



Native Condition에서 His-Tag protein의 탁월한 정제 TALON[®] Metal Affinity Resin

■ TALON[®] Resin Offers 6xHis Protein Purification Under Native Conditions Using β -mercaptoethanol as a Reducing Agent

Clontech의 TALON[®] metal affinity resin은 cobalt를 기본으로 한 immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resin으로 polyhistidine-tagged protein의 정제에 최적이다. TALON ligand resin은 metal의 누출을 막아 정제 효율을 증가시키고, 환원제 (β -Mercaptoethanol 30 mM 이상) 사용에도 적합하여 다른 IMAC resin의 단점을 극복하였다^(1,2). 또한 일반적으로 사용되는 모든 IMAC용 시약과 함께 사용할 수 있는 장점을 가진다.

단백질은 생물학적 활성을 유지하기 위해 free sulfhydryl group이 필요하며 이를 위해 β -Mercaptoethanol (β -ME)과 같은 환원제 (reducing reagent)를 필요로 한다. 그러나 대부분의 IMAC resin는 환원제에 불안정하다^(3,4). 대조적으로 TALON resin는 β -Mercaptoethanol의 존재하에서도 protein의 정제가 가능하다.

High Protein Purity and No Metal Leakage with β -Mercaptoethanol

β -ME를 환원제로 사용한 기존의 조건에서 TALON을 이용하여 polyhistidine-tagged protein 정제를 위해 mouse dihydrofolate reductase (DHFR)을 *E. coli*에 발현시킨 후 TALON으로 정제하였다(그림 1). 그림 1은 TALON을 이용하여 기존 정제 buffer에서 β -ME를 30 mM 이상 처리했을 때 6 x His DHFR이 압도적으로 많이 정제됨을 보여주고 있다. Flowthrough lane에서는 검출되지 않은 25 kDa의 DHFR가 TALON resin에서만 검출되어 β -ME가 포함된 조건에서도 정제됨을 알 수 있었다.

TALON은 polyhistidine-tagged protein을 결합시키기 위해 nickel 대신 특별한 2가 금속이온인 cobalt를 사용한다. Cobalt는 8면의 금속이온과 결합하기 적합한 polydentate metal chelator에 의해 Sepharose[®] bead와 강하게 결합되어 있다. 따라서 TALON resin은 대부분의 IMAC resin과 비교해 정제하는 과정 동안 금속 이온의 손실이 적은 것이 특징이며 nickel resin에 비해 β -ME에 의한 환원 조건에서 보다 안정적이다.

Better Yields Using β -ME with TALON than Ni-NTA

기존의 조건에서 β -ME 농도를 30 mM까지 높이며 TALON resin와 타사의 Nickel-NTA를 비교 하였다. 10, 20, 30 mM의 β -ME에서 모두 TALON을 이용한 protein 정제량이 훨씬 많음을 확인할 수 있었다(그림 2). 뿐만 아니라 낮은 β -ME 농도에서도 polyhistidine-tagged protein 양을 현저히 증가시킬 수 있다.

TALON resin은 환원제인 β -ME를 30 mM 이상 사용한 기존 조건에서 polyhistidine-tagged protein 정제에 탁월한 성능을 보였다. 또한, 보다 빠르고 간편하게 고농도의 재조합단백질을 분리할 수 있어 단백질 고유의 특성이 요구되는 생물학적 활성분석이나 기타 후속 실험에 널리 적용할 수 있다.

