

Anti-HA (YPYDVPDYA) 免疫磁珠

Cat#: MIP0063

(本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

Anti-HA (YPYDVPDYA) 免疫磁珠，由高品质的 HA 小鼠单克隆抗体与磁珠共价偶联制成。该产品具有高载量（至少为 0.6mg protein/ml 磁珠），高特异性，操作迅速便捷，性质稳定的特点，可用于 HA 标签融合蛋白的免疫（共）沉淀。

二. 性能指标

- 应用范围：** 可用于 Met 修饰的 N 端 HA 融合蛋白 (Met-HA-Protein)，N 端 HA 融合蛋白 (HA-Protein) 和 C 端 HA 融合蛋白 (Protein-HA) 的免疫（共）沉淀。
- 抗体属性：** Anti-HA (YPYDVPDYA) 小鼠单克隆抗体。
- 磁珠属性：** 琼脂糖包裹的超顺磁珠，平均粒径 50um。
- 载量：** 0.5mL 磁珠，共价偶联 1mg Anti-HA 单克隆抗体，可纯化或沉淀至少 0.6mg HA 融合蛋白。
- 成分：** 0.5mL 共价偶联 Anti-HA 小鼠单克隆抗体的磁珠，溶于 1ml PBS 中。
- 保存方法：** 在加入了 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，4°C可保存 1 年。

三. 用前必读

1. 以下试剂及设备，需要客户自备，试剂推荐配方见说明书附件 1，推荐蛋白质制备方案见附件 2。

磁力架 1 个，1.5mL 离心管若干
细胞裂解液，上样缓冲液，待测抗原样品及检测抗体

2. 注意事项（开箱前必读）

- 1) 本产品在在加入了 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，4°C可保存 1 年，冷藏条件下运输。
- 2) 勿离心、干燥磁珠，勿使用超声处理磁珠，勿使酸处理磁珠时间超过 10min。
- 3) 混匀磁珠时，请采用移液枪轻柔吹打，柔和涡旋，上下颠倒及摇床混匀等方法。勿使用超声等方法。
- 4) 以下使用方法中的磁珠用量，均为少量制备的示范用量，具体用量请根据实际情况调整。

四. 使用方法

免疫（共）沉淀法检测 HA 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-HA 免疫磁珠至均一，取 20μL 磁珠悬液(约含 10μL 磁珠)至 1.5mLEP 管中，加入 500 μL 1xPBS，轻柔重悬清洗磁珠，磁力架上静置 10 sec 后，弃上清，重复上述步骤两次。
注意：多个样品时，可将磁珠重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。
- 2) 加入 50-200μL 含有目标蛋白的真核细胞裂解液，轻柔重悬磁珠，室温摇床孵育 2hr 或者 4°C孵育过夜。
- 3) 磁力架上静置 10 sec 后，将上清液转移到新的 EP 管中备用（上清液可用于检测 HA-tag 蛋白是否存在残留）。
- 4) 清洗磁珠，加入 500μL 1xPBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复两次。

- 5) 加入 2x 上样缓冲液 50ul, 煮样 5min, 冷却至室温并离心。取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。

附件 1. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐, 客户应根据具体情况进行调整。

细胞裂解液:	150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂, 使用说明见附件 2)
HA 多肽	该多肽为轻质粉末, 开盖前应离心。建议将 1ml ddH ₂ O 溶液加至 10mg 多肽粉末中, 彻底溶解后, 制成 10mg/ml 储存液, -20°C 保存。使用时用 1xPBS 稀释至需要的浓度。按需求浓度稀释至工作浓度。
酸性预洗液:	0.15M PBS buffer, pH5.0
酸性洗脱液:	0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH3.0
中和液:	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
10xPBS (pH7.5) :	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 2.8g, NaCl 89g 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
1xPBS (清洗液/储存液)	1xPBS, pH7.5
2x 上样缓冲液	125mM Tris HCl, pH6.8, with 4% SDS, 20% glycerol and 0.004% bromphenol blue

附件 2. 细胞裂解液制备

- 1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中, 1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来, 放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 2) 预冷的 1xPBS 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液, (例如: T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%, 一般约 0.5-1x10⁷ 细胞, 需要加入 1mL 细胞裂解液)。反复吹打后冰上放置 10-20min, 让细胞充分裂解。
- 4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声, 直至细胞裂解液透明, 不再粘稠。冰上放置 30min 之后, 12000rpm, 4°C 离心 10min。取上清, -80°C 冷冻保存。