



# Chelating Beads 6FF

## 目录

1. 产品介绍	1
2. 离子螯合	1
3. 纯化流程	1
4. 在位清洗	3
5. 填料再生	3
6. 订购信息及相关产品	4

## 1. 产品介绍

**Chelating Beads 6FF** 是以高度交联的 6% 琼脂糖凝胶为基质，配体为亚氨基二乙酸 (IDA)，结构如图 1 所示。**Chelating Beads 6FF** 可以用于螯合各种金属离子，如  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ ，可根据金属离子对标签蛋白的结合力来选择需要螯合的金属离子。通常首选  $\text{Ni}^{2+}$ ，因为镍离子螯合填料可以很好的从各种表达体系中一步纯化 his 标签蛋白。 $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  结合力很强，可以用于纯化结合力弱的蛋白。 $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  对标签蛋白的特异性更强，纯度更高。

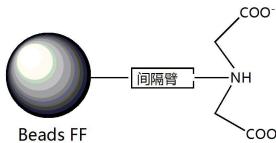


图 1. Chelating Beads 6FF 化学结构示意图

表 1. Chelating Beads 6FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 6% 琼脂糖凝胶
离子载量	>30 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{ml 介质}$
微球粒径	45–165 $\mu\text{m}$
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	20% 乙醇
储存温度	4–30°C

## 2. 离子螯合

- 将填料装至合适的层析柱中，用 3 倍柱体积的去离子水清洗。
- 用 3 倍柱体积的 100 mM 的金属离子水溶液( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  etc.)过柱螯合金属离子。注： $\text{Zn}^{2+}$ 溶液 pH 小于 6.0,  $\text{Fe}^{3+}$ 溶液 pH 小于 3.0，否则容易产生沉淀。
- 用 3 倍柱体积的去离子水清洗。
- 用 5 倍柱体积的 20 mM 醋酸钠，0.5 M NaCl, pH4.0 的缓冲液清洗去除未螯合的金属离子。
- 用 3 倍柱体积的平衡液清洗。填料可立即使用，或保存在 20% 乙醇中。注： $\text{Fe}^{3+}$ 在 pH 中性条件下容易产生沉淀，长期不用可将填料上  $\text{Fe}^{3+}$ 用 EDTA 溶液剥落保存，用时再螯合。

## 3. 纯化流程

### 3.1 缓冲液的准备

以镍离子螯合后，纯化 His 标签蛋白为例。可使用下列推荐缓冲液，也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系，基本原理就是低咪唑上样，高咪唑洗脱，或者高 pH 上样，低 pH 洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22  $\mu\text{m}$  或者 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

平衡液：50 mM 磷酸盐，0.3 M NaCl, 0–10 mM 咪唑, pH8.0

洗杂液：50 mM 磷酸盐，0.3 M NaCl, 10–20 mM 咪唑, pH8.0

洗脱液：50 mM 磷酸盐，0.3 M NaCl, 250 mM 咪唑, pH8.0

**避免使用下列试剂：**DTT (dithiothreitol), DTE (dithioerythritol) and TCEP.会降低介质的蛋白载量。EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 、 EGTA (ethylene Glycolbis ([ $\beta$ -amino-ethyl ether]) 会将金属离子从介质上剥落。



### 3.2 样品准备

#### 3.2.1 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，7,000 rpm(7,500×g)，离心 15 min 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 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶（工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml，如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶），（同时也可加入其他蛋白酶抑制剂，但不能影响目的蛋白与填料的结合）。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来，（如果菌液浓度高，也可考虑加入 10 µg/ml RNase A 和 5 µg/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，10,000 rpm(15,000×g)，4℃离心 20-30 min。取上清，置于冰上备用或-20℃保存。

#### 3.2.2 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，5,000 rpm(3,800×g)，离心 10 min，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，需用结合液透析才能加入柱子。
- 2) 对于大量体积的上清，需加入硫酸铵沉淀浓缩后，蛋白还需用结合液液透析后才能加入柱子。

### 3.3 填料的装填

#### 3.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。
- 2) 将鳌和金属离子的 Chelating Beads 6FF 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4-30℃保存。

#### 3.3.2 中压层析柱的装填

鳌和金属离子的 Chelating Beads 6FF 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍填装层析柱的方法。装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V：所需介质体积 ml

1.15：压缩系数

r：柱管半径 cm

h：装填高度 cm

**注意：**所取悬液体积应为介质体积的两倍，因为介质体积只占悬液总体积的一半，另一半为保护液。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将填料悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

### 3.4 样品纯化

#### 3.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量鳌合金属离子的 Chelating Beads 6FF 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干平衡液；重复两次以上。
- 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。



- 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 10-15 min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

### 3.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的螯合金属离子的 Chelating Beads 6FF 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

### 3.4.3 中压层析柱法纯化

螯合金属离子的 Chelating Beads 6FF 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 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，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。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) 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）。
- 6) 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。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20% 乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃ 保存。

## 3.5 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（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。

## 4. 在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时，需要进行在位清洗操作（Cleaning-in-Place, CIP）。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物，如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

### 去除强疏水结合的蛋白、脂蛋白和脂类

通过使用 30% 异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 min 可以去除此类污染物。然后，再使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。也可以选择使用含有去污剂的酸性或碱性溶液，清洗填料 2 倍柱体积。例如，含有 0.1-0.5% 非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 小时。去污剂处理后，需要使用 70% 的乙醇清洗 5 个柱体积，以彻底去除去污剂。最后使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。

### 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液清洗 10-15 min。然后，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

## 5. 填料再生

当填料使用过程中发现颜色变浅，或者填料载量明显变低时，需要进行对填料进行金属离子剥离和重新挂金属离子，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金属离子剥离和重新挂金属离子。

- 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) 剥落镍离子；
- 3) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 4) 使用 0.5 M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15 min；
- 5) 使用去离子水清洗填料，直至 pH 中性；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM 的金属离子水溶液( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  etc.)再生；
- 6) 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 4-30℃ 保存。



## 6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
IMAC Beads 6FF	SA050005	5 mL
	SA050025	25 mL
	SA050100	100 mL
	SA050500	500 mL
	SA05001L	1 L
	SA05010L	10 L
Chelating Beads 6FF	SA051005	5 mL
	SA051025	25 mL
	SA051100	100 mL
	SA051500	500 mL
	SA05101L	1 L
	SA05110L	10 L