

## GFP 标签亲和层析介质

### Anti-GFP Affinity Beads

货号	规格
BDTL0047-1	1ml
BDTL0047-5	5ml

#### 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 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。具体性能见表 1。

表 1. GFP 标签亲和层析介质产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	Anti-GFP Antibody
载量	>1mg GFP 标签蛋白/ml 介质
粒径 (μm)	45-165
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. 纯化流程

##### 2.1 Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

- **平衡/洗杂 Buffer:** 50mM Tris, 0.15M NaCl, pH 7.4
- **酸性洗脱 Buffer:** 0.1 M glycine HCl, pH3.0
- **中和液:** 1M Tris-HCl, pH8.0

##### 2.2 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/洗杂缓冲液对样品或

细胞培养液稀释，或者用平衡/洗杂缓冲液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

### 3 样品纯化

#### 3.1 柱层析

1. 将 Anti-GFP Affinity Beads 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 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 $\mu$ l 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 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 $\times$ PBS 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 Affinity Beads 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 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 $\times$ 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 $\mu$ l 的 Anti-GFP Affinity Beads（柱体积 20 $\mu$ 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 $\mu$ 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°C层析柜中操作，冷库亦可）。5000×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×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 100μl 的酸性洗脱液，悬浮填料，室温孵育 5min。5000×g 离心 1min。小心取出上清，不要吸到填料，用中和液中中和。洗脱样品放置 4°C,长时间放置-20°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 Affinity Beads 没办法重复使用。

每管中加入 20μl 2× Loading Buffer, 95°C 加热 5min。5000×g 离心 1min,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 1h 以上或 4°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。
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 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 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。