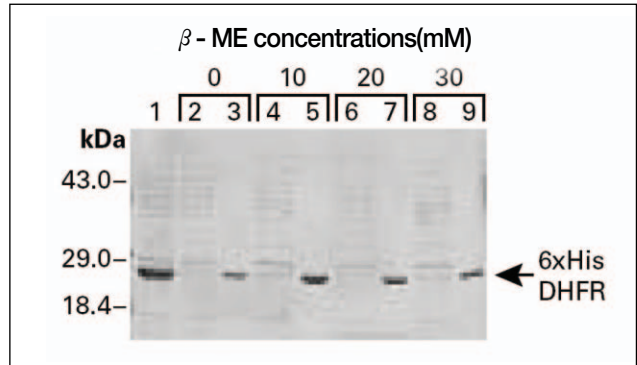


그림 1. TALON 6xHis DHFR purification under native conditions with increasing concentrations of β -ME. N-terminal 6 x His-tagged mouse DHFR (19.5 kDa) was expressed in *E. coli*. Cell cultures (25 ml) were disrupted in 2 ml of sonication buffer (pH 8.0) by freezing and thawing. Clarified lysate (2.66 ml at 4 mg/ml total protein) was applied to 200 μ l of TALON in a gravity flow column, pre-equilibrated with the sonication buffer. The 6xHis protein/resin complexes were washed 3 x with sonication buffer, pH 8.0. All bound protein was eluted with 600 μ l of 100 mM EDTA. The indicated concentrations of β -ME were included in the buffer. Samples were electrophoresed on a 12% polyacrylamide/SDS gel, and the gel was stained with Coomassie blue. Lane 1: 20 μ l of cell lysate, Lanes 2, 4, 6, & 8: 20 μ l of flowthrough. Lanes 3, 5, 7, & 9: 5 μ l of eluant.

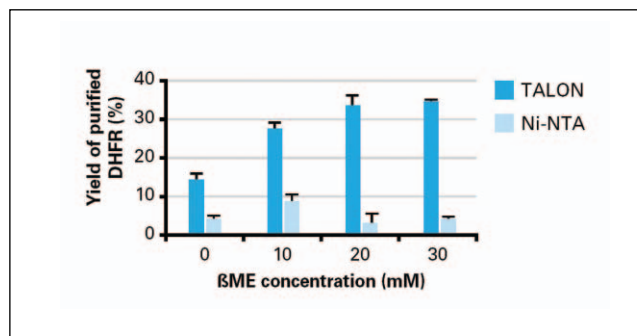


그림 2. Yields of recombinant 6xHis DHFR from cell extracts purified by TALON versus Nickel-NTA in the presence of β -ME. N-terminal 6xHis DHFR was expressed and purified under native conditions as described in 그림 1. Protein concentrations were determined by Bradford assay[®]. Yields are expressed as a percentage of total protein in the cell lysate.

References

1. TALON Resin (April 1995) *Clontechiques X*(2):8-9.
2. Porath, J. (1992) *Protein Express, Pur.* 3(4):263-281.
3. Hochuli, E., et al. (1987) *J. Chromat.* 411:177-184.
4. Sawadogo, M., et al. (1995) *Genet. Eng.* 17:53-65.
5. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem* 72:248.

Rapid One-Step IMAC Purification Using TALON[®] Superflow

TALON Superflow metal ion affinity resin을 사용하면 polyhistidine-tagged green fluorescent protein (GFP)을 빠르고 효과적으로 정제할 수 있다. 본 제품은 TALON system⁽¹⁻³⁾의 모든 장점과 함께 Superflow resin만의 뛰어난 flow 능력을 겸비하고 있다. Superflow resin을 사용하면, flow rate와 pressure를 증가시켜 사용할 수 있으며, gravity-flow에 의한 정제는 물론 spin-column 정제에도 사용 가능하다.

단백질 순도와 정제량은 보다 빠른 정제방법에 의해서 향상시킬 수 있다. TALON Superflow Resin은 flow rate를 증가시킬 수 있는 견고한 다공성 agarose 유도체인 Superflow와 높은 특이성을 가진 immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)인 TALON의 결합으로 탄생한 his-tag 정제에 탁월한 resin이다.

Rapid One-Step Purification

TALON Superflow resin은 20 cm/min (ml/cm²/min) 이상의 flow rate가 가능하지만 일반적인 chromatography는 0.5 cm/min 이상의 flow rate를 적용하기는 어렵다.

TALON Superflow를 사용하여 flow rate를 증가시켜 얻을 수 있는 장점을 알아보기 위해 Flow rate 1.25 cm/min로 single chromatographic step으로 TALON을 이용하여 6xHis-GFPuv⁽⁴⁾를 정제하였다. 일반적인 실험방법보다 2.5배 빠른 flow rate이므로, 전체 과정을 45분 안에 마칠 수 있었다 (그림 3).

그림 4에서 보는 바와 같이, 높은 효율로 6xHis-GFPuv가 정제됨을 확인할 수 있었고, one rapid chromatography로도 깨끗한 단백질을 얻을 수 있음을 알 수 있었다(Lane 4). 150 mM imidazole (그림 3, Peak III)로 분리한 eluted fraction⁽⁴⁾에서 단백질 농도를 분석한 결과 95% 이상의 6xHis-GFPuv를 회수됨을 확인하였다.

