

최고 순도의 His-Tag 융합 단백질을 위한 비장의 카드

TALON[®] Resin

Histidine으로 융합된 재조합 단백질은 immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resin과의 친화성을 이용해 고순도로 단백질을 정제할 수 있는 것으로 알려져 있다. Clontech에서는 nickel base resin을 이용한 affinity chromatography에서 정제 순도나 회수량이 떨어진 경우에 대한 해결책으로 cobalt base의 IMAC 정제용 TALON[®] resin을 추천한다. 본 고에서는 Clontech의 독자적 기술로 만들어진 TALON[®] resin을 이용하여 어떻게 단백질을 고순도로 대량 정제를 하는지에 대해서 소개하고자 한다.

■ 핵심은 Cobalt Base: Nickel base의 resin보다 고순도로 정제

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

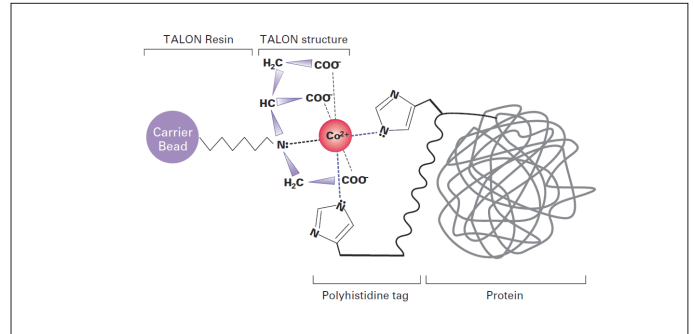


그림 1. TALON Resin과 His-tag 단백질의 결합 모식도. Clontech의 TALON[®] 기술은 강한 친화력으로 cobalt와의 tetradentate chelator를 형성함으로써 polyhistidine tag와의 결합력을 향상 시킨다.

표 1. Physicochemical Properties of TALON Resins

Features	TALON Metal Affinity Resin	TALON Superflow Resin	TALON CellThru Resin	TALONspin Columns
Batch/gravity flow applications	Yes	Yes	Yes	No
FPLC applications	No	Yes	Yes	No
Scale	Analytical, Preparative, production	Analytical, Preparative, production	Preparative, production	Analytical
Capacity** (mg protein/ml adsorbent)	5 - 15	5 - 20	5 - 10	2 - 4
Matrix	Sepharose 6B-CL (6% cross-linked agarose)	Superflow (6% cross-linked agarose)	Uniflow (4% cross-linked agarose)	Sepharose 6B
Bead size (μm)	45 - 165	60 - 160	300 - 500	16 - 24
Maximum linear flow rate (cm/hr)*	30	3,000	800	n/a
Maximum volumetric flow rate (ml/min)*	0.5	50	13	n/a
Recommended Volumetric flow rate (ml/min)	0.3	1.0 - 5.0	1.0 - 5.0	0.3
Maximum pressure	2.8 psi 0.2 bar 0.02 Mpa	150 psi 10 bar 0.97 MPa	9 psi 0.62 bar 0.06 MPa	n/a
pH stability (duration)	2 - 14 (2 hr) 3 - 14 (24 hr)	2 - 14 (2 hr) 3 - 14 (24 hr)	2 - 14 (2 hr) 3 - 14 (24 hr)	2 - 8.5 (2 hr) 2 - 7.5 (24 hr)
Protein exclusion Limit (Da)	4 x 10 ⁷	4 x 10 ⁶	2 x 10 ⁷	n/a

* For washing and elution only

** The binding capacity of individual proteins may vary

한편, nickel base의 Ni-NTA resin에서는 이러한 공간적 요구성이 그다지 엄격하지 않아 종종 host 유래의 유사 단백질까지 결합하는 경우가 있다. TALON[®] resin에서는 변성조건이나, 비변성 조건에 관계없이 histidine tag 없는 단백질의 비특이적인 흡착이 관찰되지 않았다. 이는 TALON[®] resin을 이용한 정제 시 비특이적 단백질의 혼입 없는 고순도의 정제를 기대할 수 있음을 의미한다 (그림 2).

