

단백질 정제 최적화를 위해 크로마토그래피 기법 결합

적절한 순도와 수율을 얻기 위한 일반적인 정제 프로토콜

항체 정제

3페이지

His-tag
융합 단백질
정제

4페이지

태그가 없는
단백질 정제

5페이지

이 빠른 안내서는 다음과 같이 초기 정제(capture), 중간 정제(intermediate purification), 최종 정제(polishing) 단계로 이루어진 정제 전략에 기반하여 체계적인 방식으로 정제 프로토콜을 설계하는 데 도움이 됩니다.

- 초기 정제 단계에서는 단백질을 분리, 농축 및 안정화함
- 중간 정제에서 대량의 오염물 제거
- 최종 정제 단계에서는 표적 단백질의 응집체와 같은 가장 까다로운 불순물을 제거

이 문서에 나와 있는 일반적인 프로토콜(권장 제품 포함)은 방법 개발 시 좋은 출발점이 될 수 있습니다.

이것들은 순도/수율 균형을 극대화하기 위해 Cytiva의 R&D 팀에서 테스트를 거쳤습니다.

사용 가능한 전체 제품군을 보려면 [cytiva.com](https://www.cytiva.com)을 방문하세요.

시작하기 전 점검표

1 필요한 순도 수준 정의

대표적인 애플리케이션	순도 수준
질량 분석 예방 접종용 항원	보통에서 높음, 80%~90%
기능적 연구 구조적 연구	매우 높음, 95%~99%
구조적 연구 치료용 단백질	제일 높음 > 99%

2 정제 진행 상황을 추적할 수 있는 분석적인 평가 방법을 개발했는지 확인

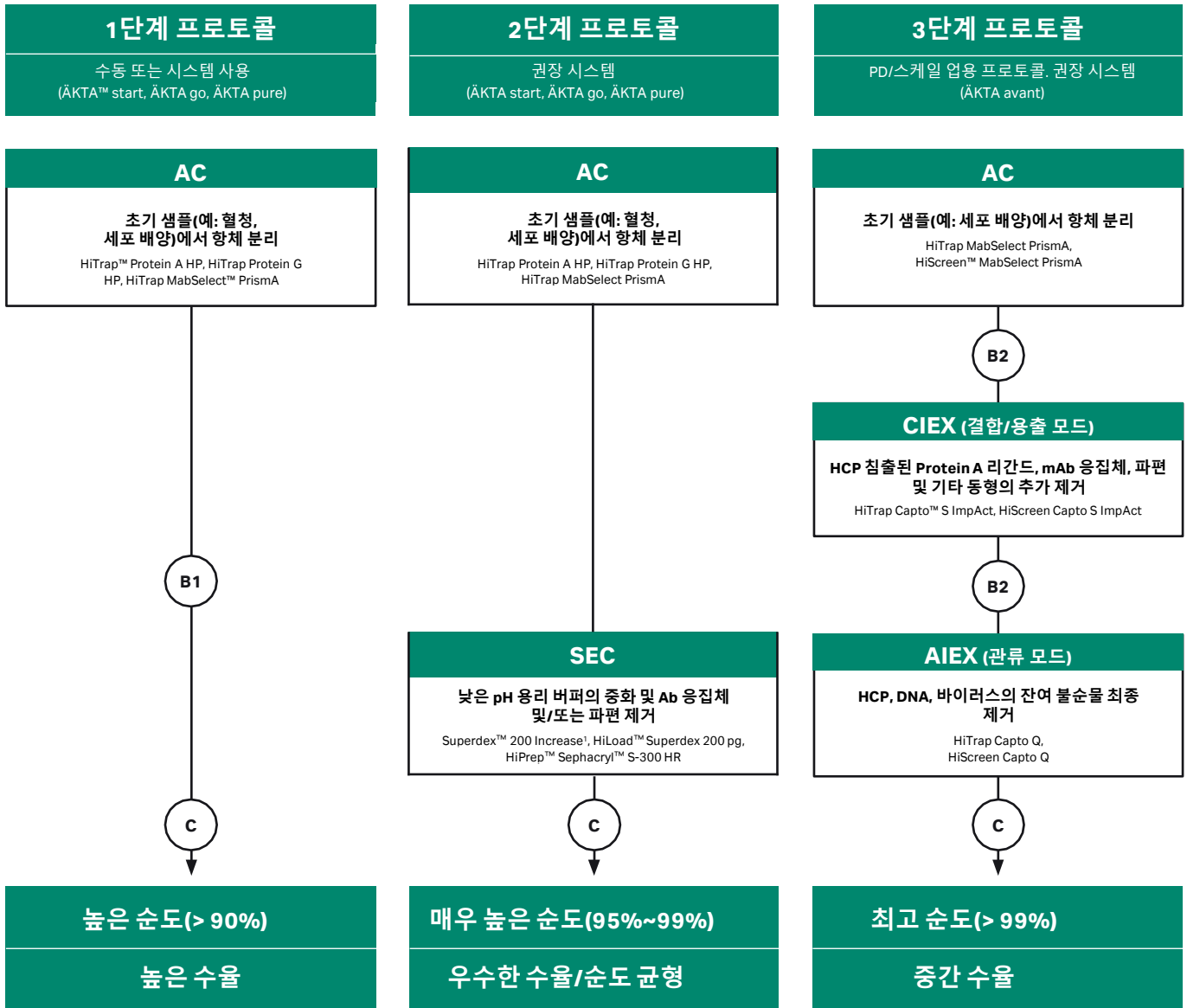
3 예상되는 순도/수율 균형을 얻기 위해 최소한의 단계로 논리적인 방식으로 기술을 결합하십시오. 필요로 하는 단백질 순도가 높을수록 작업 흐름에 더 많은 정제 단계를 적용해야 합니다. 그러나 크로마토그래피 단계를 추가하면 순도는 높아지지만 활성 단백질의 수율은 감소한다는 점에 유의하십시오.

