

Cytiva™ Protein Select™ resin

AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Cytiva™ Protein Select™ resin은 자가 절단 Cytiva Protein Select tag를 사용하여 재조합 단백질을 정제하는 Affinity 크로마토그래피 레진입니다.

Cytiva Protein Select resin을 이용한 Affinity 크로마토그래피 정제 단계에서 단백질과 태그 사이가 자가 절단되어 잔여 아미노산 없이 획득할 수 있습니다.

이 기술은 태그를 이용한 단백질의 정제 과정을 간소화할 수 있습니다. 이는 Affinity 결합 파트너가 없는 단백질의 공정 개발 및 이후 단계에서 정제를 표준화합니다.

주요 기능 및 장점:

- 재조합 단백질을 위한 간소화된 Affinity 정제 프로토콜
- 단백질 분해효소 또는 용출을 위한 별도의 시약이 필요 없는 one-step 정제
- 태그 절단 이후 잔여 아미노산이 없는 고순도의 단백질 획득
- 단백질 응집이나 생물학적 활성 손실을 유발하는 조건에 노출하지 않고 순한 조건에서 정제 가능
- 다양한 단백질 발현 시스템에서 사용 가능

재조합 단백질: 매우 다양한 후보물질

재조합 단백질 계열에는 효소, 스캐폴드 단백질, 호르몬, 성장인자 등과 같은 아주 다양한 유형의 후보물질이 포함되지만, 대부분 정제를 용이하게 하는 Affinity 결합 파트너가 없습니다. Affinity 정제 작업을 표준화하고 간소화할 수 있는 한 가지 전략은 재조합 단백질에 태그를 추가하는 것입니다. 종전에는 표적물질과 태그를 완벽하게 분리할 수 없었기 때문에 태그 정제는 바이오 신약의 정제가 아닌 연구 목적으로 주로 사용되었습니다. Cytiva Protein Select 기술을 통해 단백질이 태그에서 잔여 아미노산 없이 자동으로 제거되고 용출되어 신뢰도 높은 태그 정제 프로토콜을 사용할 수 있습니다.



그림 1. Cytiva Protein Select resin은 25, 100, 500 mL의 벌크 타입과 HiTrap™ pre-packed 컬럼 타입으로 제공됩니다. 향후 보다 큰 용량도 출시될 예정입니다.

Cytiva Protein Select resin 사용하기

간소화된 정제 프로토콜

Cytiva Protein Select tag가 표지된 단백질의 정제는 간단합니다.

Affinity 정제, 자가 태그 절단 및 태그 제거를 One-step 크로마토그래피로 수행할 수 있습니다. 획득한 단백질은 절단된 태그의 잔여 아미노산이 없는 고순한 상태입니다.

이 프로토콜은 단백질 분해효소를 사용할 필요가 없으며 평형화, 결합, 세척 및 용출에 동일한 버퍼를 사용할 수 있습니다.

원리

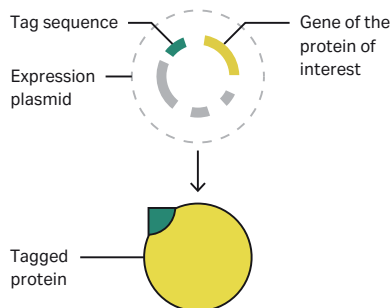
그림 2는 Cytiva Protein Select resin 및 태그를 사용하여 태그를 발현시키고 순 단백질을 획득하는 재조합 단백질 정제 방법을 설명합니다.

1. 단백질 설계 및 발현

Cytiva Protein Select tag 서열을 표적 단백질 유전자 앞에 추가한 발현 벡터를 제작합니다.

적절한 발현 시스템에서 단백질을 발현시킵니다.

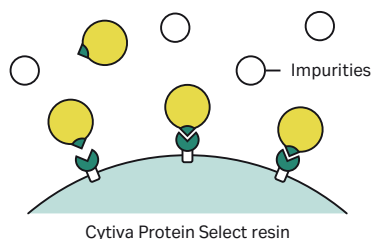
발현된 단백질이 포함된 시료를 수집합니다.



2. 결합 및 세척

시료를 Cytiva Protein Select resin에 로드합니다.

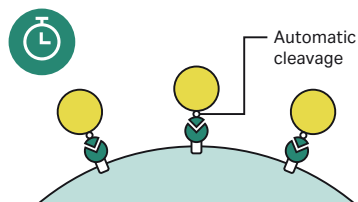
태그된 단백질이 리간드와 결합하는 동안 불순물들은 흘러내려가 세척됩니다.



3. 보류 단계

흐름을 일시 중지하고 보류 단계를 시작합니다.

이때 리간드와 태그가 접히면서, 태그가 자동으로 절단됩니다.



4. 용출

잔여 아미노산이 없이 태그가 완벽하게 제거된 순 단백질을 용출합니다.

버퍼 조성을 변경할 필요는 없지만 필요한 경우 변경할 수 있습니다.

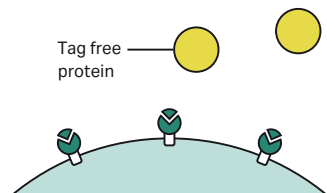


그림 2. Cytiva Protein Select 기술의 작용 방식 개요

Cytiva Protein Select tag

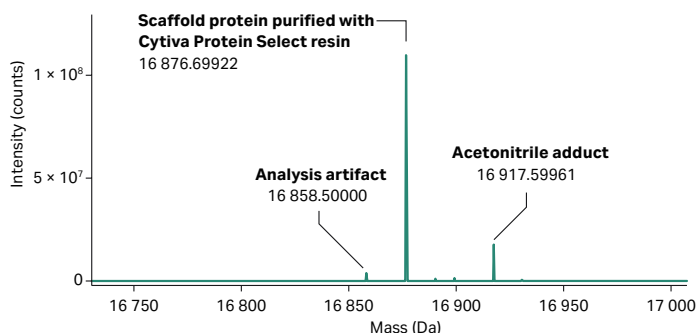
태그 특성

Cytiva Protein Select tag는 Cytiva Protein Select resin에 특이적 Affinity를 보이는 36개의 아미노산으로 구성된 태그입니다. 이 레진과 태그는 자가 절단 Cytiva Protein Select 기술의 핵심 구성 요소입니다.

