



# Co NTA Beads 6FF 重力柱

## 目录

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍.....      | 1 |
| 2. 纯化流程.....      | 1 |
| 3. 填料再生.....      | 3 |
| 4. 问题及解决方案.....   | 4 |
| 5. 订购信息及相关产品..... | 4 |

## 1. 产品介绍

**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。具体性能见表 1。

Co NTA Beads 6FF 可以耐受一定范围的变性剂和其他的添加剂，如表 2。

表 1. Co NTA Beads 6FF 产品性能

| 项目        | 性能                                |
|-----------|-----------------------------------|
| 基质        | 高度交联的 6%琼脂糖凝胶                     |
| 载量        | >20 mg 6×His-tagged protein/ml 基质 |
| 微球粒径 (μm) | 45-165 μm                         |
| 最大压力      | 0.3 MPa, 3 bar                    |
| 储存缓冲液     | 含 20%乙醇的 1×PBS                    |
| 储存温度      | 2-8℃                              |

表 2. Co NTA Beads 6FF 试剂耐受

| 试剂种类 | 浓度                                                                                                                                                                                                     |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 还原剂  | 10 mM β-mercaptoethanol <sup>1</sup>                                                                                                                                                                   |
| 变性剂  | 8 M urea<br>6 M Gu-HCl                                                                                                                                                                                 |
| 去污剂  | <1% Triton™ X-100<br>1% NP-40<br>1% CHAPS, SDS, sarcosyl                                                                                                                                               |
| 其他   | ≤500 mM imidazole <sup>2</sup> at pH7.0 to 8.0 for elution<br>30% ethanol <sup>3</sup><br>20% glycerol<br>500 mM KCl<br>1.0 M NaCl<br>20mM MES<br>50 mM Tris <sup>4</sup><br>50 mM HEPES<br>50 mM MOPS |

注：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塞柱子。
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、DTE 和 TCEP 会降低介质的蛋白载量。EDTA、EGTA 会将钴离子从介质上剥落。

**Co NTA Beads 6FF** 重力柱以 **Co NTA Beads 6FF** 为装填材料，提供 1 ml 和 5 ml 两种规格产品，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。

## 2. 纯化流程

### 2.1 缓冲液的准备

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 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤。因为 Co NTA Beads 6FF 可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化，两种方法所需缓冲液不同。具体配置方法见表 3、表 4 和表 5。





表 3. 可溶性组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方

| 名称             | 体积 | 配方                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysis Buffer   | 1L | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>300 mM NaCl (17.54 g NaCl)<br>10 mM imidazole (0.68 g imidazole)<br>使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。  |
| Wash Buffer    | 1L | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>300 mM NaCl (17.54 g NaCl)<br>20 mM imidazole (1.36 g imidazole)<br>使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。  |
| Elution Buffer | 1L | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>300 mM NaCl (17.54 g NaCl)<br>250 mM imidazole (17.0 g imidazole)<br>使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。 |

表 4. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方, pH 洗脱方式

| 名称             | 体积  | 配方                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysis Buffer   | 1 L | 8 M Urea (480.50 g urea)<br>100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>100 mM Tris·HCl (15.76 g Tris·HCl)<br>使用 HCl 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。 |
| Wash Buffer    | 1 L | 8 M Urea (480.50 g urea)<br>100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>100 mM Tris·HCl (15.76 g Tris·HCl)<br>使用 HCl 溶液调节 pH 至 6.3, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。 |
| Elution Buffer | 1 L | 8 M Urea (480.50 g urea)<br>100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>100 mM Tris·HCl (15.76 g Tris·HCl)<br>使用 HCl 溶液调节 pH 至 4.5, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。 |

表 5. 包涵体组氨酸标签蛋白纯化所需缓冲液及配方, 咪唑洗脱方式

| 名称             | 体积  | 配方                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysis Buffer   | 1 L | 8 M Urea (480.50 g urea)<br>50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>300 mM NaCl (17.54 g NaCl)<br>10 mM imidazole (0.68 g imidazole)<br>使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。  |
| Wash Buffer    | 1 L | 8 M Urea (480.50 g urea)<br>50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>300 mM NaCl (17.54 g NaCl)<br>20 mM imidazole (1.36 g imidazole)<br>使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。  |
| Elution Buffer | 1 L | 8 M Urea (480.50 g urea)<br>50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7.80 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)<br>300 mM NaCl (17.54 g NaCl)<br>250 mM imidazole (17.0 g imidazole)<br>使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。 |

## 2.2 样品准备

### 2.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到培养基中, 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: Lysis Buffer=1: 10 (W/V) 加入 Lysis Buffer, 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介质的结合)。
- 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。