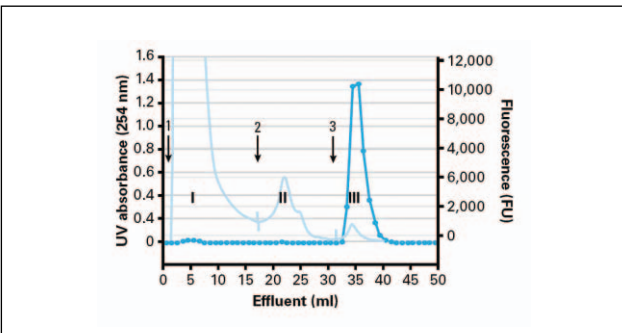


그림 3. Rapid one-step purification of 6xHis-GFPuv on TALON Superflow. Whole cell extract containing 6xHis-GFPuv was loaded in 50 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, pH 8.0 (arrow 1), washed in this buffer plus 10 mM imidazole (arrow 2), and eluted in the same buffer plus 150 mM imidazole (arrow 3).

References

1. Porath, J., et al. (1975) *Nature* 258(5536): 598-599.
2. Hochuli, E., et al. (1987) *J. Chrom.* 411: 177-184.
3. TALON Metal Affinity Resin (April 1995) *Clontechiques X* (2):8-9.
4. Kain, S. R. (1997) *Biotechnol. Intl.* 1:79-84.

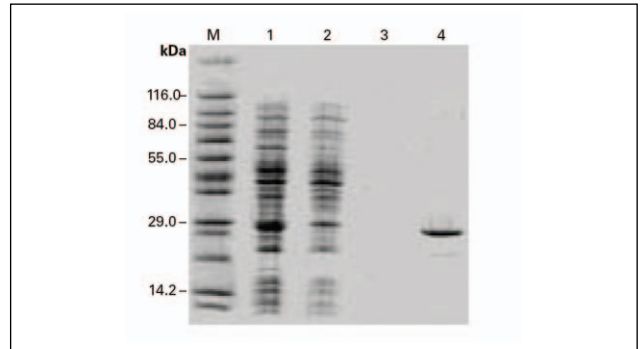


그림 4. Analysis of TALON Superflowpurified fractions. SDS-PAGE analysis was performed on the fractions represented in 그림 1. Lane 1 : extract, Lane 2 : nonadsorbed material (peak I), Lane 3 : wash (peak II), Lane 4 : eluate (peak III), Lane M : MW standard.

The TALON Advantage

TALON resin은 Nickel-based IMAC resin에 비해 다수의 장점을 가지고 있다. 첫째, TALON resin은 cobalt 이온과 4개의 결합부위를 가지는 반면 기존의 nickel-based IMAC resin은 3개의 결합부위만을 가진다. 따라서 cobalt 이온은 단백질이 정제되는 동안 확실히 결합되어 있는 상태로 column에서 분리되지 않는다⁽¹⁻³⁾.

또한, TALON은 nickel 대신 cobalt를 사용하기 때문에 polyhistidine-tagged protein과 매우 특이적으로 결합하고 다른 단백질과 비특이적으로 결합할 확률은 매우 낮다⁽²⁾. 이러한 특징 때문에 TALON은 매우 높은 특이성을 가지며 매우 낮은 background를 나타낸다는 장점으로 가진다. 결과적으로 일반적인 elution 조건에서 elution이 가능하므로, 생물학적 활성이 매우 증가된 상태의 단백질을 정제할 수 있고, 일반적으로 쓰이는 다양한 buffer 시스템의 사용이 가능하다. TALON의 chelated cobalt의 높은 감도와 Superflow의 견고하고 뛰어난 구조의 조합으로 TALON Superflow는 정제 시간의 단축과 특이성을 증가시킨 최선의 정제 방법이라 할 수 있다.

관련 제품

Product	Size	TaKaRa Code
TALON [®] Metal Affinity Resin	10 ml	635501
	25 ml	635502
	100 ml	635503
TALON [®] 2-ml Disposable Gravity Column	50 col	635606
TALON [®] CellThru 10-ml Disposable Gravity Column	20 col	635513
TALON [®] Purification Kit	each	635515
TALONspin [™] Columns	10 col	635601
	25 col	635602
	50 col	635603
TALON [®] HT 96-Well Purification Plate	1 set	635622
TALON [®] Magnetic Beads	2 x 1 ml	635636
	6 x 1 ml	635637
TALON [®] Magnetic Beads Buffer Kit	1 kit	635638
TALON [®] PMAC Magnetic Phospho Enrichment Kit	1 kit	635641

※ 본문 중 제품에 해당하는 라이선스 확인사항은 [License Notice] 참조 28)