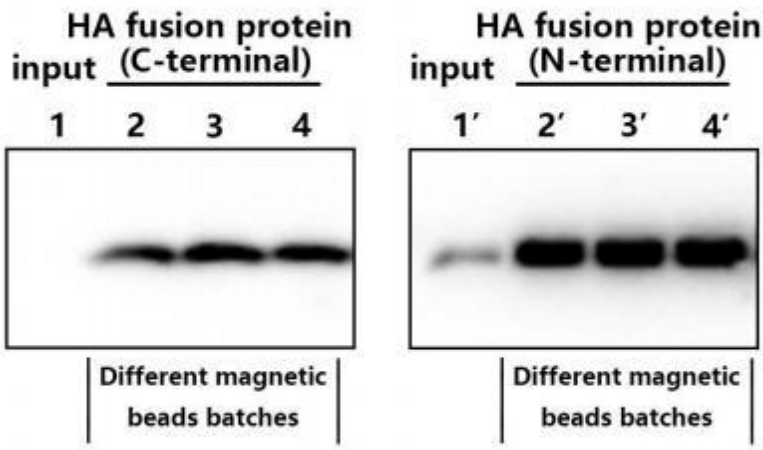
8. 清洁磁珠

建议在使用后立即清洁磁珠，方法是用 3 倍体积的（0. 1M 甘氨酸，0.2M 精氨酸，pH 2.7）的洗脱液清洗磁珠。磁珠应立即在 TBS 中重新平衡，直到流出物处于中性 pH 值。

9. 储存磁珠

清洗磁珠后，将离心管放入适当的磁力架中收集磁珠，并去除缓冲液。磁珠可以作为 20% 的悬浮液储存在 PBS，0.05% ProClean 300，pH7.4 中。将磁珠储存在 2-8℃， 避免磁珠干掉。

四、结果展示



Immunoprecipitation

Anti-HA [PSH01-92] Magnetic Beads: Cat.No. HAK21042: Purification of Two Different HA-tagged fusion protein from 293T transfected with HA-fusion protein expression vector. 20ul Anti-HA [PSH01-92] Magnetic Beads was used for IP per lane.

Lane 1, 2, 3, 4: 293T transfected with HA-fusion protein expression vector containing an C-terminal HA tag, whole cell lysate

Lane 1’, 2’, 3’, 4’: 293T transfected with HA-fusion protein expression vector containing an N-terminal HA tag, whole cell lysate