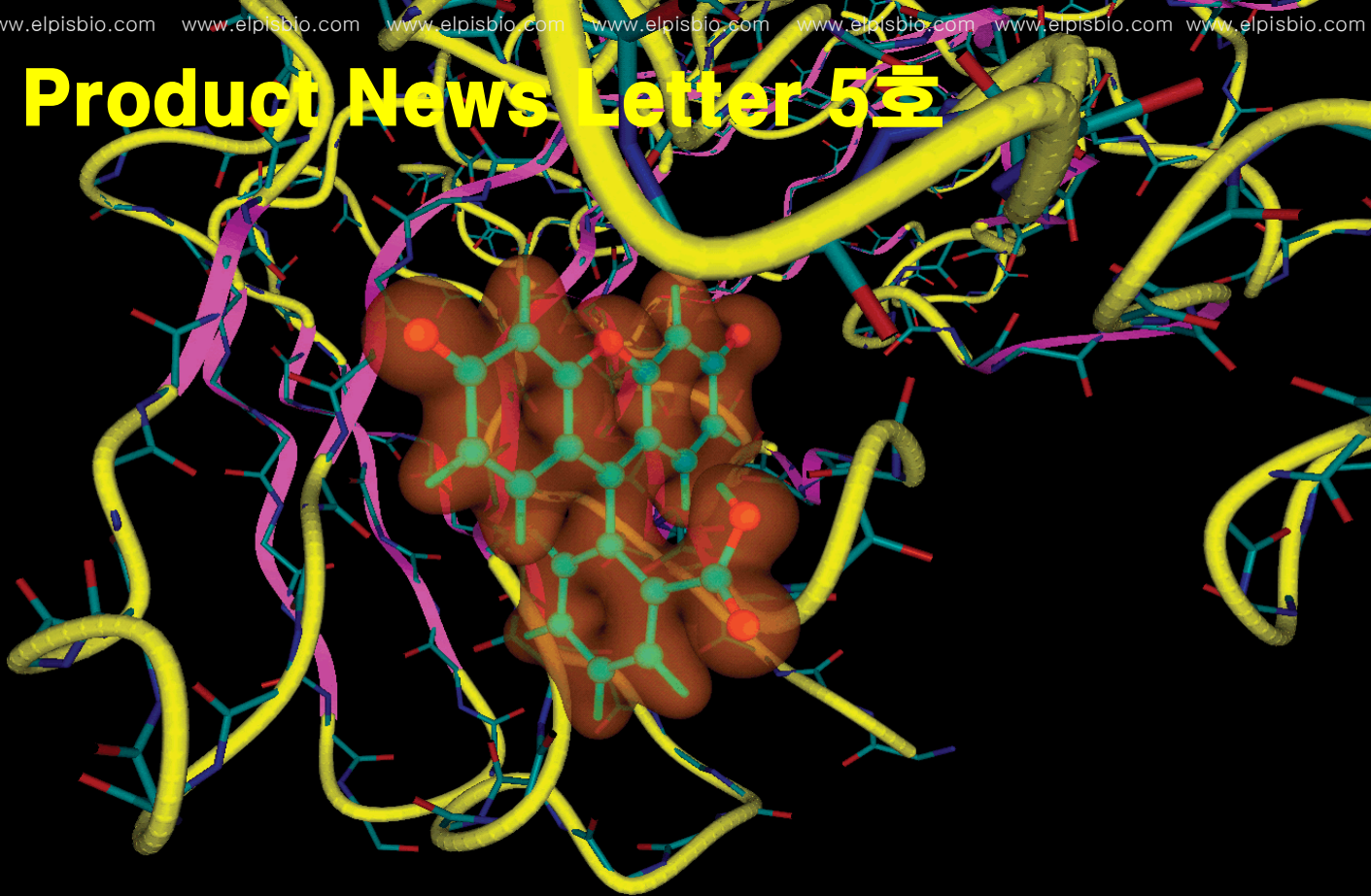


# Product News Letter 5호



## User's Guide for

# Affinity Purification : From A to Z

- ✓ 단백질 정제의 일반적 내용
- ✓ Affinity 정제방법들의 장단점
- ✓ Affinity 정제의 순서와 방법
- ✓ Affinity 정제전 필수 체크포인트
- ✓ 자주하는 질문



고객상담전화

042-581-8448

(주)엘피스바이오텍은 단백질  
전문 생명공학 기업입니다

## 단백질 정제의 일반적 내용

80년대 분자생물학은 많은 생체고분자들 중에서 특히 핵산 (DNA와 RNA)을 다루는 분야로 여겨지고 특별히 단백질을 대상으로 하는 연구분야를 생화학 (Biochemistry)으로 분류하고 하였다. 단백질을 연구하는 사람을 Biochemist로 호칭하는 것은 지금도 여전하지만 유전체학 (Genomics)과 구분되는 단백질체학 (Proteomics)이라는 생동맞은 용어가 새로 생기면서 많은 사람들이 단백질의 정제와 기능분석에 관심을 가지게 되었고 결과적으로 어떤 고분자를 대상으로 연구하느냐에 따른 연구자의 명칭과 그 경계는 모호해졌다. 고전적인 단백질연구는 단백질의 고유한 특성을 고려한 정제방법의 세팅으로 시작하여 최종적으로 단백질이 가지고 있는 특이 활성연구를 하는 것이었다. 때문에 한 단백질을 연구하고자 마음먹었을 때 Biochemist의 최우선적 작업은 최적의 정제시스템을 세팅하는 일이었다. 4개의 nucleotide로 구성된 핵산과는 달리 20개의 아미노산 조합으로 만들어지는 단백질은 아미노산의 구성과 배열에 따라 상상하기도 어려울 정도로 많은 조합이 만들어질 수 있으며 그 조합에 따라 물리화학적 특성은 물론 구조와 기능에 있어서도 완전히 다른 모습을 보이고 있다. 하지만 모든 것을 단순화시키길 좋아하는 과학자들은 가장 간단한 물리화학적 특성으로 단백질을 분류하고 정의한 후 이를 이용해 단백질 정제를 하고자 하였다.

단백질은 구성 아미노산의 종류와 갯수에 따라 분자량이 달라지며, 아미노산의 구성에 따라 산성을 띌 수도 있고 염기성을 띌 수도 있다. 또한 아미노산의 구성에 따라 친수성이 되기도 하며 소수성이 되기도 한다. 단백질에 따라 염 (salt)에 반응하는 정도가 다르며, alcohol에 의해 침전되는 정도가 다르다. 상황을 더 복잡하게 만드는 것은 20개 아미노산의 조합만으로도 충분한 다양성을 가질 수 있음에도 불구하고 단백질은 또 다른 다양한 물질들에 의해 변형이 된다는 것으로서 이를 translational modification이라 한다. 때로는 신호전달의 도구로서 때로는 자기와 비자기를 구분하는 수단으로서 단백질은 다양한 변신을 하고 있으며 지금까지 알려진 2~25,000개의 gene으로부터 만들어질 수 있는 단백질의 종류는 대략 백만개 정도라고 추정만 하고 있을 뿐이다. DNA나 RNA와 같은 핵산에서 발견되는 modification은 methylation 정도로 극히 제한적이지만 단백질의 경우에는 phosphorylation, glycosylation, methylation, acetylation, ubiquitination, nitrosylation, lipidation, proteolysis 등 다양한 변형 기작이 존재하고 있다. 그만큼 다양하고 복잡한 체계를 가지고 있는 단백질을 정제하는 것은 핵산을 정제하는 것과는 차원이 다른 문제로서 이 때문에 단백질 정제는 일도 시작하기 전에 겁부터 먹게 되는 것이 일반적인 현상이었다.

물론 이와 같이 변형 물질만을 검출하거나 정제하는 방법으로 특정 변형이 있는 단백질들만을 정제할 수 있는 많은 방법들도 개발되고 있지만 그 모든 내용을 다루고자 한다면 아마도 끝이 없을 듯 하다. 따라서 본 글에서는 누구나 다 하고 있지만 이게 그건가 듣고 나서야 인식하게 되는 가장 간단한 단백질 정제방법들에 대해서만 기술하고자 한다.

단백질의 특성을 이용해 정제과정을 세팅하는 것은 참으로 어려운 일이다. 단백질의 물리 화학적 특성은 물론 구조적 특성을 정확히 이해해야 하며 또한 단백질이 가지고 있는 translational modification에 대해서도 충분히 이해를 하고 있어야 한다. 더불어 각 특성 별 정제방법에 대해 많은 지식을 가지고 있지 않다면 전체적인 정제전략을 짜는 일에서부터 막히게 될 가능성이 농후하다. 초보자의 입장에서는 이때 등장하는 많은 전문용어들이 마치 외계어처럼 들릴 수도 있다. 단백질 정제를 오랫동안 해온 필자에게 있어서도 어떤 용어들은 여전히 외계어로 느껴진다.

소의 뇌로부터 neuropeptide를 정제하고자 하는 경우에 단백질의 특성을 이용한 복잡하고 어려운 일련의 과정을 거쳐 정제하는 것과 단순히 항체를 이용해 면역침강 (immunoprecipitation)을 하는 것에 있어서, 양적인 차이는 있을 수 있으나 두 방법 모두 정제란 목적은 명백히 달성한 것이다. 양적인 것이 문제가 된다면 단순히 사용하는 항체의 양을 늘리는 것만으로도 간단히 문제를 해결할 수 있다. 그러나 많은 연구자들은 면역침강법을 정제방법으로 생각하지 않는 오류를 범하고 있다. 그 이유는 면역침강법이 protein interaction을 보는 그냥 하나의 method일 뿐이라고 생각하는 데 있다. 하지만 면역침강법은 정제방법 중에서도 가장 세련되고 가장 확실한 정제방법이다 (항체만 충분히 보유하고 있다면).

