

HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)

产品编号	产品名称	包装
P2185S	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2185M	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次

产品简介:

- 碧云天生产的HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法) (HA-tag Protein IP Assay Kit with Magnetic Beads)是一种通过高特异性的Anti-HA磁珠进行HA标签融合蛋白免疫沉淀或免疫共沉淀的试剂盒。本产品的免疫沉淀产物,可以用于HA标签融合蛋白或其蛋白复合物组分的检测。
- 本试剂盒包含高质量的Anti-HA磁珠及经过优化验证的免疫沉淀必要试剂,使免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP, 也称Pull-down)或免疫共沉淀(Co-IP)实验更加简单、便捷、高效,广泛用于带有HA标签的融合蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀、免疫共沉淀或纯化等实验。
- 免疫沉淀或免疫共沉淀是研究蛋白或蛋白与蛋白相互作用(Protein-Protein Interactions, PPIs)的常用实验技术,通过使用特异性抗体和可结合抗体的介质(如Protein A/G Agarose或Protein A/G磁珠),或直接使用偶联特异性抗体的介质(如琼脂糖凝胶或磁珠),然后通过离心或磁力从溶液中分离出抗原和抗体复合物,从而将目标蛋白质从复杂样品中分离出来,随后可以用于Western印迹检测或质谱分析等[1-2]。
- HA标签(HA-tag)、Flag标签(Flag-tag)、Myc标签(Myc-tag)、His标签(His-tag)和GST标签(GST-tag)等是表达载体上最常见的一些标签,通过与这些标签的融合表达可以非常方便地检测目的蛋白及与目的蛋白相互结合的蛋白,也可以非常方便地用于目的蛋白的纯化。
- HA-tag是9个氨基酸残基(YPYDVPDYA)组成的多肽,源于人流行性感冒病毒血凝素(influenza virus hemagglutinin)的98-106位氨基酸序列,所以称为HA多肽。其常用的形式有HA和3X HA,通过基因重组技术把HA-tag的核酸序列与目的基因的5'端或3'端连接,就可以最终表达形成HA-tag的目的蛋白。HA-tag具有以下优点:HA-tag通常不会与目的蛋白相互作用,并且大多数情况下不会影响目的蛋白的功能;HA-tag作为标签蛋白,后续通过HA抗体(AH158/AF2858)、Anti-HA磁珠(P2121)或Anti-HA亲和凝胶(P2287)即可对目的基因的表达、定位及功能进行检测或对目的蛋白进行纯化、免疫沉淀或免疫共沉淀等。基于以上优点,HA标签已被广泛应用于蛋白表达、纯化、鉴定、相互作用和功能等多方面的研究[3]。
- 本试剂盒包含高质量的BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads (Anti-HA磁珠)、BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads (小鼠IgG磁珠,作为阴性对照)及优化的各种缓冲液如Lysis Buffer、TBS (10X)、Protease Inhibitor Cocktail (100X)、HA Peptide (25X)、Acid Elution Buffer、Neutralization Buffer、SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)等免疫沉淀必要试剂,使免疫沉淀或免疫共沉淀实验更加简单、便捷、高效。本试剂盒进行免疫沉淀的流程参考图1。

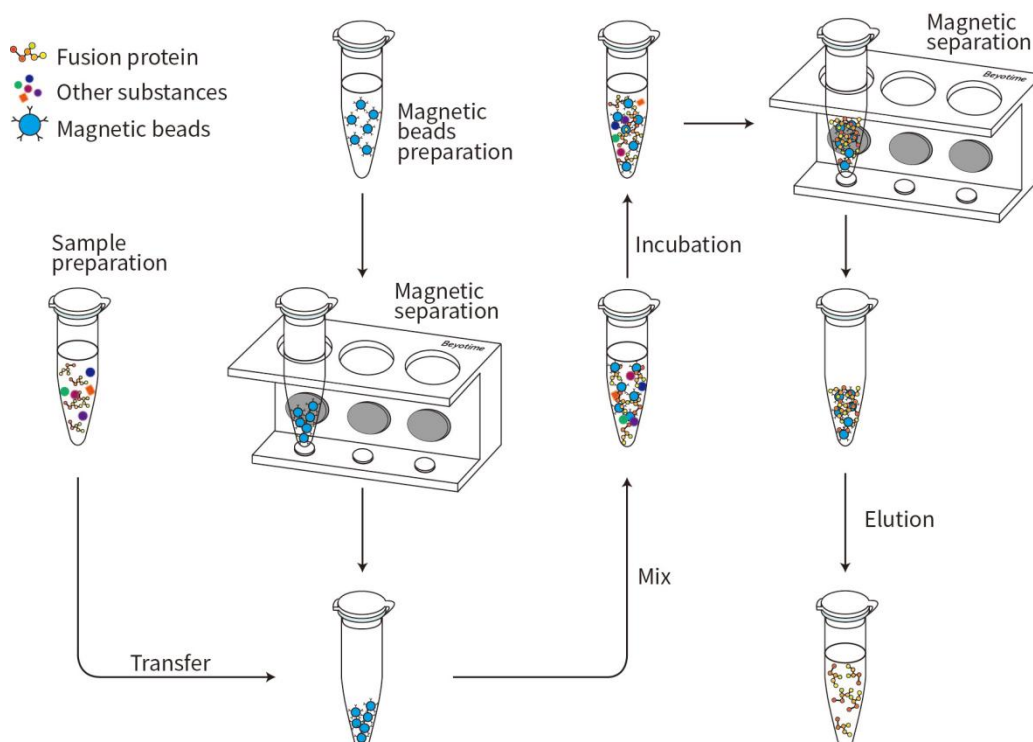


图1. 碧云天HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)的免疫沉淀流程图。

- 本试剂盒中的BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads (Anti-HA磁珠)可以特异性地结合HA标签融合蛋白，并可以借助磁力架等磁分离设备非常便捷地应用于带有HA标签的融合蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀或纯化等实验。其特点有：(1)**特异性强、靶蛋白结合量高**。与国内外大多数的同类产品相比，本Anti-HA磁珠抗体结合密度高，对带有HA标签蛋白的结合具有很强的特异性，并且磁珠粒径小，不易产生非特异吸附。每毫升磁珠悬浊液含约10mg磁珠，含有不少于0.6mg HA抗体，通常可结合不少于0.6mg HA标签融合蛋白，具体的最大结合量和标签蛋白的分子量大小等相关。每500μl样品，通常仅需使用10-20μl磁珠悬浊液，就可以高效地进行免疫沉淀实验。(2)**可结合多种形式的HA标签蛋白**。Anti-HA磁珠可特异性地结合甲硫氨酸修饰的N端HA融合蛋白(Met-HA-Protein)、N端HA融合蛋白(HA-Protein)、C端HA融合蛋白(Protein-HA)。(3)**结合目的蛋白速度快**。Anti-HA磁珠为纳米级磁珠(~200nm)，具有超大的比表面积，便于抗体和抗原的快速有效结合。通常10分钟内即可完成抗原吸附的过程，30分钟内完成目的蛋白免疫沉淀操作。缩短操作时间可以有效避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性，充分保证目的蛋白的活性。本试剂盒中Anti-HA磁珠的主要指标如下表：

Characteristics	Description
Product content	10mg/ml magnetic beads in specific protective buffer
Beads size	~200nm
Magnetization	Superparamagnetic
Coupled antibody	Anti-HA mouse monoclonal antibody
Isotype	IgG1
M.W. of antibody	Approximately 150kDa
Antibody concentration	≥0.6mg HA antibody per ml beads
Binding capacity	≥ 0.6mg HA-tagged fusion protein per ml beads
Specificity	Met-HA-Protein, HA-Protein, Protein-HA
Elution method	Acid, peptide competitive or SDS-PAGE loading buffer elution. Note: If elute with SDS-PAGE loading buffer, the light (~25kDa) and heavy (~50kDa) chain of HA antibody will be denatured and release from the beads.
Application	IP, Co-IP, Protein purification