잔여 아미노산이 남지 않는 태그 절단

자가 절단 후 Cytiva Protein Select tag는 표적 단백질에 아미노산을 남기지 않고 완전히 제거됩니다. 그림 3은 Cytiva Protein Select resin 및 tag를 사용하여 정제된 스캐폴드 단백질의 질량 분석을 보여줍니다. 이 질량 분석을 통해, 절단 후 얻은 단백질의 질량이 예상 질량과 정확히 동일하다는 것을 증명하고 태그의 잔여 아미노산이 없는 고유한 순 단백질임을 확인할 수 있습니다.

Deconvoluted mass spectrum



Protein mass with tag	22 141 Da
Expected protein mass after tag removal	16 876 Da
Obtained protein mass after purification with Cytiva Protein Select resin	16 876.7 Da

그림 3. 질량 분석에 따르면 단백질의 질량은 태그 절단 후 예상되는 질량과 일치합니다.

자동 절단 부위

절단 부위는 태그의 마지막 아미노산과 표적 단백질의 첫 번째 아미노산 사이에 위치합니다.

Cytiva Protein Select tag를 이용한 단백질 생산을 원하신다면:

- [cytiva.com/Protein-Select](https://www.cytiva.com/Protein-Select)에 등록하고 무료로 태그 서열을 받으시기 바랍니다.
- 태그가 표적 단백질의 N-terminus에 위치하도록 구조를 설계하시기 바랍니다.

Cytiva Protein Select resin

레진 특성

Cytiva Protein Select resin은 뛰어난 압력/흐름 특성을 제공하는 확인된 고유속 아가로스 매트릭스를 기반으로 합니다. 견고한 매트릭스를 통해 재조합 단백질 정제 공정에서 유속을 높일 수 있습니다.

Affinity 리간드

레진 기본 매트릭스에 고정된 리간드는 Cytiva Protein Select tag에 특이적인 Affinity를 갖습니다.

표 1. Cytiva Protein Select resin의 특성

Matrix	Highly cross-linked agarose
Particle size, d50V ¹	~ 60 µm
Ligand	Protein ligand derived from <i>E. coli</i>
Coupling chemistry	Epoxy
Yield ²	Up to 20 mg protein/mL resin
Chemical stability and compatibility	Stable in commonly used aqueous buffers
pH stability	Operational: 2 to 10 Regeneration/CIP: 4 M urea in 0.1 M NaOH
Recommended flow velocity ³	Recommended: 600 cm/h Maximum: 600 cm/h
Storage	2°C to 8°C, 20% ethanol
Delivery conditions	20% ethanol

¹ Median particle size of the cumulative volume distribution.

² Yield will depend on protein design and cleavage-time (hold time). Yield is the amount of cleaved target protein in the eluate.

³ Maximum bed height: 10 cm

레진 및 pre-packed 용량

Cytiva Protein Select resin은 연구 및 공정 개발 작업에 적합한 25 mL, 100 mL, 500 mL 벌크 레진 타입과 HiTrap 1 mL 및 5 mL 컬럼(HiTrap Protein Select 컬럼)으로 제공됩니다. Tricorn™ 컬럼에 Cytiva Protein Select resin을 패키징하는 방법에 대한 지침도 제공됩니다.

앞으로는 규제 지원 파일 및 리간드 누출 키트를 포함하여 임상 및 상업적 규모로 확장하기 위한 지원 및 제품이 제공될 예정입니다. 또한, 더 큰 용량의 벌크 레진 타입(1L, 5L, 10L)을 출시하여 HiScale™ 또는 AxiChrom™ 크로마토그래피 컬럼과 같은 대형 컬럼에 패키징하는데 활용할 수 있도록 할 계획입니다.

Cytiva에서는 고객 편의를 위해 요청 시 pre-packed 맞춤형 컬럼도 제공합니다. 자세한 내용은 Cytiva 영업 담당자에게 문의하시기 바랍니다.

약물 개발의 전과정에서 사용 가능한 Cytiva Protein Select 기술

초기 연구 및 약물 발견부터 공정 개발 및 GMP 제조에 이르기까지, 이 신기술은 개발 과정 전반에서 후보물질 개발의 원활한 진행을 촉진합니다.

정제 및 태그 제거 간소화

연구단계에서 태그된 단백질의 정제 작업을 수행할 때, 정제 이후 절단된 태그의 잔여 아미노산이 단백질에 남아있는 경우가 있습니다. 그러나 태그가 단백질의 형태를 변경하거나 단백질이 결정화되는 것을 방해하는 경우 단백질 기능에 영향을 미치는 위험을 낮추고 단백질 구조를 보다 잘 이해하기 위해서는 태그를 제거해야 합니다.

His-tag 또는 GST-tag와 같은 기존 태그를 사용하여 작업할 때 태그 제거 공정은 시간이 오래 걸리며, 태그 제거 후에도 태그의 일부 아미노산이 잔류합니다(그림 4). 잔여 아미노산은 잠재적으로 기능적/구조적 연구에 문제를 일으키고 결과에 영향을 미칠 수 있습니다.

Cytiva Protein Select resin을 사용하는 간단한 one-step 정제는 단백질 분해효소를 사용하지 않고 기존의 태그된 단백질 정제 프로토콜(그림 4)의 3단계(Affinity 초기정제 단계, 태그 절단 및 태그 제거)를 대체합니다. 태그된 단백질의 정제와 태그 절단은 Cytiva Protein Select resin을 사용하여 1일 이내에 완료할 수 있습니다. 기존의 다른 태그를 이용한 정제는 며칠이 걸릴 수 있습니다.

이 프로토콜은 정제 과정을 간편하고 빠르게 만들어주며, 태그의 일부 아미노산이 잔류하지 않아 단백질의 순도를 향상시킵니다. 추출한 단백질은 태그가 없는 순수한 단백질이므로, 기능적, 구조적 특성에 대한 연구의 신뢰도가 향상됩니다.

