



# Anti-c-Myc Affinity Beads

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 试剂准备.....	1
3. 样品纯化.....	1
4. 问题及解决方案.....	2
5. 订购信息及相关产品.....	2

## 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
粒径范围	45-165 $\mu\text{m}$
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	1×PBS, 0.02% NaN <sub>3</sub>
储存温度	2-8 °C

## 2. 试剂准备

### 2.1 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液稀释，或者用平衡液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

### 2.2 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

平衡/洗杂液：50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.4

酸性洗脱液：0.1 M glycine HCl, pH3.0

竞争性洗脱液：50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 100-500  $\mu\text{g}$  c-Myc 多肽/ml, pH7.4

中和液：1 M Tris-HCl, pH8.0

## 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，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 10-50 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) **A 酸性洗脱**：使用 5 倍柱体积的酸性洗脱液洗脱，向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 值至 7.0-8.0，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。

**B 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 倍柱体积的洗脱液再生，然后用平衡液平衡至中性。

6) 然后保存在含 0.02% 叠氮化钠的 PBS 溶液中，2-8 °C 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℃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 40 μl 的 **Anti-c-Myc Affinity Beads** (柱体积 20 μl)混合液加入到 1.5 ml 离心管中，5000×g 离心 1 min，吸弃上清。
- 2) 填料平衡：加入 0.5 ml 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 1 min，吸弃上清。重复一次。
- 3) 样品结合：加入 200-1000 μl 样品裂解液或细胞抽提物到处理好的填料中，混合均匀，在室温下置于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 h。5000×g 离心 1 min，吸弃上清。
- 4) 洗杂：加入 0.5 ml 的洗杂液，悬浮填料，轻轻混匀，5000×g 离心 1 min，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 100 μl 酸性洗脱液，悬浮填料。室温孵育 5 min，5000×g 离心 1 min。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℃，长时间放置-20℃保存。

#### B: 竞争性洗脱

加入 100 μl 竞争性洗脱液洗脱。室温孵育 30 min，5000×g 离心 1 min。小心取出上清，不要吸到填料。洗脱样品放置 4℃，长时间放置-20℃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 20 μl 2×Loading Buffer，95℃加热 5 min。5000×g 离心 1 min，吸取上清 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	使用新鲜样品。 低温操作。 细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。 增加上样量，减少缓冲液中NaCl浓度。
	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
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。

## 5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Anti-DYKDDDDK Affinity Beads	SA042001	1 ml
	SA042005	5 ml
	SA042025	25 ml
	SA042100	100 ml
	SA042500	500 ml
	SA04201L	1 L



(续表)

Anti-HA Affinity Beads	SA068001	1 ml
	SA068005	5 ml
	SA068025	25 ml
	SA068100	100 ml
	SA068500	500 ml
	SA06801L	1 L
Anti-c-Myc Affinity Beads	SA065001	1 ml
	SA065005	5 ml
	SA065025	25 ml
	SA065100	100 ml
	SA065500	500 ml
	SA06501L	1 L
Anti-GFP Affinity Beads 4FF	SA070001	1 ml
	SA070005	5 ml
	SA070025	25 ml
	SA070100	100 ml
	SA070500	500 ml
	SA07001L	1 L
Anti-YFP Affinity Beads 4FF	SA075001	1 ml
	SA075005	5 ml
	SA075025	25 ml
	SA075100	100 ml
	SA075500	500 ml
	SA07501L	1 L
Anti-RFP Affinity Beads 4FF	SA072001	1 ml
	SA072005	5 ml
	SA072025	25 ml
	SA072100	100 ml
	SA072500	500 ml
	SA07201L	1 L