- **本试剂盒提供三种洗脱方法**。根据目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的要求等，本试剂盒提供三种洗脱方法，包括HA多肽、酸性和SDS-PAGE上样缓冲液洗脱液进行洗脱。特别是HA多肽洗脱后不会包含抗体的轻链和重链，可以有效解决免疫沉淀后Western实验中轻链和重链的干扰问题。本试剂盒用于GFP-HA融合蛋白的免疫沉淀效果参考图2，本试剂盒用于p53和LTA (SV40 Large T antigen)的免疫共沉淀效果参考图3 [4]。

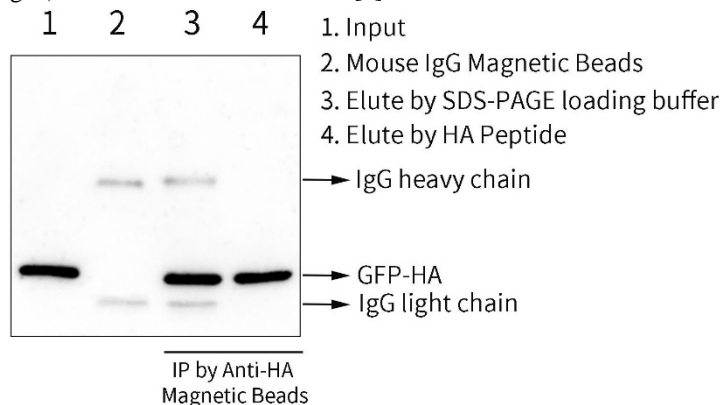


图2. 碧云天HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)用于GFP-HA融合蛋白的免疫沉淀效果图。293T细胞(人胚肾细胞)转染GFP-HA质粒36小时后，经Lysis Buffer裂解。样品1为Input，即全细胞裂解液(total cell lysate)；样品2为BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads (小鼠IgG磁珠)免疫沉淀后经SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)洗脱后的样品，该Mouse IgG是正常的小鼠IgG (Normal Mouse IgG)，为阴性对照；样品3和4都为本试剂盒中BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads (Anti-HA磁珠)免疫沉淀后的样品，其中样品3使用SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)洗脱，样品4使用本试剂盒提供的HA Peptide洗脱。使用SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)洗脱后可以检测到HA抗体的轻重链，而使用HA Peptide洗脱仅含有GFP-HA，整个泳道仅检测到单一的目的条带。Western印迹成像由BeyoImager™ 600化学发光成像系统完成(EI600)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

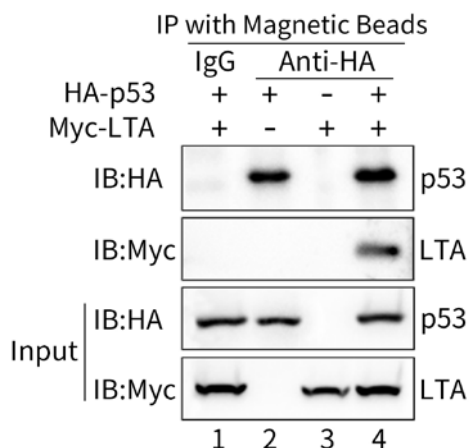


图3. 碧云天HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)用于HA-p53和Myc-LTA融合蛋白的免疫共沉淀效果图。293T细胞(人胚肾细胞)单独或共转染pCMV-HA-p53 (D3033)、pCMV-Myc-LTA (D3036)质粒36小时后,使用本试剂盒中的Lysis Buffer裂解。泳道1为Mouse IgG Magnetic Beads (小鼠IgG免疫磁珠)免疫沉淀后经本试剂盒提供的HA Peptide洗脱后的样品,该Mouse IgG是正常的小鼠IgG (Normal Mouse IgG),为免疫共沉淀的阴性对照;泳道2、3和4为BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads免疫沉淀后,经本试剂盒提供的HA Peptide洗脱后的样品,从泳道4可观察到共转染的Myc-LTA与HA-p53可以相互作用。Input即全细胞裂解液(Total cell lysate)。Western印迹成像由BeyoImager™ 600化学发光成像系统完成(EI600)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

