(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0037023
(43) 공개일자 2013년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/38 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0101333
(22) 출원일자 2011년10월05일
심사청구일자 2011년10월05일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
하상수
경기도 남양주시 도농로 32, 210동 1201호 (도농동, 부영그린타운)
김일현
경기도 고양시 일산서구 탄중로471번길 5, B동 104호 (일산동, 세인아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유수미

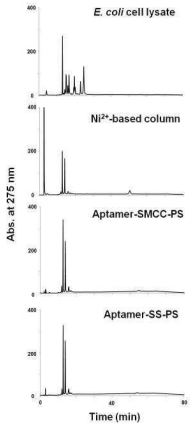
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **히스티딘 태그를 가진 단백질의 정제를 위한 고형 지지체 및 이를 이용한 정제 방법**

(57) 요 약

본 발명은 이중황화 결합을 통해 His-tag 앱타머가 결합된, His-tag를 가진 단백질의 정제를 위한 고형 지지체 및 이를 이용한 His-tag를 가진 단백질의 정제 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

임현경

서울특별시 도봉구 시루봉로21길 32, 명성빌라 6차 303호 (방학동)

신선미

경기도 안양시 동안구 부흥동 관악현대아파트 121동 1002호

남혜연

제주특별자치도 제주시 노형동 중흥S클래스 109동 605호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0021956
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	앱타머를 이용한 관심 금속이온의 선택적 추출
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	ST110001M023971
부처명	서울시
연구사업명	서울시 신기술 연구개발 지원사업(현재의 명칭은 서울시 산학연 협력사업)
연구과제명	맞춤형 항암치료를 위하여: 암세포와 백금항암제에 대한 상이한 저항성을 이해하기 위한 정량적 연구
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.08.01 ~ 2013.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

이중황화 결합을 통해 His-tag 앱타머가 결합된, His-tag를 가진 단백질의 정제를 위한 고형 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서, 머캡토메틸폴리스티렌 수지에 His-tag 앱타머가 이중황화 결합을 통해 결합되어 형성된 고형 지지체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, His-tag 앱타머는 서열 번호 2의 염기서열을 갖는 RNA 앱타머인 고형 지지체.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 고형 지지체를 이용하여 His-tag를 가진 단백질을 정제하는 방법.

청구항 5

제3항의 고형 지지체를 이용하여 His-tag를 가진 단백질을 정제하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질의 정제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 이중황화결합으로 고형 지지체에 도입된 앱타머를 이용하여 히스티딘 태그(His-tag)를 가진 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 앱타머는 그들의 상응하는 타겟에 대해 높은 친화성과 특이성을 나타내는 짧은 단일쇄 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드이다. 항체처럼, 앱타머는 상응하는 타겟의 분자적 인지와 특이적 결합을 가능하게 하는 3차 구조로 폴딩할 수 있다. 따라서, 앱타머는 분자적 인지 및 라이벌 항체에 기초한 모든 방법에서 캡처(capture) 또는 검출 분자로서 사용될 수 있다. 앱타머는 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)로 불리는 선택 및 증폭의 반복적 과정에 의해 합성 핵산의 조합 라이브러리로부터 분리된다. 친화성에 기반한 정제에서 앱타머는 항체 또는 단백질에 비하여, 고온 및 극한 pH에 대한 안정성 증가를 비롯한 여러 이점을 제공한다. 또한, 앱타머는 화학적으로 용이하게 합성되며 이러한 합성 동안 올리고뉴클레오티드 서열 내의 특정 위치에서 앱타머에 상이한 변경을 이룰 수 있어, 제어된 배향으로 고형 지지체에 앱타머가 직접 고정되도록 할 수 있다. 대조적으로, 항체는 임의의 배향으로 고형 지지체에 고정되어, 결합 효율을 감소시키고 또한 이러한 특징으로 인하여 비특이적 결합을 증가시킬 수 있다. 앱타머의 다른 효과는 SELEX 동안 여러 가지 조건(버퍼 조성, pH, 및 온도 포함)을 적용하여 원하는 분석 조건하에서 활성을 가지는 앱타머를 선택할 수 있다는 것이다. 앱타머를 이용한 단백질 정제와 관련하여, 정제를 원하는 단백질 활성에 영향을 주지 않는 온건한 용출 조건을 허용하는 앱타머를 선택할 수도 있다. 예를 들어, 정제를 원하는 단백질의 정확한 폴딩을 위해 2가 이온이 선택 버퍼에 첨가되어야 하는 경우 이들 이온에 의존하는 앱타머를 생성할 수 있으며, 정제 과정의 후반에, 결합된 타겟 단백질의 용출은 EDTA와 같은 킬레이틸 시약의 첨가를 통해 앱타머 3차 구조의 파괴에 의해 쉽게 이루어질 수 있다.