4 활동 감소 방지: 4°C에서 빠르게 작업하고 프로테아제를 조기에 제거하십시오.

사용된 약어

AC = 친화성 크로마토그래피
 AIEEX = 음이온 교환 크로마토그래피
 CIEEX = 양이온 교환 크로마토그래피
 HCP = 숙주 세포 단백질
 HIC = 소수성 상호 작용 크로마토그래피
 IEX = 이온 교환 크로마토그래피
 IMAC = 고정화 금속 이온 친화성 크로마토그래피
 PD = 프로세스 개발
 SEC = 크기 배제 크로마토그래피

항체 정제



Ab 정제를 위해 Protein A 아니면 Protein G를 사용할 것인가?

Protein G: 실험실 규모의 범용 항체 초기 정제에 적합한 첫 번째 선택입니다.

Protein A/PrismaA: 일반적으로 인간 단클론 항체를 정제하거나 제조 규모 애플리케이션을 위한 공정을 개발할 때 선호됩니다.

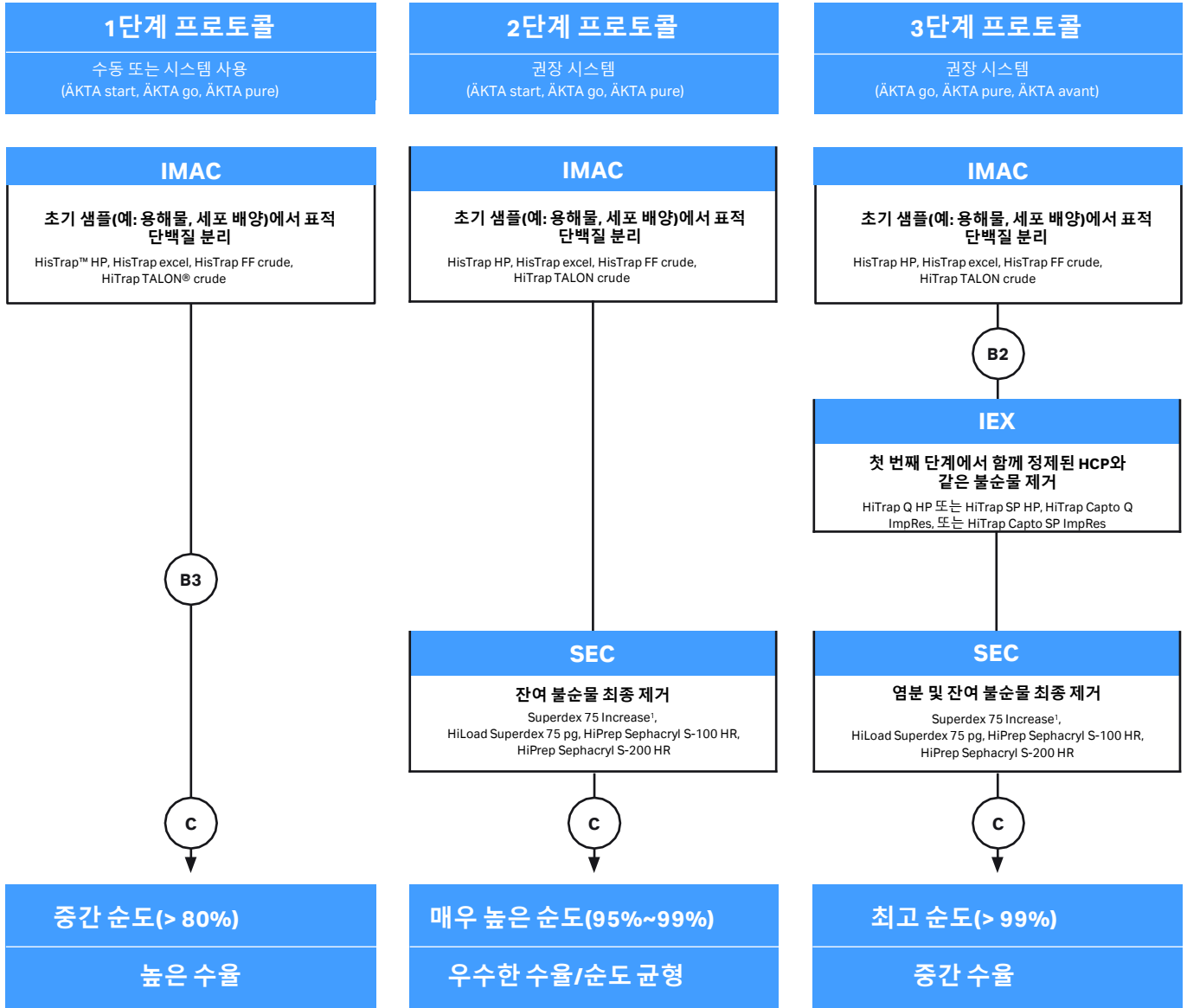
다양한 소스 또는 배치에서 여러 유형의 항체를 정제하는 경우라면?

HiTrap MabSelect PrismaA columns: 1.0M NaOH로 효율적으로 세척하여 교차 오염의 위험을 최소화하면서 컬럼을 재사용할 수 있습니다. 항체 회수는 NaOH 세척의 영향을 받지 않습니다.

¹Superdex Increase 컬럼은 ÄKTA start와 함께 사용할 수 없습니다. ÄKTA go, ÄKTA pure 및 ÄKTA avant를 권장합니다.

- B1** 낮은 pH Ab 용리 버퍼를 중화하기 위한 버퍼 교환.
(PD-10 Desalting, HiTrap Desalting 컬럼)
 - B2** IEX 준비를 위한 버퍼 교환.
(HiTrap Desalting, HiPrep 26/10 Desalting 컬럼)
 - C** 샘플 부피 감소를 위한 농축. SEC 전에 수행될 수도 있음.
(Vivaspin™ Sample Concentrators)
- 원 안의 단계는 선택 사항이며 필요한 경우 적용됩니다.

His-tag 융합 단백질 정제



이미다졸 농도: 순도/수율 균형이 중요합니다.