- 对于常规的免疫沉淀实验,按照每500μl样品使用20μl磁珠悬浊液,本试剂盒小包装P2185S和中包装P2185M分别可以进行20次和100次样品的免疫沉淀,同时分别可以进行4个和20个阴性对照的免疫沉淀;按照每100μl样品使用4μl磁珠悬浊液,则分别可以进行100次和500次样品的免疫沉淀,同时分别可以进行20个和100个阴性对照的免疫沉淀。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2185S-1	Lysis Buffer	50ml
P2185S-2	TBS (10X)	5ml
P2185S-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	0.5ml
P2185S-4	BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads	0.4ml
P2185S-5	BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads	80μl
P2185S-6	HA Peptide (25X)	80μl
P2185S-7	Acid Elution Buffer	2ml
P2185S-8	Neutralization Buffer	0.2ml
P2185S-9	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)	0.4ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2185M-1	Lysis Buffer	250ml
P2185M-2	TBS (10X)	15ml
P2185M-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	2.5ml
P2185M-4	BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads	2ml
P2185M-5	BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads	0.4ml
P2185M-6	HA Peptide (25X)	0.4ml
P2185M-7	Acid Elution Buffer	10ml
P2185M-8	Neutralization Buffer	1ml
P2185M-9	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20℃保存,一年有效。P2185-4 BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads和P2185-5 BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads可以4℃保存。

注意事项:

- 需自备磁分离架,推荐使用碧云天的1.5/2ml磁分离架(FMS004、FMS008、FMS012、FMS016、FMS024)。
- 如果免疫沉淀的目的蛋白涉及磷酸化修饰或者乙酰化修饰,需要自备相应的磷酸酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂。推荐选购

碧云天的磷酸酶抑制剂混合物A (50X) (P1081/P1082)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。

- 本试剂盒提供的Lysis Buffer经反复测试, 适合很多情况下的免疫沉淀或免疫共沉淀时的样品裂解和后续的洗涤。但由于免疫沉淀或免疫共沉淀蛋白样品的复杂性和特殊性, 本Lysis Buffer不一定适合所有免疫沉淀样品的裂解与洗涤。在使用本试剂盒提供的Lysis Buffer效果欠佳的情况下, 需要自行对于裂解液和洗涤液进行摸索和调整。此时建议根据文献自行配制裂解液和洗涤液, 或尝试碧云天的其它适当裂解液: <https://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- BeyoMag™系列磁珠经测试, 反复冻融3次以上, 不影响使用效果。
- BeyoMag™ Magnetic Beads需维持pH为6-8, 避免高速离心、干燥或冻存; 请勿长时间将磁珠置于磁场中, 否则可能会引起磁珠聚团。
- BeyoMag™ Magnetic Beads使用前要适当充分重悬, 即颠倒若干次使磁珠混合均匀, 混匀操作须轻柔, 不宜剧烈涡旋震荡等, 避免抗体变性等。
- 在免疫沉淀时, 建议设置阳性和阴性对照组(BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads)。本试剂盒中提供适量的阴性对照, 更多需求, 可以订购碧云天的BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads (小鼠IgG磁珠) (P2171)。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作, 并应始终放置在4°C或冰浴, 以减缓蛋白降解或变性。
- 如果使用真空泵等仪器吸取上清液, 须注意真空泵的吸液强度, 以免吸力过大而吸取到聚集的磁珠。
- 酸性溶液洗脱时磁珠可能会发生聚集, 属于正常现象, 不影响磁珠的正常使用。0.1%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, 并且不会影响磁珠的抗体结合效率。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 试剂盒的准备。

- a. 参考下表, 按照每个样品使用100-500μl裂解液的比例, 准备相关试剂。

Steps	Solution required	Volume per assay	Volume per assay
Cell lysis and sample preparation	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100μl	500μl
Preparation of HA Peptide elution buffer and magnetic beads	TBS	~0.52ml	~1.6ml
Immunoprecipitation	Magnetic Beads	4μl	20μl
Wash (3 times)	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100μl each time	500μl each time
Peptide competitive elution (optional)	Peptide solution (1X)	20μl	100μl
Acid elution and neutralization (optional)	Acid Elution Buffer	20μl	100μl
	Neutralization Buffer	2μl	10μl
SDS-PAGE sample loading buffer elution (optional)	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)	20μl	100μl