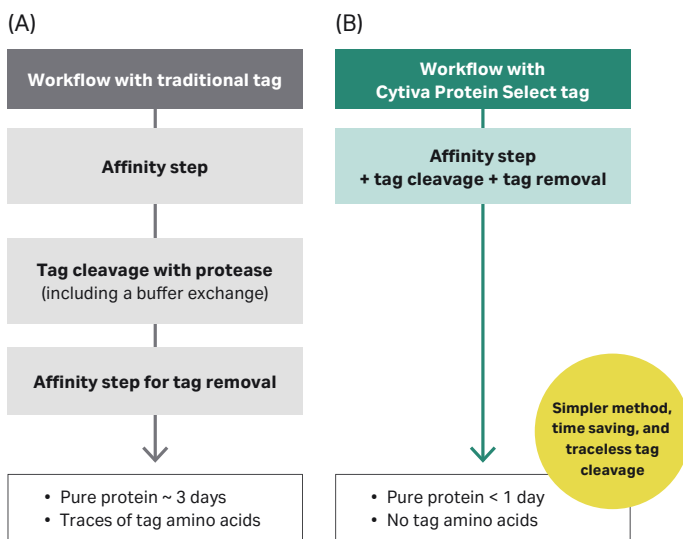


그림 4. 태그된 단백질 정제 워크플로우 비교(단계 수, 시간 및 태그의 잔여 아미노산 유무). (A) 기존 태그를 사용한 프로토콜. (B) Cytiva Protein Select tag를 사용한 프로토콜

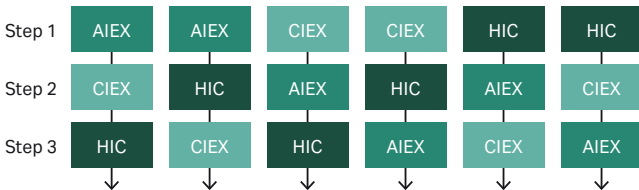
잔여 아미노산이 없는 태그 Affinity 정제 기능을 갖춘 플랫폼 공정을 통한 공정 개발 가속화

단백질에 Affinity 결합 파트너가 있는 경우 정제 공정에는 일반적으로 높은 순도(~95%)를 제공하는 Affinity 초기정제 단계가 포함될 수 있습니다. 최종 예상 순도를 얻으려면 대부분 1~2회의 폴리스싱 단계만으로도 충분합니다. 그러나 종종 재조합 단백질이 그러하듯, 단백질에 기존 Affinity 결합 파트너가 없는 경우 크로마토그래피의 첫 단계에서 효율성이 떨어집니다. 따라서 일반적으로 보다 많은 폴리스싱 단계가 필요하며, 이를 위하여 공정 개발 중에 시간과 노력이 필요합니다.

Cytiva Protein Select tag를 재조합 단백질에 추가하면 Cytiva Protein Select resin과의 Affinity 정제 작업을 통해 단백질 정제를 표준화하고 간소화하여 충분한 순도를 얻을 수 있습니다(그림 5).

공정 개발이 더욱 쉽고, 빠르고, 효율적으로 이루어집니다. 필요한 크로마토그래피 단계가 줄어들어 공정 시간과 비용이 개선됩니다.

(A) Traditional processes using nonaffinity chromatography in first step Diversity of multistep processes



(B) Platform processes with Cytiva Protein Select resin in first step

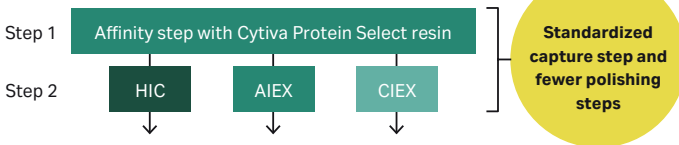


그림 5. 첫 번째 단계에서 Non-affinity 크로마토그래피(A)를 사용한 공정과 첫 번째 단계에서 Cytiva Protein Select resin(B)을 사용한 공정을 비교합니다. AIEX = 음이온 교환 크로마토그래피, CIEX = 양이온 교환 크로마토그래피, HIC = 소수성 상호작용 크로마토그래피

절단 특성

절단 속도는 주로 단백질의 아미노산, 특히 첫 1~3개 아미노산의 영향을 받습니다.

- 두 번째 위치의 소수성 아미노산 또는 방향족 아미노산은 절단 속도를 증가시킵니다.
- 첫 번째 위치의 비극성이거나 음전하를 띤 소아미노산은 절단 속도를 늦춥니다.
- 첫 번째 및/또는 두 번째 위치의 프롤린 아미노산은 절단을 중단시킵니다. 프롤린 아미노산의 점 돌연변이 수행을 권장합니다.

또한, 절단 속도는 온도와 같은 조건의 영향을 받을 수 있습니다. 일반적으로 낮은 온도에서 속도가 느려집니다.

보류 단계 시간

시료가 컬럼에 로드되고 세척 과정이 진행된 후, 절단이 일어나는 동안에는 흐름이 일시적으로 중단되는 보류 단계가 수행됩니다.

- 절단을 위한 보류 단계는 4시간 정도 권장되지만 밤새 보류 단계를 수행할 수 있습니다.
- 이 절차는 실온이나 냉장실에서 수행할 수 있습니다.
- 절단 시간은 단백질에 따라 다릅니다.

버퍼 조건

Cytiva Protein Select resin을 사용하면 단백질을 순한 조건에서 처리할 수 있으므로 생물학적 활성이 응집되거나 손실되는 조건에 노출되지 않습니다. 평형화, 결합, 세척 및 용출을 위한 전체 정제 과정에서 하나의 버퍼를 사용할 수 있습니다.

권장 버퍼

- MES (pH 6.0~6.5)
- Phosphate (pH 6.5~7.5)
- Tris (pH 7.5~9.0)

pH 6~9 범위에서 최대 1 M의 염(가능하다면 NaCl)이 보충된 20~50 mM의 버퍼 화합물을 사용하는 것이 권장됩니다.