[0003] 한편, 종래에는, 올리고히스티딘인 His-tag를 가진 단백질의 정제는 고정된 금속 친화성 크로마토그래피를 통해 실시되었다. 이미노디아세트산(IDA) 또는 니트릴로트리아세트산(NTA)와 같은 킬레이팅 리간드가 보통 금속 이온을 고정하기 위해 사용되며 금속 이온에 대한 히스티딘의 친화성이 단백질의 분리를 위해 이용된다. 가장 보

편적으로 Ni^{2+}, Cu^{2+}, 및 Co^{2+}와 같은 전이 금속 이온이 사용된다. IMAC과 관련된 한 가지 문제점은 크로마토그래피 동안 이들 금속 이온이 누출된다는 것이다. 이것은 정제된 단백질의 금속-촉매화 산화를 야기하여 예상치 못한 특성 및 활성 감소를 야기할 수 있다. 또한, 독성 전이 금속으로 인한 오염은 세포 배양 및 생의약적 응용에서 정제된 단백질의 사용을 제한할 수 있다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하기 위한 연구 결과, 본 발명자들은 His-tag를 가진 단백질의 정제를 위해 이중황화결합으로 고형 지지체에 도입된 앱타머를 기반으로하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 His-tag를 가진 단백질을 효율적으로 정제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 His-tag에 대한 RNA 앱타머를 이용하여 His-tag를 가진 단백질을 효율적으로 정제하는 방법 및 이중황화결합(disulfide bond)으로 앱타머가 도입된 고형 지지체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 His-tag에 대해 높은 특이성과 친화성으로 결합하는 RNA 앱타머(이하에서는 His-tag 앱타머라 칭함)가 이중황화결합으로 결합된 고형 지지체를 제공한다.

[0007] 본 발명에 있어서, His-tag는 올리고히스티딘 태그를 말한다.

[0008] 본 발명자들은 His-tag를 가진 단백질의 정제를 위하여 His-tag 앱타머와 올리고히스티딘 사이의 고도로 선택적인 상호작용을 이용하였다(K_d~3.78 pM). His-tag 앱타머와 올리고히스티딘 사이의 친화성은 단백질-항체의 친화성 (K_d~10^{-5}-10^{-12} M)에 견줄만한 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 티올-작용화된 RNA His-tag 앱타머를 제작하고, 이를 머캡토메틸폴리스티렌 수지와 같은 티올-작용화된 고형 지지체 상에 이중황화 결합을 통해 고정함으로써, His-tag를 가진 단백질의 정제를 위한 고형 지지체를 제조하였다. RNA 앱타머의 고형 지지체에의 결합은 도 1에 나타난 바와 같다.

[0009] 본 발명에 있어서, 고형 지지체는 친화성 크로마토그래피에 사용될 수 있는 수지 등의 지지체를 의미하며, His-tag 앱타머를 결합시키기 위한 고형 지지체로는 예를 들어, 머캡토메틸 폴리스티렌(PS) 수지가 사용될 수 있으며, 이중황화 결합을 통해 His-tag 앱타머를 결합시켜 변경된 고형 지지체의 예에는 앱타머-SS-PS 수지가 포함된다.

[0010] 본 발명에 사용될 수 있는 His-tag 앱타머는 His-tag에 높은 친화성을 가지고 특이적으로 결합할 수 있는 RNA 앱타머라면 제한없이 가능하며, 예를 들어, 서열 번호 1의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용하여 합성되어 5'-GCUAU GGGUG GUCUG GUUGG GAUUG GCCCC GGGAG CUGGC-3'의 염기서열(서열 번호 2)을 갖는 RNA 앱타머를 이용할 수 있다.

