

# Co NTA Beads 6FF

Cat# PX0004 10 ml /25 ml /50 ml

Store at 4-30°C

## 產品介紹

**Co NTA Beads 6FF** 可以從原核和真核表達系統中一步純化 His 標籤蛋白。該產品是以高度交聯的 6%瓊脂糖凝膠為基質，配體以四配位鍵螯合鈷。**Co NTA Beads 6FF** 相比 **Ni NTA Beads 6FF** 對 His 標籤蛋白具有更高的選擇性。具體性能見表 1。

表 1. **Co NTA Beads 6FF** 的產品性能

性能	指標
基質	高度交聯的 6%瓊脂糖凝膠
螯合離子	CO <sup>2+</sup>
載量 (/mL 基質)	>20mg 6×His-tagged protein
微球粒徑 (μm)	45–165
最大壓力	0.3 MPa, 3 bar
儲存緩衝液	含 20% 乙醇的 1XPBS
儲存溫度	4°C-30°C

**Co NTA Beads 6FF** 可以耐受一定範圍的變性劑和其他的添加劑，如表 2。

表 2. **Co NTA Beads 6FF** 試劑耐受情況

試劑種類	濃度
還原劑	10 mM β-mercaptoethanol <sup>1</sup>
變性劑	8 M urea 6 M Gua-HCl
去污劑	< 1% Triton™ X-100 NP-40 1% CHAPS ,SDS, sarcosyl
其他類	≤500 mM imidazole at pH7.0 to 8.0 for elution 30% ethanol <sup>2</sup> 20% glycerol 500 mM KCl 1.0 M NaCl 20mM MES 50 mM Tris <sup>3</sup> 50 mM HEPES 50 mM MOP

**Note: 1 Co NTA Beads 6FF** 立即用平衡液平衡，否則介質會變色。不要將介質保存在含有 β-Mercaptoethanol 的

緩衝液中。

2 過高濃度的咪唑有可能會降低蛋白回收率。

3 乙醇有可能造成蛋白沉澱，降低蛋白回收率和堵柱子。

4 Tris 與金屬離子微弱結合造成載量降低。

**避免使用下列試劑：** DTT (dithiothreitol), DTE (dithioerythritol) and TCEP (TRIS (2-carboxyethyl) phosphine). 會降低介質的蛋白載量。

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 、EGTA (ethylene Glycolbis ([β-amino-ethyl ether])) 會將鈷離子從介質上剝落。

## 純化流程

### 2.1 溶液的準備

推薦使用中性偏堿緩衝液 (pH7-8), 如磷酸鹽緩衝液。可加入 0.3-0.5M 氯化鈉減少非特異性吸附。在蛋白結合力弱的條件下避免使用 Tris-HCl。應避免使用螯合劑 EDTA 和檸檬酸鹽緩衝液。

#### 可溶性蛋白純化

平衡液: 50 mM 磷酸鹽, 300 mM NaCl, pH 7.4

洗雜液: 50 mM 磷酸鹽, 300 mM NaCl, 5-20 mM 咪唑, pH 7.4

洗脫液: 50 mM 磷酸鹽, 300 mM NaCl, 250 mM 咪唑, pH 7.4 洗雜和洗脫液中的 NaCl 和咪唑濃度可根據需要增加或減少。**包涵體純化**

可在平衡液、洗雜液和洗脫液中添加 8M 尿素或 6M 鹽酸胍促進蛋白的溶解。

### 2.2 樣品準備

#### 2.2.1 細菌或酵母表達的蛋白

- 1) 挑取單菌落到 LB 培養基中，根據載體使用說明加入相應濃度的誘導劑誘導相應的時間。
- 2) 表達結束後，將培養液轉移到離心杯中，7,000rpm(7,500×g)，離心 15min 收集菌體，然後按照菌體：平衡液=1：10 (W/V) 加入平衡液，加入終濃度為 1mM 的 PMSF。加入溶菌酶（工作濃度為 0.2-0.4mg/ml，如果表達的宿主細胞內含 pLysS 或 pLysE，可以不加溶菌酶），（同時也可加入其他蛋白酶抑制劑，但不能影響目的蛋白與樹脂的結合）。
- 3) 將菌體沉澱懸浮起來，（如果菌液濃度高，也可考慮加入 10μg/ml RNase A 和 5μg/ml DNase I），混勻，放置於冰上，然後冰上超聲破碎細胞，至菌液基本保持澄清。
- 4) 將澄清的破碎液轉移至離心管中，10,000rpm(15,000×g)，4 度離心 20-30 分鐘。取上

