

Q&A

Clontech社TALON™レジン特集

タカラバイオでは、Hisタグ融合タンパク質の発現・精製に最適な試薬を数多く取り揃えております。中でも、Clontech社のTALON™レジン、高性能なHisタグ融合タンパク質精製用レジンとしてご好評をいただいております。pCold™ VectorやpET Vectorなどを用いて発現したHisタグ融合タンパク質の精製を効率よく行うことができます。今回は、Clontech社のTALON™レジンに関するご質問と回答を中心にご紹介いたします。

Q1 TALON™レジンはコバルトイオンを用いていますが、ニッケルベースのものとはどこが違うのですか？

IMAC(Immobilized metal affinity chromatography)によく用いられるNiイオンに比べて、Coイオンを用いるTALON™レジンはHisタグ融合タンパク質に対して高い特異性、親和性を示すため、非特異的な吸着による夾雑タンパク質の混入が抑えられ、高純度にHisタグ融合タンパク質を精製できます。なぜなら、TALON™レジンは三次元ポケット状の立体配置をもち、かつ、金属キレートサイトを4つ含むため、より安定に金属(Co)イオンと結合でき、レジncラムからのCoイオンの脱落がほとんどないためです。一方でNiイオンベースのレジンでは、二次元(平面)の立体配置を取りうるため、Niイオンの脱落があります。なお、Niイオンベースのものと同様、6 M グアニジン存在下での変性条件でも使用することが可能です。

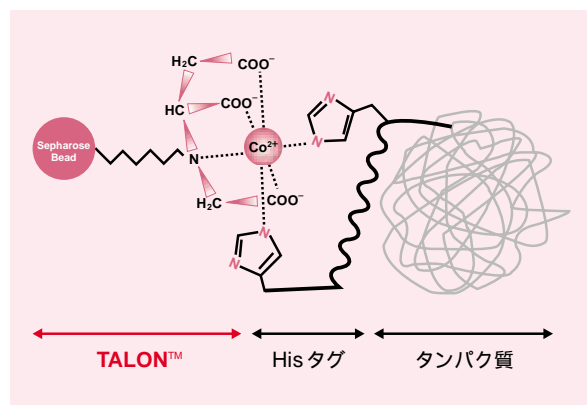


図1 TALON™レジンとHisタグ融合タンパク質

Q2 TALON™レジンを用いてHisタグ融合タンパク質はどのように精製されるのですか？

組換えタンパク質のN端やC端にある連続したヒスチジンと、レジんに保持したCoイオンとを結合させ、不要な細胞抽出物を洗い流します。その後、カラムに流す溶出バッファのpHを下げるか、イミダゾールの濃度を上げるにより、Hisタグ融合タンパク質をCoレジンから遊離させ、精製します(TALON™レジンはNi-NTAカラムより、より穏やかなpH、イミダゾール濃度での抽出が可能です)。EDTAなどのキレート剤を加えることにより溶出することも可能ですが、精製物にCoイオンが混じる上、組換えタンパク質が凝集しやすくなります。またこの場合、TALON™レジンの再使用ができません。

Q3 イミダゾールとpH抽出のどちらの方法で組換えタンパク質を精製すればよいのですか？

イミダゾールはヒスチジンと化学構造が似ているため、両者は拮抗的にTALON™レジンに結合します。溶出時、イミダゾールをカラムに流すことにより、Hisタグ融合タンパク質がTALON™カラムから離れ、精製されますので、穏やかな条件で使用される場合にはイミダゾール抽出をおすすめします。また溶出の前の洗浄操作で、洗浄バッファにイミダゾールを低濃度で加えることにより、非特異的な吸着を抑えた精製が可能です。組換えタンパク質の量が少ない場合には、pHを下げての精製をおすすめします。

Q4 どれぐらいの収量で精製できるのですか？

TALON™レジンは5 ~ 10 mg/mlの収量でHisタグ融合タンパク質を精製可能です。タンパク質の種類にもよりますが、Ni-NTAカラムと同等か、それ以上の収量が得られます。

