

## 빠르고, 쉽게 His-Tagged Protein을 정제하는 HisTALON™ Cartridge

- 생물학적 활성을 보존한 단백질의 높은 회수율
- syringe를 기본으로 한 간편한 실험법
- TALON Superflow Resin과 함께 사용하면 높은 순도와 높은 정제수율 가능
- TALON resin을 사용한 2,400 편 이상의 publication

샘플의 전처리와 정제과정에서 목적 단백질의 생물학적 활성을 보존하고 단백질회수율을 높이면 실험의 전반적인 상황과 진행 시간을 잘 조절해야 한다. pH가 지나치게 높거나 낮은 조건, 또는 정제과정에서 protease나 기타 다른 첨가물들이 존재한다면 yield를 떨어뜨리는 원인이 될 수 있다. 그러나 실험 진행을 간소화 한다면 실험에 부정적 영향을 미치는 요인들을 충분히 제거하거나 줄일 수 있다. 본 제품은 빠르고 효과적인 샘플의 전처리 단계와 양적으로 단백질을 충분히 확보할 수 있는 실험과정(capture-and-release follow-up step)을 포함하면서, 동시에 쉽게 사용 가능하다는 장점을 가지고 있어 목적 단백질의 활성도를 최대화하는데 도움을 줄 것이다.

클론텍에서 강력히 추천하는 TALON Superflow Resin (flow rate: 5~20cm/min) 제품을 사용하면 단백질 정제를 보다 빨리 진행할 수 있다. 이 resin은 Superflow 6 (다공성의 견고한 agarose 유도체) 와 선택성이 높은 immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) ligand 인 TALON으로 구성되어 있다<sup>1-6)</sup>. TALON은 cobalt의 tetradentate chelator 성질을 갖고 있으며, his-tagged protein과 특이적으로 결합한다. 여기에서 TALON Superflow Resin과 HisTALON Cartridges (그림 1)의 사용법에 대해서 알아보기로 하자.

본 cartridge는 resin이 충전되어 있으며 박테리아, mammalian 혹은 baculovirus-infected cell로부터 추출한 total soluble protein으로부터 효율적으로 his-tagged protein을 정제하기 위해 최적화되어 있다.



그림 1. The HisTALON Cartridges (1 ml) provide highly efficient and specific method for purifying his-tagged proteins.

표 1. Comparison of HisTALON Cartridge (1 ml) Protein Yield & Activity to that of Competitor Cartridge<sup>1</sup>

Vendor	Starting Sample		Flowthrough		Wash		Eluate	
	Protein (mg)	AcGFP1 (RFU)	Protein (mg)	AcGFP1 (RFU)	Protein (mg)	AcGFP1 (RFU)	Protein (mg)	AcGFP1 (RFU)
Clontech	22.3	202,167	21.1	9,363	0.1	292	1.1	198,114
Vendor G <sup>2</sup>	12.7	82,845	12.2	4,980	0.1	215	0.6	81,111
Vendor Q <sup>2</sup>	12.4	88,300	11.3	4,560	0.2	3,600	0.7	78,320
Vendor P <sup>3</sup>	20.6	201,174	18.6	10,304	0.14	653	1,311	193,214

<sup>1</sup> Extraction and chromatography were performed according to the respective vendor's recommendations(see the Figure 2 caption for the Clontech sample extraction procedure).

<sup>2</sup> Extraction in presence of lysozyme.

<sup>3</sup> Extraction with the product-specific recommended extraction buffer.

continued...

■ 생물학적 활성을 보존한 단백질 정제의 극대화  
HisTALON Cartridge는 생물학적으로 활성을 가진 단백질의 회수율을 최대화시킬 수 있도록 제작되었다.  $Co^{2+}$  이온의 안정적인 chelation과 TALON의 반응 특이성이 조화를 이루어 월등한 고순도의 단백질 정제결과를 확인할 수 있었고, 이는 곧 정제된 단백질의 양과도 밀접한 관련이 있다(경쟁사 제품과 비교, 표 1). 동시에 20 mg이 넘는 his-tagged AcGFP1가 하나의 HisTALON cartridge에 흡착할 수 있음을 확인하였다.