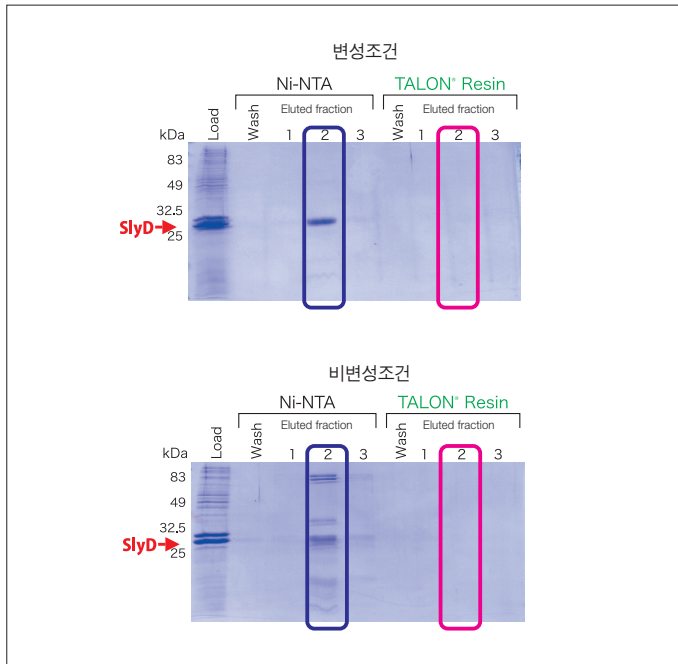


그림 2. BL21 (DE3) pLysS strain 유래 SlyD 단백질 (27 kDa)의 비특이적 흡착의 비교

Ni-NTA Resin에서는 SlyD는 비특이적으로 흡착되어 불필요한 단백질의 혼입의 원인이 된다. TALON[®] Resin에서는 변성조건이나 비변성 조건에 관계없이 비특이적인 흡착은 볼 수 없다. 이는 불필요한 단백질이 혼입되지 않음으로써 고순도의 단백질 정제가 가능하다 할 수 있다.

■ 금속 이온의 탈락이 적고 회수량 감소를 최소로 억제

정제 과정에서 금속 이온의 탈락은 단백질 회수량의 감소로 이어지는 원인이 된다. Nickel base의 Ni-NTA resin에서는 3 차원 구조와 평면 구조의 두 가지 배위 구조로 형성이 가능하기 때문에 resin의 구조가 균일하지 않고 nickel과의 결합이 그만큼 강하지 않다. 이로 인해 nickel이 누출되어 회수량이 감소한다. 반면, TALON[®] resin은 4 차원 ligand를 채용하여 모든 반응 부위가 3 차원 pocket을 형성하도록 설계되어 있어 resin으로부터의 cobalt 누출을 최소량으로 억제한다. 따라서, 그림 3에서 보는 것과 같이 TALON[®] resin은 uanidium-HCl이나 8 M urea 같은 변성조건에서만뿐만 아니라 단백질의 활성을 유지하는 비변성 조건에서도 높은 회수량과 높은 순도의 단백질을 정제할 수 있다.

