

## BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads

产品编号	产品名称	包装
P2441-0.5ml	BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads	0.5ml
P2441-2ml	BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads	2ml

### 产品简介:

- 碧云天的 BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads, 即 Anti-Ubiquitin 磁珠, 也称 Anti-Poly-ubiquitin 磁珠、Anti-Polyubiquitin 磁珠、Anti-Ubiquitin mAb-Magnetic Beads、Anti-Ubiquitin 单抗磁珠、Anti-Multi Ubiquitin 免疫磁珠、多泛素抗体磁珠或泛素亲和磁珠, 由高质量的 Ubiquitin 兔单克隆抗体与纳米级氨基磁珠偶联而成, 可特异性地与人或者大小鼠等细胞裂解液、血清、腹水等样品中的泛素化蛋白(Ubiquitinated protein)结合, 从而用于泛素化蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀(Co-IP)、富集或纯化。本产品可以识别单泛素化蛋白(Mono-ubiquitin proteins)也可以识别多泛素化蛋白(Poly-ubiquitin proteins)。
- 泛素(Ubiquitin)是一种序列高度保守的蛋白, 具有76个氨基酸残基, 分子量为8.5kDa, 几乎存在于真核生物的所有组织中。泛素在特定酶作用下, 对底物蛋白的赖氨酸进行特异性修饰的过程称为泛素化(Ubiquitination)。多聚泛素化(Polyubiquitination)的主要功能是标记需要降解的蛋白质, 然后被蛋白酶体识别和降解, 这个降解途径被称为泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-proteasome system, UPS) [1], 包括: 蛋白底物、泛素、泛素激活酶(Ubiquitin-activating enzymes, 简称E1)、泛素偶联酶(Ubiquitin-conjugating enzymes, 简称E2)、泛素-蛋白连接酶(Ubiquitin ligases, 简称E3)、蛋白酶体和泛素解离酶(Deubiquitinating enzymes, 简称DUBs)。赖氨酸泛素化修饰在多个细胞过程的调控中起着核心作用。多聚泛素化还调节膜蛋白运输, 改变蛋白-蛋白相互作用并调控多种信号转导通路的活性, 该过程涉及一大类家族的酶并调控多种功能[2-4]。此外单泛素化(Monoubiquitination)和多单泛素化(Multimonoubiquitination)也有着重要的生物学功能[5]。
- 蛋白质泛素化修饰是真核生物普遍而又复杂的翻译后修饰, 在细胞的信号转导、生长、发育、代谢等生命过程中发挥着重要作用。泛素化过程的失调则与神经退行性疾病、炎症反应、癌症等重大疾病的发生发展密切相关。分析和研究蛋白质泛素化的结构与功能, 可为探索疾病调控内在规律和发现新的诊断策略提供重要信息。生命体系的高度复杂性, 泛素化修饰位点、结构类型的多变和多样性, 及时空动态变化等特点给蛋白质泛素化分析研究带来了巨大的挑战。亲和分离以其高选择性成为泛素化蛋白结构与功能研究的有力工具。免疫亲和分离法基于抗原-抗体相互作用, 是最为经典的分离分析方法之一, 已广泛应用于泛素化蛋白或肽段的富集分离[6]。
- BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads (Anti-Ubiquitin磁珠)可特异性地结合泛素化蛋白, 并可以借助磁力架等磁分离设备非常便捷地应用于泛素化蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀或纯化等实验。本产品进行免疫沉淀的流程请参考图1。