실험시 고려사항

단백질 발현 시스템 선정

재조합 단백질 생산에 사용 가능한 발현 시스템에는 여러 다양한 유형이 있습니다. Cytiva Protein Select 기술은 유연하며 분비형 및 비분비형의 다양한 발현 시스템에 사용할 수 있습니다.

Cytiva Protein Select tag가 표지된 단백질은 포유류세포(HEK 및 CHO) 및 발현 시스템에서 발현 가능하며 단백질의 발현 수준에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났습니다.

레진 안정성 및 호환성

Cytiva Protein Select resin은 일반적으로 사용되는 수용성 버퍼 및 다양한 첨가제와 호환되며(표 2), 이러한 용액에서 일주일 동안 안정성을 유지합니다.

표 2. Cytiva Protein Select resin과 호환되는 버퍼 및 첨가제

Chemical	Concentration
MES	30 mM
HEPES (HBS-N)	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4
Phosphate buffered saline (PBS)	10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, pH 7.4
Tris	50 mM
NaCl	1 M
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.10%
Dithiothreitol (DTT)	10 mM
β -mercaptoethanol (BME)	40 mM
TCEP	10 mM
Tween 20	1%
EDTA	1 mM
DMSO	10%
Urea	4 M
Acetic acid	0.5 M
Isopropanol	30%
Ethanol	20%
Guanidine hydrochloride	4 M

단기 노출(예: 재생 및 CIP)

재생 및 CIP(clean-in-place)와 같은 단기 노출의 경우 레진은 요소 및 구아니딘 염산염과 각각 혼합한 NaOH에 안정적입니다. 표 3의 권장 농도를 참고하시기 바랍니다.

표 3. 재생 및 CIP 용액에 대한 권장 농도

Solution	Acceptable concentration
Urea combined with NaOH	4 M urea, 0.1 M NaOH
Guanidine hydrochloride combined with NaOH	4 M guanidine hydrochloride, 0.1 M NaOH

재생 및 CIP

결합 능력의 상당한 손실 없이 Cytiva Protein Select resin을 통해 다중 재생을 수행할 수 있습니다. 실제로 각 정제 후에는 태그, 절단되지 않은 단백질 및 불순물을 제거하기 위하여 레진을 재생하고 CIP(clean-in-place)를 수행해야 합니다.

Cytiva에서는 HiTrap Protein Select 1 mL 컬럼을 사용하여 반복적인 정제 주기를 통해 재생 및 CIP의 재현성을 조사했습니다. 이 연구에서는 Cytiva Protein Select tag(*대장균*에서 발현됨)로 태그된 단백질의 균질액을 사용하였으며, 단일 버퍼를 사용하고, 3시간 동안의 절단 과정을 반복적으로 수행하여 실험을 진행하였습니다. 재생 및 CIP는 4 M 요소와 100 mM NaOH를 함유한 용액을 사용하여 15분의 접촉 시간으로 매 주기마다 수행되었습니다.

그림 6은 20회의 실험 및 세척주기마다의 SDS-PAGE 결과를 보여줍니다. ImageQuant™ TL 10.1 분석 소프트웨어를 사용한 SDS-PAGE의 정량 분석 결과, 20주기 후에도 초기 수율의 80%가 유지되는 것으로 나타났습니다. 용출된 표적 단백질의 순도는 각 주기에서 90%를 초과하여 안정적으로 유지되었습니다.

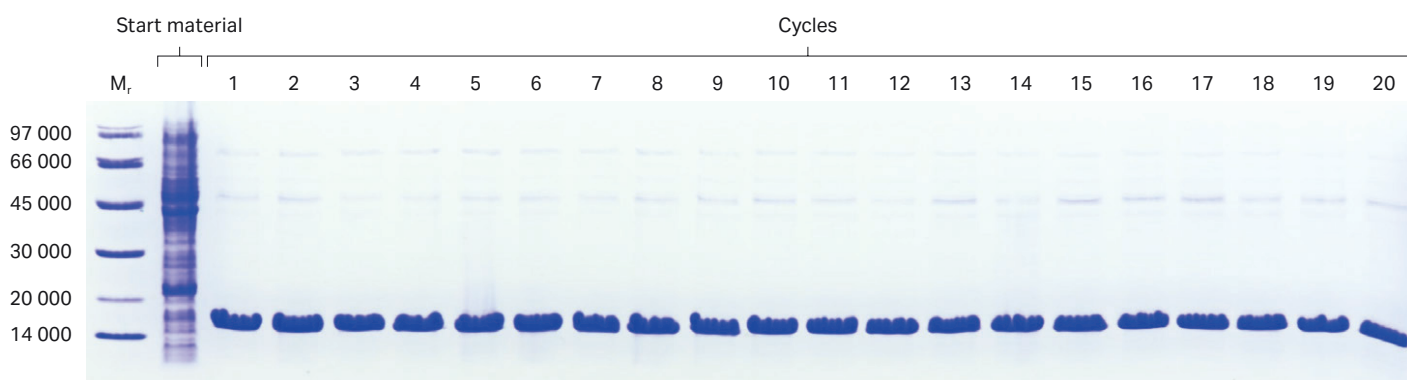


그림 6. 20회 정제 주기에서 용출된 단백질을 보여주는 SDS-PAGE 분석(환원 조건, 쿠마시 블루 염색)

응용 분야

SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인(RBD)의 one-step 정제

이 연구에서 Cytiva Protein Select resin을 사용하여 HEK293 세포에서 발현된 RBD를 정제했습니다. 태그를 N-terminus에 삽입한 후 단일 버퍼를 사용하여 Affinity 정제 작업을 수행했습니다. 태그에 잔여 아미노산이 전혀 남지 않은 상태에서 97%의 순도를 달성하였습니다(그림 7).

