

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

GFP Tag 琼脂糖磁珠 GFP Tag Magrose Beads

产品描述

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 琼脂糖磁珠以抗 GFP 抗体为配体, 能够特异性结合 GFP、EGFP 及其融合蛋白, 而不与 BFP 标签蛋白发生结合。琼脂糖磁珠系列产品具备超顺磁性、快速磁响应性、丰富的羟基官能团, 以及均匀的粒径特性, 是医学和分子生物学研究中的重要工具。GFP Tag 琼脂糖磁珠可以用于检测和纯化 GFP、EGFP 及其融合蛋白, 也可用于免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 实验。

产品特点

- 磁响应性快速
- 微球分散性优异
- 非特异性吸附极低
- 结合位点丰富

产品信息

GFP Tag 琼脂糖磁珠	特性
基质	磁性琼脂糖微球
粒径	30-100 μm
配体	Anti-GFP Antibody
结合能力	>1 mg GFP 标签蛋白/mL 磁珠
磁珠浓度	20% (v/v)
保存溶液	1 \times PBS, 0.02% NaN ₃

产品应用

- 检测和纯化 GFP、EGFP 及其融合蛋白。
- 免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 实验。

操作说明

一、缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分, 适用于多数 GFP 融合蛋白的纯化, 使用时可根据需要进行调整。缓冲液在使用前最好使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

- 1) Binding/Washing Buffer: 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.4。
- 2) Elution Buffer: 0.1 M Glycine-HCl, pH3.0。
- 3) Neutralization Buffer: 1 M Tris-HCl, pH8.0。

二、GFP 标签蛋白纯化

1. 磁珠预处理

- 1) 将 GFP Tag 琼脂糖磁珠用漩涡振荡器振荡充分混匀, 然后使用移液器吸取适量磁珠悬液置于离心管中。将离心管放入磁性分离器, 静置 1 min, 进行磁性分离, 吸去上清液, 取下离心管。

注: 磁珠悬液用量需根据样品体积和所含样品含量计算。

- 2) 向离心管中加入与磁珠悬液等量的 Binding/Washing Buffer, 振荡混匀, 使磁珠重新悬浮。接着进行磁性分离, 吸去上清液。重复洗涤步骤 2 次。

注: 在进行磁性分离时, 为了减少磁珠的损耗, 当溶液变澄清后, 应先盖紧离心管盖子, 保持离心管放置在磁性分离器上。随后, 手持磁性分离器与离心管一起上下翻转数次, 使澄清的溶液冲刷掉离心管盖上残留的磁珠。静置片刻, 待溶液再次变澄清后再进行后续操作。此步骤适用于后续的所有磁性分离过程。

2. 磁珠与目标蛋白结合

- 1) 在预处理后的磁珠中加入样品溶液，并将离心管放置于涡旋混合器中振荡 15 s。
- 2) 将离心管置于旋转混合仪上，室温下旋转混合 30 min 以上；或者为了防止目标蛋白降解，也可在 2~8°C 的低温环境下旋转混合 1-2 h。
- 3) 将离心管进行磁性分离，将上清液移至新的离心管中备用后续检测。取下离心管，进行后续的洗涤步骤。

3. 磁珠洗涤

- 1) 向装有磁珠的离心管中加入 5 倍体积的 Binding/Washing Buffer，旋转混合 2 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。将清洗液移至新的离心管中备用，以备取样检测。重复洗涤步骤 1 次。
- 2) 为避免原离心管壁上的非特异性吸附蛋白污染目标蛋白，向装有磁珠的离心管中加入 Binding/Washing Buffer，使磁珠重新悬浮后，将磁珠悬液转移至新的离心管中，进行磁性分离，将上清液移至清洗液收集管中。

4. 目标蛋白洗脱

提供以下几种洗脱方案，用户可根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。

- 1) **变性洗脱**：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向 EP 管中加入 SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，混合均匀，95°C 加热 5 min。然后进行磁性分离，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。