이런 얘기를 하는 이유는 친화력을 이용한 정제 방법 (affinity purification)의 편리성과 우수성을 언급하고자 하는 이유에서 이다. 어떤 물질이 되었건 단백질에 특이적으로 결합하는 물질이 있다면 그 물질은 좋은 정제수단의 하나가 된다. 간혹 특이성이 떨어지더라도 조건 (salt 농도라던가 pH 변화 등)에 따라 특정 단백질만을 정제할 수 있는 affinity purification 방법도 많이 알려져 있다 (blue dye conjugated resin으로 albumin을 정제하는 것이 대표적인 예이며 이외에도, heparin이나 lectin resin을 이용해 glycosylated protein을 정제하는 예까지 그 예는 아주 많다). 하지만 이러한 방법들 보다 더 확실한 것은 특정 단백질에만 결합하는 항체나 항원 또는 리간드 (ligand)를 이용하는 방법이다. Tagging protein의 정제에 보편적으로 많이 사용하고 있는 Ni-IDA/NTA (his tag protein), GSH (glutathione, GST protein), maltose (MBP protein) 등이 그 대표적인 예이다.

핵산이건 단백질이건 affinity 정제과정은 항상 동일한 순서로 이루어진다. "Binding → Washing → Elution". 각 과정에 있어서 세밀한 조건의 차이는 있을 수 있으나 그 순서가 바뀔 수는 없다. 이점만 명심하면 정제는 세상에서 가장 쉬운 일이 될 것이다 (쉽다라고 느끼는 순간부터 그 일은 하기 싫어지고 귀찮아 지는 막노동으로 인식되기 쉽다)

도축장을 내 집 삼아 매일 육즙을 받아가며 무지막지한 컬럼웍을 하던 시대는 지났다. 유전자 쪼가리만 있으면 대장균을 쓰거나, 이스트를 쓰거나 아니면 곤충세포, 좀더 돈이 많은 곳은 인간배양세포를 쓰더라도 세포내에서 대량으로 발현하여 어떤 단백질들이든 정제할 수 있는 시대가 되었다. 재조합기술과 발현기술의 눈부신 발전에 힘입은 덕으로서 이제 단백질 정제라고 하면 대장균을 갈아 작은 컬럼에 거는 모습을 먼저 떠올리게 된 것이다. 비싼 장난감인 FPLC를 도입해 정제를 하건 아니면 구차하지만 일회용 주사기나 피펫을 컬럼으로 급조하여 정제를 하건 그 결과는 같다. 그만큼 단백질 정제가 쉬워진 것은 당연히 affinity chromatography (친화크로마토그래피)가 대중화되고 보편화 되었기 때문이다.

2000년도 초반 회사의 방향을 "단백질"로 결정한 이후, 회사에서 몇 년간 제일 먼저 한 일은 affinity chromatography와 친해지는 일이었다. 단백질 이라고 western blot에 있는 것을 본 적이 다였고 단백질 추출 (extraction, 추출과 정제는 완전히 다른 개념이다) 해서 Bradford 정량 해 본 것이 전부인 필자에게는 단백질 정제는 완전히 새로운 도전이었고 외계세계였다. 이래저래 외산 resin 구매하여 his 정제, GST 정제까지는 소량으로도 할 수 있었지만 점차 정제해야 하는 단백질들의 종류가 다양해 지면서 금전적으로나 시스템 세팅면에 있어서 한계를 느끼게 되었고, 이를 해결하고자 4년여를 resin 제작에 몰두하여 지금은 native resin뿐만 아니라 다양한 affinity resin들을 직접 생산하고 사용하게 되었다. 만약 단백질 정제를 ionic exchange, gel filtration, hydrophobic interaction 과 같은 고전적인 방법들로 해야 했다면 필자는 아마 단백질을 가지고 사업을 해야겠다는 생각 자체를 하지 않았을 것이다. 하지만 만능키인 affinity chromatography가 있었고 이를 통해 지금은 수천개의 clone들로부터 자유자재로 단백질을 정제하고 있다.

따라서 본 뉴스레터에서는 누구나 할 수 있고 초보자라도 어렵지 않게 할 수 있는 affinity purification 방법과 더불어 그 실과 허에 대해 자세히 알아보도록 한다.

## Affinity 정제방법들의 허와 실

재조합 vector를 이용하고 이로부터 host cell에서 과발현한 단백질의 affinity 정제방법들을 보편적인 순서로 정리하고 그 장단점을 살펴보기로 하자.

많은 사람들이 가장 우선적으로 생각하는 정제방법은 ionic metal affinity chromatography (IMAC) 이며 이중에서도 Nickel resin을 이용한 6xhis tag 정제 방법일 것이다. 그 이유는 6xhis tag의 크기가 단백질의 구조나 기능을 해치지 않을 만큼 작고 이를 이용한 정제방법 또한 매우 간단하기 때문이다.

Histidine의 병렬구조는 Ni, Co, Cu, Fe 등의 이가 금속 이온들과 배위결합을 할 수 있으며 그 결합은 가역적이다. Imidazole은 배위결합의 가역성을 결정하기 때문에 imidazole에 의해 낮은 친화도로 붙는 단백질들의 wash와 binding protein의 elution이 모두 이루어진다. 하지만 6xhis tag를 이용한 정제방법은 특이성이 낮아 세포내 단백질들의 비특이적 결합이 의외로 많아 최종 정제산물의 정제도가 떨어지는 경우가 많으므로 이 정제방법은 독자적으로 사용하기 보다는 gel filtration이나 ionic exchange와 같은 추가의 이차 정제방법을 필요로 하기도 한다. 단백질의 발현이 상대적으로 많은 경우에는 his 정제만으로도 99%의 정제도를 갖는 단백질을 얻을 수 있지만 상대적으로 발현이 적은 경우에는 impurity의 비율이 그만큼 늘어나게 되는 것이 또한 단점으로 여겨지고 있다.

더불어서 his tag는 size가 작다라는 장점 때문에 많이 이용되기는 하지만, 단백질의 발현여부와 발현정도는 오로지 발현하고자 하는 단백질의 내재적 특성에 의해 결정되는 단점도 가지고 있다. 단백질의 아미노산 구조와 활성, 그리고 사용하는 codon의 가용성 (codon usage)에 따라 이중단백질의 발현은 제한적인 현상을 보인다. 즉 단백질의 발현양과 용해도 (solubility)를 결정짓는 중요한 요인이 단백질의 내재적 특성에 기인하며 이 때문에 발현조건은 단백질의 특성에 따라 변할 수 밖에 없다. 단백질의 발현율과 용해도를 늘리고자 하는 다양한 노력들, 즉 배양 온도 조절이나 inducer의 양적 조절, co-factor의 첨가, folding에 영향을 주리라 예측하는 다양한 단백질들과의 co-expression (특히 chaperone proteins), 세포와 분비유도 등 다양한 시도를 통해 오랫동안 많은 연구자들이 시간과 비용을 들여 왔지만 제대로 된 성과는 손에 꼽을 만하며 그나마도 특정 단백질에만 적용 가능한 제한적 조건들일 뿐이었다. 논문에서 잘 된다고 기술되어 있는 조건을 사용해도 왜 나는 좋은 결과가 나오지 않을까? 심지어 서열이 똑같은 유전자며 발현 벡터인데? 이런 고민은 단백질을 정제하는 연구자라면 누구나 한 번쯤은 해했을 만 하다. 논문에 사실이 아닌 내용을 기재했거나 아니면 중요한 원인을 뺀 것으로 밖에는 볼 수 없는 상황이다. 이러한 고민들이 his tag정제를 하고자 할 때면 고스란히 내 고민으로 다가오게 된다.

하지만, 발현이던 정제던 잘 되는 단백질은 잘 되는 것이 또한 사실이다 보니 가장 대중적인 정제수단으로 사용되고 있다. 일단 발현만 성공하면 soluble 상태이던 insoluble 상태로든 정제가 가능한 유일한 affinity 정제방법이 his tag 정제라는 것이 대중적인 정제방법으로 사용되게 된 또 하나의 이유가 된다. 활성을 봐야 하는 효소라면 어떻게든 soluble로 발현하는 것이 가장 좋지만 단백질을 항원으로 사용하거나 또는 특정 domain만을 연구하고자 하는 경우라면 insoluble로 발현하여 정제하는 것도 크게 나쁜 선택은 아니다. His tag과 Ni-ion의 결합은 chaotrophic agent인 urea나 guanidine salt의 고농도 조건에서도 잘 이루어 지며 심지어 ionic detergent인 SDS가 있는 조건에서도 결합은 잘 이루어진다. 이와 같은 his tag 정제의 장점들은 insoluble 정제, refolding이라는 궁여지책의 새로운 시도를 가능하게 하였으며 많은 단백질들이 이와같은 refolding 방법으로 생산되어 판매되고 있는 상황이다.

His tag를 이용한 정제의 또 다른 장점은 다른 fusion protein과 함께 사용할 수 있다는 사실이다. MBP나 GST의 앞이나 뒤에 6x his 서열을 넣어주게 되면 두 가지 affinity 정제 방법을 선택적으로 사용할 수 있게 된다. 하지만 다른 정제 방법들과는 달리 DTT나 EDTA를 사용할 수 없는 단점 또한 가지고 있다.