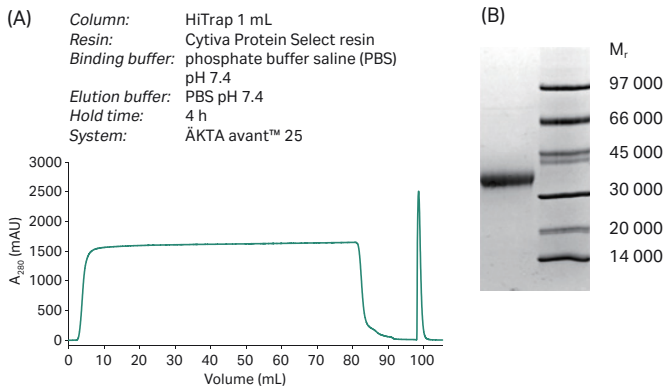


그림 7. 단백질 수율이 10 mg일 때 HiTrap™ Protein Select™ 컬럼 1 mL에 대한 RBD 정제의 크로마토그램. 해당 SDS-PAGE는 순도 97%를 보여줍니다.

히스티딘 태그 단백질 정제 프로토콜과 비교

이 연구에서 다음 두 가지 정제 프로토콜을 비교했습니다.

- Cytiva Protein Select tag를 사용한 프로토콜
 - 구성: Cytiva Protein Select tag가 표지된 인터류킨-1 β (IL-1 β) 단백질
 - 컬럼: HiTrap Protein Select 컬럼 1 mL
- His-tag를 사용한 프로토콜
 - 구성: 히스티딘 태그(His-tag)와 TEV-단백질 분해효소 절단 서열을 포함한 IL-1 β 단백질
 - 컬럼: HisTrap™ HP 1 mL

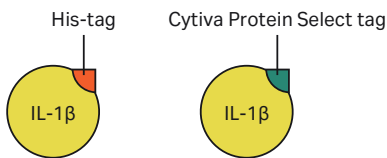


그림 8. 동일한 IL-1 β 를 His-tag 및 Cytiva Protein Select tag로 표지하고 정제 프로토콜을 비교하였습니다.

프로토콜 복잡성, 소요 시간, 획득된 순도 수준 및 태그 제거 품질을 비교하였습니다. SDS-PAGE 분석(그림 9)은 98% 이상의 순도를 갖는 태그 없는 단백질의 획득 가능성을 보여주며, 그림 10은 순 단백질을 얻고 태그를 제거하기 위하여 수행된 모든 단계를 보여줍니다. 표 4는 다음과 같은 결과를 요약하여 보여줍니다. Cytiva Protein Select tag 및 resin을 사용하는 방법은 히스티딘 태그를 사용하는 방법에 비해 시간과 노력이 적게 소요됩니다. 또한, Cytiva Protein Select 방법을 사용하면 단백질에 태그의 일부 아미노산이 남지 않는 반면, 히스티딘 태그 방법을 사용하면 태그 아미노산의 일부가 남는 것을 확인하였습니다.

Experimental conditions with Cytiva Protein Select tag methodology

Sample: IL-1 β (2nd Pro amino acid changed to Phe amino acid to improve cleavage kinetic – see Practical considerations)
Column: HiTrap Protein Select column 1 mL
Flow rate: 4 mL/min
Cleavage time: 4 h
Buffer: 2 × PBS, pH 7.4
Load: *E. coli* lysate containing IL-1 β tagged with Cytiva Protein Select tag
System: ÄKTA pure™

Experimental conditions with histidine-tag methodology

1. IMAC bind-elute affinity purification of His-tagged IL-1 β

Sample: *E. coli* lysate containing His-tagged IL-1 β
Column: HisTrap HP 1 mL
Flow rate: 1 mL/min
Binding buffer: 2 × PBS, pH 7.4
Washing buffer: 2 × PBS, 20 mM imidazole
Elution buffer: 2 × PBS, 500 mM imidazole
System: ÄKTA pure

2. Buffer exchange before tag cleavage

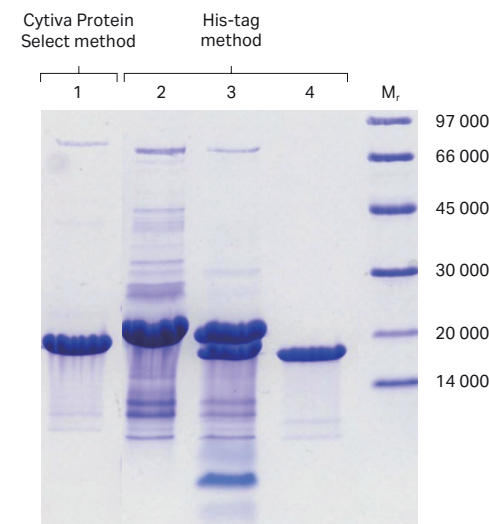
Sample: Eluted His-tagged IL-1 β in IMAC elution buffer:
2 × PBS, 500 mM imidazole
PD-10 desalting column with Sephadex™ G-25 resin
Column: PD-10 desalting column with Sephadex™ G-25 resin
Sample buffer after buffer exchange: 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5

3. Tag cleavage

Protease: His-tagged TEV protease
Tag cleavage: Sample mixture of His-tagged IL-1 β and TEV protease on end-over-end rotation
Tag cleavage buffer: 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5
Tag cleavage temperature: Cold room
Tag cleavage time: Overnight

4. IMAC flow-through purification to recover the tag-free protein

Sample: Mixture of His-tagged IL-1 β and TEV protease after cleavage
Column: HisTrap HP 1 mL
Sample loading flow rate: 0.5 mL/min
Binding and washing buffer: 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5
Column washing flow rate: 1 mL/min
Elution buffer: 2 × PBS, 500 mM imidazole
Elution flow rate: 1 mL/min



- Totally cleaved IL-1 β protein from HiTrap Protein Select column 1 mL
- His-IL-1 β purified on HisTrap HP 1 mL followed by desalting
- TEV-protease cleavage of His-IL-1 β
- IL-1 β (flow-through) from HisTrap HP containing residual amino acids

그림 9. SDS-PAGE 분석에 따르면 두 방법 모두 순도가 98%인 것으로 나타났습니다. Cytiva Protein Select 기술을 사용하는 방법은 His-tag 정제와 달리 태그 절단 후 단백질에 잔여 아미노산이 남지 않습니다(LC-MS 데이터는 제시되지 않음).