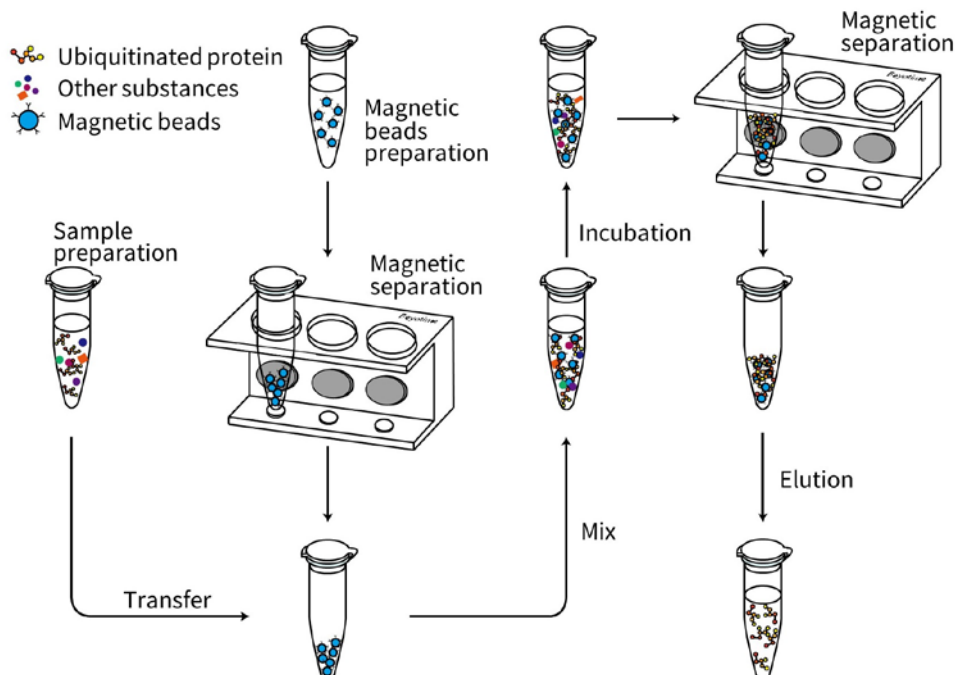


图1. 碧云天BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads (P2441)免疫沉淀流程图。

- **本产品特异性强、靶蛋白结合量高。**与国内外大多数的同类产品相比，本产品抗体结合密度高，对泛素化蛋白的结合具有很强的特异性，并且本产品磁珠粒径小，不易产生非特异吸附。本产品每毫升磁珠悬浊液含约10mg磁珠，含有不少于0.2mg Ubiquitin抗体，通常可结合不少于0.2mg泛素化蛋白，具体的最大结合量和泛素化蛋白的分子量大小、多聚化程度等相关。每500微升样品，通常仅需使用50微升磁珠悬浊液，就可以高效地进行免疫沉淀实验。
- **本产品可结合多种形式的泛素化蛋白。**本产品可特异性地结合单泛素化蛋白(Monoubiquitinated proteins)和多泛素化蛋白(Polyubiquitinated proteins)。
- **本产品结合目的蛋白速度快。**本产品使用了纳米级磁珠(~200nm)，具有超大的比表面积，便于抗体和抗原的快速有效结合。通常30分钟内即可完成抗原吸附的过程，60分钟内完成目的蛋白免疫沉淀操作。缩短操作时间可以有效避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性，充分保证目的蛋白的活性。
- **本产品可选择多种洗脱方法。**本产品根据目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的要求等，使用多种洗脱方法，包括SDS-PAGE上样缓冲液和酸性等洗脱液进行洗脱。
- 本产品的主要指标如下表：

Characteristics	Description
Product content	10mg/ml magnetic beads in specific protective buffer
Beads size	~200nm
Magnetization	Superparamagnetic
Coupled antibody	Anti-Ubiquitin Rabbit monoclonal antibody
Isotype	IgG
M.W. of antibody	Approximately 150kDa
Antibody concentration	≥ 0.2mg Ubiquitin antibody per ml beads
Binding capacity	≥ 0.2mg Ubiquitinated protein per ml beads
Specificity	Monoubiquitinated proteins and polyubiquitinated proteins
Elution method	SDS-PAGE loading buffer or Acid elution. Note: If elute with SDS-PAGE loading buffer, the light (~25kDa) and heavy (~50kDa) chain of Ubiquitin antibody will be denatured and release from the beads.
Application	IP, Co-IP, Protein purification

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2441-0.5ml	BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads	0.5ml
P2441-2ml	BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads	2ml
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存，两年有效。4°C保存，至少一个月内有效。

