

Anti-HA 琼脂糖磁珠

Anti-HA Magnetic Agarose Beads

货号	HXL-HA-mag-agro-1 / HXL-HA-mag-agro-4 / HXL-HA-mag-agro-20	规格	1 / 4 / 20 mL (40% slurry)
用途/方式	HA 蛋白 IP / Co-IP / 小规模纯化	推荐用量	标准用量 50 μ L slurry / 反应
适用样本	细胞裂解液、体外表达体系及其他澄清生物样品	保存条件	2–8°C保存；禁止冷冻

仅供科研使用（RUO），不用于临床诊断或治疗。

1. 产品概述

Anti-HA 琼脂糖磁珠以磁性琼脂糖为固相载体，在其表面稳定固定 anti-HA 抗体，可从细胞裂解液、体外表达体系或其他澄清生物样品中捕获含 HA 表位的融合蛋白。结合后通过磁力架快速完成固液分离，再以游离 HA peptide 竞争洗脱目标蛋白及其相互作用组分。

典型 HA 表位序列为 YPYDVPDYA。N 端或 C 端标签通常均可用于捕获，但标签是否暴露、邻近结构及多聚状态会显著影响实际结合效率，因此首次使用应同时检测 Input、Flow-through 和 Elution，而不能只看最终洗脱液。

2. 产品规格

项目	规格/说明
基质	磁性琼脂糖（Anti-HA 抗体已固定）
粒径	1–5 μ m
产品形式	40% (v/v) 磁珠悬液（slurry）
蛋白结合载量	>1 mg HA 标签蛋白/mL 沉降磁珠（标称值）
单次推荐用量	50 μ L 磁珠悬液，即 20 μ L 沉降磁珠
推荐样品量	起始条件：200–1,000 μ L 澄清裂解液；总蛋白约 0.5–1.0 mg
主要应用	IP、Co-IP、HA 标签蛋白富集和小规模亲和纯化
保存	2–8°C；禁止冷冻、干燥或长时间置于磁场中

包装规格

货号	规格（40% slurry）	参考反应数*
HXL-HA-mag-agro-1	1 mL	约 20 次
HXL-HA-mag-agro-4	4 mL	约 80 次
HXL-HA-mag-agro-20	20 mL	约 400 次

3. 使用前须知

取样前轻柔颠倒或旋转原瓶，使磁珠完全均一悬浮；不要仅从上清层吸取。建议使用宽口枪头或剪口枪头。

结合、洗涤和肽洗脱时保持温和悬浮；采用磁分离，避免高速涡旋、磁力搅拌及高速离心，以免损伤琼脂糖或造成聚集。

磁分离时间取决于磁力架、液体体积和黏度。以“上清澄清且磁珠完全贴壁”为终点，通常为 30–90 秒；不要按固定秒数过早吸液。

裂解液必须充分澄清。建议在 4°C、12,000–16,000 × g 离心 10–15 分钟后取上清；高黏度样品需适当剪切核酸。

所有结合和洗涤缓冲液建议预冷；蛋白酶抑制剂应在使用前现加。若研究磷酸化或其他修饰，按实验需要加入相应抑制剂。

4.推荐缓冲液

缓冲液	推荐组成	用途与注意事项
温和 IP/Co-IP 裂解液	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 或 Triton X-100, 5% glycerol, pH 7.4	适合作为常规起始条件。弱相互作用可将去污剂降至 0.1–0.3%；依赖二价离子的复合物应去除 EDTA 并补充相应离子。
常规洗涤液	TBS + 0.05% Tween-20, pH 7.4；或直接使用已验证的裂解液	常规 IP/纯化使用 TBS-T；Co-IP 优先使用与结合阶段相同或更温和的缓冲体系。
缓冲液	推荐组成	用途与注意事项
标准 HA peptide 洗脱液	1 mg/mL HA peptide (YPYDVPDYA) 溶于 TBS 或 PBS, pH 7.2–7.6	现配或分装保存，避免反复冻融。标准反应使用 50 μL，37°C 30 分钟。

缓冲液边界 不要把含高浓度 DTT、β-巯基乙醇、SDS 或强变性剂的样品直接用于结合。若目标蛋白确实需要还原剂或特殊去污剂，请做小规模梯度验证，并同时检查抗体活性和复合物完整性。

5.标准操作流程：每个样品 50 μL 磁珠悬液

流程概览 混匀取珠 → 平衡 2 次 → 加入澄清裂解液 → 4°C 结合 2-4 小时 → 洗涤 4 次 → 1 mg/mL HA peptide 37°C 洗脱 30 分钟 → 磁分离收集洗脱液。

