

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

GFP Tag 琼脂糖凝胶

GFP Tag Agarose

产品描述

黄绿色荧光蛋白 (GFP) 及其突变体增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 广泛用于检测基因表达效率以及目标蛋白的表达和分布。作为标签蛋白, GFP 能使融合的目标蛋白自发荧光, 无需依赖抗体或探针, 即可实现细胞中目标基因的定位, 且受其他物质干扰较小。

TargetMol 的 GFP Tag 琼脂糖凝胶可高效检测和纯化 GFP、EGFP 及其融合蛋白, 但不会结合 BFP 标签蛋白。

产品特点

- 使用的抗体与 GFP 具有极高的亲和力, 能够高效捕获裂解上清中的 GFP 标签蛋白。
- 免疫沉淀后, 通过 SDS-PAGE 检测, 背景信号更干净, 更利于鉴定蛋白相互作用。
- 琼脂糖基质具有低非特异性吸附和良好的兼容性, 每毫升的载量超过 1 mg, 适合进行 GFP 融合蛋白的大规模纯化。

产品信息

GFP Tag 琼脂糖凝胶	特性
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
粒径	45-165 μm
配体	Anti-GFP Antibody
载量	>1 mg GFP 标签蛋白/mL 介质
最大压力	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
保存溶液	1×PBS, 0.02% NaN3

产品应用

- 高效检测和纯化 GFP、EGFP 及其融合蛋白, 但不会结合 BFP 标签蛋白。

操作说明

1. 缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分, 使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤:

- 1) 平衡/洗杂液: 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.4
- 2) 酸性洗脱液: 0.1 M glycine HCl, pH3.0
- 3) 中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.0
- 4) 保存溶液: 1×PBS, 0.02% NaN3

2. 柱层析

- 1) 将 GFP Tag 琼脂糖凝胶装入适当的层析柱, 使用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡, 以确保填料处于与目标蛋白相同的缓冲条件下。
- 2) 将样品加入到已经平衡好的琼脂糖凝胶中, 并收集流出液。可以多次上样以提高结合效率。

- 3) 用 10-20 倍柱体积的洗涤液清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，并收集洗涤液。
- 4) 进行酸性洗脱，使用 5 倍柱体积的酸性洗脱液进行洗脱，随后在洗脱组分中添加洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 至 7.0-8.0，并分管收集。

注：酸性洗脱后，填料需立即用平衡液平衡，琼脂糖凝胶在洗脱液中的停留时间不应超过 20 min。

- 5) 使用 3 倍柱体积的洗脱液进行清洗，然后用平衡液调整至中性。
- 6) 用 3 倍柱体积的保存溶液进行平衡，保存于 2-8°C。

3. 静态吸附

- 1) 将适量的 GFP Tag 琼脂糖凝胶加入层析柱中，流干保护液。随后用 5 倍柱体积的平衡液进行清洗。
- 2) 将样品溶液加入填料中，在 4°C 或室温下震荡孵育至少 30 min (避免使用磁力搅拌)，以确保填料与样品溶液充分混合。
- 3) 孵育结束后，进行离心 (5000×g, 1 min) 或过滤，以收集填料。
- 4) 将收集到的填料装入层析柱中，用平衡液清洗，直到紫外检测稳定。
- 5) 使用酸性洗脱液进行洗脱。
- 6) 参照 2 中的第 5) 和第 6) 步骤进行填料的再生和保存。

4. 免疫沉淀

- 1) 取 40 μL 的 GFP Tag 琼脂糖凝胶 (柱体积 20 μL) 混合液，加入到 1.5 mL 的离心管中，5000×g 离心 1 min，吸去上清液。
- 2) 向填料中加入 0.5 mL 的平衡液，轻轻悬浮填料 (以确保填料处于与目标蛋白相同的缓冲体系中，保护蛋白)，5000×g 离心 1 min，吸去上清液。此步骤重复一次。
- 3) 将 200-1000 μL 的样品加入处理好的填料中，混合均匀。将离心管置于翻转混合仪中轻轻翻转，确保样品与填料充分接触和吸附，室温孵育至少 1 h (对于易降解的蛋白，建议添加蛋白酶抑制剂，如 C0001，并在 2-8°C 的层析柜中操作，也可以在冷库中进行)。5000×g 离心 1 min，吸去上清液，注意不要吸走填料。
- 4) 洗杂：向填料中加入 0.5 mL 的洗杂液，悬浮填料并轻轻混匀。5000×g 离心 1 min，吸去上清液。此步骤重复三次，以确保去除非特异性吸附。
- 5) 样品洗脱：根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。
 - a) 酸性洗脱：加入 100 μL 的洗脱液，悬浮填料，室温孵育 5 min。5000×g 离心 1 min，吸去上清液，避免吸到填料，随后用中和液中和。洗脱样品放置在 4°C，长时间可储存于 -20°C。
 - b) 变性洗脱：每管中加入 20 μL 的 SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，95°C 加热 5 min。5000×g 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。

注：变性洗脱后的琼脂糖凝胶不能重复使用。

保存条件

4°C, 2 年。

注意事项

1. 凝胶应保存在储存溶液中，防止干燥。
2. 在从保存管中取出琼脂糖凝胶之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
3. 本产品已验证能够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。
4. 纯化前建议通过 Western 检测 GFP 标签融合蛋白表达情况。
5. DTT 可能导致 GFP 抗体在凝胶上脱落，因此请避免使用含有 DTT 的细胞裂解液样品。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