다음으로 많이 사용하는 정제방법은 GST (glutathione-s-transferase) fusion 단백질을 GST의 기질인 GSH (glutathione)이 conjugation되어 있는 resin으로 정제하는 GST 정제방법이다. 물론 좋은 정제방법은 아니지만 오랫동안 사용되어 왔다. GST는 세포내에서 dimer를 형성하는 단백질로서 정제된 단백질 역시 dimer를 형성한다. 이와 같은 특성은 예측하기 어려운 이상한 결과를 내기 일쑤이며, GST를 사용하면서 몇 차례나 쓰레기통에 던져버렸던 기억도 가지고 있다. 가령 resin에 붙는 단백질이 elution이 안된다거나, 분명 fusion을 시켜줬는데 다 쪼개져 있다거나, fusion 단백질 외에도 원래 크기의 GST가 나온다가나, GST의 존재가 단백질의 발현률이나 solubility에 눈곱만큼도 도움이 되지 않는다가나, 또는 정제 후 GSH를 제거하는 쓸데없는 공정을 더 넣어야만 한다는 것들이다. 그래도 GST와 GSH의 높은 친화력 덕분에 정제도 만큼은 다른 정제방법에 비해 탁월한 편이다. 어찌보면 GST 정제의 유일한 장점일 수 있다. 이러한 장점 때문에 GST는 GST full-down이라는 용어가 보편화될 정도로 protein interaction을 관찰하는 주요한 방법으로 자리매김할 수 있었다. 하지만 발현율이 원래부터 높고 어떤 조건에서든 solubility가 높은 단백질 이외에는 대량 정제방법으로는 비추인 것도 사실이다.

Maltose와 결합하는 대장균 단백질인 MBP (maltose binding protein)는 amylose resin에 결합하고 maltose에 의해 가역적으로 elution된다. 이 원리를 이용한 MBP 정제는 그나마 GST보다는 장점이 많다. 발현량을 10배 이상 높여주는 경우도 있으며 낮은 온도에서 간신히 soluble인 단백질을 여유롭게

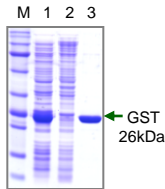
soluble로 만들어 주는 경우도 많이 보았다. 정제도 또한 매우 우수한 편이지만 발현한 단백질의 양만큼 resin에 모두 잘 붙지 않는다는 단점은 치명적이다. 이는 MBP의 구조적 문제로서 앞이나 뒤에 원가를 달고 있으면 amylose에 대한 친화도가 떨어지기 때문이다. MBP에 돌연변이를 도입하여 친화도를 높인 논문은 근거로 그 친화도를 resin binding 수준에서 조사해 봤지만 이 역시 주목할만한 차이는 없는 것으로 나타났다. 하지만 정제도, 발현율, solubility는 여러 fusion 단백질 중에서도 그나마 만족할 만한 수준으로 평가 받고 있다. 여기에 his tag를 달아 일차/이차 affinity 정제를 한다면 그 효과는 배가된다. 하지만 MBP 정제는 GST를 이용한 경우와 마찬가지로 제한적인데, 그 이유는 MBP의 크기가 너무 크다는데 있으며 (45kDa), endoprotease를 이용한 MBP 절단과 이차 정제를 또 해야 한다는데 있다. 이를 위해서는 buffer 교환, 효소처리, 이차 컬럼 통과, 다시 buffer 교환 그리고 농축의 복잡한 과정이 추가된다. 경우에 따라서는 MBP가 붙어 있는 상태로 정제 단백질을 바로 사용하거나 또는 제품으로 포장하기도 하는데, 이 경우에는 반드시 목적단백질을 잘라 정제한 경우와 MBP가 fusion으로 붙어 있는 경우에 있어서 활성도의 차이를 보이지 않아야 한다는 전제를 깔고 있어야 한다.

## GST-Bind Agarose Resin

- GST가 fusion된 단백질 정제에 사용되는 affinity resin
- 단백질에 대한 친화성 및 정제 능력 향상시킨 제품



GST



M. Prestained marker (EBM-1032)  
1. Cell lysate 2. Unbound  
3. GST eluted by reduced GSH

Product	Qty	Cat. No.	Price(₩)
GST-binding Agarose Resin	10 mL	EBE-1041	100,000

### ► Features

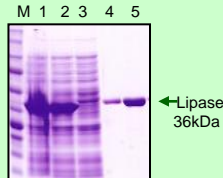
- Matrix Agarose 4B, cross-linked
- Ligand Sulfhydryl, reduced glutathione
- Linker Size 12-atom space linker
- Binding Capacity 5-10 mg GST-fusion proteins/ml resin
- Storage Buffer **75% slurry** in PBS with 20% ethanol at 4°C

## His-Bind Agarose Resin

- His-tagged 단백질 정제에 사용되는 affinity resin
- Ni ion pre-charged 형태로 즉시 사용가능



HIS



M. Prestained marker (EBM-1032)  
1. Cell lysate 2. Soluble fraction  
3. Unbound 4. Lipase eluted by 100mM  
5. 200mM imidazole

Product	Qty	Cat. No.	Price(₩)
His-binding Agarose Resin	10 mL	EBE-1031	80,000

### ► Features

- Matrix Agarose 4B, cross-linked
- Ligand Iminodiacetic acid (IDA), Ni<sup>2+</sup> pre-charged
- Linker Size 12-atom space linker
- Binding Capacity 10~15 mg His-tagged proteins/ml resin
- Storage Buffer **75% slurry** in PBS with 20% ethanol at 4°C

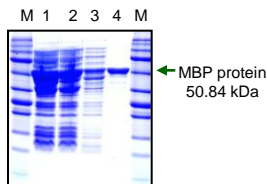
\* EDTA로 Stripping 후 recharging하여 사용 가능 (Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 등)

## MBP-Bind Agarose Resin

- MBP가 fusion된 단백질 정제에 사용되는 affinity resin
- 단백질에 대한 친화성 및 정제 능력 향상 시킨 제품



MBP



M. Prestained marker (EBM-1032)  
1. Cell lysate 2. Unbound  
3. Washed 4. MBP eluted by maltose

Product	Qty	Cat. No.	Price(₩)
MBP-binding Agarose Resin	10 mL	EBE-1071	80,000

### ► Features

- Matrix Agarose 4B, cross-linked
- Ligand Hydroxyl, amylose
- Linker Size 12-atom space linker
- Binding Capacity 5~10 mg MBP-fusion proteins/ml resin
- Storage Buffer **75% slurry** in PBS with 20% ethanol at 4°C

# Affinity 정제의 순서와 방법

발현 단백질의 정제 방법은 발현 host가 무엇이나에 따라 크게 다르지 않다. 재조합 단백질의 발현 host가 인간세포이건 대장균이건 원리와 방법은 동일하다. 다만 각 host들이 가지고 있는 특성이나 발현조건 또는 발현산물의 위치에 따라 정제방법은 약간의 차이를 보이고 있을 뿐이다. 따라서 모든 정제방법들에 공통적인 과정을 기술하며 그 차이에 대해 간략히 설명하고자 한다.

## 1. Cell Lysis

다들 알다시피 어떤 세포이건 세포는 세포막으로 외부와 차단되어 있다. 추가로 세포벽이 있어 더 단단한 구조를 갖는 생명체도 있다. 정제의 시작은 세포막을 깨어 세포 내 구성물을 꺼내는 일부터이다. 이를 통칭하여 cell lysis라고 하며 다양한 방법들이 이용되고 있지만 적용방식에 따라 크게 세가지 1) 물리적 방법 2) 화학적 방법 3) 효소를 이용하는 방법으로 구분된다. 고주파로 세포를 깨는 sonication, 좁은 노즐을 통과하는 압력으로 세포를 깨는 french press, 냉해동시 수분의 팽창률 변화를 이용하는 freezing & thawing, 밀폐된 공간에서의 압력변화로 세포를 깨는 homogenization, 기계적인 힘으로 깨는 tissue grinding, 그리고 원시적이긴 하지만 절구를 이용하는 방법 등이 물리적인 힘으로 세포를 깨는 방법들이다. SDS나 deoxycholate와 같은 ionic detergent로 세포를 깨는 방법, CHAPS나 CHAPSO와 같은 zwitter ionic detergent를 이용해 세포를 깨는 방법, 그리고 NP40나 Triton X-100과 같은 non-ionic detergent를 이용해 세포에 pore를 만들어줘 세포구성물이 외부로 흘러나오도록 하는 방법 등은 화학적 방법에 속한다. 효소를 이용하는 방법은 그 자체로 독립적으로 사용되지는 않지만 세포벽을 깨주는 효소를 보조적으로 첨가하여 물리 화학적인 방법을 보조함으로써 세포 파쇄의 효율을 높이는 데 사용되고 있다.

가장 효율적이며 가장 흔히 사용하고 있는 방법은 sonication으로서 고주파로 세포를 파쇄하기 때문에 파쇄효율이 높다. Sonication을 하는 과정에서 발생하는 열만 잘 잡아주면 단백질의 변성은 일어나지 않으면서도 genomic DNA를 잘게 부수어 정도를 낮추는 역할도 하므로 추가로 lysozyme이나 DNase를 사용할 필요가 없다. 또한 detergent의 첨가없이도 세포파쇄가 빠르게 일어나므로 가장 단순화한 buffer를 이용할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이때 lysis buffer는 적정 pH의 조절에 필요한 buffer, salt 만을 기본적으로 포함하고 있어도 단백질의 정제나 정제 후 활성에는 아무 문제가 되지 않지만 경우에 따라서는 EDTA, glycerol, 그리고 protease inhibitor를 옵션으로 넣어주기도 한다. Buffer는 단백질의 고유 특성을 고려해 결정하는 것이 가장 좋으나 일반적인 중성 buffer인 PBS나 Tris buffer만을 사용해도 무난하다.