[0011] 상기와 같이 이중황화 결합을 통해 His-tag 앱타머를 고정시켜 변경된 고형 지지체의 His-tag를 가진 단백질의 정제 기능성을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 변경된 수지 비드를 1 mg/mL의 His-tag를 가진 β-갈락토시다제(β-Gal-His)와 항온처리하고, PBST (NaCl)로 세척한 후, 단백질을 PBST + 1 M 이미다졸로 용출시켰다. 음성 대조군으로서는 앱타머가 결합되지 않은 티올-작용화된 수지를, 그리고 일반적인 가교결합제를 이용한 공유결합 방식으로 앱타머가 고정된 수지 대조군으로서 도 2에 나타난 바와 같은 방법으로 준비된 앱타머-SMCC-PS 수지를 이용하였다. 이들 조건하에서, 본 발명자들은 His-tag를 가진 β-갈락토시다제가 수지에 고정된 앱타머에 결합하는 것을 확인하였다. 앱타머-SMCC-PS 및 앱타머-SS-PS 수지의 단백질 회수율은 각각 75% 및 77%로서 이중황화 결합을 통해 앱타머가 고정된 수지는 가교결합제를 이용한 공유결합 방식으로 앱타머가 고정된 수지와 동등한 정제 효율을 나타냈다.

[0012] 이러한 단백질 회수율에서 관찰된 단백질 손실이 결합된 단백질의 불완전한 용출에 의해 야기되었음을 확인하기 위하여, 램리(Laemmli) 버퍼에서 95°C로 가열하여 추가 용출 단계를 실시하였다. 램리 버퍼는 SDS 및 머캡토에탄올을 함유하며 단백질의 3차 구조를 파괴하는 것으로 알려져 있으며, 승온은 앱타머 구조를 용융시킨다. 따라서, 앱타머 및 결합 단백질의 풀림(unfolding)으로 인하여, 앱타머와 타겟 단백질 사이의 분자적 인지의 기초가 파괴된다. SDSPAGE 결과, 램리 버퍼와의 가열은 양성 단백질 용출을 야기하였다. 이미다졸에 의한 관찰된

불완전한 용출에도 불구하고, 결과는 이중황화 결합을 통해 앱타머가 결합된 고형 지지체가 단백질 정제를 위해 효과적으로 이용될 수 있음을 보여준다.

[0013] 또한, 본 발명자들은 상기와 같이 이중황화 결합을 통해 앱타머가 결합된 수지의 정제 기능성을 정제된 β-Gal-His를 이용하여 실시하는 한편, 복합 샘플을 이용하여 앱타머-결합 수지의 정제 효율을 확인하였다. 이를 위해, His-tag를 가진 단백질 (β-Gal-His)을 발현하는 이.콜리(E.coli)의 세포 용해물을 앱타머-기반 정제를 위해 이용하여, β-Gal-His를 앱타머-SMCC-PS 및 앱타머-SS-PS 수지를 통해 정제하였다. 정제 과정의 상이한 분획들을 HPLC를 통해 분석한 결과, 용출액에서 β-Gal-His가 고순도로 검출되었으며 앱타머-SS-PS 수지에 의한 정제 결과는 종래의 Ni^{2+}-기반 친화성 크로마토그래피와 앱타머-SMCC-PS 크로마토그래피에 견줄만하였다(도 3).

[0014] 한편, 크로마토그래피 지지체의 본질적 특징은 매트릭스의 장기적 안정성이다. 이에, 이중황화 결합을 통해 앱타머가 결합된 수지의 장기적 안정성을 조사하기 위하여, 사용 후 재생된 비드를 상이한 기간 동안 결합 버퍼에서 4 °C에서 보관하였다. 최대 3개월 동안 보관 후, 정제된 β-Gal-His (1 mg/mL)의 수지에의 결합을 조사하였으며, 그 결과 이중황화 결합을 통해 앱타머가 결합된 수지가 3개월동안 기능성을 유지함이 입증되었다.

