

TALON® Resin

His-Tag 융합 단백질 정제의 비장의 카드

His-Tag 등 histidine tag를 가지는 재조합 단백질은 immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resin과의 친화성을 이용해 고순도로 정제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 현재, affinity chromatography에 광범위하게 이용되고 있는 nickel base의 resin으로 정제했을 때 순도나 회수량이 떨어질 경우, cobalt base의 IMAC 정제용 고성능 resin인 TALON resin으로 해결했다. 본 고에서는 Clontech 독자적인 기술로 만들어진 TALON resin을 이용하여 어떻게 고순도로 대량 정제를 하는지에 대해서 소개한다.

■ Point는 cobalt base!

Nickel base의 resin보다 고순도로 정제 가능

TALON resin 반응의 중심에는 cobalt가 존재하여 3차원 공간적으로 적절히 배치된 histidine만이 cobalt와 결합하기 때문에, histidine tag에 대해 높은 선택성, 친화성을 나타낸다(그림 1).

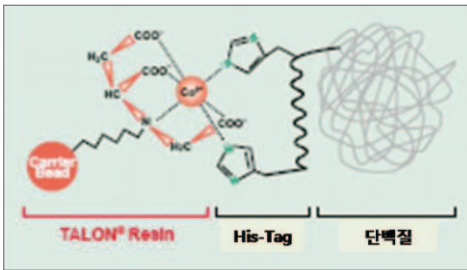


그림 1. TALON resin과 His tag 단백질의 결합 모식도

한편, nickel base의 Ni-NTA resin에서는 이러한 공간적 요구성이 그다지 엄격하지 않아 종종 host 유래의 유사 단백질까지 결합하는 경우가 있다. Cobalt의 선택성이 높기 때문에 TALON resin에서는 변성조건, 비변성 조건에 관계없이 histidine tag를 갖고 있지 않는 단백질의 비특이적인 흡착은 관찰되지 않고, 고순도의 정제를 기대할 수 있다(그림 2).

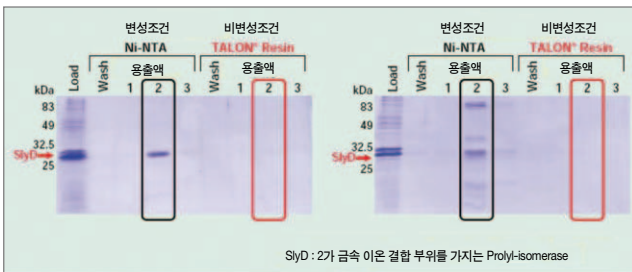


그림 2. BL21(DE3) pLysS 주 유래 SlyD 단백질(27 kDa)의 비특이적 흡착의 비교
Ni-NTA Resin에서는, SlyD는 비특이적으로 흡착되어 불필요한 단백질의 혼입의 원인이 된다. TALON Resin에서는, 변성조건, 비변성 조건에 관계없이 비특이적인 흡착은 볼 수 없다. 불필요한 단백질이 혼입되지 않으므로 고순도의 정제를 할 수 있다.

■ 금속 이온의 탈락이 적고, 회수량이 감소하는 것을 최소한으로 억제

금속 이온의 탈락은 금속 이온이 His-Tag 융합 단백질마다 chelator로부터 누출되어, 회수량이 감소하는 원인이 된다. 여기서, TALON resin은 특별히 4차원 ligand를 채용하여 모든 반응 부위가 3차원 pocket을 형성하는 것과 같이 설계되어 있다.

이 pocket 속에 cobalt는 3개의 carboxyl 기와 1개의 질소 원자와 강하게 결합하여 resin으로부터의 cobalt 누출을 최소량으로 억제하였다. Nickel base의 Ni-NTA resin에서는 3차원 구조와 평면 구조의 두가지 방법의 배위 구조를 형성할 수 있기 때문에 resin의 구조가 균일하지 않다. 이러한 비대칭적인 평면구조에서는 nickel과의 결합이 그만큼 강하지 않기 때문에, nickel이 누출되어 회수량이 감소한다. 그림 3에서 볼 수 있듯이 TALON resin은 Ni-NTA resin에 비해 변성 조건하에서 높은 회수량과 높은 순도를 나타낸다.

이와 같이, TALON resin은 강력하기 때문에 까다로운 변성 조건하에서도 뛰어난 내구성을 유지하며, 또한, β-mercaptoethanol에 대한 감수성도 낮아(30 mM 까지 허용) 여러 차례의 사용도 가능하다.

