

당사에서는 다양한 His-Tag 융합 단백질의 발현 및 정제에 적합한 시약을 갖추고 있다. 그 중에서도 Clontech사의 TALON™ resin은 고성능 His-Tag 융합 단백질 정제용 resin으로 높은 평을 받았으며, pCold™ Vector나 pET Vector 등을 이용하여 발현한 His-Tag 융합 단백질을 효율적으로 정제할 수 있다. 여기서는 Clontech사의 TALON™ resin에 관한 질문과 답변을 중심으로 소개하고자 한다.

Q1 : TALON™ resin은 코발트(Co) 이온을 이용하는데, 니켈(Ni) 이온을 이용한 resin과의 차이점은?

IMAC(immobilized metal affinity chromatography)에 자주 이용되는 Ni²⁺ 이온에 비해 Co²⁺ 이온을 이용하는 TALON™ resin은 His-Tag 융합 단백질에 대해 높은 특이성, 친화성을 보이기 때문에 비특이적 흡착에 의한 다른 단백질의 혼입이 억제되어 고순도로 His-Tag 융합 단백질을 정제할 수 있다. 이는 TALON™ resin은 3차원 pocket형 입체 구조를 가지며 metal chelate site 4개를 포함하고 있어 보다 안정적으로 금속(Co²⁺) 이온과 결합하여 resin column에서 Co²⁺ 이온의 탈락이 거의 없기 때문이다. 한편 Ni²⁺ 이온을 이용한 resin은 2차원(평면)의 입체 구조를 가지므로 Ni²⁺ 이온의 탈락이 일어난다. 또한 TALON™ resin은 Ni²⁺ 이온 resin과 같이 6 M guanidine이 존재하는 변성 조건에서도 사용할 수 있다.

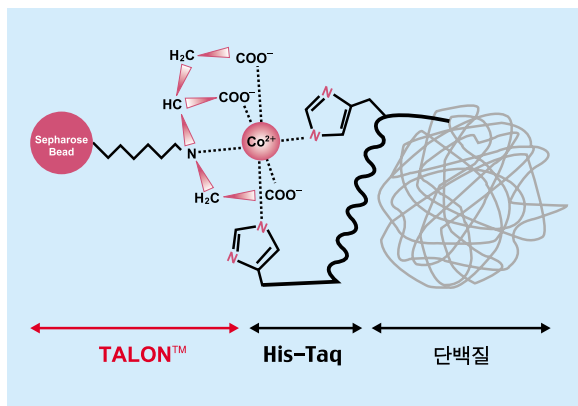


그림 1 TALON™ resin과 His-Tag 융합 단백질

Q2 : TALON™ resin을 이용한 His-Tag 융합 단백질의 정제방법은?

재조합 단백질의 N-말단이나 C-말단에 있는 연속된 histidine과 resin에 결합된 Co²⁺ 이온을 결합시켜 불필요한 세포 추출물을 씻어낸다. 그런 다음 column을 통과하는 elution buffer의 pH를 내리거나 imidazole의 농도를 올림으로써 His-Tag 융합 단백질을 Co²⁺ resin에서 유리시켜 정제한다(TALON™ resin은 Ni-NTA column보다 조금 낮은 pH와 imidazole 농도에서도 추출이 가능하다). EDTA 등의 chelate제를 첨가하여 용출시킬 수도 있지만 추출물에 Co²⁺ 이온이 혼합될 뿐 아니라 재조합 단백질이 응집될 가능성이 높다. 또 이 경우에는 TALON™ resin을 재사용할 수 없다.

Q3 : Imidazole과 pH 추출 중에 어떤 방법으로 재조합 단백질을 정제하는 것이 좋은가?

Imidazole은 histidine과 화학 구조가 비슷하기 때문에 양자는 대항적으로 TALON™ resin에 결합된다. 추출시 imidazole을 column으로 보냄으로써 His-Tag 융합 단백질이 TALON™ column에서 분리되어 정제되기 때문에 온화한 조건에서 사용하는 경우에는 imidazole 추출을 권장한다. 또 용출 전의 세정 과정에서 세정 buffer에 imidazole을 저농도로 첨가함으로써 비특이적 흡착을 억제할 정제를 할 수 있다. 재조합 단백질이 낮은 pH에서도 안정된 경우나 재조합 단백질의 양이 적은 경우에는 pH를 낮추어 정제할 것을 권장한다.

