

## 钴琼脂糖凝胶 FF

**品名:** 钴琼脂糖凝胶 FF(Cobalt SePharose Fast Flow, Co SePharose FF)

**目录号:** BN26333 (中压预装柱)、BN26334 (重力预装柱)

**贮存:** 20%乙醇, 2-25°C

**运输:** 2-30°C, 常压、避光

**保质期:** 5年

### 相关介绍:

钴琼脂糖凝胶 FF 以琼脂糖微球为基质, 通过偶联亚氨基二乙酸 (IDA), 使其具有螯合  $\text{Co}^{2+}$  的能力。IDA 是金属螯合层析中最常用的配体, 比次氨基三乙酸 (NTA) 具有更高的亲和力、更高的载量, 并且保留了可再生重复使用的特点。

钴琼脂糖凝胶 FF 主要用于纯化带组氨酸标签 (His-Tag) 的重组蛋白。纯化原理是利用重组蛋白组氨酸标签的咪唑环可与过渡金属  $\text{Co}^{2+}$  形成稳定的配位键, 因此能特异、牢固、可逆地吸附于偶联这些金属离子的基质, 结合在钴琼脂糖凝胶 FF 上的 His-Tag 重组蛋白一般可以通过增加咪唑浓度进行竞争洗脱。

### 技术指标:

基质	6%琼脂糖凝胶
配基	-N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub>
配基密度	≥25 μmol/ml
填料粒径	60~180 μm
最大流速	800 cm/h
推荐流速	50-100 cm/h
pH 稳定性	pH 5-12, pH 3~14 (脱钴)
耐反压	0.3 MPa
载量	≥40 mg His-tag 重组蛋白/ml

### 使用方法:

#### 1、色谱柱装填

- (1) 所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样, 液体最好做脱气处理。
- (2) 在柱子下端加入蒸馏水, 以除去柱子中的空气, 关闭柱子出口, 在柱内保留少量的蒸馏水。
- (3) 将琼脂糖凝胶连续倒入柱子时, 要用玻璃棒的紧靠柱子内壁引流, 以减少气泡的产生, 让填料先自然沉降。
- (4) 柱压不超过 0.3MPa, 如果装柱系统中无法测柱压, 则控制流速高于 300cm/h, 但是在使用中一般不超过最大流速的 75%。

本产品仅用于科研

(5) 填充好的钴琼脂糖凝胶 FF 柱用 2-5 个柱体积的初始缓冲溶液平衡，建议流速 100cm/h，平衡后的柱子可以用于 His-Tag 重组蛋白的上样和洗脱纯化。

## 2、上样

(1) 样品一般溶解在 pH6-9 的初始缓冲液中，提高上样缓冲液的 pH 值，可以增大载量。

(2) 缓冲液中不能含有 EDTA 和柠檬酸盐，也最好不含巯基乙醇、DTT 等还原剂。

(3) 常用缓冲液有 10-00mM 磷酸钠缓冲液、20-200mM Tris-HCl 缓冲液等。

(4) 在缓冲液中一般要加入 0.15-0.5M 的 NaCl，以消除离子交换作用。

(5) 在初次使用钴琼脂糖凝胶 FF，推荐使用 50mM PBS (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, NaOH 调节 pH 7.4) 作为初始缓冲液。

## 3、洗脱

(1) 钴琼脂糖凝胶 FF 最常用的洗脱方法为增加咪唑浓度进行洗脱。

(2) 咪唑为碱性，相应缓冲液配制后需要用 HCl 进行调节 pH。

(3) 在初次使用钴琼脂糖凝胶 FF，不知道洗脱的咪唑浓度，推荐在初始缓冲液中分别加入 10mM、20mM、50mM、100mM、200mM、500mM 咪唑，浓度从低到高，分别洗脱和收集，通过 SDS-PAGE 电泳等方法鉴定。

(4) 有条件的也可以进行线性咪唑梯度洗脱，确定较佳洗脱条件。

## 拓展应用：

### 1、更换不同的螯合离子

(1) IDA 螯合的钴琼脂糖凝胶 FF 可以用 EDTA 脱掉钴，脱掉钴后可以用 0.1-1.0M NaOH 进行清洗凝胶，再重新螯合钴，使凝胶焕然一新。也可以螯合其他金属离子，如 Ni<sup>2+</sup>，Cu<sup>2+</sup>，Zn<sup>2+</sup>，Fe<sup>3+</sup>等，进行多样纯化。