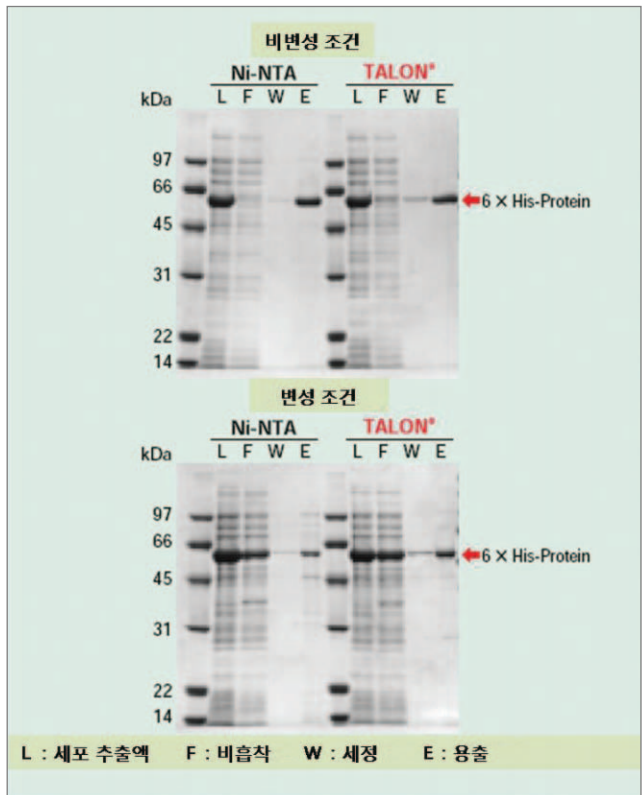


그림 3. 비변성 및 변성 조건하에서의 비교
비변성 조건 및 변성 조건하에서, Ni-NTA resin과 TALON resin을 이용하여 대장균 파쇄액으로부터 6 x His-protein을 정제했다. 정제는 각각의 표준 protocol로 하였으며, Coomassie brilliant blue(CBB) 염색으로 해석했다.

■ His Tag 뿐만 아니라, HN Tag, HAT Tag과도 특이적으로 결합

Histidine Tag은 단백질의 구조, 기능에 미치는 영향은 적으나, 응집하기 쉬운 것으로 알려져 있다.

HN Tag은 His(histidine)와 Asn(asparagine)이 연속되는 구조를 가지며, 기존의 His만 연속된 His Tag보다도 입체 구조적으로 단백질의 표면에 histidine이 노출되기 쉽고, IMAC에 결합하기 쉬워진다. 그러므로 분자량이 큰 단백질이나 발현량이 적은 재조합 단백질을 보다 좋은 효율로 정제할 수 있다.

HAT(Histidine Affinity Tag)는 천연의 단백질(Chicken lactate dehydrogenase) 유래의 서열로, 치우친 전하를 억제하여 His Tag보다 높은 용해성을 나타낸다. 한방향으로의 histidine의 입체적인 연속 배열은 IMAC과 강한 친화성을 가지게 된다. TALON resin은 His Tag, HN Tag, HAT Tag에서도 용합 단백질을 높은 효율로 정제 가능한 것을 확인했다(그림 4). 게다가 HN 이나 HAT에서는 단백질의 용출을 중성 pH 또는 낮은 imidazole 농도와 생리적인 조건에 가까운 온화한 조건으로 정제할 수 있는 것도 하나의 장점이다.

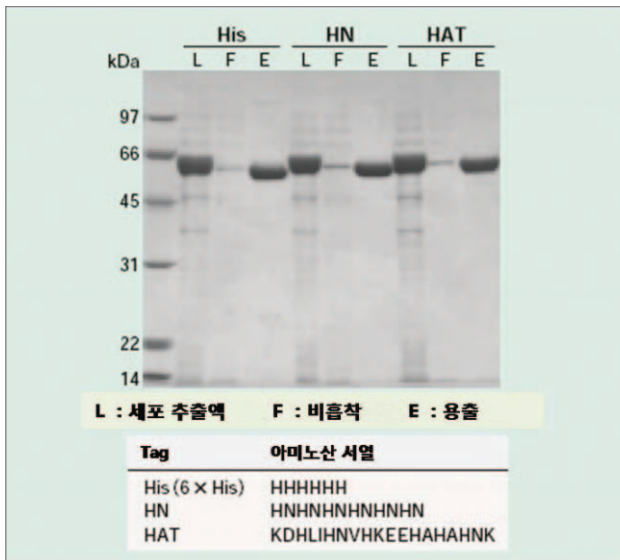


그림 4. TALON resin을 이용한 His tag, HN tag, HAT tag 용합 단백질의 정제
비변성 조건하에서 TALON resin을 이용하여, 대장균 파쇄액으로부터 각종 tag 용합 단백질을 정제했다. CBB 염색.