Sonication은 작동/멈춤의 pulse와 chase로 세포에 가해주는 것이 좋는데, 그 이유는 지속적인 sonication으로 인해 발생하는 열을 식혀주기 위한 목적으로서 보통은 열을 위에서 수행하는 것이 일반적이다. 핵산과 달리 단백질을 죽이는 가장 큰 원인은 그 무엇도 아닌 열로서 모든 단백질 정제과정은 열을 위 또는 4°C에서 수행하는 것이 바람직 하다.

결론적으로 lysis buffer는 물리적인 파쇄방법을 사용할 경우, 특정한 조성을 따르지 않아도 크게 문제되지 않는다.

## 2. Binding

Cell lysis와 단백질의 binding 조건이 다르다면 이 또한 아주 불편한 과정이 될 것이다. 따라서 특별한 경우가 아니라면 cell lysis buffer와 resin binding buffer 조건은 동일하게 가져가는 것이 편하다. 이 때문에 lysis 조건은 처음부터 resin binding 조건을 고려하여 결정하게 된다.

같은 tagging을 해놓은 단백질이라도 단백질의 고유한 특성에 따라 resin에 붙는 정도가 다 다를 수 있다. 어떤 단백질은 column에 흘러주는 것만으로도 잘 붙지만 어떤 단백질은 극히 일부만 붙기도 한다. 같은 vector 그리고 같은 tagging protein 이라고 해서 모든 단백질이 동일한 결합패턴을 보인다고 생각하는 것은 아주 큰 오산이다. 동일한 단백질이라 할지라도 구조에 영향을 줄 수 있는 한 두개 아미노산을 바꿔주는 것 만으로도 단백질의 특성은 물론 resin에 결합하는 결합력에 있어서도 완전히 다른 특성과 패턴을 보이곤 한다. 물론 다 그렇다는 것은 아니지만 실험을 시작하기에 앞서 조건이 다를 수도 있다는 가정을 하는 것이 실험결과를 보고 맨붕에 빠지는 것 보다는 좋을 수 있다는 얘기다.

따라서 binding 조건 (시간과 방식 그리고 buffer 조건)은 본 실험을 하기에 앞서 예비실험을 통해 그 정도와 패턴을 미리 파악해 놓는 것이 좋다. 하지만 적은 양의 resin을 사용하는 예비실험이 대량 정제를 100% 대변하지 못하는 것도 또한 명심해야 할 것이다.

## 3. Wash

어떤 affinity 정제방법이건 lysis, binding, wash는 동일한 buffer조건에서 할 수 있다. 다만 6xhis tag의 경우, imidazole의 농도구배별 wash 조건 사용은 impurity를 최소화 하는데 큰 도움을 주기도 한다. GST나 MBP 정제와 달리 6xhis tag의 정제는 비특이적 결합 가능성이 많은 정제방법이지만 imidazole의 농도에 따라 특이성을 높일 수 있는 장점을 가진 정제방법이기 때문에 high affinity 단백질의 경우엔 binding buffer, wash buffer에서 imidazole 농도를 높게 시작하면 그만큼 비특이적 결합을 원천적으로 막아 his 정제만으로도 99%의 정제도를 얻을 수도 있다.

일반적인 protocol에는 wash 조건을 resin 부피의 몇 배라는 방식으로 정해 놓는 경우가 많다. 물론 틀린 얘기는 아니지만, resin에 넣어주는 extract의 volume과 총 단백질의 양, 발현한 단백질의 양, 그리고 resin의 binding capacity에 따라 resin의 부피와는 전혀 상관없는 wash 조건이 되는 경우가 많다. 가장 좋은 wash 방법은 resin을 통과해 나오는 flow through의 단백질양이 zero가 되는 시점이다. 더 이상 흘러나오는 단백질이 없을 때 wash는 종결되었다고 봐야 한다.

어떤 affinity 정제방법이건 wash 조건에서 Triton X-100이나 Tween20과 같은 non-ionic detergent를 0.1-1% 농도로 첨가하여 사용하는 것도 non-

specific binding을 줄이는 한 방법이 될 수 있다. 이들 detergent들은 단백질간 interaction을 약하게 해주는 역할을 함으로써 resin에 붙은 정제단백질에 extract에 존재하는 다른 단백질들이 들러붙는 것을 완화해 주는 역할을 한다.

#### 4. Elution

Resin에 붙은 단백질을 용출하는 과정으로서 6xhis tag의 경우에는 두가지 방법을 사용할 수 있다. 첫째, 고농도의 imidazole을 column에 흘려 6xhis와 Ni ion의 결합을 경쟁적 반응으로 떨어뜨리는 방법과 산성조건에서 결합력을 약하게 하는 경우이다. 보통은 0.2-1 M의 imidazole 농도를 elution에 사용하지만 산성 buffer에서 (pH 5-6) elution을 하기도 한다. 6xhis tag의 결합은 pH 의존적으로서 알카리성 조건에서 강한 결합력을 보인다. 때로는 non-specific 결합을 최소화하기 위해 binding/wash를 산성조건에서 하는 경우도 있다 (하지만 이 내용도 어떤 단백질을 정제하느냐에 따라 달라지는 내용으로서 일괄적인 룰은 없다).

His tag의 elution은 단일 농도의 imidazole 조건에서 할 수도 있으며, step gradient 또는 linear gradient imidazole 농도조건에서 할 수도 있다. 어떤 방법을 사용하건 실험실의 상황이나 단백질의 정제특성을 고려해야 하며 정제도가 가장 좋은 방법을 선택해야 한다.

간혹 resin에 결합한 단백질이 높은 농도의 imidazole에 의해서도 용출되지 않는 경우가 발생할 수 있다. 그 정확한 원인에 대해서는 알 수가 없지만 단백질에 따라 이런 예기치 못한 결과가 나올 수도 있으며 실험과정 중 발생할 수 있는 환경적 변화에 의해 이러한 현상이 발생할 수도 있다. 단백질이 resin에 영거 침전된 경우나 또는 resin이 순간적으로라도 말랐던 적이 있는 경우에 이러한 현상이 나타날 수도 있다. Ni ion을 떼어내는 EDTA의 처리를 통해 단백질을 resin으로 부터 분리할 수는 있지만 이미 단백질의 상태가 변해 있을 가능성이 크고 활성이 중요한 단백질이라면 예측 불가한 상황을 맞을 수도 있다.

GST나 MBP의 경우에도 resin에 붙은 단백질이 떨어지지 않는 경우가 간혹 발생하곤 하는데, 이 경우들에 있어서는 다른 방법은 없고 SDS가 포함된 buffer에서 끓여주는 수밖에 없는 도리가 없다. GST나 MBP의 경우에는 elution buffer에 GSH나 maltose를 10-20 mM의 농도로 첨가하여 resin의 ligand와 경쟁적 반응을 한다. 이 농도에서는 elution이 더디게 일어나므로 빠르게 elution을 하고자 하는 경우에는 농도를 2-3배로 높여도 무방하다.

Elution buffer의 조성은 단백질의 특성에 맞는 buffer조성을 사용하는 것이 가장 좋다. 단백질의 특성에 따라 elution과 동시에 침전이 발생하는 경우도 많기 때문에 단백질의 특성을 고려하여 pH나 salt 농도를 조절해 주어야 한다. 이는 워낙 복잡한 문제이다 보니 특정한 조성을 제시할 수는 없다. 다만 단백질의 행태를 고려해 신중히 선택해야 한다.

Elution을 한 후 특별한 경우가 아니라면 즉시 dialysis나 ultrafiltration으로 buffer change를 해주는 것이 바람직하다. 6xhis tag의 경우, resin에 붙어 있던 Ni ion은 elution을 하면서 단백질용액과 함께 용출될 수 있으며 Ni ion은 단백질의 불활성화나 침전을 유도할 수도 있기 때문이다. 결론적으로 elution한 단백질을 장기 보관하는 것은 바람직하지 않다.

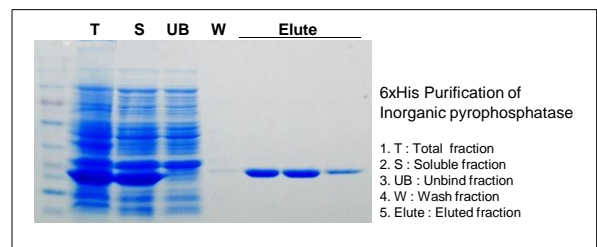
#### 5. Resin의 재활용

정제에 사용한 resin은 어떤 것이던 재활용이 가능하다. 그 이유는 resin의 affinity ligand가 resin에 공유결합으로 이어져 있기 때문에 쉽게 끊어지지 않는 결합을 하고 있다. 따라서 SDS나 acid, alcohol 처리에 안정하며, hard wash를 통해 공장출고상태로 만들 수 있다.

#### 6. 정제 단백질의 확인

정제과정 중 단백질의 확인은 SDS-PAGE를 통해 확인하는 것이 보통이다. 대장균을 배양하고 발현 유도한 후 세포를 깨고 얻은 단백질 추출물로부터 목적 단백질을 정제하는 과정에서 각 단계는 반드시 SDS-PAGE를 통해 확인하여야 한다. 이 과정에서 실패의 원인이 될 수 있는 문제점을 파악할 수 있도록 다음과 같은 실험군이 반드시 포함되어야 한다.