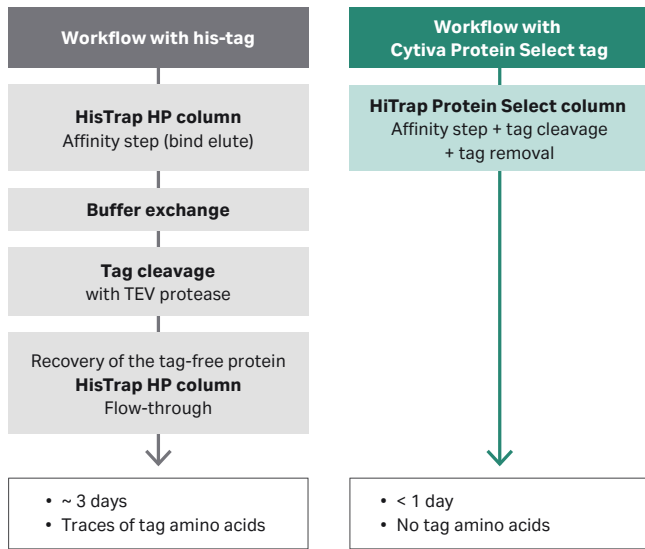


그림 10. His-tag와 Cytiva Protein Select tag를 사용하는 프로토콜의 비교

표 4. 두 방법 비교

	His-tag	Cytiva Protein Select tag
Purity level	98% (contains tag residual amino acids)	98% (no remaining residual tag amino acids)
Time	~ 3 days	< 1 day
Number of steps	4	1
Comparison	- Extra time and effort to cleave and remove the tag - Some tag amino acids stay on the protein after cleavage	- Self cleavage of the tag - Completely traceless tag cleavage

Non-affinity 정제 방법과 Cytiva Protein Select resin을 사용한 방법을 통한 공정 개발 비교

앞서 언급한 바와 같이 바이오 신약 정제 공정 시 표적 후보물질에 태그의 일부 아미노산을 남기지 않고는 태그를 제거할 수 없었기 때문에 태그의 사용은 고려된 바 없습니다. (단백질 분해효소를 사용할 때 발생하는 비용은 또 다른 장벽입니다.) 따라서 Non-affinity 크로마토그래피 단계를 조합하여 사용하는 것이 일반적이었습니다(예: HIC + CIEC + AIEC).

본 연구에서는 대장균에서 발현된 스캐폴드 단백질을 정제하기 위한 두 가지 접근법(그림 11)을 비교하였습니다.

- **Affinity 결합 파트너가 없는 재조합 단백질을 정제할 때 Non-affinity 크로마토그래피 단계를 사용하는 방법.** 이 방법은 공정 개발에서 일반적으로 사용됩니다. AIEC, 열 처리에 이어 HIC를 사용하는 방법은 적합한 정제공정을 확립하기 위한 오랜 스크리닝의 결과였습니다.

- **초기정제 단계에서 Cytiva Protein Select resin 사용 방법**

공정 개발에 소요되는 복잡성과 시간을 비교하였습니다.

표적 단백질은 단일 도메인 단백질(17 kDa)로, 고온에서도 안정성을 유지합니다(최대 75°C).

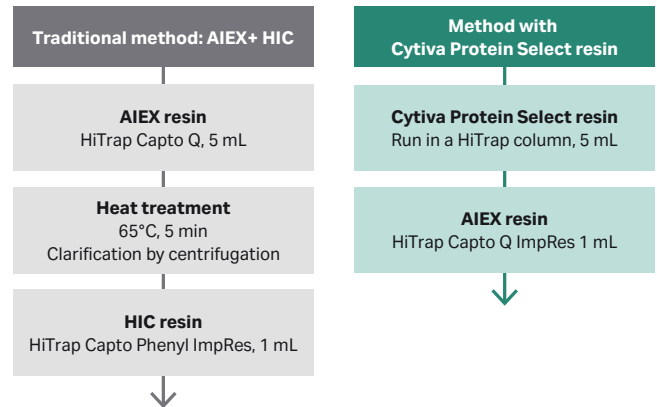


그림 11. 방법 평가의 병렬 제시

표 5에는 비교사항이 요약되어 있습니다. 전반적으로 첫 번째 단계에 Cytiva Protein Select resin을 사용함으로써 보다 높은 수준의 순도에 도달하는 방법을 더 쉽고 빠르게 개발할 수 있었습니다.

이 공정을 개발하는 데 필요한 시간이 보다 짧기 때문에 실험실에서는 전임상 연구에 사용되는 후보물질의 수를 늘리는 것을 고려할 수 있습니다.

표 5. 두 방법 비교

	AIEC + HIC	Cytiva Protein Select resin + AIEC
Convenience	- Developing a HIC chromatography step required extensive screening and optimization. - Required the addition of a non-chromatography step (heat treatment).	- This affinity chromatography does not require optimization. - No need for buffer screening.
Time spent for developing the process	Developing the full process was two times faster when Cytiva Protein Select resin was used in the first step	
Purity level	95%	Close to 100%

그림 12는 첫 번째 크로마토그래피 단계로 AIEC를 사용한 후 열 처리한 다음 두 번째 크로마토그래피 단계로 HIC를 사용한 방법의 결과를 보여줍니다. 획득된 순도 수준은 목표 수준인 95%였습니다. 단백질이 보다 높은 순도 수준에 도달하려면 추가 폴리싱 단계가 필요하며, 이로 인해 공정 개발에 소요되는 시간이 늘어나게 됩니다.

그림 13은 Cytiva Protein Select resin을 사용한 후 AIEC를 사용한 방법의 결과를 보여줍니다. 순도 수준은 거의 100%였습니다. 질량분석 수행 시 태그 제거 후 예상된 질량과 정확히 일치했으며, 절단 후 고유한 순 단백질을 획득했습니다(그림 3 참고).

