

ChromoTek 常见问题解答

1、GFP-Trap®可识别的 GFP 衍生物类型有哪些？

(1) eGFP, wtGFP, GFP S65T

(2) TagGFP

(3) eYFP, YFP, Venus, Citrin

(4) CFP

不能识别: TurboGFP, 所有的 RFPs

2、RFP-Trap®可识别的 RFP 衍生物类型有哪些？

(1) mRFP

(2) mCherry

(3) mOrange

(4) mPlum

(5) mRuby

(6) mKate2

不能识别: DsRed、mRFPpruby、TagRFP、所有 GFPs

3、Nano-Trap® (GFP-Trap® / RFP-Trap®) 的结合能力如何？

Nano-Trap®的结合能力取决于珠子。每 10 μ L 浆液, 琼脂糖珠可结合 2~3 μ g GFP, 磁性颗粒可结合 0.25~0.5 μ g GFP。

4、可以从 GFP-Trap 洗脱结合蛋白么？

关于定量洗脱, 可以将样品至于 SDS 上样缓冲液中 95 $^{\circ}$ C 煮 10min (详见 protocol), 或者在 0.2 M 的甘氨酸 (pH2.5) 中孵化 0.5~2min, 随后用 0.1 体积的 1M Tris 碱中和。

5、是否可以从 GFP-Trap 洗脱出自然状态的结合蛋白, 比如, 在凝胶迁移实验或功能分析实验中？

可以尝试洗脱游离的 GFP。但是, 请注意, 这种方法, 不能定量洗脱出目标融合蛋白。

6、怎样才能避免非特异性的蛋白与 GFP-Trap 交互作用而结合？

关键操作步骤, 是在孵化液中稀释洗涤剂的浓度。我们建议, 洗涤剂为终浓度 0.1% (如 NP-40 或 TX-100), 且最终体积不少于 0.4mL。另外, 我们建议, 要测定各种洗涤缓冲液的盐浓度, 使其范围在 150mM-500mM 范围内, 以去除非特异性结合的亲水性蛋白。

7、在 binding 过程中, N-端与 C-端 GFP 融合蛋白之间是否存在差异？

GFP-Trap®对 C-末端的 GFP 融合蛋白的亲合力稍高, 若要消除这种差异, 可以加长孵化时间 (1-2h 取代 15-30min)

8、是否可以在组织样品 (即变性缓冲液) 中直接纯化 GFP 标记的融合蛋白？

原则上, GFP-Trap®即使在恶劣的缓冲条件下 (如, RIPA 缓冲液, 含 0.1%SDS 或 1M 尿素), 也非常稳定。

9、可结合的 GFP-Trap®珠的 GFP 结构, 是否有大小限制？

无。

10、如果在洗脱液中, 有剩余的背景怎么办？

建议使用 Chromotek 的 blocked particles (bab-20 or bmp-20) 对样品进行预处理。