1. Total extract : 세포 파쇄후 원심분리를 하기 전 extract
2. Soluble extract : 세포 파쇄 후 원심분리를 한 상층부의 extract
3. Unbind fraction : Flow-through 로서 resin에 결합하지 않고 흘러나온 extract
4. Wash fraction : Wash 과정 중 흘러나온 fraction
5. Eluted fraction : Resin으로 elution하여 얻은 단백질 fraction



Total extract와 soluble extract의 비교는 발현단백질의 soluble 발현여부를 판단하는 중요한 단서가 되며, extract의 원심분리후 침전물을 녹여 pellet fraction을 그룹에 넣어 비교할 수도 있으나 pellet의 크기와 단백질의 양을 맞추는 것이 어렵고 total과 soluble fraction 만으로도 soluble발현여부는 충분히 판단할 수 있으므로 pellet을 사용하는 것은 불필요하다.

Unbind fraction은 목적단백질이 resin에 정상적으로 결합을 했는지 확인할 수 있는 단서가 되며 resin과 단백질 용액의 비율 계산이나 또는 목적 단백질이 resin에 붙는 정도를 계산할 수 있는 근거가 된다. 최종적으로 elution을 했을 때, 정제실패의 원인이 낮은 친화도 때문인지 쉽게 파악할 수 있다.

Eluted fraction은 최종 정제 단백질의 정제도와 회수율 그리고 단백질의 농도를 계산하는데 사용된다.

# Affinity 정제 전 필수 체크포인트

## 1. 내 단백질의 발현양은?

같은 vector에 들어 있고 같은 inducer를 사용한다고 해서 모든 단백질의 발현양이 같을 수는 없다. 단백질의 발현양은 단백질의 고유한 특성에 따라 달라진다. 따라서 본격적인 정제에 들어가기에 앞서 내 단백질의 발현양이 어느 정도 되는지 확인하는 과정이 반드시 필요하다. 발현양이 많다면 우선은 안심해도 좋지만 발현양이 많다고 곧 정제가 성공한다는 보장은 없다. 아주 특별한 경우가 아니라면, SDS-PAGE/Coomassie R250 염색만으로도 단백질의 발현여부와 발현양을 어렵지 않게 알아볼 수 있다. 내 단백질의 발현이 많다면 정제의 시작은 긍정적이라 볼 수 있다. 하지만 발현양이 적다면 전체적인 발현시스템을 다시 돌아볼 필요가 있다. 이때는 fusion protein의 도움을 받거나 또는 적은 발현량의 원인을 분석하여 필요할 경우, codon을 최적화하는 작업을 해야 한다. 발현 균주를 바꿔보는 작업도 필요하다. 실제로 어떤 단백질은 특정 대장균주에서만 발현을 하는 경우도 있다. 어찌보면 정제에 있어서 가장 중요한 요소라 할 수도 있다. Western으로 겨우 확인되는 단백질을 놓고 정제할 수 있느냐는 문의를 받을 땐 안타까운 마음이 든다.

발현단백질의 발현율이 낮은 경우라면 다음과 같은 처방을 할 수는 있다.

1. GST, MBP, NusA 등과 같은 fusion protein의 사용을 고려해 본다.
2. Codon optimization을 해본다.
3. 기능과 상관이 없는 단백질이라면 특정 도메인만을 발현해 본다.
4. 발현균주를 바꿔본다.

하지만 이 방법들로도 문제해결이 안되는 경우도 많다. 이때는 어쩔 수 없이 발현시스템을 바꿔야 한다. 특히 진핵생물의 단백질을 발현하는 경우, 이스트나 곤충세포, 동물세포의 사용을 심각하게 고려해야 한다.

Seven transmembrane receptor protein을 대장균에서 발현한 적이 있다. Full protein은 물론 10 여개의 도메인으로 쪼개 발현을 했을 때도 발현이 확인된 것은 단 한가지 도메인밖에 없었다. 유전자서열에는 문제가 없는데 왜 발현이 안되느냐는 식의 질문이 얼마나 어리석은 질문이지를 생각해 봐야 한다.

## 2. 발현단백질이 Soluble로 발현하는가?

발현양은 많지만 insoluble로 발현되어 불활성화 되어 있다면 정제가 불가능할 수도 있다. 여러 affinity 정제방법 중 insoluble로 발현한 단백질을 denature 조건에서 정제할 수 있는 방법은 6xhis tag를 이용한 IMAC 방법 외에는 없다. 따라서 내 단백질이 soluble로 발현되는지를 정제 전 반드시 확인해야 한다. 만약 insoluble로 발현이 된 것이라면 대장균을 배양하는 조건부터 inducer를 처리하고 발현하는 조건 (시간, 온도, inducer 농도 등)을 조절하여 solubility를 높여야 한다. 단백질은 고유한 특성으로 인해 어떤 조건에서도 insoluble로 밖에는 발현하지 않는 경우도 많다. 특히나 진핵생물의 단백질 구조는 원핵생물의 구조와는 다른 기작과 양상을 가지고 있기 때문에 동물이나 식물의 유전자를 대장균에서 발현하는 경우 insoluble로 발현할 확률은 그만큼 높아진다. 같은 미생물이지만 진핵생물인 이스트의 유전자를 대장균에서 발현했을 때 soluble로 발현되는 유전자의 수는 극히 제한적이다.

Solubility를 높이기 위한 다양한 방법들이 제시되고 시도되었지만, 여전히 많은 숙제만 남기고 있다. 내 단백질이 발현될 것이냐? 그리고 soluble로 발현될 것이냐? 정답이 없는 문제이다.

## 3. 발현단백질이 resin에 잘 붙는가?

어떤 정제방법이건 tag 또는 fusion protein에 단백질이 붙게 되면 tag이나 fusion protein의 결합특성이 달라지는 경우가 많다. 이는 목적단백질의 구조적 특성과 무관하지 않다. 따라서 같은 tag를 가지고 있다고 해서 모두 resin에 동일한 수율로 결합할 것이라는 생각은 처음부터 하지 말아야 한다. 이는 유전자의 서열문제가 아니며 이로부터 만들어지는 단백질의 구조적 문제이다. His tag를 어디에 붙이느냐? 또는 his tag의 길이나 목적단백질과의 거리는 어떠한? 와 같은 질문을 할 수 밖에 없는 이유가 여기에 있으며, 정확한 구조를 직접 눈으로 들여다 볼 수 없는 한 N-term에도 붙여보고 C-term에도 붙여보고 tag과 단백질간엔 긴 space linker 서열을 넣어 보기도 한다. 결국 resin과 tagging 단백질간의 결합력도 실제로 해보지 않으면 답을 얻을 수 없는 문제이다. 붙지 않거나 붙더라도 기준단백질에 비해 결합력이 약하다면 다른 vector construct를 준비하는 것이 그 원인을 찾는 일보다 수월할 수도 있다.

단백질이 resin에 붙지 않는 원인은 파악하기가 어렵다. 단백질이 붙지 않는 문제로 resin의 품질을 의심하는 경우가 종종 있는데, 정제 resin을 판매하는 회사로서 답답함을 느낄 때가 많다. 다른 것들은 어떠한 반응을 하면 다른 것들은 잘 붙는다고 답변을 한다. 이런 문제 제기가 있는 이유는 단 하나로서, 특정 resin 사용을 목적으로 tagging한 단백질은 무조건 붙어야 한다는 잘못된 인식 때문이다. 하지만 헛된 바람일 뿐 결코 그렇지 않다는 점을 꼭 알아야만 할 듯 하다.

## 4. 얼마만큼의 resin을 사용할까?

Affinity resin을 구입할때 동봉되어 있는 설명서에는 표준단백질을 이용했을 때 resin에 붙는 평균결합수율이 표기 되어 있다 (binding capacity : mg protein/ml resin). 그럼 내 단백질이 이만큼 붙을까? 결코 그렇지 않다. 표준단백질이란 20 kDa 전후 크기의 표준분자량을 가지고 있으며 어떤 조건에서도 잘 붙는 단백질을 사용한다. GST resin의 경우에는 표준 GST 발현 단백질을 사용하고 MBP resin의 경우에도 아무것도 붙어 있지 않은 표준 발현 vector에서 발현한 단백질을 사용한다. 내 단백질은 이러한 표준 단백질에 서열을 추가한 것이므로 결합력이 달라질 수 있어 최종 결합 수율은 물론 친화력도 달라지게 된다. 따라서 발현단백질의 정제에 사용한 resin의 양은 수차례 실험하여 얻은 평균 결합 수율이 반드시 반영되어야 한다. 무슨 일이 있더라도 만사 제쳐 놓고 사전 실험을 할 필요가 있다. 처음 정제를 시도할 때, 내 단백질에 대한 아무런 정보도 없을 때는 설명서에 명시된 표준 결합 수율보다 넉넉한 양의 resin을 준비해 사용하는 것이 바람직하다.

발현에 사용한 배지의 양, 이로부터 얻은 extract에 포함된 목적단백질의 총량, 그리고 목적 단백질이 resin에 결합하는 평균 수율을 가지고 사용할 resin의 양을 계산해야 한다. 10 Liter의 대장균을 배양했다고 해서 resin의 양을 1 liter 배양기준의 10 배로 하지는 않는다. 발현된 단백질의 총량이 적다면 발현된

양 만큼에 해당하는 resin을 사용하는 것이 처음부터 무조건 많은 양의 resin을 사용하는 것 보다 정제도에 있어서 유리할 수 있다. 즉 resin에 붙일 extract의 총단백질양이 아니라 resin에 붙을 목적단백질의 총량을 기준으로 잡아야 한다.