清，置於冰上備用或-20 度保存。

#### 2.2.2 酵母、昆蟲和哺乳細胞分泌表達可溶性蛋白

- 1) 將細胞培養液轉移至離心杯，5000rpm(3,800×g)，離心 10min，收集菌體得上清，如上清中不含 EDTA、組氨酸和還原劑等物質，即可直接加入柱子使用；如含有 EDTA、組氨酸和還原劑等物質，需用平衡液 4℃ 下透析才能加入柱子。
- 2) 對於大量體積的上清，需加入硫酸銨沉澱濃縮後，蛋白還需用平衡液 4℃ 透析後才能加入柱子。

#### 2.2.3 包涵體蛋白純化(變性條件)

- 1) 將培養液轉移至離心杯中，7,000rpm(7,500×g)，離心 15min 收集菌體，去掉上清。
- 2) 按照菌體：平衡液（不含 8M 尿素或 6M 鹽酸胍）=1：10(W/V)將菌體懸浮起來混勻，冰浴超聲破碎。
- 3) 將破碎液轉移至離心管中，10,000rpm(15,000×g)，4 度離心 20-30 分鐘。去掉上清，步驟 2) 和 3) 可

以重複一次。

- 4) 按照包涵體：平衡液(含 8M 尿素)=1：10(W/V)將包涵體懸浮起來。
- 5) 變性條件下進行 His 標籤蛋白純化。

### 2.3 Co NTA Beads 6FF 的裝填

Co NTA Beads 6FF 被廣泛應用於工業純化，因此，涉及到各種中壓色譜層析柱的填裝，下面介紹使用 Co NTA Beads 6FF 填裝層析柱的方法。

#### 層析柱的裝填（使用儲液器裝填）

- 1) 用去離子水沖洗層析柱底篩板與接頭，確保柱底篩板上無氣泡，關閉柱底出口，並在柱底部留出 1-2cm 的去離子水。
- 2) 將樹脂懸浮起來，小心的將漿液連續地倒入層析柱中。用玻璃棒沿著柱壁倒入漿液可減少氣泡的產生。
- 3) 如果使用儲液器，應立即在層析柱和儲液器中加滿水，將進樣分配器放置於漿液表面，連接至泵上，避免在分配器或進樣管中產生氣泡。
- 4) 打開層析柱底部出口，開啟泵，使其在設定的流速下進行。最初應讓緩衝液緩慢流過層析柱，然後緩慢增加至最終流速，這樣可避免液壓對所形成柱床的衝擊，也可以避免柱床形成的不均勻。如果達不到推薦的壓力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，這樣也可以得到一個很好的裝填效果。（注意：在隨後的色譜程式中，不要超過最大裝柱流速的 75%）當柱床高度穩定後，在最後的裝柱流速下至少再上 3 倍柱床體積的去離子水。標上柱床高度。
- 5) 關閉泵，關閉層析柱出口。
- 6) 如果使用儲液器，去除儲液器，將分配器置於層析柱中。
- 7) 將分配器推向柱子至標記的柱床高度處。允許裝柱液進入分配器，鎖緊分配器接頭。
- 8) 將裝填好的層析柱連接至泵或色譜系統中，開始平衡。如果需要可以重新調整分配器。