- b. **含抑制剂裂解液的配制。**参考上表, 按照每50-100万细胞使用100-200μl含抑制剂裂解液用于裂解以及300-600μl含抑制剂裂解液用于洗涤的比例, 配制适量的含抑制剂裂解液。将Lysis Buffer与Protease Inhibitor Cocktail (100X)按照100:1的比例混合, 例如在1ml的Lysis Buffer中加入10μl Protease Inhibitor Cocktail (100X), 即得1ml含抑制剂裂解液(Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail)。配制好的含抑制剂裂解液宜放置在冰浴或4°C。

注1: 如果免疫沉淀的目的蛋白涉及磷酸化修饰或者乙酰化修饰, 需要添加磷酸酶抑制剂或去乙酰化酶抑制剂。推荐使用碧云天的磷酸酶抑制剂混合物A (50X) (P1081/P1082)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。如果有特殊需求, 可考虑选择其它适当的抑制剂混合物: <https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。

注2: 本试剂盒提供的Lysis Buffer不仅用于样品裂解, 也用于后续的洗涤步骤, 请特别注意“注意事项”中的相关描述。

注3: 含抑制剂裂解液宜现用现配, 不宜配制后冻存并留作后续使用。如果有特殊需求, 可以尝试碧云天的其它多种蛋白酶、磷酸酶和去乙酰化酶抑制剂混合物: <https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。

- c. **TBS的配制。**将TBS (10X)用超纯水稀释至1X, 即为TBS。例如1ml TBS (10X)加入9ml超纯水, 混匀后即TBS。

- d. **磁珠的准备。**由于磁珠储存在特殊保护液中, 所以需要在加入样品前适当洗涤。

(a) 用移液器轻轻吹打重悬磁珠, 按照每500μl样品使用20μl磁珠悬浊液比例, 取适量磁珠至一洁净离心管中(FTUB015), 加入TBS至最终体积为约0.5ml。说明: 如果初始磁珠体积大于0.2ml, 可以考虑先直接置于磁力架上分离10秒, 去除上清, 然后再加入TBS至最终体积为约0.5ml。

(b) 用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离10秒, 去除上清。重复上述步骤两次。

(c) 按照初始体积的量, 用TBS重悬磁珠。

- e. **HA多肽洗脱液的配制。**将HA Peptide (25X)用TBS稀释25倍即为HA多肽洗脱液, 如将10μl HA Peptide (25X)加入240μl TBS中混匀即可。配制好的HA多肽洗脱液宜放置在冰浴或4°C。本HA Peptide (25X)经过优化, 适用于大多数洗脱, 如果标签蛋白丰度高, 也可以仅稀释10倍。如需更多的HA多肽, 可订购碧云天的HA Peptide (HA多肽) (P9808)。

- f. **SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)的配制。**取适量SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)用水稀释5倍即为SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。例如0.2ml SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)加入0.8ml超纯水, 混匀后即

SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。

2. **细胞或组织样品的裂解和准备。**样品裂解后宜立即进行后续的免疫沉淀或免疫共沉淀，如果不能立即进行后续的实验，可以-20°C或-80°C冻存，但冻融可能会影响蛋白与蛋白的相互作用。所有的样品裂解步骤宜在冰浴或4°C操作，以尽量减少蛋白降解的可能性。样品准备好后，注意取一定量作为Input或Total，以用于后续的Western等检测。

a. **悬浮细胞的样品裂解和准备。**250-1000×g室温离心3-5min收集细胞。如有必要，可以使用PBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻vortex或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照每50-100万细胞加入100-200μl的比例加入含抑制剂裂解液。轻弹管底或适当吹打，以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，建议分装成50-100万细胞/管，然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分，而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触，相对比较容易裂解充分。充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。**注：**裂解后会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

b. **贴壁细胞样品的裂解和准备。**吸除培养液。如有必要，用PBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。按照每50-100万细胞(相当于6孔板的一个孔)加入100-200μl的含抑制剂裂解液，适当吹打，使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞1-2秒后，细胞就会被裂解。植物细胞宜在冰上裂解2-10min。充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。**注：**裂解后会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

