

使用说明书

Instruction Manual

HA Tag 纳米抗体免疫沉淀磁珠

HA Tag Nanobody Immunomagnetic Beads

产品描述

TargetMol 的 HA Tag 纳米抗体免疫沉淀磁珠可特异性地与带有 HA 标签的蛋白结合, 可以用于蛋白质、蛋白质复合物、蛋白质核酸复合物和其他抗原的免疫沉淀 (IP)。本品适用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等来源的抗原样品。纳米抗体 (Nanobody) 是一类来源于骆驼科动物 (如骆驼、羊驼) 的天然重链抗体的可变区片段 (VHH), 是目前已知最小的天然功能性抗体结构单元, 通常只有约 12–15 kDa, 为传统 IgG 抗体的十分之一。纳米抗体较传统 IgG 抗体体积更小、亲和力更高、无轻重链干扰, 能够更接近目标蛋白表位, 减少空间位阻, 同时不易脱落, 洗脱条件温和, 对样品保持更高的生物学活性。

产品特点

- 无抗体链干扰: 无论使用变性或非变性洗脱, 免疫沉淀产物中均不会混入抗体轻链或重链, 便于后续 WB 分析。
- 超高亲和力: 具 nM 级结合能力, 适用于表达量低或难转染的细胞样本。
- 结合能力强: 采用定向偶联工艺, 10 μ L 磁珠可结合约 15 μ g 目标重组蛋白。
- 高特异性: 经 10 余种空白细胞系验证, 几乎无非特异性吸附。
- 标签识别灵活: 可特异性结合 1 $\times$ 或 3 $\times$ Flag 标签, 可识别诱饵蛋白 N 端或 C 端的标签, 兼容性广。
- 抗热稳定: 经 45 $^{\circ}$ C 高温测试, 耐受运输波动及常温放置, 稳定可靠。

产品信息

HA Tag 纳米抗体免疫沉淀磁珠	
粒径	2 μ m
结合能力	$\geq$ 1.5 mg HA 标签蛋白/mL 磁珠
保存溶剂	20 mM PBS, 5% BSA
应用推荐	IP, Co-IP, ChIP、RIP

操作说明

自备试剂

试剂	可选配方
洗涤缓冲液 Washing Buffer (1 $\times$)	TBST: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1%(v/v) Tween-20, pH7.4
HA 多肽洗脱缓冲液 HA Peptide Elution Buffer	PBS, 1 mg/mL HA peptide (TP1276), pH 7.4
酸性洗脱缓冲液 Acidity Elution Buffer	0.1M Glycine, 0.1% (v/v) Tween-20, pH2.5
中和缓冲液 Neutralization Buffer	1 M Tris-HCl, pH 9.0

1. 细胞裂解液制备

选择合适的裂解液处理细胞样品，按照标准步骤制备细胞裂解液，置于冰上备用，或于-20℃长期保存。

2. 磁珠预处理

- 1) 将免疫沉淀磁珠用涡旋振荡器振荡 1 min，使磁珠重新悬浮，取 20~30 μL 磁珠悬液放入 1.5 mL EP 管中。
- 2) 向 EP 管中加入 500 μL Washing Buffer 进行洗涤，温和翻转 EP 管数次，使磁珠重新悬浮。将 EP 管放入磁性分离器，静置 1 min，进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管。重复上述洗涤步骤 2 次。

3. 免疫沉淀步骤

- 1) 向 EP 管中加入 500 μL 制备好的细胞裂解液，将 EP 管放在旋转混合仪上，在 37℃ 下旋转混合 30 min。如结合力较弱，可在室温下孵育 1 h，或在 4℃ 下孵育过夜。
- 2) 孵育结束后，进行磁性分离，弃去或保存上清以供后续分析。
- 3) 向 EP 管中加入 500 μL Washing Buffer 进行洗涤。进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管，重复洗涤磁珠 3 次。

4. 抗原洗脱

提供以下几种抗原洗脱方案，用户可根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。

- 1) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向 EP 管中加入 100 μL SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，混合均匀，95℃ 加热 5 min。然后进行磁性分离或者离心(室温，13000 g, 10 min)，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。
- 2) 中性洗脱法：向 EP 管中加入 50 μL HA Peptide Elution Buffer，置于旋转混合仪上在 37℃ 孵育 5-10 min (低于 37℃ 时需适当延长孵育时间)。然后进行磁性分离或者离心，收集上清液。为提高抗原回收率，可重复以上步骤。
- 3) 酸性洗脱法：向 EP 管中加入 100 μL Acidity Elution Buffer，置于旋转混合仪上在 37℃ 孵育 5-10 min。然后进行磁性分离或者离心，收集上清液。如需中和酸性洗脱液，可向 100 μL 洗脱液中加入 50 μL Neutralization Buffer，调整 pH 至中性。

注：纳米抗体磁珠没有轻重链污染问题，建议首选变性洗脱法，洗脱效率更高。

保存条件

4℃，1 年。

注意事项

1. 避免冷冻磁珠。磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
2. 为了减少磁珠的损失，每次磁性分离的时间不应少于 1 min。
3. 在从磁珠保存管中取出磁珠之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管，以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 操作者可根据实际需求，利用抗体结合反应步骤和抗原结合反应步骤中收集的上清液，检测抗体、抗原与磁珠的结合情况。
6. 在 IP 实验中，不同类型的抗体和抗原结合的亲和力会有所不同。如果使用本说明书推荐的缓冲体系未能获得理想的实验结果，操作者可以自行筛选和配制缓冲液进行实验。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

