



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

Anti-GFP 亲和层析介质

货号: R43296

储存条件: RT

有效期: 24个月

产品介绍

GFP (绿色荧光蛋白) 或其突变体 EGFP (增强型绿色荧光蛋白) 被广泛应用于检测基因表达效率以及目的蛋白的表达和分布。GFP 作为标签蛋白, 其融合目的蛋白自发荧光, 不需要目的基因的抗体或杂交就能知道目的基因在细胞中的定位, 其他物质干扰小。Anti-GFP 亲和层析介质以重组的抗 GFP 纳米抗体为亲和配体, 可以检测和纯化 GFP、EGFP 及其融合表达蛋白, 不结合 BFP 标签蛋白。

源叶 Anti-GFP 亲和层析介质储存在含 0.1% ProClin 300 的保护液中, 凝胶和保护液的体积比为 1:1, 我司产品规格为实际凝胶的体积。

参数	指标
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配基	Anti-GFP Nanobody
粒径范围	45~165 μm
结合能力	>1mg GFP 标签蛋白/mL 介质
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
试剂耐受	Stable up to 80°C, 1mM DTT, 3M Guanidinium•HCl, 8M Urea, 2M NaCl, 2% Nonidet P40 Substitute, 1% SDS, 1% Triton X-100
储存	0.1% ProClin 300, 2~8°C

使用说明

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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。



2、缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 50mM Tris, 0.15M NaCl, pH7.4。

酸性洗脱液: 0.1M glycine HCl, pH3.0。

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.0。

3、样品纯化

3.1 柱层析

(1) 将 Anti-GFP 亲和层析介质装入合适的层析柱, 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-GFP 亲和层析介质中, 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) 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-GFP亲和层析介质在洗脱液中不要超过 20min。

(5) 使用 3 倍柱体积的洗脱液清洗, 然后用平衡液平衡至中性。

(6) 使用 3 倍柱体积的储存缓冲液平衡, 2-8 $^{\circ}$ C保存。

3.2 静态吸附

(1) 填料准备: 取适量的 Anti-GFP 亲和层析介质加入层析柱中, 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 $^{\circ}$ C或室温震荡孵育至少30min (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 $\times$ g 离心 1min) 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) 用酸性洗脱液洗脱。

(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 μ L 的 Anti-GFP 亲和层析介质 (柱体积 20 μ L) 混合液加入到 1.5mL 离心管中, 5000 $\times$ g 离心 1min, 吸弃上清。
- (2) 填料加入 0.5mL 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 $\times$ g 离心 1min, 吸弃上清。重复一次。
- (3) 加入 200-1000 μ L 样品到处理好的填料中, 混合均匀, 在室温下置于翻转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 小时 (对于易降解的蛋白, 建议使用蛋白酶抑制剂, 并在 2-8 $^{\circ}$ C 层析柜中操作, 冷库亦可)。5000 $\times$ g 离心 1min, 吸弃上清, 小心不要吸走填料。
- (4) 洗杂: 加入 0.5mL 的洗杂液, 悬浮填料, 轻轻混匀, 5000 $\times$ g 离心 1min, 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 μ L 的酸性洗脱液, 悬浮填料, 室温孵育 5min。5000 $\times$ g 离心 1min。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 $^{\circ}$ C, 长时间放置 -20 $^{\circ}$ C 保存。
B 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介质配体变性, 洗脱后的 Anti-GFP 亲和层析介质没办法重复使用。
每管中加入 20 μ L 2 $\times$ Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C 加热 5min。5000 $\times$ g 离心 1min, 吸取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

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磁珠体积。
	结合时间太短	延长样品和填料的结合时间。正常高浓度 GFP (1 mg/ml) 需要 30 min 才能达到饱和, 样品浓度低时可延长至 1 h 以上或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
	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。
	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。
		Anti-GFP Affinity Beads 4FF 和 GFP 的结合



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

洗脱组分中没有目的蛋白	GFP 空间构象	，强烈依赖 GFP 的空间构象，影响 GFP 构象的缓冲条件会影响两者之间的结合。
	GFP 种类不同	绿色荧光蛋白有很多种，Anti-GFP Affinity Beads 4FF 确定结合来自于管水母的野生型 GFP 以及 EGFP、YFP 等，不结合 CFP 和其他种属 GFP。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前用荧光或 WB 检测是否有 GFP 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。
背景太杂	非特异性吸附	少上样量，增加盐浓度。
	洗杂不充分	保证充分悬浮，填料需要完全吹打散开，洗涤残留液需要尽量去除干净，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，使用超级核酸酶去除核酸影响。
	洗脱后污染	填料用酸洗脱后，将洗脱液转移至新管中，再进行检测，可有效降低背景。