### 2.2.2 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 Lysis Buffer 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 Lysis Buffer 透析后才能加入柱子。

### 2.2.3 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 15 min 收集菌体，去掉上清。
- 2) 按照菌体:Lysis buffer (不含 8 M 尿素) =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°C 离心 20-30 min。去掉上清，步骤 2 和 3 可以重复一次。
- 4) 按照菌体: Lysis buffer (含 8 M 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，具体缓冲液配方见表 4、表 5。

### 2.3 样品纯化

**Co NTA Beads 6FF 重力柱**使用请参考以下说明，各溶液用量均按照柱体积计算（例如：2 个柱体积，1 ml 规格对应为 2 ml 溶液，5 ml 规格对应为 10 ml 溶液）。整个纯化流程大约需要 30 min（主要取决于样品体积和溶液的粘稠性），操作快捷。使用流程请参考图 1。

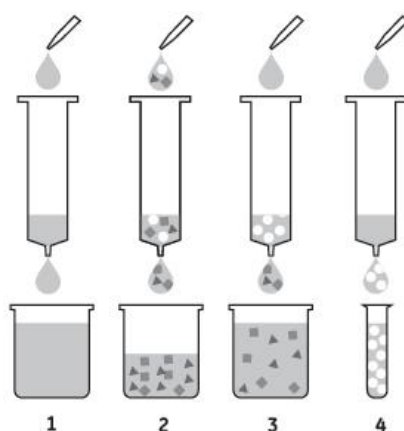


图 1. 使用 Co NTA Beads 6FF 重力柱纯化蛋白流程示意图

Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

- 1) 将 **Co NTA Beads 6FF 重力柱**固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干重力柱的保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 个柱体积的 Lysis Buffer（可参考表 3、表 4 或表 5 的配方），进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
- 3) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证目的蛋白与  $\text{Co}^{2+}$  充分接触，提高目的蛋白的回收率。收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况，在出现问题时，更方便寻找解决问题的方案。
- 4) 用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 5) 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer 进行目的蛋白的洗脱，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。
- 6) 依次使用 3 倍柱体积的 Lysis Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中，置于 2-8°C 保存，防止填料被细菌污染。

### 2.4 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。

## 3. 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整合去除和重新挂钴离子。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钴离子剥离和重新挂钴离子。

- 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) 剥落钴离子；
- 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 10 倍柱体积去离子水清洗填料；





6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM CoCl<sub>2</sub> 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 2-8℃保存。

#### 4. 问题及解决方案

| 问题             | 原因分析                 | 推荐解决方案                                                                                         |
|----------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 柱子反压过高         | 填料被堵塞                | 裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22 或 0.45 μm）过滤，或者离心去除。                                              |
|                | 样品太粘稠                | 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 μg/ml），Mg <sup>2+</sup> （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 min。 |
|                | 缓冲液太粘稠               | 有机溶剂或者蛋白稳定试剂（如甘油等）可能会引起反压增高，降低操作流速。                                                            |
| 洗脱组分中没有目的蛋白    | 蛋白可能是包涵体，没有在上清中      | 可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。                                                  |
|                | 表达量太低                | 优化表达条件。                                                                                        |
|                | 目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了 | 提高 wash Buffer 的 pH，或者降低咪唑浓度。                                                                  |
|                | 目的蛋白结合过强，不容易洗脱下来     | 降低 Elution Buffer 的 pH 值，或者增加 Elution Buffer 中咪唑浓度。                                            |
|                | 蛋白降解                 | 使用 10-100 mM EDTA 溶液剥离钴离子，同时得到目的蛋白。<br>在 4℃ 下进行纯化操作。<br>菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。                       |
| 洗脱组分不纯（含有多重蛋白） | 洗杂操作不彻底              | 增加 Wash Buffer 体积。                                                                             |
|                | 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。再使用其他的纯化手段（如离子交换，疏水等）进一步纯化洗脱组分。                                        |
| 填料颜色变浅或变成白色    | 钴离子脱落或被剥离            | 按照第 3 部分填料再生中的建议重新挂镍离子。                                                                        |
| 上样过程中蛋白发生沉淀    | 操作温度太高               | 4℃ 下进行上样。                                                                                      |
|                | 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。                                             |

#### 5. 订购信息及相关产品

| 名称                   | 货号        | 规格   |
|----------------------|-----------|------|
| Co NTA Beads 重力柱     | SA037GC01 | 1 ml |
|                      | SA037GC05 | 5 ml |
| Co NTA Beads 6FF 重力柱 | SA038GC01 | 1 ml |
|                      | SA038GC05 | 5 ml |

