

Co NTA Beads

目录

1. 产品介绍	1
2. 纯化流程	2
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	5

1. 产品介绍

Co NTA Beads 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 4% 琼脂糖凝胶为基质，配体以四配位键螯合钴。**Co NTA Beads** 相比 **Ni NTA Beads** 对 His 标签蛋白具有更高的选择性。具体性能见表 1。

表 1. **Co NTA Beads** 的产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖凝胶
螯合离子	Co ²⁺
载量 (/mL 基质)	>20mg 6×His-tagged protein
微球粒径 (μm)	45–165
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1XPBS
储存温度	4°C–30°C

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

表 2. **Co NTA Beads** 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	10 mM β-mercaptoethanol ¹
变性剂	8 M urea 6 M Gua-HCl
去污剂	< 1% Triton™ X-100 1% NP-40 1% CHAPS ,SDS, sarcosyl
其他类	≤500 mM imidazole at pH7.0 to 8.0 for elution 30% ethanol ² 20% glycerol 500 mM KCl

	1.0 M NaCl 20mM MES 50 mM Tris ³ 50 mM HEPES 50 mM MOPS
--	--

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。

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

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。

2.2 样品准备

2.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到 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。

2.2.2 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，5000rpm(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。

2.2.3 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(不含尿素或盐酸胍)=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。

2.3 样品纯化

Co NTA Beads 耐压性较 Co NTA Beads 6FF 差，适用于重力或少量纯化，大规模纯化建议选择 Co NTA Beads 6FF。

- 1) 将 Co NTA Beads 装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的平衡液进行平衡，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。
- 2) 将样品加到平衡好的 Co NTA Beads 中，保证目的蛋白与填料充分接触，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。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，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，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
- 5) 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。将填料保存在等体积的 20%乙醇中，置于 4-30℃ 保存，防止填料被细菌污染。

2.5 纯度检测

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 4-30°C 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0.45μm）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 μg/ml），Mg ²⁺ （终浓度 1 mM），冰上孵育 10-15 分钟。
	样品太粘稠	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	提高洗杂液的pH，或者降低咪唑浓度。
	目的蛋白结合过强，不容易洗脱下来	降低洗脱液的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。
	蛋白降解	菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。在4°C下进行纯化操作。
洗脱组分不纯（含有多种蛋白）	洗杂不彻底	增加洗杂液体积。
	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	Co离子被剥落	参考part3重新螯合钴离子。
上样过程中蛋白发生沉淀	操作温度太低	室温下进行上样。
	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	SA037010	10mL
	SA037050	50mL
	SA037100	100mL
	SA037C	1L
Co NTA Beads 6FF	SA038010	10mL
	SA038025	25mL
	SA038050	50mL
	SA038100	100mL
	SA038C	1L
HisCap Co 6FF	SA038C11	1X1mL
	SA038C51	5x1mL
	SA038C15	1X5mL
	SA038C55	5X5mL
	SA038CS	3X1mL+1X5mL