

Co NTA Beads 6FF 的预装柱说明书

货号: AC17631

规格: 1*1mL / 1*5mL / 5*1mL / 3*1mL+1*5mL / 5*5mL

保存: 2-8°C

产品说明:

Co NTA Beads 6FF 可以从原核和真核表达系统中一步纯化 His 标签蛋白。该产品是以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质，配体以四配位键螯合钴。Co NTA Beads 6FF 相比 Ni NTA Beads 6FF 对 His 标签蛋白具有更高的选择性。

表 1: 介质性能参数

基质	高度交联 6%的琼脂糖凝胶	
粒径范围	45-165 μ m	
螯合离子	Co ²⁺	
结合载量	>20mg 6 \times His-tagged protein /ml(介质)	
耐受试剂	还原剂	10 mM β -mercaptoethanol ¹
	变性剂	8 M urea 、 6 M Gua-HCl
	去垢剂	<1% Triton X-100、 1% NP-40 1% CHAPS , SDS, sarcosyl
	其他类	\leq 500 mM imidazole ² at pH7.0 to 8.0 for elution 30% ethanol ³ 、 20% glycerol、 500 mM KCl、 1.0 M NaCl 20mM MES、 50 mM Tris ⁴ 、 50 mM HEPES、 50 mM MOPS
操作压力	\leq 0.3MPa, 3bar	
贮存溶液	20%乙醇	

Note: ¹ Co NTA Beads 6FF 立即用平衡液平衡，否则介质会变色。不要将介质保存在含有 β -Mercaptoethanol 的缓冲液中

² 过高浓度的咪唑有可能会降低蛋白回收率

³ 乙醇有可能造成蛋白沉淀，降低蛋白回收率和堵柱子

⁴ Tris 与金属离子微弱结合造成载量降低

避免使用下列试剂：DTT (dithiothreitol)，DTE (dithioerythritol) and TCEP (TRIS (2-carboxyethyl) phosphine)。会降低介质的蛋白载量。

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 、EGTA (ethylene Glycolbis [β -amino-ethyl ether])会将钴离子从介质上剥落。

纯化流程:

1、Buffer 的准备

推荐使用中性偏碱缓冲液 (pH7-8)，如磷酸盐缓冲液。可加入 0.3-0.5M 氯化钠减少非特异性吸附。在蛋白结合力弱的条件下避免使用 Tris-HCl。应避免使用螯合剂 EDTA 和柠檬酸盐缓冲液。

可溶性蛋白纯化

平衡液: 50 mM 磷酸盐, 300 mM NaCl, pH 7.4

洗杂液: 50 mM 磷酸盐, 300 mM NaCl, 5-20 mM 咪唑, pH 7.4

洗脱液: 50 mM 磷酸盐, 300 mM NaCl, 250 mM 咪唑, pH 7.4

洗杂和洗脱液中的 NaCl 和咪唑浓度可根据需要增加或减少。

包涵体纯化

可在平衡液、洗杂液和洗脱液中添加 8M 尿素或 6M 盐酸胍促进蛋白的溶解。

2、样品准备

2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到 LB 培养基中, 根据载体使用说明加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后, 将培养液转移到离心杯中, 7,000rpm(7,500×g), 离心 15min 收集菌体, 然后按照菌体: 平衡液=1: 10 (W/V) 加入平衡液, 加入终浓度为 1mM 的 PMSF。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4mg/ml, 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶), (同时也可以加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与树脂的结合)。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10μg/ml RNase A 和 5μg/ml DNase I), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000rpm(15,000×g), 4 度离心 20-30 分钟。取上清, 置于冰上备用或-20 度保存。

2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯, 5,000rpm(3,800×g), 离心 10min, 收集菌体得上清, 如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 即可直接加入柱子使用; 如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 需用平衡液 4℃ 下透析才能加入柱子。
- 2) 对于大量体积的上清, 需加入硫酸铵沉淀浓缩后, 蛋白还需用平衡液 4℃ 透析后才能加入柱子。

2.3 包涵体蛋白纯化(变性条件)

