

# HA标签磁珠法IP/Co-IP试剂盒(动物)

## HA-tag Magnetic IP/Co-IP Kit for Mammal

注:本产品干冰运输;试剂按说明书保存于4°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP011 (6T)	IPP011M (12T)	IPP011L (40T)	
01	Anti-HA Magnetic Beads	0.125 mL	0.25mL	0.83 mL	4°C
02	Lysis Buffer	3.5 mL	7 mL	24mL	4°C
03	Wash Buffer	12.5 mL	25 mL	84mL	4°C
04	Elution Buffer	0.325 mL	0.65mL	2.17 mL	-20°C
05	Protease Inhibitor	95μL	0.19mL	0.63 mL	-20°C
06	Neutralization Buffer	32.5 μL	65 μL	0.22mL	4°C

### 注意:

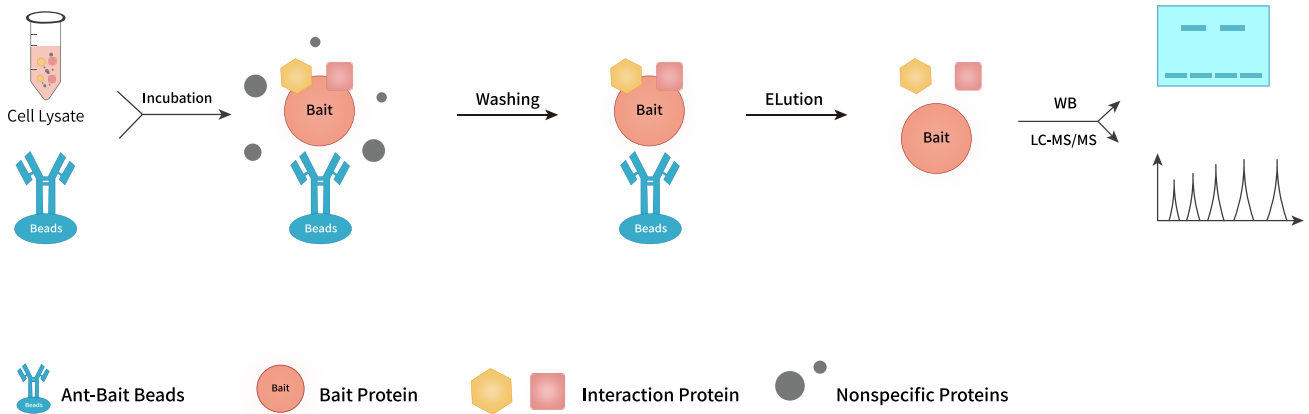
1. 需自备 PBS、磁力架等试剂耗材。
2. 该试剂盒包含足够完成 6、12 或 40 个反应的试剂, 每个反应使用 20 μL 磁珠。由于每次 IP 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组, 因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

### 产品简介/Product Description

本试剂盒采用 Anti-HA 磁珠来完成 HA 标签融合蛋白的免疫共沉淀实验。实验前先将 HA 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。裂解样本后, 将 Anti-HA 磁珠加入样本中, 磁珠上偶联的 HA 纳米抗体与 HA 标签融合蛋白及其结合蛋白形成复合体, 去除未结合的蛋白后, 可以采用多种方法洗脱蛋白质。

# 技术路线/Technology mapping

## 1. 原理流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. 总蛋白提取

#### (1) 动物细胞

- ①实验组和对照组分别取  $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$  个细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞 2~3 次，每次  $4^\circ\text{C}$  500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；
- ②样本管置于冰上，每组加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1% 添加），吹打混匀；
- ③为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- ④ $4^\circ\text{C}$  12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- ⑤取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或  $-80^\circ\text{C}$  保存。

#### (2) 动物组织

- ①采用预冷的 PBS 清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作；
- ②实验组和对照组分别取 0.1~0.2 g 干净的组织，用液氮在研钵中充分研磨，再转移粉末至预冷的新离心管中；
- ③将样本管置于冰上，每组加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1% 添加），吹打混匀；
- ④冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- ⑤ $4^\circ\text{C}$  12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- ⑥取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或  $-80^\circ\text{C}$  保存。

#### 注意：

1. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于  $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。
2. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

## 2. 漂洗液准备

- ①为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出 10 mL 离心管，加入实验组和对照
- ②组总共所需的 3.8 mL a. 漂洗液、19  $\mu$ L b. 蛋白酶抑制剂（按照 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。
- ③如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

## 3. 免疫共沉淀

- ①将① Anti-HA 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20  $\mu$ L 磁珠到新的离心管中；
- ②每组加入 200  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- ③重复上步操作一次；
- ④向磁珠中加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜；
- ⑤放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- ⑥每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- ⑦重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

## 4. 蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

1) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50  $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95  $^{\circ}$ C 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

2) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50  $\mu$ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中；加入 5  $\mu$ L ⑥中和液，-80 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物保持原有生物活性，适用于各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。

**注意：**

1. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。
2. Anti-HA 磁珠没有抗体轻重链污染问题，建议首选变性洗脱法，洗脱效率更高。如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，如果洗脱效率低，则采用变性洗脱法继续洗脱蛋白。
3. Co-IP 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤参考如下：  
(为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可)
  - (1) 固定：30 min（乙醇：乙酸：水 = 4：1：5 体积比）；
  - (2) 敏化：30 min（乙酸钠 10.2 g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45 mL，加水至 150 mL）；
  - (3) 水洗：4 次，每次 10 min；
  - (4) 银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150 mL）；
  - (5) 水洗：2 次，每次 40 s；
  - (6) 显色：显影至条带清楚（碳酸钠 3.75 g，60  $\mu$ L 甲醛，加水至 150 mL）；
  - (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

## 注意事项/Notes

1. 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；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