Q4 얼마나 많은 양의 정제가 가능한가?

TALON™ resin은 5~10 mg/ml 정도의 His-Tag 융합 단백질을 정제할 수 있다. 단백질의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 Ni-NTA column과 같거나 그 이상을 회수할 수 있다.

Q5 재조합 대장균에서 단백질 추출법은?

TALON™ xTractor Buffer Kit(TaKaRa Code 635623)를 권장한다. 이 추출 buffer kit은 TALON™ resin의 정제에 가장 적합하다. 본 buffer로 추출을 할 때 추출액의 점성을 떨어뜨리기 위해 DNase I으로 처리하지만 DNase I 대신 Cryonase™ Cold-active Nuclease(TaKaRa Code 2670A)를 이용하면 저온에서 처리가 가능하다.

Q6 대장균의 배양액을 직접 resin에 가능한가?

TALON™ CellThru resin(TaKaRa Code 635509)을 이용하면 대장균 추출액(초음파 파쇄액)을 직접 resin에 첨가하여 정제할 수 있다. 본 resin은 bead size가 크고(300~500 μm), cell debris가 column에서 유출되기 때문에 원심분리로 균을 분리할 필요는 없다. Resin을 충전한 column인 TALON™ Single Step Columns(TaKaRa Code 635631 등)을 사용하여 대장균 배양액에서 단번에 His-Tag 융합 단백을 정제할 수 있다.

Q7 TALON™ resin은 몇 회 정도 사용가능한가?

3~4회 가장 사용할 수 있다. 재사용 횟수가 많은 경우나 lysate에서 EDTA나 EGTA가 반입된 경우 Co^{2+} 이온이 탈락하여 resin이 핑크색에서 흰색으로 변색된다(이 상태에서는 재사용 불가). 이런 경우에 50 mM $CoCl_2$ 용액을 column에 첨가하여 TALON™ column을 재생할 수 있다.

Q8 : TALON™ resin은 His-Tag 융합 단백질 이외의 단백질도 정제가능한가?

His-Tag 외에도 HAT Tag, 6×HN Tag, 그 밖에 histidine 잔기가 입체 배치로 연속된 아미노산 서열을 가진 융합 단백질을 정제할 수 있다.

6×His 서열은 Tag로서는 작고, 재조합 단백질 전체의 구조에 영향을 미칠 가능성이 낮지만 재조합 단백질이 불용성이 되는 경우가 있다. HAT 서열(Histidine Affinity Tag)은 인공적인 6×His-Tag와 달리 천연 단백질 유래로 19 아미노산으로 이루어진 histidine 잔기가 입체적으로 인접한 서열로 총 전하가 억제되어 6×His-Tag에 비해 높은 용해성을 보인다. 또 6×HN Tag는 입체 구조상 금속 chelate resin으로 유지되기 쉬울 뿐 아니라 분자량이 큰 재조합 단백질이나 발현량이 적은 재조합 단백질을 보다 효율적으로 정제할 수 있다. Clontech 사에서는 HAT-Tag, 6×HN Tag를 미리 vector에 주입한 발현 벡터 시스템을 갖추고 있어서 Tag 서열을 이용한 효율적인 정제가 가능하다. 또 이들 3종류의 Tag 서열이 융합된 재조합 단백질을 독특한 방법으로 검출할 수 있는 Universal HIS Western Blot Kit(TaKaRa Code 635633)도 갖추고 있다.

Q8 : High-throughput(HTP) His-Tag 융합 단백질 정제에 적합한 제품은?

TALON™ HT 96-Well Purification Plate(TaKaRa Code 635622)는 96-well plate의 각 well에 미리 resin이 충전되어 있고, 96종류의 서로 다른 샘플에서 샘플 하나 당 1 mg의 His-Tag 융합 단백질을 30분 이내에 정제할 수 있다.

또, TALON™ Magnetic Beads는 magnetic bead를 이용해 신속하게 정제하기 때문에 다검체 처리에 적합하다. 정제 샘플은 소용량(50~200 μl)으로 용출되고 최고 3 mg/ml까지 농축 샘플을 만들 수 있다.

Q8 : Q10 대장균 숙주는 어떤 것이 적합한가?

BL21이 가장 일반적인 발현용 숙주이다.

TaKaRa technical support

문의 사항이 있으시면 당사 (031-739-3320)으로 연락주시기 바랍니다.