Q5 TALON™レジンでの精製に適した組換え大腸菌からのタンパク質抽出法は？

TALON™ xTractor Buffer Kit(製品コード 635623)をお勧めします。この抽出バッファキットは、TALON™レジンでの精製に最適化されています。本バッファで

抽出を行う際には、抽出液の粘性を低減するために DNase I による処理を行います。DNase I の代わりに Cryonase™ Cold-active Nuclease (製品コード 2670A) を用いることにより、低温での処理が可能です。

Q6 大腸菌の培養液を直接レジンにかけることはできますか？

TALON™ CellThru Resin (製品コード 635509) を用いると、大腸菌粗抽出液(超音波破碎液)を直接レジンに加えて精製を行うことが可能です。本レジンにはビーズサイズが大きく(300 ~ 500 μm) 細胞の残渣がカラムから流出されるため、遠心による集菌操作は不要です。TALON™ Single Step Columns (製品コード 635631 など) は本レジンで充填したカラムであり、大腸菌の培養液からワンステップで His タグ融合タンパク質の精製が可能です。

Q7 TALON™ レジンは何回くらい使用可能ですか？

3 ~ 4 回使用可能です。再使用の回数が多い場合や、ライセートから EDTA や EGTA が持ち込まれた場合、Co イオンが脱落し、レジンがピンク色から白色に変色します(この状態では再使用不可)。この場合、50 mM の塩化コバルト溶液をカラムに流し、TALON™ カラムを再生することが可能です。

Q8 TALON™ レジンは、His タグ融合タンパク質以外のタンパク質も精製できますか？

His タグ以外にも HAT タグ、6 × HN タグ、その他のヒスチジン残基が立体配置として連続したアミノ酸配列をもつ融合タンパク質の精製が可能です。

6 × His 配列はタグとしては小さく、組換えタンパク質全体の構造に影響を与える可能性は少なくすみますが、組換えタンパク質が不溶性になりやすい場合があります。HAT 配列(Histidine Affinity Tag)は人工的な 6 × His タグと異なり、天然のタンパク質由来で、19 アミノ酸よりなるヒスチジン残基が立体的に隣接した配列で、総電荷が抑えられており、6 × His タグに比べ高い溶解性を示します。また、6 × HN タグは立体構造上、より金属キレートレジンに保持されやすく、分子量の大きい組換えタンパク質や発現量の少ない組換えタンパク質をより効率よく確実に精製可能です。Clontech 社では、HAT タグ、6 × HN タグをあらかじめベクターに

組み込んだ発現ベクターシステムをご用意しておりますので、それらのタグ配列を用いた効率的な精製が可能です。また、これら 3 種類のタグ配列が融合した組換えタンパク質を、特異的に検出できるウエスタンブロットキット Universal HIS Western Blot Kit (製品コード 635633) もをご用意しております。

Q9 ハイスループットな His タグ融合タンパク質の精製に適した製品はありますか？

TALON™ HT 96-Well Purification Plate (製品コード 635622) は、96 穴プレートの各ウェルにあらかじめレジンが充填されており、96 種類の異なるサンプルから 1 サンプルあたり 1 mg の His タグ融合タンパク質を 30 分間で精製可能です。

また、TALON™ Magnetic Beads (製品コード 635636) は、磁気ビーズを用いて迅速な精製を行いますので、多検体処理に適しています。精製サンプルは小容量(50 ~ 200 μl)で溶出され、最高 3 mg/ml までの濃縮サンプルが得られます。

Q10 大腸菌宿主としては、何が適していますか？

BL21 はもっとも一般的な発現用宿主です。その他、ジスルフィド結合形成が促進される Origami™* や、大腸菌でのコドンの使用頻度の制約を受ける遺伝子配列に対しても“Universal”な翻訳が可能な Rosetta™* など、多くの発現用宿主が利用できますので、目的にあわせた宿主をご使用ください。

* : 本製品は Novagen 社の製品です。

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は 23 ページをご覧ください。
[14] [15]

Takara テクニカルサポートライン

製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。
Tel. 077-543-6116 Fax. 077-543-1977