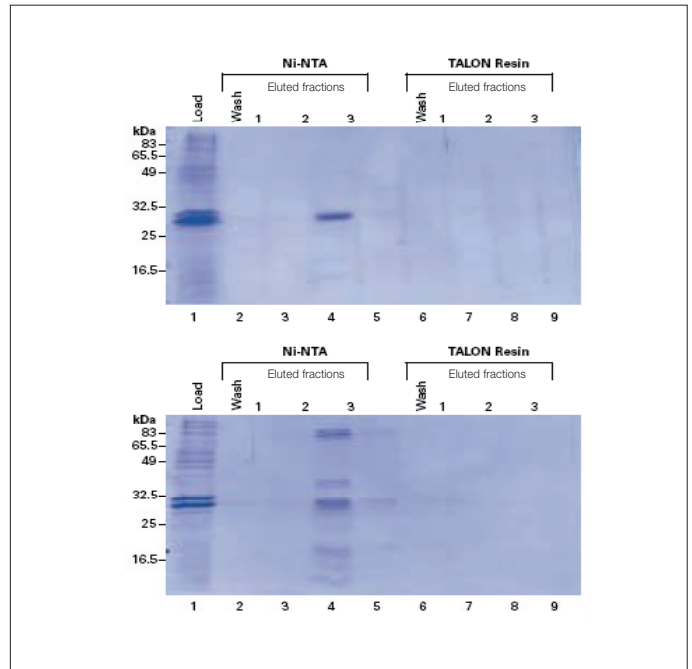


그림 3. 비변성 조건 하에서 TALON[®] resin과 Ni-NTA resin으로 각각 histidine tag된 단백질의 정제를 비교하였다.

TALON은 polyhistidine-tag 융합 단백질 정제 시 Ni-NTA resin보다 월등한 특이성을 보였다. 이 단백질들은 Ni-NTA resin은 pH4.5 에서 용출되었지만 TALON에서는 더 비변성 조건인 pH6.3에서 용출되었다. 대장균에서 발현되는 6xHis-tagged prepro- α -factor는 대장균에서 발현되고 각각의 gravity flow column에 로딩하여 단계적인 pH gradient로 용출하였다. 정제된 분획(fraction)은 SDS-PAGE로 분석되었다. M = molecular weight markers.

표 2. Faster purification with TALON[®] Resin

Resin	Extraction/Loading pH	Extracted Protein	Nonadsorbed Protein	Eluted Protein	Runtime
TALON [®] Superflow	7.0	22.9 mg	12.5 mg	10.4 mg	20 min
Ni-NTA Superflow	8.0	18.4 mg	9.3 mg	7.7 mg	64 min

* polyhistidine-tagged GFPuv

또한, TALON[®] resin은 까다로운 변성 조건 하에서도 뛰어난 내구성을 유지할 뿐만 아니라 β -mercaptoethanol에 대한 감수성도 낮아 (30 mM 까지 허용) 반복 사용도 가능하다.

■ TALON[®] resin 시리즈

TALON[®] resin은 다양한 실험에 적용할 수 있는 소량, 대량, 그리고 plate 형태의 제품으로 판매되고 있다.

(1) His-tagged protein 정제 (높은 순도와 특이성 Co²⁺ Resin 타입)

분류	제품명	용량	TaKaRa Code	Resin	Column	Extract Buffer	Washing/ Elution Buffer
His-tagged protein 정제용 Resin	TALON [®] Metal Affinity Resin [*]	25 ml	635502	●			
		100 ml	635503	●			
		250 ml	635504	●			
	TALON [®] 2ml Disposable Gravity Column	50 개	635606		●		
His-tagged protein 정제용 Resin FPLC 적용	TALON [®] Superflow Metal Affinity Resin [*]	25 ml	635506	●			
		100 ml	635507	●			
		250 ml	635670	●			
Prepacked FPLC 정제 카트리지	HisTALON [™] Cartridge	5 개	635650		●		
	HisTALON [™] Cartridge Purification Kit	20 회	635649	prepacked cartridge		●	●
	HisTALON [™] Buffer Set	20 회	635651			●	●
Magnetic beads용 Resin	TALON [®] Magnetic Beads	2 x 1 ml	635636	●			
		6 x 1 ml	635637	●			
	TALON [®] Magnetic Beads Buffer Kit	1 Kit	635638			●	●
세포 lysate에서 곧바로 단백질 정제에 최적	TALON [®] CellThru Resin	10 ml	635509	●			
		100 ml	635510	●			
	CellThru 10-ml Disposable Columns	20 개	635513		●		
Resin이 충전된 Spin column 타입 소규모 정제에 적합	TALONspin [™] Columns	10 개	635601		● prepacked column		
		25 개	635602				
		50 개	635603				
Single Step의 충전column 대장균 배양액용 샘플수가 많을 때 최적	TALON [®] Single Step Columns (5 ml)	25 개	635628		● prepacked column		
	TALON [®] Single Step Columns (20 ml)	10 개	635632				
세균 또는 세포로부터의 단백질 추출 전용 Buffer	xTractor Buffer Kit	1 Set	635623			●	
	xTractor Buffer	100 ml	635656			●	
		500 ml	635625				