- 순도를 높이려면: 샘플 및 결합 버퍼에 고농도 이미다졸(> 20mM)을 사용
- 수율을 높이려면: 샘플 및 결합 버퍼에 이미다졸을 사용하지 않거나 낮은 농도(0~5 mM)로 사용

니켈 컬럼의 색이 녹색에서 매우 밝은 색으로 바뀌었는가?

샘플에 니켈 박리제가 포함되어 있을 수 있습니다. 니켈 이온이 강하게 결합된 레진이 포함된 HisTrap excel 컬럼을 선택합니다.

¹Superdex Increase 컬럼은 ÄKTA start와 함께 사용할 수 없습니다. ÄKTA go, ÄKTA pure 및 ÄKTA avant를 권장합니다.

B2

IEX 준비를 위한 버퍼 교환.
(HiTrap Desalting, HiPrep 26/10 Desalting columns)

B3

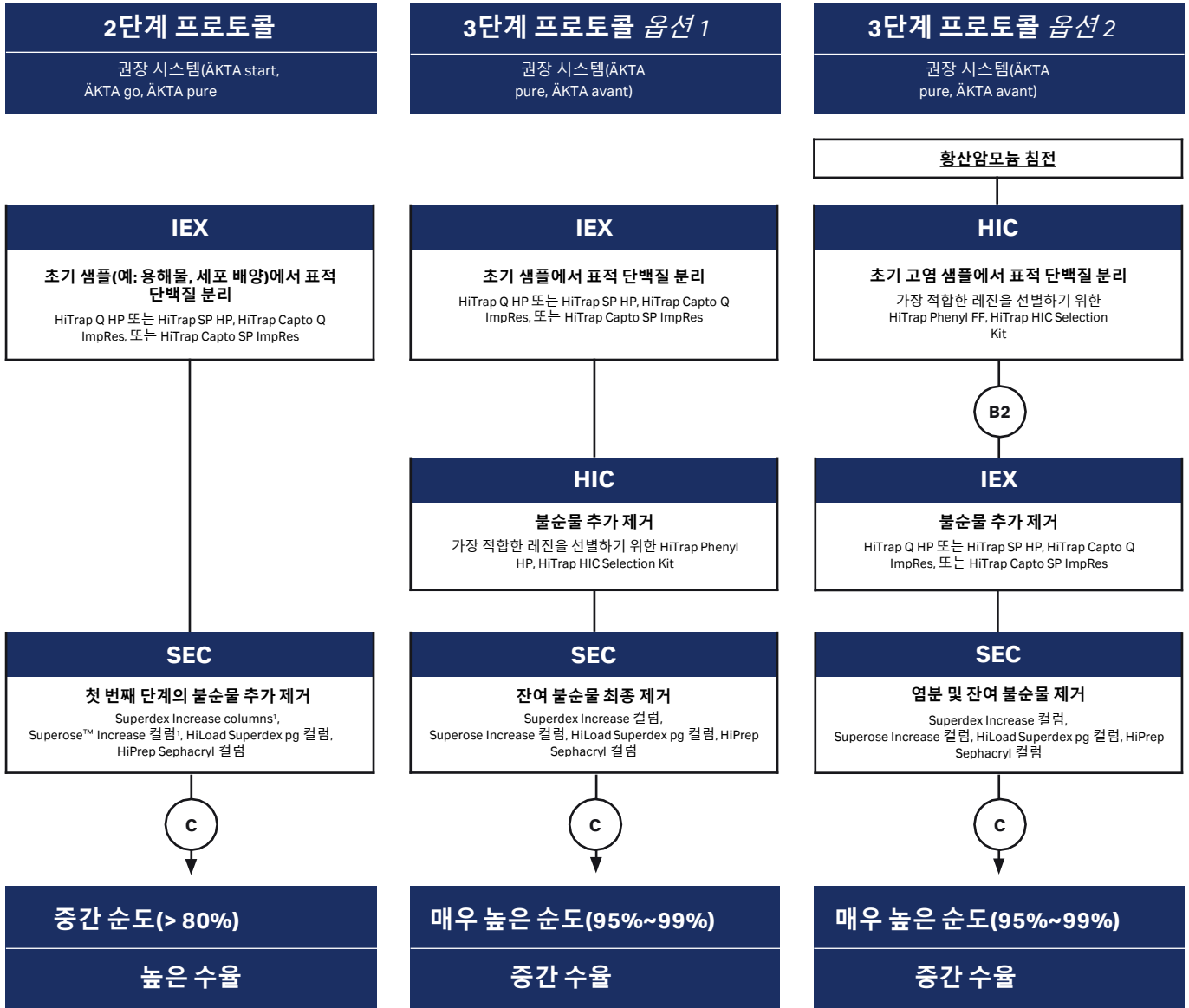
이미다졸 또는 염분을 제거하기 위한 버퍼 교환.
(PD-10 Desalting, HiTrap Desalting 컬럼)

