

Anti-HA Tag Magnetic Beads

Anti-HA Tag 免疫磁珠

货号	规格
BDAD0003	1ml/2ml/5ml

4°C 保存，12个月有效；冰袋运输

产品介绍

Anti-HA Tag 免疫磁珠在大小为 200nm 纳米的羧基修饰的磁珠上共价结合了小鼠 Anti-HA Tag 单克隆抗体，与传统的 Anti-HA Tag 琼脂糖凝胶比较，抗体结合能力相同，背景更低，可用于 HA Tag 融合蛋白的纯化、免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(Co-IP)，由于采用磁性分离，使得每次实验可以节省一定的时间。

产品特性

项目	特性
抗体纯化方法	Protein A 纯化制备
适用范围	HA-Tag 蛋白纯化， IP， Co-IP
推荐使用体积	500 μ L 细胞裂解液样品使用 10-20 μ L 磁珠
融合蛋白结合容量	大于 0.6 mg protein/mL 磁珠
储存条件	4°C，避光，切勿冻存产品
缓冲液	pH 7.4, 1*PBS (10mM sodium phosphate, 150mM sodium chloride) , and 0.01% (v/v) Proclin 300

产品使用说明

1. 样品的准备

依据样品选择合适的细胞裂解液，制备好裂解液样品放于冰上或者 4 度保存。

注：后续实验步骤以 500 μ L 裂解液样品为例进行实验步骤说明。

2. 磁珠的准备

2.1 将 Anti-HA Tag 免疫磁珠在小瓶中重新重悬（倾斜并旋转 2 分钟或用移液器轻轻吹打 10 次）。



2.2 将 10-20 μ L 磁珠转入 1.5 mL 管中（转移量可根据需要调整）。

2.3 加入 500 μ L TBST 缓冲液，轻轻移液吹打混合。将管子放入磁性支架中，分离磁珠，静置 10 秒，取出并丢弃上清液。重复此步骤 3 次。

3. 样品的免疫结合（Binding）

从磁性支架中取出试管，将步骤 1 准备好的 500 μ L 裂解液样品加入预洗的磁珠中，并在室温下孵育 2 小时或在 4 度下混合过夜。

4. 洗涤（Washing）

4.1 用磁性支架分离磁珠 10 秒，取出未结合的上清样品（可以保留上清液，用于实验效果分析）。

4.2 将 500 μ L TBS 缓冲液加入管中并轻轻混合，用移液器轻轻吹打重悬 Anti-HA 磁珠，再磁性支架收集磁珠并丢弃上清液。重复洗涤 3 次。

注：可以通过检测上述丢弃上清液的 OD280 来判断是否洗涤完全，OD280 应小于 0.05，否则应适当增加洗涤次数。

5. 洗脱（Elution）

可以依据实验情况，选择以下三种洗脱方案之一进行洗脱。如果希望洗脱的融合蛋白最大程度保持原有生物活性，可优先使用多肽竞争洗脱方案。

5.1 多肽竞争洗脱（本方法为非变性洗脱方案，洗脱效率高）

- 1) 用 TBS 制备 0.2mg/mL 的 HA 多肽洗脱液（多肽浓度可以适当调整）。
- 2) 每 10-20 μ L 原始磁珠体积，加入 100 μ L 0.2mg/ml 的 HA 多肽洗脱液，轻轻涡旋混合并将样品在 4 $^{\circ}$ C 下在旋转器上孵育 2h-4h。
- 3) 在磁性支架上分离磁珠 10 秒，保存上清液到新的离心管中。上清即为洗脱的融合蛋白。
- 4) 为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复 2-3 次洗脱步骤。

5.2 化学基本洗脱方案（本方法为变性洗脱方案，得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 WB 检测）

- 1) 每 10-20 μ L 原始磁珠体积，加入 100 μ L 的 1x SDS-PAGE 上样缓冲液。
- 2) 在 95 度水浴上煮 5 分钟。
- 3) 在磁性支架上分离磁珠 10 秒，保存上清液到新的离心管中。上清即为洗脱的融合蛋白。

5.3 化学酸性洗脱方案（本方法为非变性洗脱方案）

- 1) 每 10-20 μ L 原始磁珠体积，加入 100 μ L 的酸性洗脱液（0.1M 甘氨酸，pH 3.5），将样品在室温下在旋转器上混合并孵育 5-10 分钟。
- 2) 在磁性支架上分离磁珠 10 秒，保存上清液到新的离心管中，并立即加入中和缓冲液（如每 100 μ L 的酸性洗脱液加入 20 μ L 中和缓冲液（1 M Tris pH 8.5））。上清即为洗脱的融合蛋白。
- 3) 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 2.5-3.5 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。

缓冲液汇总

细胞裂解液：正常 RIPA 细胞裂解缓冲液

Binding buffer: 可以用 RIPA 代替

Washing buffer: PBST(1*PBS + 1% Triton X-100)

Elution buffer: 直接加入 1*蛋白 loading buffer, 98℃ 5 min 后弃去磁珠后, 收集上清液检测

0.05 M TBS (pH7.4) 的配制: Tris (三羟甲基胺基甲烷) 6.05g, NaCl 8.75g, 加蒸馏水 800ml, 磁力棒搅拌下滴加浓 HCl 至 pH 为 7.4, 再加蒸馏水至 1000ml。

0.05 M TBST (pH7.4) 的配制: Tris (三羟甲基胺基甲烷) 6.05g, NaCl 8.75g, 加蒸馏水 800ml, 加 5ml tween20, 磁力棒搅拌下滴加浓 HCl 至 pH 为 7.4, 再加蒸馏水至 1000ml。

常见问题及对策

常见问题	原因	解决方法
高的背景条带	蛋白非特异结合到抗体, 磁珠或 EP 管上洗涤次数不够	对裂解液进行预处理去除非特异蛋白; 在最后一次洗涤前, 转移整个样品到新的 EP 管中然后进行离心。
	洗涤次数不够	增加洗涤的时间和次数。
无蛋白条带	HA 标签蛋白没有表达	确保目的蛋白带有 HA 标签; 制备新鲜的裂解液; 使用恰当的蛋白酶抑制剂。
	孵育时间不足	增加孵育时间。
	样品中存在干扰物质	裂解液中存在高浓度的 DTT, 2-mercaptoethanol 或者其他的还原剂, 更换裂解液。