#### 注意事项：

- 由于泛素化蛋白与Ubiquitin抗体的结合力非常强，酸性洗脱的效果可能比较差，建议优先使用SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法。此时后续用于Western检测时，建议使用非兔来源的抗体进行检测，以避免洗脱下来的Ubiquitin兔单抗干扰Western检测。
- 本产品需维持pH为6-8，避免高速离心、干燥；请勿长时间将磁珠置于磁场中，否则可能会引起磁珠聚团。
- 本产品使用前要适当充分重悬，即颠倒若干次使磁珠混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡等，避免抗体变性等。
- 在免疫沉淀或纯化时，建议设置阳性和阴性对照组。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X) (P1005/P1006)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型, 质谱兼容, 50X) (P1048/P1049)、蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)等。
- 如果使用真空泵等仪器吸取上清液，须注意真空泵的吸液强度，以免吸力过大而吸取到聚集的磁珠。
- 酸性溶液洗脱时磁珠可能会发生聚集，属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。0.1%的非离子型去垢剂(如Triton X-100、Tween-20或NP-40)可有效防止磁珠聚集，并且不会影响磁珠的抗体结合效率。
- 高浓度的DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对本产品与标签蛋白的结合可能有一定影响，但Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液(P0013B/C/D)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全适用。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异，以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

### 1. 样品的制备:

- 选择合适的裂解液, 用于制备细胞或组织的裂解液。优先推荐选择碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)用于细胞或组织样品的裂解。根据特定的实验目的, 如有必要, 也可以使用碧云天生产的RIPA裂解液(强) (P0013B)、RIPA裂解液(中) (P0013C)或RIPA裂解液(弱) (P0013D)用于样品的制备。如果使用自行配制的或其它公司生产的裂解液, 需要确保裂解液的pH为6-8。
- 具体的细胞或组织样品裂解的制备步骤请参考裂解液的使用说明。制备好的裂解液上清宜置于冰上或4°C存放, 随后即可用于免疫沉淀或免疫共沉淀、标签蛋白的纯化等操作。新鲜制备好的样品, 建议尽量当天完成免疫沉淀等后续操作, 但如果样品不能当天使用, 也可以适当分装后-80°C冻存。

### 2. Anti-Ubiquitin磁珠准备:

由于Anti-Ubiquitin磁珠储存在特殊保护液中, 所以需要在加入样品前用适当洗涤。

- 用移液器轻轻吹打重悬Anti-Ubiquitin磁珠, 按照每500µl样品50µl磁珠悬浊液, 取适量Anti-Ubiquitin磁珠至一洁净离心管(FTUB015)中, 加入1X TBS (ST661/ST665)至最终体积为约0.5ml。**说明:** 如果初始体积大于0.2ml, 可以考虑先直接置于磁力架(FMS012/FMS024)上分离10秒, 去除上清, 然后再加入1X TBS (ST661/ST665)至最终体积为约0.5ml。
- 用移液器轻轻吹打重悬Anti-Ubiquitin磁珠。置于磁力架(FMS012/FMS024)上分离10秒, 去除上清。重复上述步骤两次。
- 按照初始体积的量, 用1X TBS (ST661/ST665)重悬Anti-Ubiquitin磁珠。

### 3. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP):

- 加入磁珠与孵育。**按照每500µl蛋白样品加入50µl磁珠悬浊液的比例加入Anti-Ubiquitin磁珠, 置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温孵育2小时或4°C孵育过夜。**注:** 孵育过程中, 如果磁珠发生聚团或呈片状属正常现象, 不会影响实验结果。
- 磁分离。**孵育完毕后, 置于磁力架上分离10秒, 去除上清。**注:** 可保留部分上清液, 用于检测免疫沉淀的效果。
- 洗涤。**加入500µl的1X TBS, 用移液器轻轻吹打重悬Anti-Ubiquitin磁珠。置于磁力架上分离10秒, 去除上清。重复洗涤三次。**注:** 也可以通过检测洗涤得到的洗涤液的OD<sub>280</sub>来判断是否洗涤完全, 若OD<sub>280</sub>大于0.05, 应适当增加洗涤次数。