c. **细菌或酵母样品的裂解和准备。**对于1ml菌液或酵母液，离心去上清，如果有必要，可以使用PBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻vortex或者弹击管底以把细菌或酵母尽量分散开。加入100-200μl含抑制剂裂解液，轻轻vortex或者弹击管底以混匀，冰上裂解2-10min。如果希望获得更好的裂解效果，细菌和酵母可以分别使用溶菌酶(lysozyme)和破壁酶(lyticase)消化，然后再使用含抑制剂裂解液进行裂解。充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。**注：**裂解后很可能会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

d. **组织样品的裂解和准备。**

(a) 把组织剪切成细小的碎片。如果组织样品本身非常细小，也可以不再进行剪切。

(b) 按照每10-20毫克组织使用100-200μl的比例加入含抑制剂裂解液。如果裂解不充分可以使用更多的含抑制剂裂解液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少裂解液的用量。

(c) 用玻璃匀浆器匀浆，或使用碧云天生产的E6600 TissueMaster™手持式组织研磨仪研磨，直至充分裂解。也可以把组织样品冷冻后液氮研磨，研磨充分后加入裂解与洗涤液进行裂解。

(d) 充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。每20mg冻存的小鼠肝脏组织用200μl含抑制剂裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为15-25mg/ml，不同状态的不同组织有所不同。**注：**裂解后很可能会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

3. **免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)。**

a. **加入磁珠与孵育。**按照每500μl蛋白样品加入20μl磁珠悬浊液的比例加入磁珠，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育2小时或4°C孵育过夜。

注1：样品中需要加入BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads用于免疫沉淀带有HA标签的目的蛋白及其复合物，同时建议酌情在部分样品中加入BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads进行免疫沉淀以作为阴性对照。

注2：孵育过程中，如果磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。

注3：对于使用BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads进行免疫沉淀后续发现背景非常高的情况，可以考虑使用BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads进行预沉淀处理，以消除非特异性吸附，然后再使用BeyoMag™ Anti-HA Magnetic Beads进行免疫沉淀。BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads用于进行预免疫沉淀时用量比较多，需要另行订购。

b. **磁分离。**孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，去除上清。**注：**可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。

c. **洗涤。**加入0.5ml的含抑制剂裂解液，用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复使用含抑制剂裂解液洗涤三次。**注：**也可以通过检测洗涤得到的液体的OD₂₈₀来判断是否洗涤完全，若OD₂₈₀大于0.05，应适当增加洗涤次数。

4. **洗脱。**根据标签蛋白的特点及后续实验要求，可以选择如下3种方法之一进行洗脱。

a. **HA多肽竞争洗脱法。**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。

(a) 每20μl原始磁珠体积，加入100μl HA多肽洗脱液，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温摇晃孵育30-60分钟，或4°C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。

(b) 孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的HA标签蛋白及其复合物。

(c) 洗脱的HA标签蛋白及其复合物置于4°C待用，或者-20°C或-80°C长期保存。

b. **酸性洗脱法。**本方法为非变性法，比较快速高效。洗脱后的蛋白很多情况下能保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

(a) 每20μl原始磁珠体积，加入100μl Acid Elution Buffer (酸性洗脱液)，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育5分钟。**注：**孵育时间不宜超过15分钟。

(b) 孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入10μl Neutralization Buffer (中和液)，适当混匀。**注：**须立刻加入中和液并混匀，否则长时间处于酸性洗脱液中会容易导致一些蛋白失去活性。

(c) 为了获得最大的洗脱效率，可重复步骤a和b，并将相同样品合并。

(d) 洗脱并中和的HA标签蛋白及其复合物置于4°C待用，或者-20°C或-80°C长期保存。

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

注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, 具体需要自行优化相关实验条件。也可以考虑采用效率可能更高的HA多肽竞争洗脱法或效率预期最高的SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法, 后者的缺点是在变性条件下进行洗脱, 可能会对后续的对蛋白活性有要求的实验产生影响。

c. 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检测。

(a) 每20 μ l原始磁珠体积的磁珠, 加入100 μ l SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X), 95 $^{\circ}$ C加热5分钟。

