

HA 免疫(共)沉淀试剂盒

HA IP/Co-IP Kit

本产品 4℃运输；保存于 4℃,其中 **SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)** 需 -20℃保存,保质期 12 个月,**Anti-HA 免疫磁珠** 严禁冻结,长期存放请保证试剂管竖立向上,磁珠浸没于保存液中。

货号规格

货号	规格
YJ205	≥40次

产品简介

本产品能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验,其核心成分 Anti-HA 免疫磁珠采用新一代纳米表面生物技术,将鼠源单克隆 Anti-HA 抗体高密度共价偶联在超顺磁性纳米微球表面,是纯化 HA 标签蛋白的理想工具。与市场上同类产品相比,其具有更大的特异性表面区域及更多的表面抗体结合位点,非特异性结合率低,10 min 内即可完成抗体吸附过程,30 min 内完成抗原沉淀操作,使用起来简便高效。可有效避免长时间操作造成目标蛋白被水解,确保了目标蛋白的活性及蛋白复合物的完整性。

此外,本试剂盒中配有经过优化预制的各种缓冲液,为免疫(共)沉淀实验提供了合适的反应条件,增强了实验的稳定性,可应用于多种样品,细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它的免疫抗原等均可适用。

产品内容

组分名称	体积及数量
Anti-HA 免疫磁珠	1 mL
裂解/漂洗缓冲液	125 mL
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)	10 mL
洗脱缓冲液	5 mL
中和缓冲液	1 mL

操作步骤

样本处理

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

A. 悬浮细胞: 离心收集细胞 (4℃, 500×g, 10 min), 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50 μL 的比例用 1×PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每毫克细胞 5~10 μL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 5~20 min(期间混匀几次); 离心收集上清液 (4℃, 12,000~16,000×g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20℃长期保存);

- B. 贴壁细胞: 移去培养基, 按每 1.0×10^5 个细胞 150 μL 的比例用 1 $\times$ PBS(货号: PS110) 洗涤两次; 用细胞刮刀刮落细胞, 收集至 1.5 mL 离心管内, 按每 1.0×10^5 个细胞 20~30 μL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 5~20 min(期间混匀几次); 离心收集上清液 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000~16,000 $\times g$, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存);
- C. 大肠杆菌: 离心收集大肠杆菌 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\times g$, 2 min), 弃上清后称重, 按每克菌体 (湿重)10 mL 的比例用 1 $\times$ PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每克菌体 (湿重)5~10 mL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000~16,000 $\times g$, 10 min)。

磁珠预处理

2. 用移液器轻柔吹打 **Anti-HA 免疫磁珠**, 使其充分混悬, 取 25 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中;
3. 加入 500 μL **裂解 / 漂洗缓冲液**, 用移液器轻柔吹打重悬磁珠, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清;
4. 重复步骤 3 一次;

样品的结合

5. 在预处理后的磁珠中加入 500 μL 步骤 1 制备好的样品, 置于翻转混合仪上孵育 (常温 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 4~6 h 或过夜);
6. 将上述混合液置于磁力架上静置 1 min, 然后把上清液转移到新的离心管中备用 (上清液可用于检测 HA 标签蛋白是否存在残留), 原离心管中剩余的即为 **蛋白 - 磁珠复合物**;

洗涤

7. 向步骤 6 所得的 **蛋白 - 磁珠复合物** 中加入 500 μL **裂解 / 漂洗缓冲液**, 用移液器轻柔吹打重悬, 接着在磁力架上静置 1 min 后, 吸弃上清;
8. 重复步骤 7 大约三次, 直至洗涤后的上清液 OD280 小于 0.05 为止;
注意: 如上清液的 OD280 仍大于 0.05, 则适当增加洗涤次数。

洗脱

9. 本操作说明书提供以下两种抗原洗脱方案, 操作者可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。
变性洗脱: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向步骤 8 洗涤后的 **蛋白 - 磁珠复合物** 中加入 80~100 μL 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 (由 5 $\times$ 稀释为 1 $\times$) 混合均匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。待冷却后, 将离心管在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 检测。
非变性洗脱: 此方法洗脱的样品保持原有的生物活性, 可用于后期功能分析。向步骤 8 洗涤后的 **蛋白 - 磁珠复合物** 中加入 50~100 μL **洗脱缓冲液**, 室温孵育 5~10 min; 将离心管在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 收集上清液至新的离心管, 每 100 μL 洗出液中加入 10 μL **中和缓冲液** 将洗脱产物 pH 调节至中性, 用于后期功能分析。

常见问题 及对策

如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

答：磁珠应保存在 2~8℃，使用时应避免由于污染或干燥而导致的聚集。不过，磁珠在低 pH 值的缓冲液中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。在 **裂解 / 漂洗缓冲液** 中添加终浓度为 0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可有效防止磁珠聚集。经过低 pH 值洗脱操作的磁珠可以用 **裂解 / 漂洗缓冲液** 洗涤至中性，然后用含有 0.1%(V/V) Tween-20 的 Tris 缓冲液（pH 7.5）振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理 2 min，即可使磁珠恢复均匀状态，以上处理均不影响磁珠的抗体结合效率。

如何解决磁珠易粘附管壁的现象？

答：建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加 0.01%~0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可以有效降低耗材对磁珠的粘附。

抗原为何没有免疫沉淀下来？

答：① 样品中抗原含量过少，不足以被检测到
建议：通过 SDS-PAGE 或 Western Blot 验证裂解液中蛋白的表达和裂解效率；如有必要，可加大样品用量；
② **裂解 / 漂洗缓冲液** 中的成分干扰了抗原与抗体的结合
建议：使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（比如可选用含有 0.5% CHAPS 的 TBS 缓冲液）。

为何获得的蛋白量过低？

答：① 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂；
② 所用的 **Anti-HA 免疫磁珠** 量不够
建议：提高 **Anti-HA 免疫磁珠** 用量；
③ 样品中的目标蛋白量不够
建议：提高抗原样品量。

为何有多条非特异条带？

答：有非特异性的蛋白结合在磁珠上
建议：在 **裂解 / 漂洗缓冲液** 中加入 50~350 mM NaCl，并加大洗脱力度和次数。

注意事项

1. 请勿高速离心、干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低其结合力；
2. 免疫（共）沉淀实验中不同类型的抗体与抗原间的亲和力是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 **裂解 / 漂洗缓冲液** 的影响，因此，如使用本试剂盒不能获得最佳的实验结果，可自行优化操作细节或者筛选及配制合适缓冲液进行实验；
3. 磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥，使用前应充分振荡混匀；
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
5. 本产品仅限科研使用。