■ 높은 재현성과 빠른 결과

그림 2는 HisTALON Buffer Set과 HisTALON cartridge를 이용한 단백질 추출과 정제과정을 세 가지 chromatography의 결과로 보여준다. Protein content와 fluorescence signal의 차이가 5% 이하로 재현성이 높음을 확인할 수 있었다 (data not shown). 실험의 진행은 추출에서 정제까지 1시간 이내에 가능하다.

■ 쉽게 자동화하거나 syringe-based 정제 가능

HisTALON Cartridge는 부수적으로 buffer set과 함께 사용하면 효율이 높아지고, 순도가 높은 결과물을 얻을 수 있다. 게다가 AKTA FPLC과 같은 자동화 제품을 함께 사용하면 선택적으로 순도를 높일 수 있다. Cartridge와 buffer는 각각 HisTALON Cartridge (5 x 1 ml cartridge 형태로 판매)와 HisTALON Buffer Set로 사용이 가능하며 이를 조합한 HisTALON Cartridge Purification Kit 제품도 있다. 또한 cartridge는 Luer Lock Syringe Fitting (GE Healthcare, Cat. No. 18-1112-51), M6 FPLC fitting (GE Healthcare, Cat. No. 18-1112-58 & 18-1112-57)과 함께 syringe를 이용한 단백질 정제에 적용가능하다. HisTALON Cartridge는 빠르고 쉬우며 chromatographic separation에 재사용이 가능하고, 다방면에 적용할 수 있다.

하지만 이러한 cartridge의 재사용은 동일한 protein일 경우에만 사용해야 하며, 이와 관련된 방법은 제품 매뉴얼에 설명되어 있다.

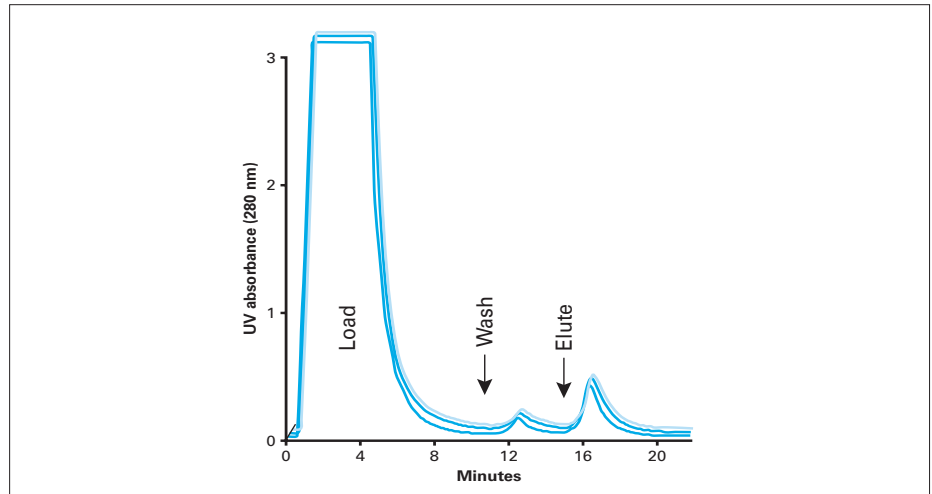


그림 2. HisTALON Cartridges provide highly reproducible and rapid his-tagged protein purification. Protein extraction and chromatography were performed according to the User Manual, with 0.4 g pellets of E. coli cells expressing his-tagged AcGFP1. These cells were extracted in the recommended volumes of extraction buffer and centrifuged at 10,000 x g for 20 min, at 4°C. For each run, extract from 250 mg of cells was consequently applied to the cartridge using the recommended loading buffer and flow rate, on an FPLC system from GE Healthcare (used for all the purifications described in this article). After the wash and elution steps were completed, all fractions, as well as the original samples, were analyzed for protein content<sup>(7)</sup> and relative fluorescence (from active AcGFP1) on a 96-well fluorescence spectrophotometer. A high level of reproducibility was observed between runs, with differences of less than 5% in both protein content and fluorescent signal (data not shown). The entire process, including extraction and purification, was completed in less than 1 hour.

