MYC 标签亲和层析介质

Anti-c-Myc Affinity Beads

货号	规格
BDTL0071-1	1ml
BDTL0071-5	5ml

1. 产品介绍

Anti-c-Myc Affinity Beads 可以检测原核、真核表达的 c-Myc 标签融合蛋白。c-Myc 多肽是由人类染色体 8q24 上的 c-Myc 基因编码，对应于人类 P62 的 410-419（EQKLISEEDL）氨基酸。Anti-c-Myc Affinity Beads 可以识别 C 端，N 端或内部 c-Myc 标签蛋白融合蛋白，可应用在 Western-blot 杂交技术、免疫沉淀和流式细胞计量术中, 用于检测重组蛋白质在靶细胞中的表达。

表 1. Anti-c-Myc Affinity Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	Anti-c-Myc 人单克隆抗体
结合能力	≈1 mg c-Myc 标签蛋白/ml 介质
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	1× PBS（含防腐剂）
储存温度	2-8℃

2. 纯化流程

2.1 Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

- **平衡/洗杂 Buffer:** 50mM Tris，0.15M NaCl, pH 7.4
- **酸性洗脱 Buffer:** 0.1 M glycine HCl, pH3.0
- **竞争性洗脱 Buffer:** 50 mM Tris，0.15 M NaCl，100-500 μg c-Myc 多肽/ml，pH 7.4
- **中和液：** 1M Tris-HCl, pH8.0

2.2 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡液对样品或细胞培养

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

液稀释，或者用平衡液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

3 样品纯化

3.1 柱层析

1. 将 Anti-c-Myc Affinity Beads 装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下。
2. 将样品加到平衡好的 Anti-c-Myc Affinity Beads 中，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
3. 用 10-20 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
4. **酸性洗脱：**使用 5 倍柱体积的酸性洗脱液洗脱，收集管中预先加好中和液，加入量 10-20μl 中和液/ml 洗脱液，分管收集。

   注：酸性洗脱后填料要立即用平衡液平衡，Anti-c-Myc Affinity Beads 在洗脱液中不要超过 20 min。

   竞争性洗脱：使用 5 倍柱体积的竞争性洗脱液洗脱。分管收集。
5. 使用 3 倍柱体积的洗脱液清洗，然后用平衡液平衡至中性。
6. 然后保存在 PBS 溶液（含防腐剂）中，2-8℃保存。

3.2 静态吸附

1. 填料准备：取适量的 Anti-c-Myc Affinity Beads 加入层析柱中，流干保护液。加入 5 倍柱体积的平衡液清洗。
2. 加入样品溶液，4°C 或室温震荡孵育至少 30 min（不能磁力搅拌），确保填料与样品溶液充分混合。
3. 孵育完毕后，将填料混合液离心（5000×g 离心 1 min）或过滤收集填料。
4. 将填料装入层析柱中，用平衡液清洗直至紫外稳定。
5. 用酸性洗脱液或竞争性洗脱液洗脱，参考 3.1 中 4。
6. 填料再生和保存参考 3.1 中 5.和 6.。

3.3 免疫沉淀操作流程

1. 填料准备：取 40μl 的 Anti-c-Myc Affinity Beads（柱体积 20μl）混合液加入到 1.5ml 离心管中，5000×g 离心 1min,吸弃上清。
2. 填料加入 0.5ml 平衡液，悬浮填料（使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用），5000×g 离心 1min,吸弃上清。重复一次。
3. 加入 200-1000μl 样品裂解液或细胞提取物到处理好的填料中，混合均匀，在室温下置

于翻转混合仪轻轻翻转离心管，促使样品和填料充分接触并吸附，室温至少 1 小时。5000×g 离心 1min,吸弃上清，小心不要吸走填料。

4. 洗杂：加入 0.5ml 的洗杂液，悬浮填料，轻轻混匀，5000×g 离心 1min,吸弃上清。再重复三次。确保去除非特异性吸附。

5. 样品洗脱：可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

A：酸性洗脱

加入 100μl 的酸性洗脱液，悬浮填料，室温孵育 5min。 5000×g 离心 1min。小心取出上清，不要吸到填料，用中和液中和。洗脱样品放置 4°C,长时间放置-20°C 保存。

B：竞争性洗脱

加入 100μl 的竞争性洗脱液洗脱，室温孵育 30min。 5000×g 离心 1min。小心取出上清，不要吸到填料。洗脱样品放置 4°C,长时间放置-20°C 保存。

C：变性洗脱

实验室常规蛋白上样缓冲液（Loading Buffer）中含有β-巯基乙醇和 DTT,可以使填料中抗体重链和轻链断开。含有 SDS 的样品缓冲液可以使 Anti-c-Myc 抗体变性，洗脱后的 Anti-c-Myc Affinity Beads 没办法重复使用。

每管中加入 20μl 2× Loading Buffer, 95°C 加热 5min。 5000×g 离心 1min,吸取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
流穿中有目的蛋白	填料过载	减少上样体积或增加填料体积。
	结合时间太短	延长样品和填料的结合时间。可过夜孵育。
	标签未暴露	可以加入低浓度的变性剂，上样前透析。
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行透析。
洗脱组分中没有目的蛋白	目的蛋白不稳定	使用新配制的样品。 低温操作。 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前 Western 检测是否有 c-Myc 标签蛋白
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。 增加上样量，减少 NaCI 浓度。

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

背景太高	非特异性吸附	最后一次洗杂后，填料转到新的管子里再洗脱或 IP。
	洗杂不充分	增加洗杂次数，每次清洗孵育 5-10 min。 增加洗杂液中盐离子浓度。

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn