



Anti-GFP Affinity Beads 4FF

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.....	3

1. 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 Affinity Beads 4FF** 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。

表 1. Anti-GFP Affinity Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	Anti-GFP Antibody
载量	>1 mg GFP 标签蛋白/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大流速	0.3 MPa, 3 bar
试剂耐受	Stable up to 80°C, 1 mM DTT, 3 M Guanidinium·HCl, 8 M Urea, 2 M NaCl, 2% Nonidet P40 Substitute, 1% SDS, 1% Triton X-100
储存缓冲液	0.02%叠氮化钠, 1×PBS
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 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。

2.2 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 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

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.0

3. 样品纯化

3.1 柱层析

- 1) 将 **Anti-GFP Affinity Beads 4FF** 装入合适的层析柱,层析用 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 Affinity Beads 4FF** 中,收集流出液,可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-20 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,收集管中预先加好中和液,加入量 15-25 μl 中和液/ml 洗脱液,分管收集。
注: 酸性洗脱后填料要立即用平衡液平衡, **Anti-GFP Affinity Beads 4FF** 在洗脱液中不要超过 20 min。
- 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 0.02%叠氮化钠, 1×PBS 平衡, 2-8°C 保存。

3.2 静态吸附

- 1) 填料准备: 取适量的 **Anti-GFP Affinity Beads 4FF** 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°C 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 μl 的 **Anti-GFP Affinity Beads 4FF**(柱体积 20μl)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) 加入 200-1000μl 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℃层析柜中操作，冷库亦可）。5000×g 离心 1 min，吸弃上清，小心不要吸走填料。
- 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 的酸性洗脱液，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: 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 Affinity Beads 4FF** 没办法重复使用。

每管中加入 20μl 2× Loading Buffer，95℃加热 5min。5000×g 离心 1 min，吸取上清进行 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。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℃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。
洗脱组分中没有目的蛋白	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。
	GFP空间构象	Anti-GFP Affinity Beads 4FF和GFP的结合，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	减少上样量，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。



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
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