

## Biolinkedin® Anti-HA 琼脂糖磁珠

### 包装清单

| 名称      | 货号      | 包装              |
|---------|---------|-----------------|
| Anti-HA | L-1301  | 1mL (0.2mL 实体积) |
| 琼脂糖磁珠   | L-1301A | 5mL (1mL 实体积)   |

### 产品概述

Biolinkedin® Anti-HA 琼脂糖磁珠是平均粒径约为 70 $\mu$ m 的琼脂糖磁珠表面上共价结合了大量的高质量鼠源抗 HA 单克隆抗体。琼脂糖磁珠系列是采用天然高分子材料琼脂糖与超顺磁性材料复合形成的一种新型功能化磁性微球,具有更快的磁响应性同时保持微球良好的分散性、极低的非特异性吸附和更丰富的结合位点等特性。本产品广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中带有 HA 标签融合蛋白的免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 或 Pull-down 实验,也可用于 HA 标签融合蛋白的纯化。

### 产品特性

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| 基质   | 琼脂糖磁珠                         |
| 配体   | 鼠源抗 HA 单克隆抗体 (G2)             |
| 粒径   | 30-100 $\mu$ m                |
| 磁珠浓度 | 磁珠体积占悬浮液体积的 20%               |
| 结合能力 | $\geq 1.0$ mg HA 标签融合蛋白/mL 磁珠 |
| 适用范围 | IP, Co-IP, HA 标签融合蛋白纯化        |
| 保质期  | 在 2~8 $^{\circ}$ C 稳定保存两年     |

### 操作流程

**注意:缓冲液自行准备或直接购买我司 IP 试剂盒。**

#### 贴壁细胞样品:

1. 移去培养基,用 PBS 洗细胞两次。
2. 收集细胞至 1.5mL EP 管内,按比例加入 IP Lysis/Wash Buffer,同时加入 PMSF 等相应的抑制剂,混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
3. 4 $^{\circ}$ C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液,置于冰上以备后续实验 (或置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存)。

#### 培养皿 IP Lysis/Wash Buffer 推荐使用体积:

| 培养皿大小/表面积       | IP Lysis/Wash Buffer 体积 |
|-----------------|-------------------------|
| 100 mm x 100 mm | 500~1000 $\mu$ L        |
| 100 mm x 60 mm  | 100~300 $\mu$ L         |
| 6 孔板            | 100~200 $\mu$ L         |

#### 悬浮细胞样品:

1. 4 $^{\circ}$ C、500~1000xg、10min,收集细胞,弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次,即用 PBS 将细胞团重悬,4 $^{\circ}$ C、500~1000xg、5min,收集细胞,弃上清。
3. 用预冷的 IP Lysis/Wash Buffer 重悬细胞。每 50mg 细胞使用 500 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer。同时加入 PMSF 等相应的抑制剂,混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
4. 4 $^{\circ}$ C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液,置于冰上以备后续实验 (或置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存)。

#### 血清样品:

一般建议用 IP Lysis/Wash Buffer 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50~150 $\mu$ g/mL,置于冰上备用 (或置于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存)。

#### 免疫沉淀:

**注意:为保证磁珠均匀分布,使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中磁珠。**

1. 将 20~50 $\mu$ L 的 Biolinkedin® Anti-HA 琼脂糖磁珠加入 1.5mL 离心管中。
2. 向磁珠中加入 500 $\mu$ L 预冷 PBS,轻柔混匀。
3. 将离心管放入磁力架中收集磁珠到离心管的一边。去除上清。
4. 向离心管中加入 200~500 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。用磁力架收集磁珠。去除上清。
5. 将含有 HA 标签标记的蛋白样品加入装有磁珠的离心管中,保持混匀室温下孵育 1~2h,或 4 $^{\circ}$ C 2~4h。
6. 用磁力架收集磁珠,除去未结合的样品,保存以备分析。
7. 向离心管中加入 1000 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer,轻柔混匀磁珠 5~10min。收集磁珠,弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱:**向离心管中加入 80~100 $\mu$ L SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1 $\times$ ),将样品置于 100 $^{\circ}$ C 水浴或者金属浴中加热 10min。通过磁力架分离磁珠,保留含有目的抗原的上清。

**备注:**如需保持蛋白活性,也可采用以下洗脱方式。

**低 pH 洗脱:**向离心管中加入 100 $\mu$ L Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过磁力分离磁珠,保留含有目的抗原的上清。每 100 $\mu$ L 洗出液中加入 20 $\mu$ L Neutralization Buffer 来中和低 pH。

## 注意事项

1. 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
2. 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结合能力。
3. IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 IP Lysis/Wash Buffer 的影响，因此**可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。**
4. 磁珠使用前应充分振荡均匀。磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
5. 本产品仅供科学研究使用。

## 相关产品

| 货号     | 产品名称                 |
|--------|----------------------|
| L-1009 | Anti-HA 磁珠           |
| L-1101 | Anti-HA 磁珠 ( G2 )    |
| L-1107 | Anti-HA 琼脂糖凝胶 ( G2 ) |
| L-1301 | Anti-HA 琼脂糖磁珠        |

## 问题解决

### 1. 抗原没有免疫沉淀下来

- ① 样品中所含的抗原过少，不足以被检测  
**建议：**通过 SDS-PAGE 或蛋白免疫印迹验证裂解液中蛋白的表达和/或裂解效率； 如果需要，加大样品量
- ② IP Lysis/Wash Buffer 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（例如，含有 0.5% CHAPS 的 TBS）

### 2. 获得的蛋白量低

- ① 蛋白质被降解  
**建议：**加入蛋白酶抑制剂
- ② 所使用的磁珠量不够  
**建议：**提高捕获免疫复合物所使用的磁珠量
- ③ 样品中的目标蛋白量不够  
**建议：**提高抗原样品量

### 3. 多条非特异条带

有非特异性的蛋白结合在磁珠上

**建议：**在 IP Lysis/Wash Buffer 中加入 50~350mM NaCl。加大洗脱力度和次数。

### 4. 磁珠聚集

磁珠在低 pH 的 Elution Buffer 中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。

**建议：**用 IP Lysis/Wash Buffer 至中性，然后用含有 0.1% ( v/v ) Tween-20 的 Tris buffer ( pH7.5 ) 振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理，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。也可添加终浓度为 0.1% ( v/v ) 的非离子型去垢剂( 如 Tween-20 或 Triton X-100 ) 可有效防止磁珠聚集。

**注意：**超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。