



## Anti-HA Nanobody IP kit (Magarose)

### ● 产品规格

货号: KTSM1363

储存条件: 4°C (避免冻存)

保质期: 12 个月

运输: 冰袋运输

### ● 试剂盒清单

品名	货号	规格	
Anti-HA Nanobody Magarose Beads	KTSM1335	500 uL	
Negative Control Magarose Beads	KTSM1357	500 uL	
Positive Control Protein Sample (HA-tag)	KTSM302	1 mL	
Buffer Set	Lysis buffer	KTSM1401	5 mL
	RIPA buffer	KTSM1402	5 mL
	Dilution/Wash buffer (10x)	KTSM1403	10 mL
	Loading buffer	KTSM1404	1 mL
	Glycine-elution buffer	KTSM1405	1 mL
	Neutralization buffer	KTSM1406	1 mL

注意: Dilution/Wash buffer (10x) 产品为 10 倍浓缩缓冲液, 需要用去离子水 10 倍稀释后使用。收到货后请尽快将 Positive Control Protein Sample 取出, 分装 10 份后 -80°C 保存, 每次取一份用于阳性对照实验。

### ● 产品说明

Anti-HA Nanobody Magarose Beads (以下称 anti-HA beads) 是将抗 HA 标签 (YPYDVDPYA) 纳米抗体共价偶联到磁性琼脂糖珠上, 用于抓取哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物的细胞提取物中的含 HA 标签的蛋白及与其紧密相互作用的蛋白。

本试剂盒 (KTSM1363) 包含一份正装 Anti-HA Nanobody Magarose Beads、一份带 HA 标签的融合蛋白正对照、一份偶联 BSA 阴性对照 Beads, 并搭配推荐 buffer, 一站式服务 IP 相关实验。



## ● 产品应用

应用于: 免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(CO-IP)、RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)、酶活性检测、质谱分析 (MS) 等。

## ● 产品属性

### Anti-HA Nanobody Magarose Beads 属性:

珠子直径: 30-100  $\mu\text{m}$  (磁性琼脂糖微球)

储存液: 1xPBS, 25% glycerol 和 0.02%  $\text{NaN}_3$

结合能力: 每 10  $\mu\text{L}$  anti-HA beads (包含悬浮液) 结合 15-20  $\mu\text{g}$  含 HA 标签的融合蛋白

配基: 抗 HA 标签 (YPYDVPDYA) 纳米抗体 (融合 6 $\times$ his 和 Myc 标签)

反应性: 结合 HA 标签的融合蛋白及与其紧密相互作用的蛋白

### Negative Control Magarose Beads 属性:

珠子直径: 30~100  $\mu\text{m}$  (磁性琼脂糖微球)

储存液: 1xPBS, 25% glycerol 和 0.02%  $\text{NaN}_3$

配基: Bovine Serum Albumin (BSA)

偶联量: 6mg/mL

反应性: 不结合 HA 标签的融合蛋白, 做阴性对照

### Positive Control Protein Sample (HA-tag) :

表达 HA 标签融合蛋白的大肠杆菌裂解液, 融合蛋白大小约 35kDa, 可直接解冻后与平衡后的 Anti-HA Nanobody Magarose Beads 孵育。若有明显沉淀, 可 12000  $\times$  g 离心 10 分钟后取上清使用。

反应性: 与 Anti-HA Nanobody Magarose Beads 特异性结合, 作为阳性对照样品。

## ● 推荐缓冲液

Buffer	Composition
Lysis buffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% Triton-100; 1 mM EDTA
RIPA buffer	10 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 0.1% SDS;
Dilution/Wash buffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA
Loading buffer	120 mM Tris-HCl pH 6.8; 20% glycerol; 4% SDS; 0.04% Bromophenol



Glycine-elution buffer	200 mM glycine pH 2.5
Neutralization buffer	1 M Tris-HCl pH 10.4