C

샘플 부피 감소를 위한 농축. SEC 전에 수행될 수도 있음. (Vivaspin Sample Concentrators)

원 안의 단계는 선택 사항이며 필요한 경우 적용됩니다.

태그가 없는 단백질 정제



3단계 프로토콜에서 황산암모늄 침전을 사용하는 이유가 무엇일까요?

황산암모늄은 초기 샘플 농축 및 정화에 사용됩니다. 이는 변성 없이 단백질을 안정화시킵니다. 샘플에는 고농도 염분이 포함되며 추가 준비 없이 HIC 컬럼에 바로 적용할 수 있습니다.

IEX 기법을 결합하는 것은 어떨까요?

IEX는 양이온(CIEX) 또는 음이온(AIEX) 교환기를 사용하여 서로 다른 성질을 제공하는 방법입니다. 따라서 CIEX와 AIEX의 조합을 포함하도록 정제 프로토콜을 설계할 수 있습니다. IEX 컬럼의 순서는 표적 단백질의 등전점(pI)과 제거하려는 오염물에 따라 달라집니다. 첫 번째 컬럼은 표적 단백질의 결합 및 농축에 사용하고 두 번째 컬럼은 (표적 단백질이 통과하는) 나머지 오염물의 결합에 사용해 보십시오.

B2 IEX 준비를 위한 버퍼 교환.
(HiTrap Desalting, HiPrep 26/10 Desalting 컬럼)

C 샘플 부피 감소를 위한 농축. SEC 전에 수행될 수도 있음.
(Vivaspin Sample Concentrators)

원 안의 단계는 선택 사항이며 필요한 경우 적용됩니다.

¹Superdex Increase 컬럼은 ÄKTA start와 함께 사용할 수 없습니다. ÄKTA go, ÄKTA pure 및 ÄKTA avant를 권장합니다.

ÄKTA 시스템을 사용자를 위한 권장 사항

프로토콜 지침에 사전 정의된 방법 사용

1 방법 생성¹

Method editor(방법 편집기)에서 **File: New method**(파일: 새 방법)를 선택하여 애플리케이션에 따라 사전 정의된 방법을 선택합니다.

2 방법 조정

Phase properties(단계 속성) 탭에서 다음을 선택하여 조건에 맞게 방법을 조정하십시오.

- **Method settings**(방법 설정) 단계의 컬럼
- **Method settings**(방법 설정) 단계의 컬럼 위치
- **Elution**(용리) 단계에서 분획 방법

3 ÄKTA 준비

컬럼, 샘플, 버퍼, 튜브 및 구성 요소로 ÄKTA 시스템을 설정합니다.

4 방법 실행

- 생성된 방법을 **Method navigator**(방법 탐색기)의 **System control**(시스템 컨트롤) 탭에서 실행
- **Run**(실행) 버튼을 클릭하여 방법을 실행

¹ ÄKTA go, ÄKTA pure 및 ÄKTA avant와 관련되어 있습니다. ÄKTA start의 경우, 동일한 단계가 적용되지만 소프트웨어 용어의 이름이 다르게 지정됩니다.



컬럼 패키지로 빠르게 시작하기

컬럼을 빠르고 쉽게 선택할 수 있도록 다음과 같이 정제 요구 사항에 맞는 컬럼 패키지를 사용할 수 있습니다.

