

Y-Tec c-Myc Magbeads(human)产品说明书

Cat# : MPNH29-005 / MPNH29-025

Size : 200ul / 1ml

►产品介绍:

c-Myc (EQKLISEEDL) 标签是由10个氨基酸组成的短肽, 来源于人类 P62 的 410-419氨基酸, 不会占据其他表位与结合域而易与抗体结合。Y-Tec c-Myc Magbeads(human)是将抗 c-Myc人源重组单抗标签抗体共价偶联到4%琼脂糖磁珠上, 用于捕获哺乳动物、植物、细菌、酵母、昆虫等多种生物的细胞提取物中的含 c-Myc 标签的蛋白及与其紧密相互作用的蛋白, 可用于 c-Myc 标签融合蛋白的免疫沉淀 (IP), chIP实验与蛋白纯化。

►产品性能:

Magbeads粒径: 45-90 μm (4%交联琼脂糖磁珠)

储存液: 1xPBS (pH7.4), 0.2% Proclin 300

结合能力: >0.6mg c-Myc标签蛋白/ml Magbeads混和液

配体: 抗c-Myc标签人源重组单克隆抗体

用量: 25-50ul混和液/样本

储存条件: 2-8℃保存2年, 切勿冰冻

►免疫沉淀操作流程

1) 缓冲液准备与建议:

实验中用到的水和buffer, 使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

各参考使用buffer体系表:

平衡/洗杂缓冲液	样本IP裂解buffer 或 50 mM Tris , 150mM NaCl , 0.1 % NP40, 1mM EDTA, pH7.4
酸性洗脱液	200 mM glycine pH 2.5
变性洗脱液	2xSDS Sample buffer(120 mM Tris-HCL pH 6.8, 20 % 甘油, 4 % SDS, 0.04 % 溴酚蓝, 10 % β -巯基乙醇)
中和缓冲液	1 M Tris-HCl , pH8.0

2) **磁珠准备:** 取25-50ul Y-Tec c-Myc Magbeads(human)混合液加入1.5 ml离心管中, 5000×g离心1min, 吸弃上清。

3) **磁珠平衡:** 加入0.5ml平衡buffer, 悬浮Magbeads (使Magbeads与目的蛋白处于相同的buffer体系下, 可保护蛋白) 1min, 磁力架分离上清吸弃, 重复2次。

4) **蛋白结合:** 加入200-1000ul样品裂解液到处理好的Magbeads中, 混合均匀, 在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管, 保证样品和Magbeads充分接触结合, 4℃或室温孵育30-60min (注意结合时间不要超过60min, 否则可能导致非特异性结合)。5000×g离心1 min, 磁力架分离上清吸弃。

5) **洗杂:** 加入0.5ml的洗杂buffer, 悬浮磁珠, 轻轻混匀1 min, 磁力架分离上清吸弃。再重复三次。确保去除非特异性吸附。

6) **样品洗脱:** 可根据后期检测的需要选择不同的洗脱方法。

酸性洗脱 - 加入100ul酸性洗脱液，悬浮磁珠室温孵育5-10min，磁力架分离上清后小心取出上清，不要吸到磁珠，按酸性洗脱液的1/10体积中和液中和。洗脱样品放置4℃，长时间放置-20℃保存。

变性洗脱 - 实验室常规蛋白上样缓冲液（Loading Buffer）中含有β-巯基乙醇或DTT，以及含有SDS的样品缓冲液可以使Y-Tec c-Myc Magbeads(human)抗体变性，变性洗脱后的Y-Tec c-Myc Magbeads(human)不能重复使用。每管中加入25ul 2×Loading Buffer，95℃加热10min。5000×g离心1 min，吸取上清 SDS-PAGE 电泳检测。

注：因人源化配体抗体亲和力很高，本Magbeads不适用于多肽竞争性洗脱方法。

免疫沉淀常见问题分析与解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
样本结合不完全	蛋白量超过Magbeads载量	减少上样体积或增加磁珠体积。
	结合时间太短	延长样品和磁珠的结合时间。
	标签包裹未充分暴露	可以加入低浓度的变性剂，上样前透析。
	溶液中试剂不兼容	样品上样前进行脱盐处理。
未检测到目的蛋白	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 标签融合蛋白。
	目的蛋白表达量太低	优化蛋白表达量。 增加上样量。 减少 NaCl 浓度。
非特异性杂带过多	非特异性吸附	减少上样量，减少孵育时间。
	洗杂不充分	增加洗杂次数，或增加洗杂液中盐离子浓度。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic applications.