[0015] 이처럼, 본 발명의 이중황화 결합을 통해 His-tag 앱타머가 결합된 고형 지지체는 His-tag를 가진 단백질의 정제를 위해 효과적으로 사용될 수 있으며, 또한, 단백질 분리에 사용된 후, 이중황화 결합의 환원에 의해 고형 지지체로부터 앱타머를 제거하여 이후의 다른 정제를 위해 재사용될 수 있으므로 일반적인 가교결합제를 이용한 공유결합에 의해 앱타머를 결합시킨 고형 지지체에 비하여 효율적으로 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한 상기한 바와 같은 His-tag 앱타머가 이중황화 결합을 통해 고정된 고형 지지체를 이용하여 His-tag를 가진 단백질을 정제하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 방법은 조(crude) 이.콜리 세포 용해물로부터 상이한 His-tag를 가진 단백질의 정제에 성공적으로 이용되었으며, 가교결합제를 이용한 공유결합을 통해 앱타머가 결합된 고형 지지체를 이용하는 경우와 대등한 정제 효율을 나타내었다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 His-tag 앱타머가 이중황화 결합을 통해 결합된 고형 지지체는 종래의 Ni^{2+}-기반 친화성 크로마토그래피 정제에 비하여 안전성면에서 우수하며, 가교결합제를 이용한 공유결합 방식으로 앱타머가 결합된 고형 지지체와 달리 이중황화 결합의 환원을 통해 지지체의 재사용이 가능하여 비용 절감 효과를 제공할 수 있어, His-tag를 가진 다양한 단백질의 정제를 위해 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 His-tag 앱타머-SS-PS 수지의 제조를 나타내는 도식이다.

도 2는 가교결합제를 이용한 공유결합을 통해 앱타머가 결합된 앱타머-SMCC-PS 수지의 제조를 나타내는 도식이다.

도 3은 이.콜리 세포 용해물 및 His-tag 앱타머가 결합된 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 얻어진 정제 분획의 HPLC 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하에서, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 하지만, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 본 발명의 범위를 이로 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0021] **실시예 1. His-tag 앱타머가 결합된 고형 지지체의 제조**

[0022] 시약은 상업적 공급체로부터 입수하여 추가 정제없이 사용하였다.

[0023] 일반적인 공유결합 방식으로 앱타머를 수지에 결합시키기 위해 사용된 가교결합제는 설포석신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (설포-SMCC, 시그마(Sigma))였다.

[0024] His-tag를 가진 단백질에의 특이적 결합을 위한 RNA-기반 앱타머는, 5'-말단에 T7 프로모터 서열을 함유한 안티센스 올리고뉴클레오티드 (5'-GCCAG CTCCC GGGGC CAATC CCAAC CAGAC CACCC ATAGC CCCCC CTATA GTGAG TCGTA TTAGT CC-3' (서열 번호 1), Shin *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3322-3325)를 이용하여 합성하였으며, 생성된 RNA는 서열 번호 2의 염기서열을 가지며, 문헌 (Kim *et al*, *Tet. Lett.* **2010**, *51*, 3446-3448)에 따라 RNA 분자의 5 '-말단에 5'-말단 설프하이드릴기를 도입하기 위한 효소 방법을 통해, 5 ' 티올기를 함유하도록 변경하였다. 전사 전에, 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'- 모노포스포로티오에이트 (GSMP)를, T7 RNA 폴리머라제를 위한 기질로서 합성하였다 (Kim *et al*, *Tet. Lett.* **2010**, *51*, 3446-3448). 인비트로 전사 및 이어서 알카라인 포스파타제의 처리를 이용하여 RNA 분자의 5 '-말단에 설프하이드릴 부분을 포함시켰다.

[0025] 가교결합제를 통해 앱타머가 고정된 앱타머-SMCC-PS 수지는 도 2의 도식에 따라, 고체 지지체로서 이용된 아미노메틸화 폴리스티렌 (아미노PS) 수지 (메쉬: 200~400, 2-3 mmol *N*/g 수지, 노바바이오켐(Novabiochem))의 변경에 의해 제조하였다. 합성 단계 동안 아미노PS에 첨가된 설포-SMCC (설포석신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트, 시그마)의 양은 과량의 설포-SMCC에 의해 공격되도록 노출되는 아미노기의 5 mol %였다. 수지와 컨쥬게이션된 His-tag 앱타머의 양은 대략 2.65 nmol/g 수지로 추정되었으며, 즉, 0.265 mol%의 아미노기가 His-tag 앱타머에 공유적으로 부착되었다.

[0026] 본 발명에 따라 이중황화 결합을 통해 앱타머가 결합된 앱타머-SS-PS 수지는 도 1의 도식에 따라, 고체 지지체로 이용된 머캡토메틸 폴리스티렌(머캡토메틸PS) 수지 (메쉬: 100~200, 2.0 mmol *S* /g 수지, 시그마)의 변경에 의해 제조하였다. 머캡토메틸PS에 첨가된 티올-작용화된 RNA 앱타머는 앱타머와 이중황화 결합을 형성하기 위해 실온에서 밤새 노출되는 티올기의 5 mol%였다. 수지와 컨쥬게이션된 His-tag 앱타머의 양은 대략 2.62 nmol/g 수지로 추정되었으며, 즉, 0.262 mol %의 티올기가 His-tag 앱타머에 공유적으로 부착되었다.

