

TALON[®] Superflowを用いた迅速な1ステップIMAC精製

クロンテック（株）化学・酵素学・タンパク質精製グループ

TALON Superflow金属イオンアフィニティー樹脂を用いることにより、ポリヒスチジンタグ融合緑色蛍光タンパク質（GFP）を迅速かつ効率的に精製できることをお示しします。この樹脂は、TALON システム(1-3)の長所とSuperflow樹脂の流速の良さを組み合わせたものです。生産スケールでの使用に理想的な速い流速や高い圧力のもとで性能を発揮し、また自然落下やスピカラム精製にも利用できます。

組換えタンパク質の収率と純度は、精製操作をより速くすることにより改善されます。TALON Superflow樹脂は、速い流速で使用可能な固い多孔性アガロース（Superflow）と、ポリヒスチジン融合タンパク質を特異的に結合する固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（immobilized metal ion affinity chromatography；IMAC）リガンド（TALON）を組み合わせたもので、多くのタンパク質精製操作に利用できる優れた樹脂です。

迅速な1ステップ精製

TALON Superflowを用いることにより、最大20 cm/min (ml/cm²/min)の流速でクロマトグラフィーを行うことができます。これとは対照的に、一般的なアフィニティークロマト担体は、0.5 cm/min以上の流速にはほとんど耐えられません。速い流速でTALON Superflowを使用できるというメリットを実証するために、TALON Superflowを用いて6xHisタグGFPuv（4）を1.25 cm/minの流速で1ステップ精製しました。この流速は一般的な実験の場合の2.5倍の速さであるため、ステップ全体を45分以内に完了できました（図1）。

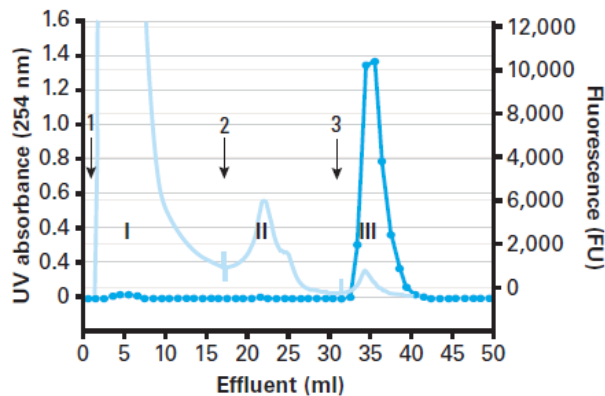


図1. TALON Superflowを用いた6xHis-GFPuvの迅速な1ステップカラム精製

6xHis-GFPuvを含む全細胞抽出液を50 mM リン酸ナトリウム-0.3 M NaCl (pH 8.0) バッファー中でカラムにローディングし（矢印1）、10 mMイミダゾールを含む同バッファーで洗浄した後（矢印2）、150 mMイミダゾールを含む同バッファーで溶出した（矢印3）。

6xHis-GFPuvを高純度かつ高収率で精製できたことを図2は示しています。レーン4からわかるように、1ステップの迅速なカラムクロマトグラフィーにより、電気泳動的に純粋なタンパク質を得ることができます。溶出画分のタンパク質濃度の分析から、ローディングした6xHis-GFPuvの95%以上が150 mMイミダゾールによる溶出で回収され（図1、ピークIII）、またローディングした総タンパク質から20倍以上精製されたことが明らかになりました。

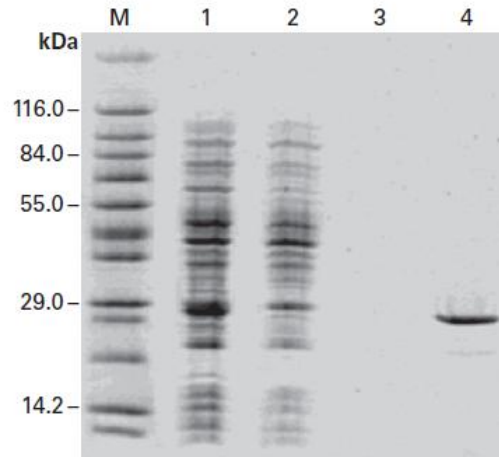


図2. TALON Superflowで精製された画分の分析

図1に示す各画分をSDS-PAGEで分析した。レーン1：細胞抽出液。レーン2：非吸着画分（ピークI）。レーン3：洗浄画分（ピークII）。レーン4：溶出画分（ピークIII）。レーンM：分子量マーカー。

TALONの利点

TALON樹脂はニッケルベースのIMAC樹脂と比べていくつかの利点があります。まず、TALON樹脂はコバルトイオンと4つの部位で配位結合していますが、ニッケルベースのIMAC樹脂の場合では配位結合の部位は一般的には3つしかありません。したがって、コバルト金属イオンは精製過程でカラムにしっかり結合しており、カラムから漏出しません（1-3）。さらに、TALONはニッケルではなくコバルトを使用しているため、ポリヒスチジン融合タンパクとの結合の特異性は非常に高く、他のタンパク質との非特異的な結合は非常に低いという利点があります（2）。これらの特長により、高い特異性と非常に低いバックグラウンドが保証されます。その結果、穏やかな条件で溶出することができ、生物活性の回収率が向上します。さらにTALONシステムでは、多くの汎用性のバッファーを使用することができます。TALON Superflowは、Superflowの優れた構造および剛性と、TALONにキレートしたコバルトイオンの特異性を兼ね備えているため、所要時間や特異性に関する問題を克服しています。

参考文献

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.

製品ガイド

- ▶ TALON[®] His タグ融合タンパク質精製樹脂