### 5. Binding은 어떤 방법으로 할까?

앞서 얘기한 대로 발현단백질의 친화도는 발현한 단백질의 특성에 따라 완전히 달라진다. 친화도가 높은 경우라면 resin을 충전한 column에 한번 통과시키는 것만으로도 충분한 결합을 유도할 수 있지만 친화도가 낮아진 경우에는 binding하는 과정을 수 차례 반복하거나 또는 tube에서 batch-type으로 장시간 붙이는 것도 고려해봐야 한다. 이 역시 어떤 원칙이나 법칙이 있는 것은 아니고 해봐야 결과를 알 수 있는 문제이다.

### 6. 기능성 단백질인가?

정제하고자 하는 단백질의 활성이 온전히 보전되어야 하는 경우와 단순히 단백질 쪼가리를 얻고자 하는 경우에 있어서 정제 방법과 정제환경은 달라질 수 있다. 정제를 진행하는 온도는 물론 protease inhibitor의 첨가 유무, fusion protein의 사용시 fusion 파트너의 제거유무 등 고려해야 할 사항이 많다. 단백질의 활성은 단백질의 안정성은 물론 구조적 문제와도 연관이 되기 때문에 전체적인 정제과정에서 강도 높은 주의를 요한다. 하지만 면역항원으로 사용할 목적 등의 단백질이라면 활성을 보기 위한 것이 아니므로 온도나 정제조건에 민감할 이유가 전혀 없다. 또한 구조적 특성을 고려할 이유도 없고, 발현양만 많다면 경우에 따라서는 insoluble로 정제를 할 수도 있고 많은 양이 필요치 않다면 SDS-PAGE gel에서 해당 단백질만을 오려내 추출해 낼 수도 있다.

목적에 따라 불필요한 주의나 과정을 생략할 수 있다는 얘기이다.

하지만 단백질의 활성이 중요한 경우에는 lysis 과정부터 최종 농축/buffer 교환 과정까지 모든 과정에 있어서 깊은 주의를 해야 한다. 정제를 하고 농축까지 진행했는데 활성이 사라져버리는 경우를 심심치 않게 경험하고 또한 주변에서 볼 수 있다. 정제를 하고 buffer 교환을 하는 과정에서 어렵게 얻어 온 단백질을 모두 잃어버리는 경우를 또한 자주 본다. 이러한 원인의 가장 큰 이유는 정제 전 그 단백질의 특성에 대한 공부를 게을리 한데서 찾아볼 수 있다. Co-factor가 필요한 경우나 안정제의 첨가가 필요한 경우 등, 생각치 못하고 있던 요인들에 의해 활성단백질의 정제에 실패할 수도 있다.

결론적으로 활성이 중요한 경우에는 사전에 또는 정제를 진행하는 과정에서 많은 생각과 공부가 필요하지만, 단순히 단백질 조각을 얻고자 하는 경우에도 이와 같이 한다면 오히려 시간과 정력낭비가 된다.

활성을 갖는 단백질을 원하지만 발현이 적고, 설명 많더라도 insoluble로 발현이 된다면 어찌되었건 정제를 한 후 활성을 되찾도록 하기 위해 고민을 하게 될 것이다. 이 과정에서 insoluble 조건의 정제방법을 쓰게 되는데, insoluble 조건은 모든 단백질이 풀어져 어떤 단백질이라도 활성을 잃는 조건이고 protease도 예외는 아니다. 비싼 protease inhibitor를 사용하거나 전 과정을 얼음 위에서 작업하는 것은 바보 같은 것이 될 수 있다. 이 경우에는 활성을 부여하는 과정, 즉 refolding 과정에만 주의를 해도 무방하다. 하지만 in vitro에서 복잡한 구조의 단백질을 정상상태로 돌려 놓는다는 것이 근본적으로 허구가 될 수 있고 환상에 그칠 수도 있다.

### 실험팁 : 주사기를 이용해 간단히 Column 만들기

- 준비물 :
1. 1-10 ml 주사기 또는 플라스틱 pipette
  2. 유리성유 또는 거즈
  3. 링거줄 (스토퍼 포함)
  4. Resin

- 방법 :
1. 주사기의 내부에 유리성유나 거즈를 조금 잘라 넣은 후 막대로 살살 두드리면서 아랫부분에 팍킹해 줌  
(주의 : 너무 많이 넣거나 짝차게 팍킹을 하면 flow가 떨어지고 너무 적게 넣으면 resin이 흘러 나올 수 있으므로 잘 조절해야 함)
  2. 링거줄을 5-10cm 정도로 잘라 주사기의 끝부분에 끼어 넣고 링거줄의 스토퍼를 줄에 끼워 넣음
  3. 스토퍼를 잠근 후 resin을 column의 용량에 맞게 부어 줌
  4. 중력작용만으로 resin을 가라앉힌 후, 스토퍼를 열어 용액을 빼냄
  5. DW로 수차례 resin을 wash한 후, 정제에 사용할 binding buffer로 column volume의 두배만큼 흘려줌

- 주의 :
- 주사기나 또는 column으로 사용할 워든지 그 내경에 맞는 frit을 구할 수 있다면 유리성유나 거즈를 이용한 것보다 유리함
  - 전용 column이 있는 경우에는 내부의 frit이 막혀 있는지 사전에 반드시 확인을 해야 함
  - 링거줄은 약국에서 저렴한 가격에 구입가능하며 길이에 맞게 재단 가능함



## 자주하는 질문

### 1) 인간세포에서 발현한 6xhis tag 단백질을 정제하는데 특별한 resin이나 방법이 필요한가요?

인간세포를 발현에 이용하던 대장균을 발현에 이용하던 발현한 단백질에 6xhis tag이 붙어 있는 사실은 변함이 없다. 따라서 발현 host가 어떤 종류이건 특별한 방법이 있는 것은 아닙니다. 다만 인간세포의 경우에는 많은 단백질에 his 유사서열이 존재하고 또한 disulfide bond로 구조를 갖는 단백질이 많으며 과발현 단백질의 발현양이 적은 경우가 많으므로 binding/wash 과정에서 impurity를 줄이고자 하는 노력을 더 해야 한다.

### 2) 대장균에서 단백질을 과발현 하고자 합니다. 반드시 BL21 균주를 사용해야 하나요?

실험에 사용하는 대장균은 K-12와 B strain 두 종류이며 K-12 균과 B strain균인 BL21 균주가 다른 점은 두 종류의 주요 protease gene이 없고 (Lon과 OmpT) 성장속도가 빠르다는 것이다. 단백질을 발현하는데 있어서 발현 균주의 protease 유전자가 없다는 것은 분명 장점이지만 단백질의 발현에 반드시 BL21 균주를 사용해야 한다는 공식은 없다. K-12에서 유래한 균주 (JM시리즈, DH5a, XL-blue 등)도 좋은 발현 host가 될 수 있다. 하지만 발현 vector의 promoter가 어떤 것이냐에 따라 그리고 발현하고자 하는 단백질의 특성에 따라 발현균주를 결정해야 한다. BL21 균주는 protease 유전자는 없는 반면 RecA 유전자를 가지고 있어 DNA에 관련된 단백질을 정제하는 데는 좋은 발현 균주가 될 수 없다.

### 3) BL21과 BL21(DE3)의 차이가 무엇인가요?

BL21은 wild-type B strain이며 BL21(DE3)은 lambda DE3 lysogen을 유전체내에 갖고 있는 BL21 균주이다.  $\lambda$  DE3 =  $\lambda$  sBamHIo  $\Delta$ EcoRI-B int::[lacI::PlacUV5::T7 gene1] i21 Ani5. DE3 유전자에는 LacUV promoter에 의해 조절되는 T7 gene1 이 있고 T7 gene1은 T7 RNA polymerase를 발현하는 유전자로서 IPTG에 의해 발현이 유도된 T7 RNA polymerase는 pET 시리즈 vector의 T7 promoter를 turn-on하여 발현을 유도한다. 따라서 T7 promoter를 갖는 발현 vector는 반드시 BL21(DE3) 균주에서만 발현된다. 그러나 Trp promoter나 pTac promoter, lac promoter, araBCD promoter를 갖는 발현 vector들은 어떤 균주에서 발현해도 잘 된다.

### 4) pLYS나 pRARE는 무엇인가요?

BL21(DE3)pLys라는 균주는 BL21(DE3)에 T7 lysozyme을 발현하는 vector를 넣어 놓은 균주이다. T7 lysozyme은 T7 promoter를 가지는 발현 vector의 basal expression을 최소화 하는 작용을 한다. 따라서 T7 promoter가 아닌 다른 promoter를 가지는 발현 vector를 사용할 경우 pLys를 가지는 균주의 사용은 아무런 의미가 없다. pLysR과 pLysS의 차이는 T7 lysozyme의 방향을 의미하는 것으로서 pLys는 p15 origin을 가지고 있는 low copy vector이고 chloroamphenicol 저항유전자를 가지고 있다. p15 replication origin은 pUC에서 기원한 origin과 공존할 수 있는 특성을 가지고 있으며 모 vector는 pACYC184이다.

pPIR이나 pRARE는 pLys와 같이 pACYC184 vector를 변형하여 만든 vector로서 기능은 pLys와 다르다. 종이 다른 유전자를 대장균주에서 발현하는 경우, 대장균이 사용하는 codon 이 발현하고자 하는 종의 codon usage와 다를 수 있다. 이중 가장 문제가 되는 것이 arg (AGA, AGG, CGA), gly (GGA), ile (AUA), Leu (CUA), Pro (CCC)로서 대장균에 모자라는 tRNA를 보충해 주는 것이 pRARE vector이다. 미리 pRARE를 BL21 균주에 넣어놓은 것이 Rosetta 균주이다.

