

Anti-MYC 标签 (EQKLISEEDL) 亲和凝胶

Cat#: IP0097

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

一. 背景信息

Anti-MYC 标签(EQKLISEEDL)亲和凝胶, 由高品质的 MYC 单克隆抗体与琼脂糖胶共价偶联制成。该产品具有高载量(至少为 1.2mg protein/ml 凝胶), 高特异性, 性质稳定, 可反复使用的特点, 可用于 MYC 标签融合蛋白的亲亲和纯化及免疫(共)沉淀。

二. 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) 的亲亲和纯化及免疫(共)沉淀。
- 抗体属性:** Anti-MYC (EQKLISEEDL) 单克隆抗体。
- 载量:** 1ml 琼脂糖颗粒, 共价偶联 6mg Anti-MYC 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:** 共价偶联 Anti-MYC 单克隆抗体的琼脂糖颗粒, 1ml 溶于 2ml PBS 中。
- 保存方法:** 在加入了 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年。

三. 说明书阅读指南

使用目的	使用要求	使用方法
IP/CoIP		见 应用一. 免疫(共)沉淀法检测 MYC 标签蛋白质
亲和纯化	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
亲和纯化	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
细胞裂解液选择		
MYC 标签蛋白质在细胞内表达		见 细胞裂解液制备 也可使用其它公司细胞裂解液裂解细胞
MYC 标签蛋白质在细胞外分泌表达		表达量高可以直接纯化, 表达量低请浓缩后纯化

四. 用前必读

1. 以下试剂及设备, 需要客户自备, 试剂推荐配方见说明书附件 1, 推荐蛋白质制备方案见附件 2。

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(货号 Q7009)

待测抗原样品及检测抗体

2. 注意事项 (开箱前必读)

- 1) 本产品在含 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, -20°C可保存 1 年, 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) 以下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。

五. 使用方法

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 μ L 混合液(约含 10 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 100 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ 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°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 μ L 混合液(约含 20 μ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200 μ L) 1x PBS, 5000rpm x30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ 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°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°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°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 μ L 混合液(约含 20 μ L 凝胶)至离心管中，加入 10 倍凝胶体积 (约 200 μ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清，重复该步骤清洗凝胶三次。
- 2) 加入 50-200 μ 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 μ 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。

附件 1. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐，客户应根据具体情况进行调整。

细胞裂解液:	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, 使用说明见附件 2)
MYC 多肽	该多肽为轻质粉末, 开盖前应离心。建议将 1ml ddH ₂ 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。
酸性预洗液:	0.15M PBS buffer, pH5.0
酸性洗脱液:	0.15M Gly-HCl 缓冲液, pH3.0
中和液:	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
10xPBS (pH7.5) :	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 2.8g, NaCl 89g 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 2% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
2x 上样缓冲液	125mM Tris HCl, pH6.8, with 4% SDS, 20%glycerol and 0.004% bromphenol blue

附件 2. 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 1xPBS 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 0.5-1x10⁷ 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。