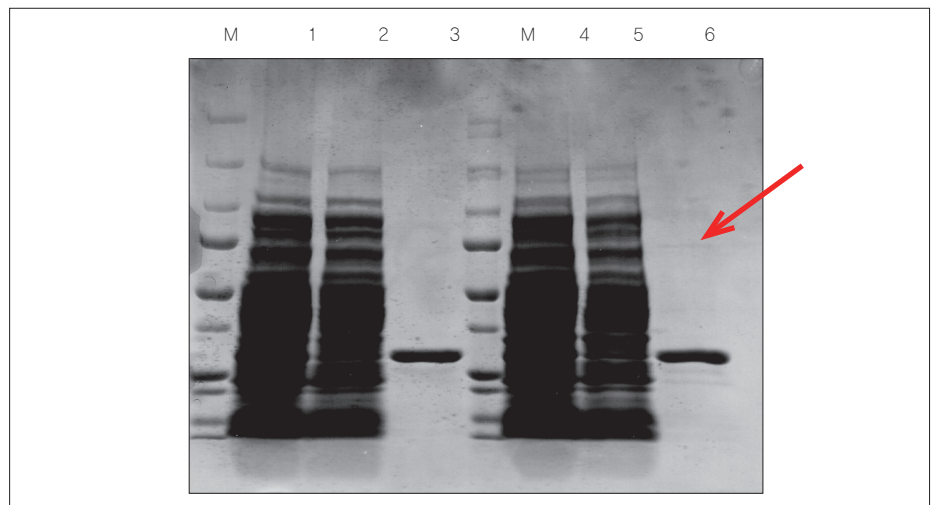


그림 3. HisTALON Cartridges yield higher purity than a competitor. Fractions from the purification of his-tagged AcGFP1 on respective HisTALON and Vendor P cartridges were compared via electrophoresis on a 4-15% SDS polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue. Lanes M: Bio-Rad Precision Plus Protein All Blue Standards. Lane 1: HisTALON extract, Lane 2: HisTALON flowthrough, Lane 3: HisTALON eluate. Lane 4: Vendor P extract, Lane 5: Vendor P flowthrough, Lane 6: Vendor P eluate. A contaminating high molecular weight band appeared in Lane 6 (Vendor P eluate), but not in Lane 3 (HisTALON eluate), indicating that the HisTALON eluate was of higher purity—consistent with the data in Table I.

# 빠르고, 쉽게 His-Tagged Protein을 정제하는 HisTALON™ Cartridge

continued...

SDS-PAGE를 통해 경쟁사 제품과 chromatography 효율을 비교하여 HisTALON Cartridge의 수율이 높게 나타나는 것은 확인하였다(그림 3). P 경쟁사의 추출물에서는 높은 분자량의 비특이적인 추출이 확인이 되었지만, HisTALON을 이용하여 추출한 경우엔 이를 확인할 수 없었다. 코발트를 기본으로 한 클론텍의 TALON resin은 수많은 연구자 (2,400 편 이상의 publication) 들이 사용하였으며, 높은 특이성과 선택성을 가지는 TALON resin이 목적 단백질의 순도를 최대로 이끌어 낼 수 있도록 도움을 주고 있다.

단백질이 극소량만 발현될 때, 많은 경우에 매우 낮은 회수율로 인하여 여러 과정을 거쳐 단백질을 정제하게 된다. 이때 많은 시간이 소요되며 여러가지 요인(proteolytic, oxidation, or denatured products)에 의해 목적단백질이 변형되거나 분해되는 위험에 노출된다.

### ■ Mammalian 유래 단백질의 효과적인 정제

HisTALON Cartridge의 다양한 성능을 검증하기 위해 mammalian sample에 적용하였다. Sample은 HEK293 cell pellet에서 추출하고, 25µg의 AcGFP1을 첨가하였으며 TALON xTractor Buffer (HisTALON Buffer Set 나 HisTALON Cartridge Purification Kit에 포함)와 HisTALON cartridge를 이용하여 추출 및 정제하였다. 전체적인 형광신호는 eluate에서 확인하였고 flowthrough에서는 감지되지 않았다.