■ 표준 protocol(column법)

기본적으로는 Ni-NTA와 같은 방법으로 정제하면 좋은 품질의 단백질을 얻을 수 있다. 결합량은 5~10 mg histidine Tag 용합 단백질/ 1 ml resin이다.

【비변성 조건하】

Equilibration buffer/wash buffer^{*1} : 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH7.0

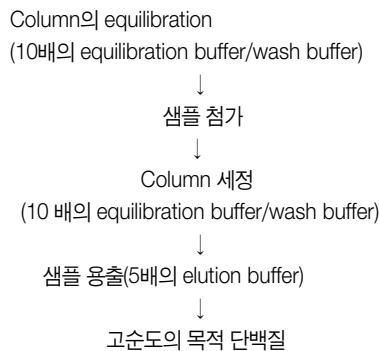
Elution buffer : 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH7.0

【변성 조건하】

Equilibration buffer/wash buffer : 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 6 M guanidine, pH7.0

Elution buffer^{*2} : 45 mM sodium phosphate, 270 mM NaCl, 5.4M guanidine, 150 mM imidazole, pH7.0

【실험 순서】



*1 : TALON resin은 nickel base의 Ni-NTA resin보다 mild한 조건에서 용출이 가능하다. 따라서, 비특이적인 흡착을 막기 위해 미리 imidazole을 첨가하는 경우, 5 mM 정도를 권장한다.

*2 : Equilibration buffer와 1.5 M imidazole pH7.0을 9 : 1로 혼합하면 간단히 제조할 수 있다.

■ 마지막으로

Histidine Tag 용합 단백질을 다량, 고순도로 정제 가능한 TALON resin에는 소량, 대량, plate type의 여러가지 type으로 이용할 수 있는 다양한 제품군이 갖추어져 있다.

■ His Tag 융합 단백질 정제를 위한 TALON® 시리즈

Product	TaKaRa Code	Size	Kit 내용			
			Resin	Column	Extraction buffer	Wash • Elution buffer
His Tag 정제용 Resin(10 ml), Columns 및 Resin Wash • Elution buffer → 처음으로 사용하시는 분에게 최적. TALON® Purification Kit	635515	1 set	O	O		O
His-Tag 정제용 Resin → Scale 맞추어 선택						
TALON® Metal Affinity Resin	635501	10 ml	O			
TALON® Metal Affinity Resin	635502	25 ml	O			
TALON® Metal Affinity Resin	635503	100 ml	O			
TALON® Metal Affinity Resin	635504	250 ml	O			
TALON® 2-ml Disposable Gravity Column	635606	50 개		O		
His-Tag 정제용 Resin (가압가능) → 고속 chromatography에 최적.						
TALON® Superflow Metal Affinity Resin	635506	25 ml	O			
TALON® Superflow Metal Affinity Resin	635507	100 ml	O			
Magnetic Bead형 Resin						
TALON® Magnetic Beads	635636	2 X 1 ml	O (magnetic bead)			
TALON® Magnetic Beads	635637	6 X 1 ml	O (magnetic bead)			
TALON® Magnetic Beads Buffer Kit	635638	1 kit			O	O
Resin이 충전되어 있는 96 well plate → High-throughput 사용에 최적.						
TALON® HT 96-Well Purification Plate	635622	1 set	O (충진 plate)			
His-Tag 정제용 Resin(세포용) → 세포 파쇄액으로부터의 정제에 최적.						
TALON® CellThru Resin	635509	10 ml	O			
TALON® CellThru Resin	635510	100 ml	O			
TALON® CellThru 10-ml Disposable Columns	635513	20개		O		
Resin이 충전된 Spin Columns type → mini scale로 간편하게.						
TALONspin™ Columns	635601	10개	O (충진 column)			
TALONspin™ Columns	635602	25개	O (충진 column)			
TALONspin™ Columns	635603	50개	O (충진 column)			
Single step 충전 Columns → 대장균 배양액용, 다검사대상 물체 처리에 최적.						
TALON® Single Step Columns (5 ml)	635631	2개	O (충진 column)		(충진제)	
TALON® Single Step Columns (5 ml)	635628	25개	O (충진 column)		(충진제)	
TALON® Single Step Columns (20 ml)	635632	10개	O (충진 column)		(충진제)	
Resin wash & elution buffer						
TALON® Buffer Kit	635514	1 set				O
세균 또는 세포로부터의 단백질 추출 전용 buffer						
TALON® xTractor Buffer Kit	635623	1 set			O	
TALON® xTractor Buffer	635625	500 ml			O	