### 2.4 樣品純化

Co NTA Beads 6FF 裝填好後，可以用各種常規的中壓色譜系統純化。

- 1) 將泵管道中注滿去離子水。去掉上塞子，將層析柱連接至色譜系統中，打開下出口，將預裝柱接到色譜系統中，並旋緊。
- 2) 用 3-5 倍柱體積的去離子水沖洗出儲存緩衝液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床體積的平衡液平衡色譜柱。
- 4) 利用泵或樣品環上樣。注：樣品的粘度增加使得即使上樣體積很少，也會導致層析柱很大的反壓。上樣量不要超過柱子的結合能力。大量的樣品體積也可能造成很大的反壓，使得進樣器更難使用。
- 5) 用洗雜液沖洗柱子，直到紫外吸收達到一個穩定的基線（一般至少 10-15 個柱體積）。

注：在樣品和平衡緩衝液中加入咪唑可以提高樣品純度。

- 6) 用洗脫液採用一步法或線性梯度洗脫。一步洗脫中，通常 5 倍柱體積洗脫液就足夠了。梯度洗脫可以用一個小的梯度，例如 20 倍柱體積或更多，來分離不同結合強度的蛋白質。

### 2.5 純度檢測

將使用純化產品得到的樣品（包括流出組分、洗雜組分和洗脫組分）以及原始樣品使用 SDS-PAGE 檢測純化效果。

## 填料再生

組氨酸標籤蛋白親和純化填料所帶的鈷離子不需要經常去除和重新掛鈷離子。當填料使用過程中發現反壓過

高，填料上面出現明顯的污染，或者填料載量明顯變低時，需要進行對填料 進行鈷離子剝離和重新掛鈷離子，也就是填料再生。將填料裝填在合適的層析柱內，按照下 面操作流程進行。

- 1) 使用 5 倍柱體積去離子水清洗填料；
- 2) 使用 5 倍柱體積 100 mM EDTA (pH 8.0)剝落鈷離子；
- 3) 使用 10 倍柱體積去離子水清洗填料；
- 4) 使用 0.5M NaOH 清洗 5 倍柱體積，停留 10-15min；
- 5) 使用 10 倍柱體積去離子水清洗填料；
- 6) 使用 3-5 倍柱體積 100 mM CoCl<sub>2</sub> 再生掛鈷；
- 7) 使用 10 倍柱體積去離子水清洗；

填料再生後，可以立即使用，如不立即使用，需要將填料懸浮於等體積的 20%乙醇中，置於 4-30°C 保存。

## 問題及解決方案

問題	原因分析	推薦解決方案
柱子反壓過高	填料被堵塞	裂解液中含有微小的固體顆粒，建議上柱前使用濾膜（0.22或0.45μm）過濾，或者離心去除。樣品中含有高濃度的核酸，加長破碎時間直至粘度降低，或者添加 DNase I（終濃度 5 μg/ml）Mg <sup>2+</sup> （終濃度 1 mM）冰上孵育 10-15 分鐘。
	樣品太粘稠	有機溶劑或者蛋白穩定試劑（如甘油等）可能會引起反壓增高，降低操作流速。
洗脫組分中沒有目的蛋白	蛋白可能是包涵體，沒有在上清中	可以通過電泳檢測裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵體蛋白需要按照包涵體蛋白的純化方式。
	表達量太低	優化表達條件。
	目的蛋白結合比較弱，在洗雜步驟被洗下來了	提高洗雜液的pH，或者降低咪唑濃度。
	目的蛋白結合過強，不容易洗脫下來	降低洗脫液的pH值，或者增加洗脫液中咪唑濃度。 使用10-100mM EDTA溶液剝離鈷離子，同時得到目的蛋白。
	蛋白降解	菌體破碎時添加一些蛋白酶抑制劑。在4°C下進行純化操作。
洗脫組分不純（含有多種蛋白）	洗雜不徹底	增加洗雜液體積。
	樣品中含有其他的組氨酸標籤蛋白	通過調節pH值，或者咪唑濃度來優化洗雜條件。再使用其他的純化手段（如離子交換，疏水等）進一步純化洗脫組分。
填料顏色變淺	Co離子被剝落	參考part3重新螯合鈷離子。

上樣過程中蛋白發生沉澱	操作溫度太低	室溫下進行上樣。
	蛋白發生聚集	在樣品和所有的緩衝液中添加穩定劑，如0.1%的 Triton X-100 或者 Tween-20。