版本：01

生效日期 :01/04/2024

**Anti-GFP\_Affinity beads 使用说明书**

 [**Anti-GFP\_Affinity beads使用说明书** 0](#_Toc154493426)

[1. 产品信息 1](#_Toc154493427)

[2. 使用说明 1](#_Toc154493428)

[3. 试剂兼容性表 2](#_Toc154493430)

[4. 问题处理 3](#_Toc154493433)

操作者在使用本产品之前必须认真阅读操作指南

本产品仅供科研使用，不能用于临床诊断

1. 产品信息

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。eGFP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。佰翱得Anti-GFP\_Affinity beads 具有高亲和力、高特异性、高灵敏度、性质稳定等特点，主要用于原核、真核细胞等常用蛋白表达系统中含有GFP、eGFP标签融合蛋白的亲和纯化和检测。

表 1. 本产品的基本特征

|  |  |
| --- | --- |
| 产品配置 | 50%含有0.1% ProClean 950的磷酸缓冲液，50%沉淀填料 |
| 用途 | 亲和纯化 |
| 基质 | 4%高度交联琼脂糖 |
| 粒径 | 45-165 μm |
| 配基 | Anti-GFP Nanobody |
| 结合能力 | ~3 mg eGFP标签蛋白（~26 kDa）/ml填料颗粒 |
| 储存条件 | 2~8°C保存 ，**避免0℃及0℃以下冻存填料**。 |

2. 使用说明

考虑到样本的复杂性和实验条件的多样性，以下实验指导说明仅供参考，操作过程中可根据实际情况进行调整，以获得更优的实验结果。

**2.1 设备及试剂准备（本产品不提供）**

微量移液器，离心管，离心机，孵育旋转仪，空层析柱，蛋白酶抑制剂，缓冲溶液（见表 2）。

表 2. 重力柱层析法所需缓冲溶液

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **溶液用途** | **试剂简称** | **推荐配方** |
| 裂解缓冲液 | HEPES | 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5 |
| 自制或购买裂解液 | N/A |
| 平衡溶液 | HEPES | 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5 |
| 洗涤溶液 |
| 保存溶液 | PBS | 10 mM NaPhosphate, 200 mM NaCl, pH 7.0, 0.1% ProClean 950 |

**2.2 样品前处理**

根据样品性质，进行处理，得到上清液。

**2.3 孵育上样**

将上清液与平衡好的填料进行孵育或用预装柱流穿。

**2.4 洗杂**

在收集完流穿液的层析柱中，添加25CV的 HEPES 洗涤 buffer 冲洗填料。注意保持填料的湿润。

**2.5 柱切**

洗杂结束后，根据融合蛋白的酶切位点，在离心管中加入相应的酶进行柱切，将离心管置于孵育旋转仪上，4℃过夜旋转酶切。或在预装柱中循环酶切。

**2.6 流穿**

孵育结束后，收集流穿液至干净的离心管中，待流穿结束后继续加入3倍柱体积的洗涤buffer继续收集至离心管中。

**2.7 除酶**

将收集的流穿液缓慢流过经洗涤buffer平衡过的的除酶填料，收集目的蛋白。

3. 试剂兼容性表

上样过程中，样品缓冲液中的化学试剂可能会干扰目标蛋白与填料的结合，请参考下表添加合适浓度的化学试剂。

表 3. 样品缓冲液中试剂兼容性

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂类型** | **试剂** | **最大耐受浓度** |
| 去垢剂 | DDM | 20% |
| LMNG | 20% |
| GDN | 20% |
| 还原剂 | TCEP | 5 mM |
| β‐ME | 150 mM |
| DTT | 100 mM |
| 其它试剂 | Glycerol | 50% |
| 盐类 | KCl | 1 M |
| NaCl | 1 M |

4. 问题处理

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **可能原因** | **解决方法** |
| 穿透中有目的蛋白 | 填料与目的蛋白结合时间太短 | 延长样品与填料的结合时间，可延长至2h以上或4℃过夜 |
| 反应过程中，填料未能充分重悬 | 调整样品与填料孵育时的反应条件，使填料和样品充分结合 |
| 填料过载 | 减少上样体积或增加填料的体积 |
| 试剂兼容性问题 | 参考试剂兼容性表，判断样品中试剂是否过量。如有过量， 纯化前对样品进行Buffer置换 |
| 最终流穿样品中没有目的蛋白 | 目的蛋白酶切不成功 | 确保使用含有活性的酶，增加酶切时间 |
| 目的蛋白表达量低 | 优化表达条件，提高蛋白表达水平 |
| 目的蛋白不稳定 | 使用新配置的样品，低温操作，在纯化过程中加入蛋白酶抑制剂 |
| 目的蛋白背景杂 | 洗杂不充分 | 保证充分悬浮，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。 |