- 1) 将培养液转移到离心杯中, 7,000rpm(7,500×g), 离心 15min 收集菌体, 去掉上清。
- 2) 按照菌体: 平衡液 (不含 8M 尿素或 6M 盐酸胍)=1: 10(W/V)将菌体悬浮起来混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管中, 10,000rpm(15,000×g), 4 度离心 20-30 分钟。去掉上清, 步骤 2) 和 3) 可以重复一次。
- 4) 按照包涵体: 平衡液(含 8M 尿素)=1: 10(W/V)将包涵体悬浮起来。
- 5) 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化。

3、样品纯化

1. 上柱: 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子, 将层析柱连接至色谱系统中。再折断下口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。

2. 水洗: 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。

3. 平衡: 使用至少 5 倍柱体积的平衡液平衡色谱柱。

备注: 此步骤用于平衡介质, 保证介质中的溶液的组分和 pH 与样本一致。

4. 利用泵或注射器上样。

注: 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。

5. 洗杂: 用洗杂液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线 (一般至少 10-15 个柱体积)。

注: 在样品和平衡缓冲液中加入咪唑可以提高样品纯度。

6. 洗脱: 用洗脱液采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中, 通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。梯度洗脱可以用一个小的梯度, 例如 20 倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。

7. 水洗：依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料，最后再用 5 倍柱体积的 20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 4℃ 保存，防止填料被细菌污染。

4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

填料再生

组氨酸标签蛋白亲和纯化填料所带的钴离子不需要经常去除和重新挂钴离子。当填料使用过程中发现反压过高，填料上面出现明显的污染，或者填料载量明显变低时，需要进行对填料进行钴离子剥离和重新挂钴离子，也就是填料再生。将填料装填在合适的层析柱内，按照下面操作流程进行。

- 1) 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 2) 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0)剥落钴离子；
- 3) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 4) 使用 0.5M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15min；
- 5) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM CoCl₂ 再生挂钴；
- 7) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗； 填料再生后，可以立即使用，如不立即使用，需要将填料悬浮于等体积的 20%乙醇中，置于 4℃ 保存。

常见问题

表 1：常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1.上样量过载	降低上样量
	2.上样速度过快	降低上样流速
	3.蛋白或脂类在介质中聚集影响结合	及时有效地清洗介质或更换新的介质
	4.目标蛋白出现在流穿中	目标蛋白没有成功表达或样品和平衡液中 pH 和组分不正确
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1.目标物没有与介质结合或结合量较少	先确认目标物是否与介质结合
	2.洗脱时间不够	降低流速，延长洗脱液的保留时间
	3.目标物出现降解	检测目标物的稳定性并加入蛋白酶抑制剂，在 4℃ 下进行纯化操作
	4.洗脱体积过小	加大洗脱体积

	5.洗杂时，目的蛋白被洗下来	提高洗杂液的 pH，或者降低洗杂液中的咪唑浓度
	6.目的蛋白结合过强，不容易洗脱	降低洗脱液 pH 值，或者增加洗脱液中咪唑浓度 使用 10-100mM EDTA 溶液剥离钴离子，同时得到目的蛋白
洗脱组分不纯 (含有多种蛋白)	1.洗杂不彻底	增加洗杂液体积
	2.样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节 pH 值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。再使用其它的纯化手段（如离子交换、疏水等）进一步纯化洗脱溶液
柱子反压过高	1.填料被堵塞	样品上柱前使用滤膜(0.22 或 0.45 μm)过滤，或者离心去除。 样品中含有高浓度的核酸，加长破碎时间直至粘度降低，或者添加 DNase I（终浓度 5 $\mu\text{g/ml}$ ）， Mg^{2+} （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 分钟。
	2.样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品，降低粘度
介质载量下降	1.上样速度过快	降低上样流速
	2.蛋白或脂类在介质中聚集，导致载量下降。	及时清洗介质
	3.使用次数过多	更换新介质
色谱峰上升缓慢	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡，重新装柱
液流较慢	1.蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	2.蛋白沉淀在介质中	调整平衡液和洗脱液组分，以维持目标物的稳定性和介质的结合效率
	3.分离柱中微生物生长	所用试剂必须经过过滤和脱气；样品上柱前必须离心或过滤
填料变浅	Co 离子被剥落	参考填料重生
上样过程中蛋白发生沉淀	1.操作温度太低	室温下上样
	2.蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂，如 0.1%的 Triton X-100 或者 Tween-20