

## Anti-Myc Affinity Gel 亲和凝胶

货号: M2512

保存: -20℃保存, 一年有效, 冷藏条件运输

### 产品信息:

Myc 标签亲和凝胶, 由高品质的 Myc 小鼠单抗与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (至少为 1.2mg protein/ml 凝胶悬液), 高特异性, 性质稳定, 可反复使用的特点, 可用于 Myc 标签融合蛋白的亲纯化及免疫 (共) 沉淀。

### 性能指标

应用范围	可用于 Met 修饰的 N 端 Myc 融合蛋白 (Met-Myc-Protein), N 端 Myc 融合蛋白 (Myc-Protein) 和 C 端 Myc 融合蛋白 (Protein-Myc) 的亲纯化及免疫 (共) 沉淀。
抗体属性	Anti-MYC 单克隆抗体。
载量	1ml 琼脂糖颗粒, 共价偶联 6mg Anti-Myc 小鼠单克隆抗体, 可纯化或沉淀至少 1.2mg Myc 融合蛋白。
强度	可反复使用 5 次以上。
成分	1ml 共价偶联 Anti-Myc 单克隆抗体的琼脂糖颗粒, 溶于 2ml PBS 中。

### 使用说明 (仅供参考):

使用目的	使用要求	使用方法
<b>IP/CoIP</b>		见 应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 Myc 标签蛋白质
<b>亲和纯化</b>	1. 目标蛋白遇酸不稳定 2. 要求纯化柱反复使用 3. 接受高成本纯化	见 应用二. Myc 多肽亲和纯化 Myc 标签蛋白质
<b>亲和纯化</b>	1. 目标蛋白比较稳定 2. 不要求纯化柱反复使用 3. 不接受高成本纯化	见 应用三. 酸洗脱亲和纯化 Myc 标签蛋白质
<b>细胞裂解液选择</b>		
<b>Myc 标签蛋白质在细胞内表达</b>		见 细胞裂解液制备 也可使用其它细胞裂解液来裂解细胞
<b>Myc 标签蛋白质在细胞外分泌表达</b>		表达量高可以直接纯化, 表达量低请浓缩后纯化

## 需自备试剂及设备

离心机, 1.5mL 离心管若干, 重力纯化柱 (大量纯化需要)

细胞裂解液, 酸性洗脱液, 中和液, PBS, 2x 蛋白上样缓冲液, Myc 多肽

待测抗原样品及检测抗体

## 使用实例

### 应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 Myc 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-MYC 亲和凝胶至均一, 转移 20 $\mu$ L 混合液 (约含 10 $\mu$ L 凝胶) 至离心管中, 加入 10 倍凝胶 体积 (约 100  $\mu$ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200  $\mu$ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 MYC-tag 蛋白是否存在残留)。
- 4) 清洗凝胶, 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心弃上清。
- 5) 加入 2x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。

### 应用二. Myc 多肽亲和纯化 Myc 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-MYC 标签亲和凝胶至均一, 转移 40  $\mu$ L 混合液 (约含 20  $\mu$ L 凝胶) 至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200  $\mu$ L) 1x PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200  $\mu$ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 MYC-tag 蛋白是否存在残留)。
- 4) 加入 10 倍凝胶 1xPBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。
- 5) 将 2 倍凝胶体积, 浓度为 1mg /mL MYC 多肽溶液分几次加入上述沉淀, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h 后 (为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱), 离心收集上清。如有必要, 重复本步骤 1-3 次。将几次分离的上清分管收集。合并洗脱液。

备注: 根据蛋白质洗脱难易程度, 调整 MYC 多肽溶液, 最高可到 2mg/ml。

- 6) 亲和凝胶如需重复使用, 需依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 PBS 清洗, 再用适量 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 清洗, 再加入适量该保存溶液至填料中, 保存在-20 $^{\circ}$ C。

注意: 酸性环境会缩短凝胶的使用寿命, 应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。

- 7) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

### 应用三. 酸洗脱亲和纯化 Myc 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-MYC 标签亲和凝胶至均一, 转移 40  $\mu$ L 混合液 (约含 20  $\mu$ L 凝胶) 至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200  $\mu$ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。

- 2) 加入 50-200  $\mu$ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液，室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 3) 加入 10 倍凝胶 PBS，用上述离心法清洗凝胶三次；预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶，除去非特异性结合蛋白。离心，弃上清。
- 4) 预冷的 10 倍凝胶体积 pH 3.0 的酸性洗脱液进行洗脱，收集管中预先放入中和液 10  $\mu$ l。注意：酸性环境会缩短凝胶的使用寿命，应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间，不超过 10min。
- 5) 用紫外检测仪测定收集峰，合并收集峰。
- 6) 亲和凝胶如需重复使用，需依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 1xPBS 清洗，再用适量 1xPBS（含 50%甘油，0.2%叠氮钠）清洗，再加入适量该保存溶液至填料中，保存在-20 $^{\circ}$ C
- 7) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度，并按照需求处理和保存蛋白质。

### 细胞裂解液制备

- 1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 2) 预冷的 1x PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，（例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约  $0.5-1 \times 10^7$  细胞，需要加入 1ml 细胞裂解液）。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4 $^{\circ}$ C离心 10min。取上清，-80 $^{\circ}$ C冷冻保存。

### 推荐缓冲液配方

以下配方仅供参考，应根据具体情况进行调整。

<b>细胞裂解液:</b>	150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂)
<b>Myc 多肽:</b>	该多肽为轻质粉末, 开盖前应离心。建议将 1ml ddH <sub>2</sub> O 溶液加至 5mg 多肽粉末中, 彻底溶解后, 制成 5mg/ml 储存液-20 $^{\circ}$ C 保存。使用时用 1xPBS 稀释至需要的浓度。按需求浓度稀释至工作浓度。
<b>酸性预洗液:</b>	0.15M PBS buffer, pH5.0
<b>酸性洗脱液:</b>	0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH3.0
<b>中和液:</b>	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
<b>10xPBS (pH7.5) :</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 35.8g; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 2.8g ; NaCl 89g 溶于 1L dd H <sub>2</sub> O, 加入 2% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
<b>2x 上样缓冲液</b>	125mM Tris HCl , pH6.8, 含有 4% SDS, 20%甘油和 0.004% 溴酚蓝

### 注意事项:

- (1) 本产品含 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中，需冷藏条件下运输。
- (2) 勿干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，勿使酸处理凝胶时间超过 10min。
- (3) 以上使用方法中的凝胶用量，均为少量制备的示范用量，具体用量请根据实际情况调整。
- (4) 本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗。