



## YFP 标签亲和层析介质

### Anti-YFP Affinity Beads

| 货号         | 规格  |
|------------|-----|
| BDTL0073-1 | 1ml |
| BDTL0073-5 | 5ml |

#### 1. 产品介绍

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。YFP (Yellow Fluorescent Protein)即黄色荧光蛋白，是绿色荧光蛋白(GFP) 的一种突变体，其荧光向红色光谱偏移，主要是因为 GFP 蛋白第 203 位苏氨酸被酪氨酸取代，从而发出波长较长的黄色荧光。荧光蛋白作为标签,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，受其它物质干扰小。Anti-YFP Affinity Beads 4FF 可以富集和纯化 YFP 及其融合表达蛋白，此外还能结合和纯化 GFP 和 EGFP 标签蛋白，不结合 BFP 以及 RFP 标签蛋白。具体性能见表 1。

表 1. YFP 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-YFP Antibody                                                                                                        |
| 载量      | > 1mg YFP 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. 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 $\mu$ 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-YFP 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-YFP 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-YFP 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 1 $\times$ PBS（含防腐剂）平衡，2-8 $^{\circ}$ C 保存。

### 3.2 静态吸附

1. 填料准备：取适量的 Anti-YFP 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-YFP 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。

- 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 $^{\circ}$ 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。
- 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。
- 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 $\mu$ 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 $\beta$ -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-YFP Affinity Beads 没办法重复使用。

每管中加入 20 $\mu$ 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。

### 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 YFP（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 $^{\circ}$ 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。                                                                           |
| 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。<br>低温操作。<br>细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂。                                                |
|             | YFP 空间构象 | Anti-YFP Affinity Beads 和 YFP 的结合，强烈依赖 YFP 的空间构象，影响 YFP 构象的缓冲条件会影响两者之间的结合。           |

|      |            |                                                                                        |
|------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|      | YFP 种类不同   | 绿色荧光蛋白有很多种，Anti-YFP Affinity Beads 确定结合来自于管水母的野生型 YFP 以及 EYFP、YFP 等，不结合 CFP 和其他种属 YFP。 |
|      | 样品中无标签融合蛋白 | 纯化前用荧光或 WB 检测是否有 YFP 标签融合蛋白。                                                           |
|      | 目的蛋白表达量太低  | 优化蛋白表达量。<br>增加上样量。<br>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。                                                      |