[0027] **실시예 2. His-tag 앱타머가 결합된 고형 지지체를 이용한 His-tag를 가진 단백질의 정제**

[0028] 상기 실시예 1에서 제조한 앱타머-SMCC-PS 및 앱타머-SS-PS를 제조사의 매뉴얼에 따라 친화성 크로마토그래피 컬럼 키트 (일회용 5 mL 폴리프로필렌 컬럼, 써모 사이언스(Thermo Sci.)) 내로 각각 패킹하였다.

[0029] His-tag를 가진 β-갈락토시다제 (β-Gal-His)를 코딩하는 플라스미드 (pRSET/*lacZ*)를 인비트로겐(Invitrogen)으로부터 구매하였다. pLysS 벡터를 보유한 이.콜리 DE21/DE3의 형질전환은 형질전환 및 보관 용액(TSS) 방법을 이용하여 실시하였다. 요약하면, 컴피턴트(competent) 이.콜리를 10% 폴리에틸렌 글리콜, 5% 다이메틸 설폭시드 및 50mM Mg^{2+}, pH 6.5 (TSS)를 함유한 LB 브로쓰에서 제조하였다. 그 후, 20 ng의 플라스미드를 200 mL의 컴피턴트 세포에 첨가하고 1시간 동안 0 °C에서 항온처리를 실시하였다. 2분 동안 42 °C에서 항온처리 및 5분 동안 0 °C에서 항온처리 후, 800 mL의 LB 배지를 첨가한 후 1시간 동안 37 °C에서 항온처리하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고 플라스미드를 함유한 세포의 선택은 100 mg/mL 암피실린을 함유한 한천 플레이트 상에 세포를 도말하여 실시하였다.

[0030] 배양은 100 mg/mL 암피실린으로 보충된 100 mL의 LB 배지(10 g/L 카제인 펩톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물)를 가진 쉐이킹 플라스크에서 실시하였다. 0.8-1.0의 광학 밀도 OD_{600}에서, IPTG의 첨가에 의해 His-tag를 가진 β-갈락토시다제의 발현을 유도하였다. 배양물을 30 °C에서 밤새 성장시키고 세포를 30분 동안 3,345*g*에서(4 °C) 원심분리하여 수집하였다. β-갈락토시다제의 세포내 생산은 세포의 파괴가 필요하도록 한다. 따라서, 세포 펠렛을 50 mM NaH_2PO_4, 500 mM NaCl, pH 8.0에 재현탁시키고, 초음파로 4 °C에서 파괴시켰다. 원심분리 및 여과 후, 이.콜리 세포 용해물을 His-tag를 가진 단백질의 정제를 위해 사용하였다.

[0031] 이.콜리 세포 용해물로부터 β-Gal-His의 정제는 제조사에 의해 권고된 대로 Ni^{2+}-로딩된 친화성 크로마토그래피 컬럼(His SpinTrap, 지이 헬스케어(GE Healthcare))를 이용하여, 그리고 동일한 방식으로 앱타머-SMCC-PS 및

앱타머-SS-PS 친화성 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 실시하였다.

