



# Co Smart Beads 6FF

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 在位清洗.....	4
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 Smart Beads 6FF** 是一种新型 IMAC 填料，螯合有非常牢固的 Co 离子，具体性能见表 1。Co<sup>2+</sup>离子半径大于 Ni<sup>2+</sup>，因此 Co<sup>2+</sup>结合 His 标签能力小于 Ni<sup>2+</sup>。**Co Smart Beads 6FF** 主要应用于分泌到真核培养液上清中的组氨酸标记蛋白的捕获和纯化，可以在含有 EDTA 及 DTT 的情况下进行目的蛋白高效的纯化。该介质同样能够应用于各种表达系统胞内表达蛋白的纯化，而且其选择性更高，纯化获得的目的蛋白纯度更好。**Co Smart Beads 6FF** 有很强的组分兼容性，适用于广泛底物及盐浓度的缓冲条件，试剂耐受情况见表 2。

表 1. Co Smart Beads 6FF 产品信息

项目	性能
基质	高度交联的 6%琼脂糖微球
载量	> 10 mg 6XHis-tagged protein/mL 基质
微球粒径	45–165 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1XPBS
储存温度	2-8℃

表 2. Co Smart Beads 6FF 试剂耐受情况

试剂种类	耐受时间
0.01 M HCl, 0.01 M NaOH	1 week
10 mM EDTA, 1 M NaOH, 5 mM DTT, 5 mM TCEP, 20 mM β-mercaptoethanol,	24 hours
6M Gu-HCl	2 hours
500 mM imidazole, 100 mM EDTA	20 min
30% isopropanol	

## 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。推荐使用中性偏碱缓冲液 (pH7-8), 如磷酸盐缓冲液。可加入 0.3-0.5 M 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。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 Smart 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 和表 4。

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	1 L	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)
		500 mM NaCl (29.22 g NaCl)
		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	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)
		500 mM NaCl (29.22 g NaCl)
		5 mM imidazole (0.34 g imidazole)
Elution Buffer	1 L	使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。
		20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)
		500 mM NaCl (29.22 g NaCl)
		250 mM imidazole (17.0 g imidazole)
		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，咪唑洗脱方式

名称	体积	配方
Lysis Buffer	1 L	8 M Urea (480.50 g urea) 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) 500 mM NaCl (29.22 g NaCl) 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 ) 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) 500 mM NaCl (29.22 g NaCl) 5 mM imidazole (0.34 g imidazole) 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) 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) 500 mM NaCl (29.22 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 或者 0.45 μm 滤膜过滤。

**注：**为了减少宿主细胞蛋白的结合，建议在 Wash Buffer 中加入低浓度的咪唑。

为了消除一些离子作用蛋白的吸附，可以在溶液中加入 0.5 M-1.0 M NaCl。

低 pH 洗脱会增加洗脱体积，请按需求进行选择。

## 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 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、昆虫和哺乳细胞等真核细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯，7,000 rpm (7,500×g)，离心 15 min 取上清。
- 2) 样品中含有可耐受范围内试剂，不需要透析或浓缩，可以直接上样。

**注：**所有样品在过柱前，可以用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤，防止柱子堵塞。

### 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，7,000 rpm(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，10,000 rpm(15,00×g)，4℃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。

## 2.3 Co Smart Beads 6FF 装填

### 2.3.1 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 Co Smart Beads 4FF 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中，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。

### 2.3.2 中压层析柱的装填

Co Smart 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装填，下面介绍中压层析柱的装填方法。

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：

$$V \square 1.15 \square r^2 h$$

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) 将介质悬浮起来，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。

## 2.4 样品纯化

### 2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 **Co Smart 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 Lysis Buffer 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 Lysis Buffer；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 Wash Buffer 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。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的 Elution Buffer 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。

### 2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 装填好的 **Co Smart Beads 6FF** 重力柱用 5 倍柱体积 Lysis Buffer 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 Wash Buffer 进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。必要时可以调整咪唑的浓度进行洗杂。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer 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。

### 2.4.3 中压层析柱法纯化

**Co Smart 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 Lysis Buffer 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 Wash Buffer 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：在样品和结合缓冲液中加入咪唑可以提高样品纯度。
- 6) 用 Elution Buffer 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。

上述步骤介质洗脱结束后，先用 Lysis Buffer 冲洗 3 倍柱体积，然后用纯水冲洗 5 倍柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，然后将介质置于 2-8℃保存。

## 2.5 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。



### 3. 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

方案一：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。

方案二：使用含有 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 h。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。

方案三：使用 0.1 M 或 0.5 M NaOH 溶液冲洗填料 3 个柱体积，然后用 10-15 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。

清洗好的柱子可再用 20% 乙醇冲洗 2 个柱体积，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	按照第 3 部分对填料进行在位清洗。 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	样品中无 His 标签蛋白	采用 Western Blotting 等确定样品中是否含有目的蛋白。
	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	降低洗脱液的 pH 值，或者增加洗脱液中咪唑浓度。
	蛋白降解	在 4℃ 下进行纯化操作。 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
洗脱组分不纯（含有多种蛋白）	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。
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	SA037005	5 ml
	SA037025	25 ml
	SA037100	100 ml
	SA037500	500 ml
	SA03701L	1 L
	SA03710L	10 L
Co NTA Beads 6FF	SA038005	5 ml
	SA038025	25 ml
	SA038100	100 ml
	SA038500	500 ml
	SA03801L	1 L
	SA03810L	10 L
HisCap Co 6FF	SA038C11	1×1 ml
	SA038C51	5×1 ml
	SA038C15	1×5 ml
	SA038C55	5×5 ml
	SA038CS	3×1 ml+1×5 ml



名称	货号	规格
Co Smart Beads 6FF	SA062005	5 ml
	SA062025	25 ml
	SA062100	100 ml
	SA062500	500 ml
	SA06201L	1 L
	SA06210L	10 L