SDS-PAGE (그림 4)를 이용한 chromatography 분석 결과를 보면 HEK 293 cell로부터 추출된 10mg 이상의 mammalian protein에 AcGFP1을 25µg의 첨가하였음에도 불구하고 sample이 고순도 정제됨을 확인할 수 있었다.

HisTALON Cartridge는 TALON Superflow Resin를 만큼 사용하기 편리한 포장으로 되어 있다. HisTALON Buffer Set과 함께 사용할 경우, 시간 절약과 함께 효과적으로 sample을 추출할 수 있고 활성을 유지한 목적 단백질의 최고의 순도와 회수효율을 확인할 수 있다.

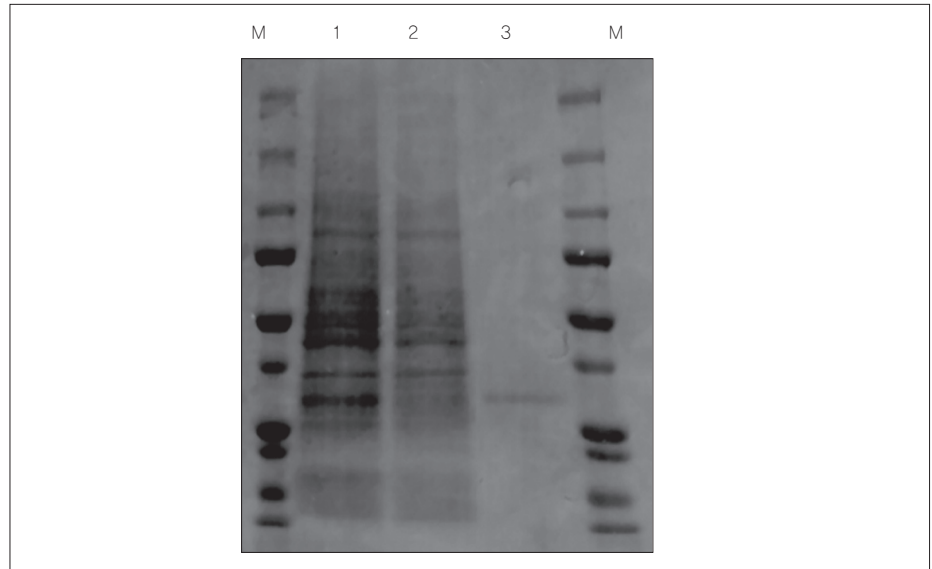


그림 4. HisTALON Cartridges effectively purify mammalian samples. A 200 mg HEK 293 cell pellet sample was extracted with our TALON xTractor Buffer. The extract, spiked with 25 µg of AcGFP1 and containing more than 10 mg of mammalian proteins from the HEK 293 cells, was loaded on a HisTALON cartridge. Fractions were analyzed via electrophoresis on a 4-15% SDS polyacrylamide gel and visualized with a silver staining kit (both from Bio-Rad Laboratories). Lanes M: Bio-Rad Precision Plus Protein All Blue Standards, Lane 1: HEK 293 extract spiked with 25 µg of AcGFP1, Lane 2: flowthrough, Lane 3: eluate. The single band in Lane 3 demonstrates the high purity of the eluate.

### ■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
HisTALON Cartridge	5 x 1ml	635650
HisTALON Buffer Set	20 purifications	635651
HisTALON Cartridge Purification Kit <sup>1</sup>	5 x 1ml	635649

<sup>1</sup> The HisTALON Cartridge Purification Kit combines the HisTALON Cartridge (containing 5 x 1 ml cartridge) and the HisTALON Buffer Set.

### ■ 참고문헌

1. Porath, J. *et al.* (1975) *Nature* 258 (5536) : 598-599.
2. Hochuli, E. *et al.* (1987) *J. Chrom.* 411:177-184.
3. Hochuli, E. *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6(11):1321-1325.
4. Chaga, G. *et al.* (1994) *Protein Eng.* 7(9):1115-1119.
5. Froelich, C. J. *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229(1):44-49.
6. Stephens, L. R. *et al.* (1997) *Cell* 89 (1): 105-114.
7. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72:248-254.

\* License Notice: [18]