### 5) 단백질 발현시 soluble과 insoluble 발현을 확인하는 방법은 어떤 것이 있나요?

발현한 단백질이 soluble한지 확인하는 방법은 cell lysis 후 원심분리한 맑은 상층액을 전기영동해 보면 바로 알 수 있다. 발현한 단백질이 insoluble한 경우 축적되어 형성되는 inclusion body는 12000 rpm의 속도로 1분만 원심분리해 주어도 모두 가라앉기 때문이다. Cell을 파쇄한 후 용액의 탁도로도 짐작은 할 수 있지만 확실한 것을 알기 위해서는 total fraction과 비교하여 soluble fraction에 존재하는 단백질의 양을 확인하는 것이 가장 정확하다.

### 6) 대장균 세포를 깨고자 할 때 특별한 buffer조성이 있나요?

어떤 lysis 방법을 쓰느냐에 따라 특별한 조성이 있을 수 있지만, 물리적인 힘 (sonication)으로 세포를 깨고자 할 때는 가장 기본이 되는 buffer만 사용해도 문제가 없다.

### 7) 대장균을 lysis 할때 반드시 protease inhibitor를 첨가해야 하나요?

Protease inhibitor는 발현균주에 존재할 수 있는 단백질분해효소의 활성을 최대한 억제하기 위한 목적이지만 흔히 사용하는 발현균주인 BL21에는 두개의 주된 효소가 결핍되어 있기 때문에 발현한 단백질의 총량이나 활성에 영향을 줄 정도는 아니다. 따라서 protease inhibitor의 첨가는 필수가 아닌 옵션으로서 실험자가 임의로 결정할 문제이다.

### 8) 발현단백질의 solubility에 영향을 주는 요인은 무엇들이 있나요?

대장균은 지나치게 과발현한 단백질이나 세포의 생존에 위험을 줄 수 있는 단백질, 그리고 대장균의 환경에 맞질 않는 구조를 가지고 있는 단백질을 비활성화된 상태로 inclusion body에 축적한다. Inclusion body의 정확한 생성기작은 완벽히 알려져 있지 않다. 따라서 발현온도, 발현양에 영향을 주는 inducer의 농도에 대한 사전조사를 실시하는 것이 좋다.

### 9) Tagging 서열이 있지만 resin에 붙지 않습니다. 이유가 무엇일까요?

단백질은 핵산처럼 단순한 구조가 아니라 아미노산의 구성에 따라 복잡한 3차, 4차 구조를 형성한다. 이 과정에서 붙여 놓은 tag 서열이 내부로 감춰질 수 있으며 노출되어 있다 해도 주변에 있는 다른 아미노산이나 구조에 의해 발현이 억제되거나 아예 되지 않을 수 있다. 비교적 작은 크기의 tag인 6xhis tag를 사용할 경우엔 단백질의 위치에 따른 결합율을 비교해 보는 것이 좋다. 비교적 크기가 큰 GST나 MBP 도 그 자체로서는 resin과의 결합효율이 높으나 fusion한 단백질에 따라 결합수율이 극도로 낮아 질 수 있으므로 주의해야 한다.

### 10) DNA서열에는 문제가 없지만 발현이 확인이 되지 않는 경우는 왜 그럴까요?

이중 단백질을 대장균에서 발현하는 경우, Coomassie 염색만으로도 정상적인 발현을 확인할 수 있을 만큼 발현률이 높은 경우는 많지 않다. 여러가지 요인들, codon usage 문제나 구조적 문제, 세포내 독성 문제 등에 의해 발현이 억제되거나 아예 되지 않을 수 있다. 특히 membrane domain을 갖는 단백질의 경우는 성공률보다 실패율이 더 높게 나오고 있다. 이런 경우 항체를 이용해 western 분석을 해아 발현을 겨우 확인할 수 있지만 발현율을 더 높이거나 할 수 있는 대안은 현재로서는 없다.

### 11) GST fusion 단백질을 정제하면 GST 크기의 band가 보입니다. 무엇이 문제일까요?

GST fusion 방법은 GST pull-down assay 등에 자주 사용되는 정제 방법이지만, fusion 단백질의 불안정성이나 insolubility 문제에 있어서 역량이 높은 방법 중 하나이다. 구조적으로 불안정하여 fusion 단백질이 빠른 속도로 깨져 나가는 경우에 GST fusion 단백질 외에도 GST 크기의 band가 함께 정제되는 경우가 많다. GST의 고유한 속성으로서 이문제를 해결할 방법은 없다.

### 11) 단백질이 resin으로부터 elution이 되지 않습니다. 원인은 무엇이며 어떻게 해야 하나요?

정제를 하다 보면 단백질이 resin으로 부터 정상적으로 elution되지 않는 경우를 간혹 접하게 된다. 특히 단백질의 크기가 큰 경우에 이러한 현상이 자주 일어나며, 그 원인은 다양하다. 단백질이 resin에 무작위적으로 흡착하여 강하게 결합된 경우, 단백질이 resin에 붙은 채 aggregation이 되는 경우, 단백질의 고유한 특성으로 인해 polymerization이 일어나는 경우, 정제 과정 중 resin이 한번이라도 마른 적이 있는 경우 등 원인은 다양하며 이런 경우엔 해당 단백질이 정상적인 기능을 갖길 바라는 것은 무리이다. His resin의 경우에는 EDTA를 처리하여 Ni ion과 함께 단백질을 elution할 수도 있지만, 다른 affinity 정제의 경우에는 resin에 SDS를 처리하는 방법 외에는 별다른 수가 없다. Resin에 붙이는 단백질의 양을 조절해 주거나 또는 elution buffer의 조성은 물론, bind/wash buffer의 조성을 최적화 해주는 작업을 해야 한다. 일반적인 물은 없으며 정제하고자 하는 단백질들의 특성을 충분히 숙지한 후 개별적으로 조건을 잡아줘야 한다는 점에서 아주 까다로운 일이 될 수 있다.

**12) Impurity가 너무 많습니다. 어떻게 하면 줄일 수 있나요?**

단백질 정제에서 impurity는 정제단백질과의 비율문제일 뿐, 100%의 정제도로 단백질을 정제하는 것은 불가능하다. 정제도를 높여 나가는 것이 정제의 핵심으로서 impurity를 줄여 나가는 것이 정제과정이기 때문에 affinity 정제만으로 만족할만한 수준의 정제도를 얻지 못한다면 gel filtration이나 ionic exchange와 같은 이차 정제방법을 고려해야 한다. 하지만, affinity 정제방법만으로도 높은 정제도의 단백질을 분리하여 정제할 수 있는 키워드는 bind/wash 조건이다. Hard한 조건에서의 결합과 wash는 가능한 많은 양의 impurity를 제거할 수 있는 유일한 방법으로서 통상적으로 resin volume의 몇배를 wash하라는 식이 아닌 impurity가 최대한 많이 제거되는 volume으로 wash를 하는 것이 좋다. Resin에 비특이적으로 결합한 단백질이나 resin에 붙은 단백질과 비특이적으로 결합하는 단백질들은 hard한 조건의 wash 방법과 더불어 단백질간 비특이적 결합을 줄여주는 non-ionic detergent의 첨가에 의해 제거될 수 있다 (NP40, Tween 20, Triton X-100 등).

결론적으로 wash를 일률적인 방법으로 하는 것이 아니라 단백질의 특성에 따라 최대한 impurity가 없어질때 까지만 개념으로 하는 것이 도움이 된다.

**13) 같은 vector를 사용하는데 왜 발현율이 다를까요?**

발현에 사용하는 vector들은 생각하는 것만큼 다양하지 않다. 하지만 같은 vector를 사용하더라도 발현하고자 하는 단백질의 특성에 따라 발현율은 놀라울 정도로 달라진다. 발현율은 단백질의 구조적 특성, 생리화학적 특성, codon의 구조에 의해 달라지며, 같은 단백질이라 할지라도 아미노산 한두개의 차이에 따라서도 발현율은 급격히 달라진다. 따라서 같은 vector를 이용해 이전에 좋은 결과를 얻었다고 해서 다른 단백질에서도 같은 결과를 얻을 것이라고 속단하는 것은 금물이다.

**14) 발현 정제는 잘 되는데 활성이 없는 이유는 무엇인가요?**

발현정제와 활성은 다른 문제일 수 있다. 단백질이 활성을 갖기 위해서는 특별한 조건이 필요한 경우가 많으며, 정제가 잘 되었다고 이에 비례하여 활성이 좋은 것은 아니다. 활성에 필요한 조건들을 충족시켜주는 것이 먼저이다.