(2) His-tagged protein 정제 (높은 정제 효율 Ni²⁺ Resin 타입)

분류	제품명	용량	TaKaRa Code	Resin	Column	Extract Buffer	Washing/ Elution Buffer
His-tagged protein 정제용 Resin FPLC 적용	His60 Ni Superflow [™] Resin [*]	25 ml	635660	●			
		4 x 25 ml	635661	●			
		250 ml	635662	●			
His-tagged protein 정제용 Resin	His60 Ni Gravity Columns	5 x 1 ml	635657		● prepacked column		
	His60 Ni Gravity Column Purification Kit	1 Kit	635658			●	●
His60 Ni용 buffer	His60 Ni Buffer Set	20 회	635665			●	●

※ 그 외 500 ml 과 1000 ml 의 대용량도 있습니다.

■ 관련제품

분류	제품명	용량	TaKaRa Code
Protease inhibitor	ProteoGuard™ EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail NEW	10 x 100 µl	635660
Hist-tagged protein 검출용 항체	6 × His mAb-HRP Conjugate	100 µl	631210
	6 × His Monoclonal Antibody (Albumin Free)	200 µg	631212
	6 × HN Polyclonal Antibody	200 µl	631213
His-tagged와 HA-tagged proteins 검출용 항체	c-Myc Monoclonal Antibody	200 µg	631206
	HA-Tag Polyclonal Antibody	100 µg	631207
	c-Myc Monoclonal Antibody-Agarose Beads	1 ml	631208
HAT-tagged protein 검출	Universal His Western Blot Kit 2,0	50 회	635642
Glycoprotein 검출	Glycoprotein Western Detection Kit	20 회	635648
pET 시스템 기반의 대장균 발현벡터	pEcoli Expression System	Each	631417
	pEcoli Linear Expression System	Each	631418
대장균 발현 벡터 (Cold shock 타입)	pCold [®] I DNA	25 µg	3361
	pCold [®] II DNA	25 µg	3362
	pCold [®] TF DNA	25 µg	3365
	pCold [®] ProS2 DNA	25 µg	3371
Baculovirus 발현 벡터	BacPAK™ Baculovirus Expression System	Each	631402
	BacPAK6 DNA (Bsu36 I digest)	5 rxns	631401



* Superflow™ is a trademark of Sterogene Bioseparations, Inc.

■ 참고문헌

1. Porath, J., et al. (1975) *Nature* **258**:598 – 599.
2. Janssen, D. (2002) *Genomics & Proteomics* **2**:48 – 51.
3. Sulkowski, E. (1989) *Bioessays* **10**:170 – 175.
4. Tchaga, G. S., et al. (April 2000) *Clontechiques* **XV**(2):31 – 32.

*License Notice: [2]

더 이상 protease에 의한 단백질 분해는 없다! **NEW**

EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail- ProteoGuard™
(TaKaRa Code 635673)

- EDTA-Free Protease inhibitor cocktail : IMAC column에 바로 적용 가능
- 5 종의 protease inhibitor cocktail : 1 회 처리로 세포 lysate 내 다양한 protease로부터 단백질 보호
- 다양한 적용 : xTractor Buffer나 다른 lysis buffers와 사용 시에도 뛰어난 효과
- Liquid type : 원하는 양만 첨가하여 사용하기 때문에 fresh하고 시약 낭비 없이 경제적 사용 가능
- 배양 세포, 동·식물 조직, Yeast, 박테리아의 단백질 추출에 적용 가능

Formulation of ProteoGuard™ EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail

Protease Inhibitor	Concentration in ProteoGuard Cocktail (100 X)	MW	Protease Family Targeted	Inhibitor Type
Bestatin	5 mM	308,38	Amino-peptidase	Reversible
Pepstatin A	1 mM	685,0	Aspartic acid proteases	Reversible
Leupeptin Hemisulfate	2 mM	475,6	Serine and cysteine proteases	Reversible
Aprotinin	0,08 mM	6,511,5	Serine proteases	Reversible
PMSF	100 nM	174,19	Serine proteases	Irreversible