5.1样品制备

裂解：使用预冷、已验证的裂解液制备样品，并现加蛋白酶抑制剂。建议起始样品为 200–1,000 μL、总蛋白约 0.5–1.0 mg。

澄清：4°C、12,000–16,000 × g 离心 10–15 分钟，转移上清至新的低吸附管；避免带入沉淀。

留样：保留 5–10% 澄清裂解液作为 Input。首次优化或排查实验时，同时计划保留 Flow-through、末次 Wash、Elution 1 和 Elution

5.2磁珠平衡

重悬：轻柔颠倒原瓶 10–20 次，或缓慢旋转至磁珠完全均一。不要剧烈涡旋。

取珠：用宽口枪头吸取 50 μL 磁珠悬液至 1.5 mL 低吸附管。该体积分含约 20 μL 沉降磁珠。

磁分离：置于磁力架 30–90 秒，待上清澄清后小心去除保存液。

平衡：加入 500 μL 冰冷裂解/结合缓冲液，轻柔吹打或颠倒使磁珠完全悬浮；磁分离并弃上清。重复 1 次，共平衡 2 次。

5.3结合 HA 标签蛋白

加样：将澄清裂解液加入已平衡的磁珠中，轻柔混匀。若总体积小于 200 μL，可用结合缓冲液补足，以利于持续混匀。

孵育：4°C 端对端温和旋转2小时。低丰度样品可延长至 4 小时。

收集 Flow-through：磁分离至上清澄清，转移上清至新管并保留用于评估是否过载或结合不完全。

5.4 洗涤

洗涤 1-4：每次加入 500 μ L 预冷洗涤液，轻柔、充分重悬磁珠，4°C 旋转 3-5 分钟；磁分离至上清澄清后去除洗液。共洗 4 次。

末次换管：为降低离心管壁吸附造成的背景，末次洗涤重悬后可将全部磁珠悬液转入新管，再完成磁分离。

去残液：末次洗涤后尽量去净上清，但不要让磁珠干燥。残留过多洗液会稀释 HA peptide 并降低洗脱效率。

5.5 HA peptide 竞争洗脱（推荐）

加入洗脱液：加入 50 μ L 新鲜配制的 1 mg/mL HA peptide（YPYDVPDYA，TBS 或 PBS，pH 7.2-7.6）。

充分重悬：轻柔吹打使磁珠完全悬浮，37°C 端对端混匀 30 分钟。对于温度敏感复合物，可改为 4°C 60 分钟，但可能需要二次洗脱。

收集 Elution 1：置于磁力架直至上清完全澄清，转移上清至新低吸附管；必要时对收集液再磁分离一次，以去除少量随液带出的 1-5 μ m 磁珠。

二次洗脱（可选）：为提高总回收率，再加入 30-50 μ L 1 mg/mL HA peptide，室温混匀 10-20 分钟并收集 Elution 2。可分别分析或合并。

增强条件：若两次 1 mg/mL 洗脱后仍有明显目标残留，可将 HA peptide 提高至 2 mg/mL，或在 37°C 延长至 60 分钟。

洗脱后的定量 游离 HA peptide 在 280 nm 有吸收，并可能影响部分基于肽键或染料结合的蛋白测定。不要直接把 A280/BCA/Bradford 的读数当作目标蛋白量。需要准确测定或进行质谱、再次 HA 亲和步骤时，建议先脱盐、透析或超滤去除游离肽。

6. 推荐条件优化

实验目标/现象	优先调整	不建议的第一反应
提高总回收率	保留并分析 Flow-through；做第二次肽洗脱；必要时改用 2 mg/mL HA peptide	直接把结合时间延长到过夜
提高洗脱浓度	单次使用 30-50 μ L 洗脱液；减少残留洗液；洗脱后超滤浓缩	无限减少洗脱体积，导致磁珠无法完全悬浮
降低非特异背景	缩短结合至 1 小时；末次洗涤换管；增加至 4-5 次洗涤；在复合物允许时提高盐浓度	盲目增加磁珠量或使用过夜结合
保留弱/瞬时复合物	0.1-0.3% 温和去污剂；150 mM NaCl；3 次快速洗涤；全程 4°C	RIPA、300-500 mM NaCl 或长时间洗涤
处理高表达目标	依据 >20 μ g/50 μ L slurry 的标称容量按比例增加磁珠；同步放大洗脱液	只增加裂解液体积而不核算目标量
提高批间重复性	固定混匀方式、取珠枪头、样品总蛋白、结合时间、洗涤体积和磁分离终点	以肉眼大致估计 slurry 体积或忽略磁珠沉降