注：GFP Tag 琼脂糖磁珠变性洗脱后不可重复使用。

- 2) **非变性洗脱**：根据需要确定洗脱体积以调整目标蛋白浓度，加入 3-5 倍体积的 Elution Buffer，室温旋转混合 5-10 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。将洗脱液收集到新的 EP 管中，即得到目标蛋白。在洗脱液中加入相当于十分之一洗脱体积的 Neutralization Buffer，将 pH 值调整至 7.0-8.0。

注：酸性洗脱后，应立即使用 Binding/Washing Buffer 平衡磁珠，且 GFP Tag 琼脂糖磁珠在洗脱液中停留时间不应超过 20 min。

三、IP/Co-IP 实验

1. 磁珠预处理

同蛋白纯化。

2. 磁珠与靶蛋白结合

- 1) 向处理后的磁珠中加入含 GFP 标签的靶蛋白溶液，颠倒混匀。将离心管置于旋转混合仪上，室温下旋转混合 30 min；或者为了防止目标蛋白降解，也可在 2~8°C 的低温环境下旋转混合 1-2 h。
- 2) 将离心管进行磁性分离，将上清液移至新的离心管中备用后续检测。取下离心管，加入 5 倍悬浮液体积的 Binding/Washing Buffer，旋转混合 2 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。重复洗涤步骤 2 次，即得到靶蛋白-磁珠复合物。

注：如果进行 IP 实验，跳过第 3 步，直接进行第 4 步。如果进行 Co-IP 实验，请继续进行第 3 步操作。

3. 目标蛋白与复合物结合

- 1) 向上述 GFP 融合蛋白-磁珠复合物中加入含目标蛋白的裂解液。将离心管置于旋转混合仪上，室温下旋转混合 30 min 以上。
- 2) 将离心管进行磁性分离，将上清液移至新的离心管中备用后续检测。取下离心管，加入 5 倍悬浮液体积的 Binding/Washing Buffer，旋转混合 2 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。重复洗涤步骤 2 次，即得到目标蛋白-靶蛋白-磁珠复合物。

4. 目标蛋白洗脱

提供以下几种洗脱方案，用户可根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。

- 1) **变性洗脱**：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向 EP 管中加入 SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，混合均匀，95°C 加热 5 min。然后进行磁性分离，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。

注：GFP Tag 琼脂糖磁珠变性洗脱后不可重复使用。

- 2) **非变性洗脱**：根据需要确定洗脱体积以调整目标蛋白浓度，加入 3-5 倍体积的 Elution Buffer，室温旋转混合 5-10 min，使磁珠重新悬浮，进行磁性分离。将洗脱液收集到新的 EP 管中，即得到目标蛋白。在洗脱液中加入相当于十分之一洗脱体积的 Neutralization Buffer，将 pH 值调整至 7.0-8.0。

注：酸性洗脱后，应立即使用 Binding/Washing Buffer 平衡磁珠，且 GFP Tag 琼脂糖磁珠在洗脱液中停留时间不应超过 20 min。

保存条件

4°C，2 年。

注意事项

1. 避免对磁珠进行冷冻、干燥和高速离心等操作。
2. 为了减少磁珠的损失，每次磁性分离的时间不应少于 1 min。
3. 从磁珠保存管中取出磁珠之前，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。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管，以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 磁珠与溶液混合过程中，如果溶液粘稠导致翻转离心管无法重悬磁珠，可以使用移液器吹打或瞬时涡旋混合，使磁珠充分重悬。
6. 用户可以根据实际需求保留经磁性分离后移去的上清液，并进行取样检测，以便分析纯化过程并优化蛋白纯化流程。
7. 本产品可以重复使用。当使用过的磁珠在重复使用时，建议继续纯化同种蛋白；如果要纯化不同种类的蛋白，建议使用新的磁珠。
8. 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。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