(2) 脱钴方法：用 5-10 个柱体积蒸馏水淋洗柱子，再用 5-10 个柱体积的 100 mM EDTA 淋洗柱子，再用 2-3 个柱体积的 0.5M NaCl 洗掉残留的 EDTA。

(3) 螯合金属离子方法：用 2-5 个柱体积的蒸馏水充分平衡脱钴的柱子，用 0.1-0.3M 金属盐溶液过柱 5-10 个柱体积螯合金属，螯合后用 5-10 个柱体积蒸馏水淋洗，去除未螯合的金属离子。

(4) 金属盐可以为硫酸盐或盐酸盐，如为 NiSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、PbSO<sub>4</sub> 等，金属盐溶液应中性或弱酸性，且必须经过过滤，以防止金属盐在胶上沉淀。

(5) 如果是 Fe<sup>3+</sup> 必须在低 pH 下螯合 (pH 3)，以防止 Fe<sup>3+</sup> 产生沉淀，一般可以加入少量盐酸和硫酸保持 pH。

### 2、多种洗脱方法

(1) 降低 pH 洗脱：大多数蛋白在 pH6-4 会被洗脱下来，也可以在 pH 3-4，缓冲液可以是醋酸钠、柠檬酸、磷酸盐缓冲体系。

(2) 竞争性洗脱：线性增加或一步增加与金属离子有亲和力的物质，如 0-0.5M 咪唑，0-50 mM 组氨酸，0-2M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 。梯度洗脱最好在起始缓冲液的恒定 pH 下进行。

(3) 螯合剂洗脱：EDTA、EGTA 等螯合剂会与金属离子产生作用力，导致蛋白被洗脱下来。这种方法不能使不同的蛋白分离，此外会影响蛋白吸附，导致融合蛋白不能挂柱。

(4) 所有上述情况中，缓冲液中必须加入 0.15-0.5M 的 NaCl 以消除离子交换作用。

(5) 当螯合离子配基是  $\text{Cu}^{2+}$  时，有以下的三种操作方式

降低 pH 洗脱：

上样缓冲液：50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，0.5M NaCl，pH 7.4

洗脱缓冲液：50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，0.5M NaCl，pH 3.5

竞争性洗脱：

上样缓冲液：50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，1M NaCl，pH 7.4

洗脱缓冲液：50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，pH 7.4

螯合剂洗脱：

上样缓冲液：50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，0.5M NaCl，pH 7.4

洗脱缓冲液：50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，0.5M NaCl，50 mM EDTA，pH 7.4

注：配制的缓冲液需要用 NaOH 或 HCl 调节至要求的 pH。使用降低 pH 和螯合剂洗脱会使金属离子脱落，下次使用得重新螯和金属离子，最常用的为竞争性洗脱。

## 再生、清洗：

### 1、凝胶的再生

(1) 多次使用后或需要更换螯合的金属离子，必须将胶脱钴再生。脱钴方法：用 5-10 个柱体积蒸馏水淋洗柱子，再用 5-10 个柱体积的 100 mM EDTA 淋洗柱子，再用 2-3 个柱体积的 0.5M NaCl 洗掉残留的 EDTA。

(2) 多次使用的柱子脱钴后一般需要清洗。清洗方法：用 0.1-1.0M NaOH 反向清洗柱子，流速 50cm/h，保持 1-2h，能去除结合强的杂质，同时也能去除热源。

(3) 清洗后需要重新螯合金属离子。螯合方法：用 2-5 个柱体积的蒸馏水充分平衡脱钴的柱子，用 0.1-0.3M 金属盐溶液过柱 5-10 个柱体积螯合金属，螯合后用 5-10 个柱体积蒸馏水淋洗，去除未螯合的金属离子。

### 2、在位清洗

(1) 除去因离子交换作用吸附的蛋白，用 2-3 个柱体积 2M 的 NaCl 溶液反向清洗柱子。

(2) 除去强的疏水性蛋白和脂质等，用 4 个柱体积的 70% 的乙醇或者 30% 的异丙醇反向清洗柱子。

(3) 除去蛋白沉淀、疏水性蛋白，参照凝胶的再生。