(b) 置于磁力架上分离10秒, 取上清即可用于SDS-PAGE电泳或Western检测。

注1: 通常SDS-PAGE蛋白上样缓冲液含有DTT等还原剂, 其洗脱得到的蛋白样品中会含有抗体的轻链和重链。

注2: 其它SDS-PAGE上样缓冲液可以考虑选择碧云天的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(2X) (P0015B)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X) (P0015)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0015F)。

常见问题:

Problem	Possible Causes	Solution
Very few or no tagged protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	Change elution methods.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the tagged protein by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	Reduce the time and number of washes.
	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation time.
	Interfering substance is present in sample.	Lysates containing high concentration of DTT, 2-mercaptoethanol, or other reducing agents may destroy antibody function, and must be avoided.
	Detection system is inadequate.	If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity. 2. Verify that the transfer was adequate by using prestained protein marker or staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.
Background is too high.	Proteins bind nonspecifically to the monoclonal antibody, insufficient washing on magnetic beads, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Mouse IgG Magnetic Beads (P2171) to remove nonspecific binding proteins. 2. After suspending beads for the final wash, transfer entire sample to a clean microcentrifuge tube before centrifugation.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Choose other wash buffers. Increase the salt and/or detergent concentrations in the wash solutions. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins.
Multiple protein bands found in the eluate.	The protein is not stable at room temperature.	Purify the target protein at lower temperature, such as 4 $^{\circ}$ C.
	Protein degradation due to proteases activity during purification process.	Add protease inhibitors to cell lysate.
	Non-specific binding.	1. Prepare cell lysate again. 2. Add additional wash steps.

参考文献:

1. Lee C. Methods Mol Biol. 2007. 362:401-406.
2. Gevaert K, Vandekerckhove J. Electrophoresis. 2000. 21:1145-1154.
3. Toshiyuki U, David J F W, Pier-Luc T, Kelly P N, Joy E W, et al. ACS Synth Biol. 2019. 8(8):1809-1817.
4. Bargonetti J, Reynisdóttir I, Friedman PN, Prives C. Genes Dev. 1992. 6(10):1886-98.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2175S	免疫沉淀试剂盒(Protein A 磁珠法)	20-100 次
P2175M	免疫沉淀试剂盒(Protein A 磁珠法)	100-500 次
P2177S	免疫沉淀试剂盒(Protein G 磁珠法)	20-100 次
P2177M	免疫沉淀试剂盒(Protein G 磁珠法)	100-500 次

P2179S	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G 磁珠法)	20-100 次
P2179M	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G 磁珠法)	100-500 次
P2181S	Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100 次
P2181M	Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500 次
P2183S	Myc 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100 次
P2183M	Myc 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500 次
P2185S	HA 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100 次
P2185M	HA 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500 次
P2187S	V5 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100 次
P2187M	V5 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500 次
P2193S	免疫沉淀试剂盒(Protein A 琼脂糖凝胶法)	20 次
P2193M	免疫沉淀试剂盒(Protein A 琼脂糖凝胶法)	100 次
P2195S	免疫沉淀试剂盒(Protein G 琼脂糖凝胶法)	20 次
P2195M	免疫沉淀试剂盒(Protein G 琼脂糖凝胶法)	100 次
P2197S	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G 琼脂糖凝胶法)	20 次
P2197M	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G 琼脂糖凝胶法)	100 次
P2202S	Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20 次
P2202M	Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100 次
P2204S	Myc 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20 次
P2204M	Myc 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100 次
P2206S	HA 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20 次
P2206M	HA 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100 次
P2208S	V5 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20 次
P2208M	V5 标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100 次
D3031-1μg	pCMV-3X Flag-p53	1μg
D3031-100μg	pCMV-3X Flag-p53	100μg
D3033-1μg	pCMV-HA-p53	1μg
D3033-100μg	pCMV-HA-p53	100μg
D3036-1μg	pCMV-Myc-LTA	1μg
D3036-100μg	pCMV-Myc-LTA	100μg

Version 2022.05.10