注意: 对于特定样品类型, 请使用等效的细胞溶解缓冲液

## ● 操作说明

### 1. 实验组

#### ➤ 收集细胞

对于一个免疫共沉淀反应, 推荐使用  $10^6$ - $10^7$  个表达 HA 标签融合蛋白的哺乳动物细胞。吸出生长培养基, 向培养皿中加入 2 mL 预冷的 1x PBS 洗涤细胞 2 次, 利用细胞刮或胰酶消化的方法收集贴壁细胞, 细胞转移到离心管,  $1200 \times g$  离心 3-5 分钟并丢弃上清液。

#### ➤ 裂解细胞

1. 对于细胞质蛋白, 用 200  $\mu$ L 预冷 Lysis buffer 重悬细胞。

注: 在 Lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂和 1 mM PMSF。

对于核蛋白可选择: 在 RIPA buffer 中加入 1 mg/mL DNase、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、蛋白酶抑制剂和 1 mM PMSF。

2. 将离心管放在冰上 30-40 分钟, 每隔 10 分钟重悬细胞一次。

3. 4°C,  $12000 \times g$  离心 10 分钟, 将上清液转移到一个新的预冷离心管中加入 300  $\mu$ L dilution buffer (可用 1x PBS 代替), 弃沉淀 (如需要, 保存 50  $\mu$ L 裂解液进行进一步分析)。

注: 此步骤获得的细胞溶解物可置于 -80°C 下长期保存。

可选做: 在稀释液中加入 1 mM PMSF 和蛋白酶抑制剂。

#### ➤ 平衡 Beads

1. 混匀 anti-HA beads, 吸取 25  $\mu$ L (包含 50%混悬液) 放在 1.5 mL 离心管中。

2. 加入提前预冷的 500  $\mu$ L Dilution buffer 或 1xPBST (0.05% Tween-20), 上下颠倒混匀。

3. 放入磁力架静置分离磁珠 60 秒, 直到上清液澄清, 弃上清液, 重复 3 次。

#### ➤ 结合蛋白

1. 将细胞裂解后获得的上清液加入平衡后的 anti-HA beads 中, 4°C 上下颠倒孵育 1-3 小时。

2. 用磁力架静置分离磁珠, 直到上清液澄清, 丢弃上清液 (如果需要, 保存 50  $\mu$ L 上清液以供进一步分析)。



## ➤ 洗涤

1. 加入 500  $\mu\text{L}$  Dilution buffer 或 1xPBST 重悬 anti-HA beads。
2. 磁力架静置分离磁珠，弃上清液，重复此步骤 2-5 次。

可选做：在第二次洗涤的步骤中增加 NaCl 浓度到 500 mM。

## ➤ 检测

1. 30  $\mu\text{L}$  loading buffer 重悬 anti-HA beads。
2. 将 anti-HA beads 在 95°C 水浴中加热 10 分钟，使免疫沉淀复合物和 anti-HA beads 分离。
3. 用磁力架静置分离磁珠，取上清样品通过 SDS-PAGE 或 western blot 检测。

## ➤ 选做步骤：洗脱（需跳过上述检测步骤）

1. 加 50  $\mu\text{L}$  200 mM glycine pH 2.5，重悬 anti-HA beads，保持混匀状态孵育 3-10 分钟。
2. 用磁力架静置分离磁珠，将上清液转移至新的离心管中，加入 25  $\mu\text{L}$  1M Tris-HCl, pH 10.4 中和 glycine。
3. 为了提高洗脱效率可重复上述步骤 1 和 2 以增加洗脱效率。

## 2. 对照组

### Negative Control Magarose Beads

作为纳米抗体 Beads 阴性对照，参照实验组 Magarose beads 操作说明，以同样操作处理 Negative Control Magarose beads。

Negative Control Magarose Beads 也用于 IP/CO-IP 实验样品的预处理，以减少其他蛋白的非特异性结合，使用方法为：将 50  $\mu\text{L}$  对照组 Magarose beads（包含悬浮液）加入装有 500  $\mu\text{L}$  细胞裂解物的微量离心管中，冰上孵育 30 分钟。磁力架分离或 1200  $\times$  g 离心 3 分钟后把上清液转移到新的离心管，继续后续的标签纳米抗体 beads IP/CO-IP 实验流程。

### Positive Control Protein Sample

作为阳性对照样品使用，可参照实验组步骤，从平衡 Beads 步骤开始操作。

声明：本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序等。