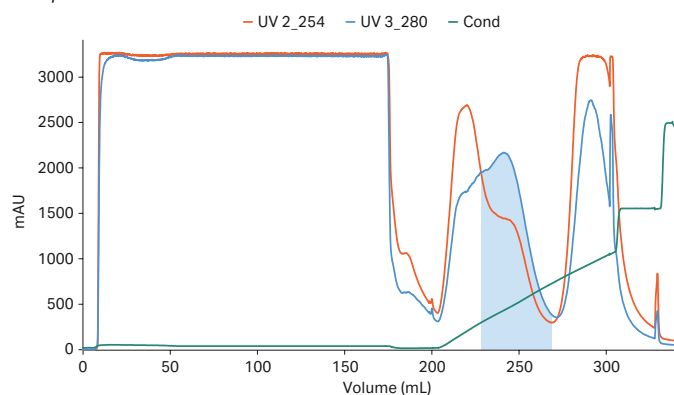
기존 방법: AIEX + 열 처리 + HIC

Anion exchange chromatography

Column: HiTrap Capto™ Q 5 mL

Flow rate: 5 mL/min

Sample load: 150 mL



Hydrophobic interaction chromatography

Column: HiTrap Capto Phenyl ImpRes 1 mL

Flow rate: 1 mL/min

Sample load: 38 mL

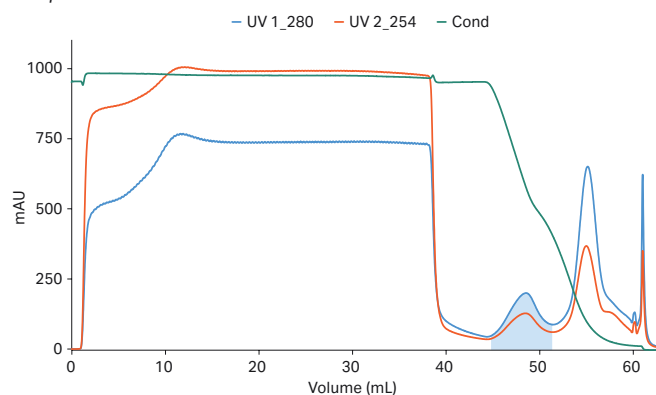


그림 12. AIEX 및 HIC 단계에 대한 크로마토그램(파란색 영역은 표적 단백질을 포함하는 분획에 해당). AIEX와 HIC 단계 사이에 열 침전 단계가 적용되었습니다. HIC 단계 이후에 얻은 순도는 95%였습니다.

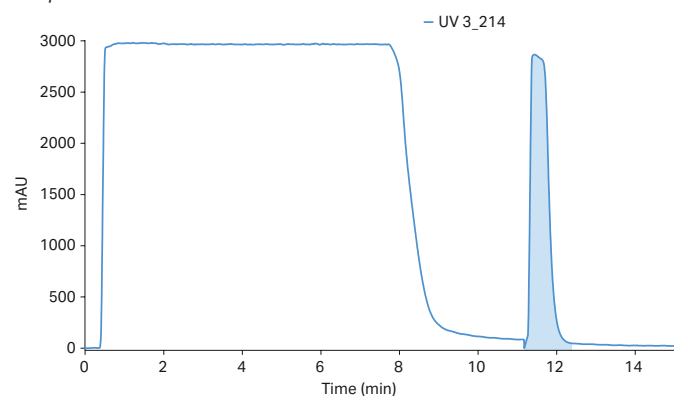
Cytiva Protein Select resin을 사용한 방법

Affinity chromatography

Column: HiTrap Protein Select column 5 mL

Flow rate: 5 mL/min

Sample load: 40 mL



Anion exchange chromatography

Column: HiTrap Capto Q ImpRes 1 mL

Flow rate: 1 mL/min

Sample load: 4 mL

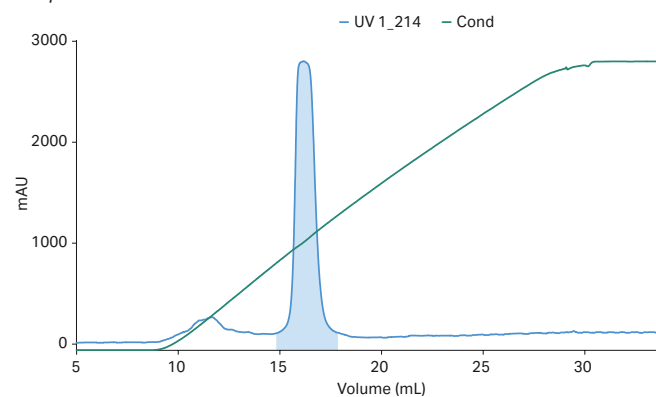


그림 13. Cytiva Protein Select resin을 사용한 Affinity 정제 작업 및 AIEX 단계에 대한 크로마토그램(파란색 영역은 표적 단백질을 포함하는 분획에 해당). AIEX 단계 이후에 얻은 순도는 거의 100%였습니다.

Cytiva Protein Select resin과 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 결합

Cytiva Protein Select resin을 통해 Affinity 크로마토그래피를 사용하여 one-step에서 고순도 단백질을 얻을 수 있음을 확인하였습니다. 그러나 아주 높은 순도가 요구되는 응용 분야에서는 추가적인 정제 단계가 필요할 수 있습니다.

한 연구에서 우리는 Cytiva Protein Select tag가 표지된 인터류킨-1 β (IL-1 β) 단백질을 정제하였습니다. Cytiva Protein Select resin을 사용하여 Affinity 정제 작업을 수행한 후에 얻은 순도는 그림 14에 제시된 대로 96.2%였습니다. 용출에서 총 6.3 mg의 단백질이 수집되었습니다.