- 패키지에는 시작 시간을 단축할 수 있도록 사전 패키징된 사용자 친화적인 컬럼이 포함되어 있음
- 신뢰할 수 있는 정제 결과를 위한 고성능 레진이 담긴 컬럼
- 항체, His-tag, GST 태그 및 태그가 없는(네이티브) 단백질의 정제에 사용 가능



권장 사전 패키징된(prepacked) 컬럼에 대한 주문 정보

항체 정제

	기법	제품 이름	제품 코드
1단계 프로토콜	AC	항체 패키지, 최신 Protein A(1단계 프로토콜) ¹	29497628
		항체 패키지, protein A ²	29058805
		항체 패키지, protein G ³	29058806
	AC	HiTrap MabSelect PrismaA 1 × 1 mL	17549851
		HiTrap Protein A HP 1 × 1 mL	29048576
		HiTrap Protein G HP 1 × 1 mL	29048581
	B1	PD-10 Desalting columns	17085101
		HiTrap Desalting 1 × 5 mL	29048684
2단계 프로토콜	AC + SEC	항체 패키지, 최신 Protein A(2단계 프로토콜) ⁴	29497629
	AC	HiTrap MabSelect PrismaA 1 × 1 mL	17549851
		HiTrap Protein A HP 1 × 1 mL	29048576
		HiTrap Protein G HP 1 × 1 mL	29048581
	SEC	HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR	17116701
		HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	28989335
		Superdex 200 Increase 10/300 GL	28990944
3단계 프로토콜	AC	HiTrap MabSelect PrismaA 1 × 1 mL	17549851
		HiScreen MabSelect PrismaA	17549815
	CIEX	HiTrap Capto S ImpAct 1 × 1 mL	29400459
		HiScreen Capto S ImpAct	17371747
	AIEX	HiTrap Capto Q 1 × 1 mL	29401107
		HiScreen Capto Q	28926978
	B2	HiTrap Desalting 1 × 5 ml	29048684
		HiPrep 26/10 Desalting	17508701
모든 프로토콜	C	Vivaspin Sample Concentrators	Cytiva.com 참조

¹ HiTrap MabSelect PrismaA 1 × 1 mL, HiTrap Desalting 1 × 5 mL 포함
² HiTrap Protein A HP 1 × 1 mL, HiTrap Desalting 1 × 5 mL 포함
³ HiTrap Protein G HP 1 × 1 mL, HiTrap Desalting 1 × 5 mL 포함
⁴ HiTrap MabSelect PrismaA 1 × 1 mL, HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR 1 × 120 mL 포함

His-tag 융합 단백질 정제

	기법	제품 이름	제품 코드
1단계 프로토콜	IMAC	태그가 있는 패키지, His ⁵	29058803
	IMAC	HisTrap HP 1 × 1 mL	29051021
		HiTrap TALON crude 1 × 1 mL	29048565
		HisTrap excel 1 × 1 mL	29048586
		HisTrap FF crude 1 × 1 mL	29048631
	B3	PD-10 Desalting columns	17085101
HiTrap Desalting 1 × 5 mL		29048684	
2단계 프로토콜	IMAC + SEC	태그가 있는 패키지, His(2단계 프로토콜) ⁶	29497630
	IMAC	HisTrap HP 1 × 1 mL	29051021
		HiTrap TALON crude 1 × 1 mL	29048565
		HisTrap excel 1 × 1 mL	29048586
		HisTrap FF crude 1 × 1 mL	29048631
	SEC	Superdex 75 Increase 10/300 GL	29148721
		HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	28989333
		HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	17116501
		HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	17116601
	3단계 프로토콜	IMAC	HisTrap HP 1 × 1 mL
HiTrap TALON crude 1 × 1 mL			29048565
HisTrap excel 1 × 1 mL			29048586
HisTrap FF crude 1 × 1 mL			29048631
IEX		HiTrap Q HP 1 × 1 mL	29051325
		HiTrap SP HP 1 × 1 mL	29051324
		HiTrap Capto Q ImpRes 1 × 1 mL	29400462
		HiTrap Capto SP ImpRes 1 × 1 mL	29400460
SEC		Superdex 75 Increase 10/300 GL	29148721
		HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	28989333
		HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	17116501
		HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	17116601
B2		HiTrap Desalting 1 × 5 mL	29048684
		HiPrep 26/10 Desalting	17508701
모든 프로토콜	C	Vivaspin Sample Concentrators	Cytiva.com 참조

