

RFP 标签亲和层析介质(4FF)

Anti-RFP Affinity Beads 4FF

货号	规格
BDTL0072-1	1ml
BDTL0072-5	5ml

1. 产品介绍

红色荧光蛋白 (Red Fluorescent Protein, RFP) 是从海葵中分离得到的一种分子标记, 常用于研究蛋白质的定位、报告基因表达和蛋白-蛋白质相互作用。Anti-RFP Affinity Beads 4FF 是一种偶联了抗 RFP 抗体的琼脂糖填料, 可以用于天然 RFP、RFP 突变体及其融合蛋白的免疫沉淀、免疫共沉淀、亲和层析等实验。本产品具有以下特点: 1) 使用的抗体和 RFP 之间具有极高的亲和力, 可以高效捕获裂解上清中的 RFP 标签蛋白; 2) 免疫沉淀后, SDS-PAGE 检测, 背景更干净, 更有利于鉴定蛋白相互作用。3) 琼脂糖基材具有非特异性吸附低, 兼容性好的特点, 每毫升载量大于 1 mg(最高可达到 5 mg/ml RFP 结合载量), 可以用于 RFP 融合蛋白的大量纯化。

表 1. Anti-RFP Affinity Beads 4FF 产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	Anti-RFP Antibody
载量	> 1mg RFP 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	1× PBS (含防腐剂)
储存温度	2-8°C

2. 试剂准备

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, 或者用平衡液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ 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-RFP 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-RFP 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 μ 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-RFP 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 $\times$ 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-RFP 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 $^{\circ}$ 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 μ l 的 Anti-RFP Affinity Beads 4FF (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×g 离心 1min,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 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-RFP 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 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
洗脱组分中没有目的蛋白	种属不同	并不是每一种 RFP 蛋白 都可以结合 Ant-RFP Afinity Beads,本产品确定结合 TagRFP、turbo-RFP、DsRed、mRFP 、mChery 、mOrange 、mPlum 、mRuby 、mKate2、 mRFPruby。
	样品中无标签融合蛋白	纯化前 Western 检测是否有 RFP 标签融合蛋白。
	空间构象改变	Anti-RFP Afinity Beads 对于 RFP 的结合,强烈依赖于 RFP 的空间构象，影响 RFP 构象的缓冲条件会影响 Beads 和 RFP 之间的结合。
副孔样品差异较大	细胞转染和样品制备差异	通常样品制备以后，需要进行蛋白浓度定量，各正副孔上样量需要一致。

	填料损失	填料在洗涤过程中有损失，琼脂糖填料离心后，每次移液需要注意不要吸走填料。最后一次洗涤以后，如果有液体残留，不同样品之间需要留有相同体积的残液。降低操作误差。
背景高	洗涤不充分，洗杂液残留	填料需要轻轻吹打分散开。可以考虑用 SDS-PAGE 的上样针，插入 Beads 中，尽量移走残液。最后一次洗杂更换新离心管。
	核酸影响	样品裂解时候，如果核酸过多,可能造成大量非特异性吸附，此时推荐使用本公司的超级核酸酶促进样品处理。同时也要注意，高速离心以后，转移样品不要将沉淀的细胞碎片转移。
结合效率低	孵育时间过短	在高浓度的 RFP 蛋白溶液中(1mg/ml) ,至少需要 30 分钟，填料才可以达到饱和。样品浓度低时建议延长时间至 1 h 以上或 4°C 过夜。
	填料粒径大，空间位阻影响结合	选择粒径更小的磁珠 Anti-RFP Affinity Beads 4FF (1 μm),磁珠和 RFP 的结合速度可以大大提高，洗涤的时间也可以缩短。