Column: HiTrap Protein Select 1 mL
Sample: *E. coli* lysate containing Interlukin-1 β tagged with Cytiva Protein Select tag
System: ÄKTA pure 25
Buffer: 30 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5
Cleavage time: 4 h
Purity analysis: Analytical SEC and SDS-PAGE

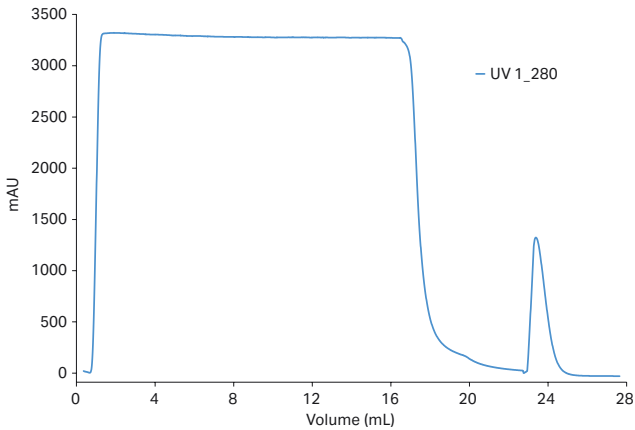


그림 14. Cytiva Protein Select resin을 사용하여 인터류킨-1 β 를 정제 시 순도 96.2%

이 응용 분야에서는 보다 높은 수준의 순도가 필요하였기 때문에 수율 손실 가능성에도 불구하고 크기 배제 크로마토그래피 단계가 폴리싱 단계로 추가되었습니다. Superdex™ 75 Increase resin의 분자량 분획 범위는 3,000~70,000 Da이므로 대부분의 재조합 단백질 및 크기가 작은 단백질 정제에 적합합니다.

그림 15에서 볼 수 있듯이 HiScale 16/40 컬럼에 패킹된 Superdex 75 Increase resin에서 시료를 분석한 후 얻은 순도는 99.8%였습니다. 이 과정을 통해 얻은 인터류킨-1 β 단백질의 수율은 5.3 mg이었습니다.

정제 첫 단계에서 Cytiva Protein Select resin을 사용하였을 때 순도는 96.2%로, 많은 응용 분야에 적합합니다. 보다 높은 순도가 필요할 경우 이 사례 연구에 제시된 대로 크기 배제 크로마토그래피 단계를 추가할 수 있으며, 이때 최종 순도는 99.8%였습니다. 두 단계의 높은 순도는 그림 16에 제시된 SDS-PAGE에서 관찰할 수 있습니다.

Sample: Cleaved Interleukin-1 β purified with Cytiva Protein Select resin
Column: HiScale 16/40 Superdex 75 Increase
System: ÄKTA pure 25
Buffer: 30 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5
Purity analysis: Analytical SEC and SDS-PAGE

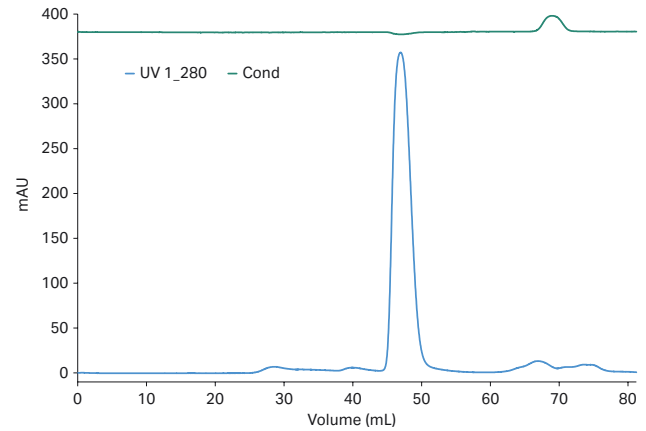


그림 15. SEC 단계 후 순도 99.8%

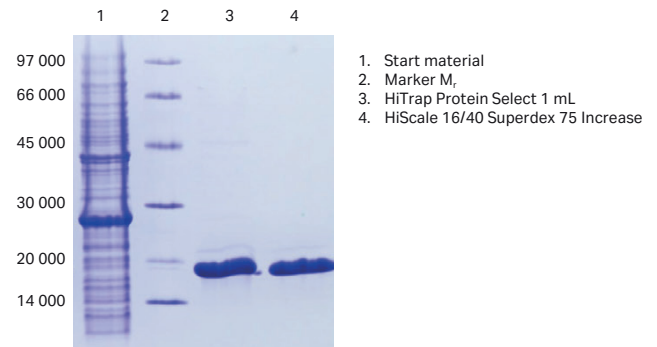


그림 16. HiTrap Protein Select 컬럼(레인 3)에서 Affinity 정제와 절단 및 Superdex 75 Increase resin(레인 4)을 이용한 SEC 후 시료의 SDS-PAGE

추가 정보

- Top challenges in recombinant protein purification process development
- Tag affinity chromatography challenges faced by researchers today

주문 정보

Format	Volume	Product code
Bulk resin	25 mL	17542101
	100 mL	17542102
	500 mL	17542103
HiTrap column	1 × 1 mL	17542151
	5 × 1 mL	17542152
	1 × 5 mL	17542153
	5 × 5 mL	17542154

Cytiva Protein Select tag

태그 서열 무료 제공

QR 코드를 스캔하거나 [cytiva.com/Protein-Select](https://www.cytiva.com/Protein-Select)를 방문하시면, 태그 서열을 이메일로 보내드립니다.



cytiva.com

Cytiva and the Drop logo are trademarks of Life Sciences IP Holdings Corporation or an affiliate doing business as Cytiva. ÄKTA, ÄKTA avant, ÄKTA pure, AxiChrom, Capto, HiScale, HisTrap, HiTrap, ImageQuant, Protein Select, Sephadex, Sepharose, Superdex, and Tricorn are trademarks of Global Life Sciences Solutions USA LLC or an affiliate doing business as Cytiva.

Coomassie is a trademark of Thermo Fisher Scientific. Tween is a trademark of Croda Group of Companies. Any other third-party trademarks are the property of their respective owners.

Memo 30070145

© 2023 Cytiva

For local office contact information, visit [cytiva.com/contact](https://www.cytiva.com/contact)

CY38320-05Dec23-DF