### 4. 洗脱:

根据标签蛋白的特点及后续实验要求, 可以选择如下2种方法之一进行洗脱。

- SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法:** 本方法为变性法, 得到的蛋白样品适合SDS-PAGE电泳或WB检测。
  - SDS-PAGE上样缓冲液的配制: 可以直接使用碧云天生产的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A), 或使用碧云天生产的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X) (P0015)或自行参考《分子克隆》等配制5X或2X的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 然后加入水配制成1X的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液。通常SDS-PAGE蛋白上样缓冲液含有DTT等还原剂, 其洗脱得到的蛋白样品中会含有Ubiquitin抗体的轻链和重链。
  - 每10-20µl原始磁珠体积的磁珠, 加入100µl 1X SDS-PAGE上样缓冲液, 95°C加热5分钟。
  - 置于磁力架上分离10秒, 取上清进行SDS-PAGE电泳或Western检测。
- 酸性洗脱法:** 本方法为非变性法, 洗脱后的蛋白保持原有的生物活性, 便于后续分析检测。
  - 溶液的配制: 酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH3.0), 中和液(0.5M Tris-HCl, pH7.4, 1.5M NaCl)。
  - 每10-20µl原始磁珠体积, 加入100µl酸性洗脱液, 混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温孵育5分钟。**注:** 孵育时间不要超过15分钟。
  - 孵育完毕后, 置于磁力架上分离10秒, 将上清转移到新的离心管中, 并立刻加入10µl中和液, 适当混匀。
  - 为了获得最大的洗脱效率, 可重复步骤(b)和(c), 并将相同样品合并。
  - 洗脱并中和的泛素化蛋白置于4°C待用, 或者-20°C或-80°C长期保存。

**注1:** 由于泛素化蛋白与Ubiquitin抗体的结合力非常强, 酸性洗脱法的效果可能低于SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法。  
**注2:** 由于目的蛋白的差异, 酸性洗脱法的洗脱效率也会存在一定的差异。如果对洗脱效率的要求比较高, 可对酸性洗脱液的pH值在2.5-3.1之间进行适当的调整, 相应的中和液的pH值或量也要进行适当的调整, 例如100µl酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH2.8)和15µl中和液(1M Tris-HCl, pH8.5)。

## 常见问题:

Problem	Possible Causes	Solution
Very few or no Ubiquitinated protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	Change elution methods.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the Ubiquitin by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	Reduce the time and number of washes.
	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation time.
	Interfering substance is	Lysates containing high concentration of DTT,

	present in sample.	2-mercaptoethanol, or other reducing agents may destroy antibody function, and must be avoided.
	Detection system is inadequate.	If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity. 2. Verify that the transfer was adequate by using prestained protein marker or staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.
Background is too high.	Proteins bind nonspecifically to the Anti-Ubiquitin monoclonal antibody, insufficient washing on magnetic beads, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Mouse IgG Magnetic Beads (P2171) to remove nonspecific binding proteins. 2. After suspending beads for the final wash, transfer entire sample to a clean microcentrifuge tube before centrifugation.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Increase the salt and/or detergent concentrations in the wash solutions. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins.
Multiple protein bands found in the eluate.	The protein is not stable at room temperature.	Purify the target protein at lower temperature, such as 4°C.
	Protein degradation due to proteases activity during purification process.	Add protease inhibitors to cell lysate.
	Non - specific binding.	1. Prepare cell lysate again. 2. Add additional wash steps.

#### 参考文献:

1. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. J Biosci. 2006. 31(1):137-55.
2. Damgaard RB. Cell Death Differ. 2021. 28:423-426.
3. Morreale FE, Walden H. Cell. 2016.165(1):248-248.
4. Dewson G, Eichhorn PJA, Komander D. Nat Rev Cancer. 2023. 23(12):842-862.
5. Ronai ZA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 9;113(32):8894-6.
6. Zhong H, Huang Y, Jin Y, Zhao R. Se Pu. 2021. 39(1):26-33.

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2171-1ml	BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads (小鼠IgG磁珠)	1ml
P2171-5ml	BeyoMag™ Mouse IgG Magnetic Beads (小鼠IgG磁珠)	5ml
P2173-1ml	BeyoMag™ Rabbit IgG Magnetic Beads (兔IgG磁珠)	1ml
P2173-5ml	BeyoMag™ Rabbit IgG Magnetic Beads (兔IgG磁珠)	5ml
P2441-0.5ml	BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads	0.5ml
P2441-2ml	BeyoMag™ Anti-Ubiquitin Magnetic Beads	2ml
AF1705	Ubiquitin Rabbit Monoclonal Antibody	50µl
AG3157	Ubiquitin (NT) Mouse Monoclonal Antibody	50µl
AG3161	Ubiquitin (NT) Rabbit Monoclonal Antibody	50µl
AG3164	Ubiquitin (NT) Rabbit Polyclonal Antibody	50µl
S1748-1mg	MG-132 (Proteasome抑制剂)	20mg/ml × 0.05ml
S1748-5mg	MG-132 (Proteasome抑制剂)	5mg
S1748-25mg	MG-132 (Proteasome抑制剂)	25mg