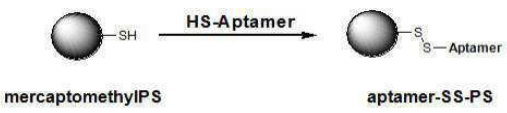
[0032] 정제 후, 친화성 크로마토그래피 이전의 조 세포 용해물과 크로마토그래피에 의한 정제 분획을 HPLC에 의해 분석하였다. HPLC를 위해 세포 용해물, 종래의 Ni2+-기반 컬럼, 앱타머-SMCC-PS 컬럼, 및 앱타머-SS-PS 컬럼을 각각 이용하여 정제된 분획을 250-mm X 4.6-mm Hypersil ODS 컬럼 (써모 일렉트론 코포레이션(Thermo Electron Corporation), 미국 매사추세츠주 월댐 소재)에 로딩하였다. 용매 A와 B는 각각 물(0.1% TFA) 및 아세토니트릴(0.1% TFA)이었다. 5분 동안 0% B의 등용매 용출 후 5분 동안 0% B 내지 20% B, 10분 동안 20% B 내지 35% B, 10분 동안 35% B 내지 40% B, 그리고 마지막으로 30분 동안 40% B 내지 70% B의 구배 용출이 이루어졌다. 1.0 mL/min의 유속을 사용하였으며, β-Gal-His-1에 대한 ~ 12.7 min 및 β-Gal-His-2에 대한 ~ 13.9 min의 체류 시간이 각각 얻어졌다. 생성물은 275 nm에서 모니터하였다. 도 3의 HPLC 결과로부터 나타나듯이 본 발명의 His-tag 앱타머-SS-PS 수지는 기존의 Ni^{2+}-기반 친화성 크로마토그래피 또는 앱타머-SMCC-PS 기반 친화성 크로마토그래피와 대등한 정제 효율을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0033] 한편, 종래의 Ni^{2+}-로딩된 친화성 크로마토그래피에 비하여 고정된 앱타머의 기능성을 조사하기 위하여, 수지를 2시간 동안 PBST에서 정제 β-Gal-His와 항온처리하였다. 그 후, 수지를 500 mM NaCl 로 보충된 PBST(PBST (NaCl)) 또는 500 mM NaCl 및 1 M KCl로 보충된 PBST (PBST (NaCl, KCl))로 3회 세척하였다. PBST 내의 1 M 이미다졸을 이용하여 단백질의 His-tag를 경쟁적으로 대체하였다. 모든 항온처리, 세척, 및 용출 단계는 100 mL의 부피로 실시하였으며, 단 마지막 세척 분획 및 첫 번째 용출은 50 mL의 버퍼에서 실시하였다. 용출의 완료를 조사하기 위하여, 마지막 용출 후 95 °C에서 10분 동안 램리 버퍼(20 mM 트리스(하이드록시메틸)-아미노에탄 (Tris)/HCl, 2 mM EDTA, 5% 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 10% 글리세롤, 및 10% 2-머캡토에탄올)와 수지를 항온처리하였다. 음성 대조군으로서, 티올-개질된 수지를 앱타머를 이용한 사전 작용화없이 이용하였다.

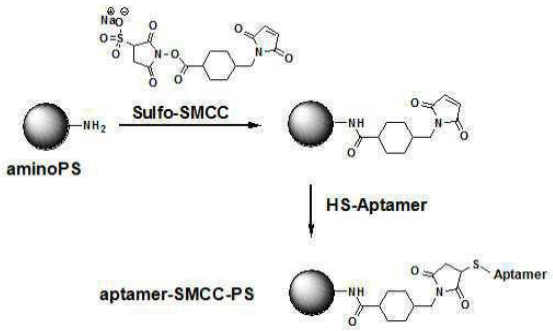
[0034] 세척 분획 및 용출액을 분석하고 "회수된" 단백질 양을 결합된 단백질과 비교한 결과, 앱타머-SMCC-PS 및 앱타머-SS-PS의 단백질 회수율은 각각 75%와 77%로서 앱타머-SS-PS는 앱타머-SMCC-PS와 대등한 기능성을 나타냈다.

도면

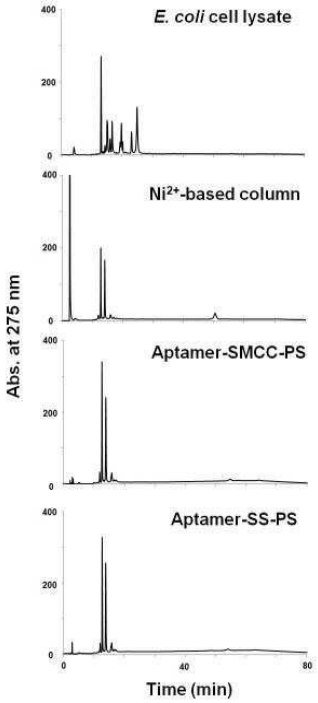
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Solid support and method for purifying His-tagged protein

<130> SDP50324

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense oligonucleotide

<400> 1

gccagctccc ggggccaatc ccaaccagac cacccatagc ccccccctata gtgagtcgta 60

ttagtcc 67

<210> 2

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 2

gcuaugggug gucugguugg gauuggcccc gggagcuggc 40