**15) 과발현을 유도하면 대장균이 죽거나 자라는 속도가 늦어집니다. 무엇이 문제일까요?**

대장균의 생존에 영향을 줄 수 있는 단백질을 발현하는 경우라면 과발현은 대장균을 죽음으로 몰아 갈 수도 있다. 그리고 Induction을 하게되면 대장균내의 단백질 합성 기구는 발현 단백질을 합성하는데 많은 부분을 할애하게 됨으로써 생장에 필요한 구성물들이 부족하게 되어 생장률이 급격히 떨어질 수 있다. 실제로 inducer를 넣어준 후 생장곡선을 비교해 보면 inducer를 넣어주지 않은 대장균에 비해 생장이 눈에 띠도록 둔화되는 것을 볼 수 있다. 일반적인 batch induction의 경우에는 이러한 성장둔화가 문제되지 않지만 고밀도로 균을 배양하는 fed batch 배양의 경우에는 지속적으로 생장에 필요한 성분을 공급해 주어야 한다.

**16) 정제된 단백질을 농축할 때 침전이 생깁니다. 어떻게 해야 하나요?**

단백질은 정확한 buffer pH 조건이나 salt 조건 그리고 경우에 따라서는 cofactor를 첨가해 주는 조건에서 안정적으로 soluble 상태를 유지할 수 있다. 이외에도 다양한 이유로 인해 침전이 발생할 수 있으며 단백질의 특성을 정확히 이해하지 못하면 그 원인을 분석하고 해결방안을 제시할 수 없다. Buffer의 종류, buffer pH, 첨가해 주는 salt의 종류/농도를 다변화여 최적의 조건을 실험자가 직접 잡아야 한다.

**17) Denaturing 조건에서 정제가 가능한 방법이 있나요?**

Urea나 guanidine chloride와 같은 chaotropic agent에 의해 denature되어 있는 경우나 또는 SDS와 같은 ionic detergent를 이용해 denaturing시킨 단백질을 정제할 수 있는 현재까지 알려진 유일한 방법은 his resin을 이용하는 방법뿐이다.

**18) 정제한 단백질의 크기가 다르게 나옵니다. 원인이 뭘까요?**

유전자의 서열에 문제가 있거나, 단백질의 구조적 문제로 인해 단백질합성이 조기 종료되거나 (premature termination), 발현/정제과정 중 protease에 의해 합성된 단백질이 깨지거나, 발현 단백질이 불안정하여 스스로 깨지는 경우에 예측 크기보다 작은 크기의 단백질이 나올 수 있다. 또한 실제 크기는 맞지만 음 또는 양전하를 띠는 아미노산의 함량이 높아 SDS-PAGE 분석과정에서 단백질의 이동이 단백질의 크기에만 비례하지 않고 단백질이 가지고 있는 전하의 영향을 받게 되는 경우에도 크기는 달라질 수 있다. 또한 각종 modification (acetylation, methylation 등)에 의해서도 단백질의 크기는 다르게 보일 수도 있다.

**19) 정제한 단백질의 정량 방법은 어떤 것들이 있나요?**

정제한 단백질의 정량방법은 dye binding 법과 UV 흡광법이 주로 사용된다. Dye binding 방법 (Bradford assay와 같은)은 단백질의 아미노산 함량에 따라 변이가 심한 방법으로 잘 알려져 있고 UV 흡광법은 정제 단백질의 아미노산 서열을 알고 있어야 하며 비교적 정확한 방법이지만 단백질의 tyrosine이나 tryptophan 함량에 따라 오차가 발생할 수 있는 단점이 있다. 단백질의 Molecular extinction coefficient는 1 M 용액의 흡광계수로서 단백질이 가지고 있는 tyrosine과 tryptophan의 갯수를 이용해 다음과 같은 간단한 식으로 계산할 수 있다.

$$\epsilon: \text{Molar Extinction Coefficient} = (\text{Number of Tryptophan residues} \times 5500) + (\text{Number of Tyrosine residues} \times 1490)$$

흡광계수를 구한 후 흡광도를 측정하면 아래의 식으로부터 단백질용액의 농도를 계산할 수 있다.

$$A = c d \epsilon$$

A: Absorption at 280 nm

c: Concentration [mol/l]

$\epsilon$ : Extinction coefficient [l/(mol\*cm)]

d: Cuvette length [cm]

이 식에 단백질의 분자량을 대입하면 농도를 mg/ml의 단위로 환산할 수 있다.

(참고 : 단백질의 아미노산 서열로부터 흡광계수를 계산해 주는 인터넷 사이트)

<http://www.biomol.net/en/tools/proteinextinction.htm>

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>

(참고 : 280nm의 흡광도로 단백질 농도 계산하는 인터넷 사이트)

<http://christoph-leidig.de/tprot.html>

**20) Resin의 사용 volume은 어떻게 결정해야 하나요?**

사용할 resin의 volume은 발현단백질의 양과 volume을 고려해 결정해야 한다. 계산상의 수치값을 가지고 결정하기 보다는 실제 실험내용을 기준으로 판단하는 것이 좋다.

**21) Resin의 재활용이 가능한가요? 가능하다면 어떻게 해야 하나요?**

Affinity 정제에 사용하는 resin은 binding ligand를 공유결합으로 붙여 만든다. 재활용이 가능하며 적절하게 wash를 하여 사용하면 반 영구적으로 사용이 가능하다. Wash는 resin에 끼어 있는 이물질이나 단백질을 제거하기 위해 SDS와 같은 ionic detergent를 이용하거나 ethanol과 같은 유기용매를 사용할 수 있다. Wash한 resin은 증류수로 수차례 깨끗이 씻은 후 최종적으로 binding buffer나 또는 장기보관시 20% ethanol에 담가 4C에서 보관하면 된다.

**22) His resin의 recharging이 뭐가요?**

His resin은 Ni ion이 결합하는 IDA나 NTA를 resin에 공유결합으로 붙인 후 Ni ion을 붙여 만든다. Ni ion을 붙이는 과정을 nickel charging이라 하고 이를 다시 떼어내는 작업을 stripping이라 한다. 이 상태에서 resin은 백색으로 변하며 여기에 다시 Ni ion을 붙이는 과정을 nickel recharging이라 하는데 이 과정은 무한반복이 가능하다. Ni ion의 stripping은 0.1 M EDTA 용액을 resin에 흘려주고 반복적으로 wash하는 과정을 통해 이루어지며 recharging은 Ni sulfate 용액을 resin에 처리하는 과정을 통해 이루어진다. 이와 같은 과정을 통해 resin은 Ni ion의 고유색인 에머럴드 색을 다시 갖게 된다.

**23) His resin에 다른 이가 금속 이온을 charging 해 사용할 수 있나요?**

당연히 가능하다. 엘피스바이오텍의 Ni-IDA his resin은 Ni ion으로 charging하여 판매하고 있지만 EDTA로 어렵지 않게 stripping을 할 수 있고 여기에 Cu, Co, Fe ion들을 따로 붙여 다른 목적으로도 사용할 수 있다. Cu나 Co ion은 Ni ion보다 친화력이 좋다고 하여 별도의 제품으로 판매하는 회사들이 있는 것으로 알고 있지만, 비싼 가격에 별도의 제품으로 구매하는 것 보다 엘피스바이오텍의 Ni-IDA resin을 탄력적으로 이용한다면 더 경제적인 실험방법이 될 것으로 예상된다. Fe ion이 charging된 IDA resin은 세포내 phosphoprotein의 농축 정제에 (enrichment) 특화되어 사용되는 resin 중 하나로서, 다른 금속이온들과 마찬가지로 어렵지 않게 charging과 recharging이 가능하다.

**24) Resin의 종류와 표기방법에 대해 궁금합니다.**

Agarose CL4B에서 agarose는 resin의 재질을 의미하며 CL은 cross-linking, 4B는 4% bead를 의미한다. 즉 4% agarose를 중합하여 cross-linking시킨 bead란 의미가 된다. 6%의 agarose로 만든 bead 라면 agarose CL6B가 되고 2%의 agarose로 만든 bead라면 agarose CL2B가 되는 것이다. Bead를 만든 후 cross-linking 과정이 없었다면 Agarose 4B가 된다. Cross-linking은 화학적 가교제를 이용해 agarose 분자간 공유결합을 유도한 것으로서 물리적 화학적 안정성이 갖게 된다. 높은 온도에서 bead가 녹지 않고 강산 강염기 성 조건에서도 bead에 손상을 주지는 않지만 심한 물리적 충격에 의해 bead가 깨질 수도 있다.

Affinity 정제에는 agarose 재질의 bead가 많이 사용되며, 흔히 superose, sepharose라고 하는 것은 상표명일 뿐 재질은 agarose인 bead이다.

**25) Resin의 링커길이에 따라 결과적 차이가 있는지요?**

Resin과 affinity ligand를 이어주는 링커 (linker)는 보통 3개 또는 12개의 탄소원자로 구성된 linear chemical을 이용하는데, 탄소의 길이가 길수록 단백질간, 그리고 resin과 단백질간의 결합 반발력이 줄어들게 된다. 12 atom linker의 사용이 일반적이다.

**26) Agarose resin이 Affinity 정제에 보편적으로 사용되는 이유가 궁금합니다.**

Agarose resin이 affinity 정제에 주로 사용되는 이유는 agarose에 단백질이 비특이적으로 결합하는 비율이 타 재질의 resin들에 비해 낮으며 또한 agarose의 pore size가 단백질이 통과할 만큼 크기 때문이다.

**ELPIS-Biotech. Inc.**  
**www.elpisbio.com**

보다 자세한 자료를 원하시면 [www.elpisbio.com](http://www.elpisbio.com) 을 방문하시거나 이메일 [elpis@elpisbio.com](mailto:elpis@elpisbio.com) 또는  
전화 042-581-8448로 문의를 주시면 성심껏 답변을 드리겠습니다