⁵HisTrap HP 1 × 1 mL, HiTrap TALON crude 1 × 1 mL, HiTrap Desalting 1 × 5 mL 포함

⁶HisTrap HP 1 × 1 mL, HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR 1 × 120 mL 포함

태그가 없는 단백질 정제

	기법	제품 이름	제품 코드
2단계 프로토콜	IEX + SEC	태그가 없는 패키지 ⁷	29497631
	IEX	HiTrap Q HP 1 × 1 mL	29051325
		HiTrap SP HP 1 × 1 mL	29051324
		HiTrap Capto Q ImpRes 1 × 1 mL	29400462
		HiTrap Capto SP ImpRes 1 × 1 mL	29400460
	SEC	컬럼 선택은 단백질의 분자량에 따라 다름	cytiva.com 참조
3단계 프로토콜 옵션 1	IEX	HiTrap Q HP 1 × 1 mL	29051325
		HiTrap SP HP 1 × 1 mL	29051324
		HiTrap Capto Q ImpRes 1 × 1 mL	29400462
		HiTrap Capto SP ImpRes 1 × 1 mL	29400460
	HIC	HiTrap Phenyl HP 5 × 1 mL	17135101
		HiTrap HIC Selection Kit	28411007
	SEC	컬럼 선택은 단백질의 분자량에 따라 다름	cytiva.com 참조
3단계 프로토콜 옵션 2	HIC	HiTrap Phenyl FF (high sub) 5 × 1 mL	17135501
		HiTrap HIC Selection Kit	28411007
	IEX	HiTrap Q HP 1 × 1 mL	29051325
		HiTrap SP HP 1 × 1 mL	29051324
		HiTrap Capto Q ImpRes 1 × 1 mL	29400462
		HiTrap Capto SP ImpRes 1 × 1 mL	29400460
	SEC	컬럼 선택은 단백질의 분자량에 따라 다름	cytiva.com 참조
	B2	HiTrap Desalting 1 × 5 mL	29048684
		HiPrep 26/10 Desalting	17508701
	C	Vivaspin Sample Concentrators	cytiva.com 참조

⁷ HiTrap Capto Q ImpRes 1 × 1 mL, HiTrap Capto SP ImpRes HP 1 × 1 mL, HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR 1 × 120 mL 포함

더 많은 단백질 정제 리소스

cytiva.com/proteinresearch를 방문하세요



Cytiva 핸드북 모음

cytiva.com/handbooks



대화형 컬럼 선택기

cytiva.com/purify-app



온라인 숍

cytiva.com/shop



cytiva.com/proteinresearch

Cytiva 와 Drop 로고는 Global Life Sciences IP Holdco LLC 또는 그 계열사의 상표입니다. ÄKTA, Capto, HiPrep, HiTrap, HiLoad, HiTrap, HiScreen, MabSelect, MabSelect SuRe, Sephacryl, Superdex 및 Superose는 Global Life Sciences Solutions USA LLC 또는 Cytiva로 사업을 영위하는 그 계열사의 상표입니다.

TALON은 Clontech Laboratories Inc.의 등록 상표이며, Vivaspin은 Sartorius Stedim Biotech GmbH의 상표입니다. 모든 타사 상표는 각 소유자의 자산입니다.
IMAC Sepharose 제품, Ni Sepharose 제품 및 Fe Sepharose 제품의 경우, 이 제품들은 Sigma-Aldrich의 특허 번호 EP 1276716(금속 킬레이트 조성물) 및 기타 국가에서 동등한 특허 및 특허 출원에 따른 라이선스에 따라 판매됩니다.

© 2020 Cytiva

현지 사무소 연락처 정보는 cytiva.com/contact에서 확인하세요.

CY14037-04Nov20-FL

