



EcoPro™ System

DNA 주형에서 고효율로 전체 단백질을 합성할 수 있는 대장균 *in vitro* 전사/번역시스템

제품명	TaKaRa Code	포장량
EcoPro™ Introductory System	NV9471	10회용
EcoPro™ System	NV947	50회용
EcoPro™ System plus Streptavidin LumiBlot™ Kit	NV9472	50회용
EcoPro™ T7 Introductory System	NV9481	10회용
EcoPro™ T7 System	NV948	50회용
EcoPro™ T7 System plus Streptavidin LumiBlot™ Kit	NV9482	50회용

*In vitro*에서 전사/번역하는 시스템은 진핵세포나 원핵세포 추출액을 이용하는 시스템이 있으며 기본 시스템에 변화를 준 다양한 방법이 보고되어 있다. 대장균 추출액을 이용한 *in vitro* 전사/번역시스템은 진핵세포 추출액을 이용한 시스템은 target이 아닌 RNA와 DNA template의 존재, 전사 개시 또는 종결의 이상, nuclease, protease의 혼재 등으로 일반적으로 background가 높으며 전체 길이의 목적 단백질의 수량이 낮다.

Novagen사에서는 진핵세포를 이용한 *in vitro* 전사/번역시스템으로 Single Tube Protein System 3(TaKaRa Code NV712, NV713)을 판매하고 있으며 새롭게 원핵세포 추출액을 이용한 시스템 EcoPro™ System을 발매하였다.

EcoPro™ System은 대장균 promoter를 갖는 DNA template (plasmid, linear DNA 또는 PCR 산물)에서 고효율로 전체 길이의 단백질을 합성할 수 있는 *in vitro* 전사/번역시스템이다.

■ EcoPro™ System의 개요

EcoPro™ 시스템은 protease 활성을 제거한 대장균 숙주에서 조제한 S30 extract를 이용하였다.

EcoPro™ Reaction Mix에는 S30 extract, 반응 buffer, 아미노산 성분이 함유되어 있어 전체길이의 단백질을 고효율로 생성할 수 있다. 전사와 번역에 필요한 모든 성분이 하나의 튜브로 되어 있어 피펫팅 횟수가 적으며 조작이 간편하다. 목적 유전자를 cloning하여 *in vivo*에서 발현할 필요 없이 신속하게 코딩 영역의 스크리닝이 가능하다.

대장균 promoter를 포함하는 sense primer를 이용한 PCR로 본 시스템에 사용하는 DNA template를 간단히 조제할 수 있다. EcoPro™ System은 supercoil을 형성하지 않는 강력한 대장균 promoter(*tac* 또는 *lac* 등)를 포함하는 template로 고효율로 작용한다. EcoPro™ T7 System은 λ DE3 용원성을 갖는 대장균 숙주

에서 조제한 추출액을 이용한다. 대장균 RNA polymerase와 T7 RNA polymerase가 들어 있어 대장균 promoter나 T7 promoter를 포함하는 DNA template를 고효율로 전사/번역한다.

DNA template(2~4 μg primer 또는 2 μl의 PCR 산물)와 EcoPro™(EcoPro™ T7) Reaction Mix, Methionine(또는 ³⁵S-methionine)을 혼합하여 37°C에서 60분 반응으로 간단하게 전사/번역할 수 있다.

Kit에는 EcoPro™ Control DNA(T7/대장균의 2종류 promoter를 갖는 S·Tag β-glucuronidase 유전자)가 포함되어 반응상의 오류를 확인할 수 있다. 생성된 단백질은 ³⁵S-Methionine을 이용한 assay, S·Tag Western Blot, S·Tag Assay 등으로 확인할 수 있다. 또한 반응액에 Biotin-tRNA (Biotin화 lys-t RNA_{lys}; TaKaRa Code NV269)를 첨가하여 Biotin이 표식된 산물을 화학발광 western blot법(Streptavidin AP LumiBlot™ Kit을 이용)으로 검출할 수 있다.

■ Kit의 내용

EcoPro™ System(50회용)

· EcoPro™ Reaction Mix 또는 T7 EcoPro™ T7 Reaction Mix	5×350 μl
· 5 mM Methionine	100 μl
· Nuclease-free Water	1.5 ml
· EcoPro™ control DNA(1.0 μg/μl)	10 μg

EcoPro™ System plus Streptavidin AP LumiBlot™ Kit에는 아래 시약도 포함되어 있다.

· Streptavidin AP Conjugate	50 μl
· 20× TBST	3×200 ml
· Blocking Reagent	25 g
· CDP-Star Substrate	40 ml
· gLOCATOR Luminescent Labels	25개
· Development Folders	25개

■ 특징

- 진핵세포 시스템과 유사한 완전 단백질 생성효율을 갖는다.
- 반응이 1단계로 간단하며 많은 시료 반응에 유용하다.
- 구축한 DNA의 Open Reading Frame(ORF)을 신속하게 동정할 수 있다.
- 독성이 있는 유전자 발현도 가능하다.
- Streptavidin AP LumiBlot™ Kit, Biotin-tRNA를 이용하여 RI법보다 신속, 간단하게 검출할 수 있다.
- 환상, 직쇄상의 plasmid나 PCR산물 등 어떤 종류의 DNA template라도 사용할 수 있다.

■ EcoPro™ System과 타사 제품과의 비교

EcoPro™ 시스템과 타사 제품을 이용하여 대장균 *tac* promoter의 down stream에 β -glucuronidase 유전자를 코드하는 DNA template (환상 plasmid(C), PCR 산물(P), 및 DNA를 포함하지 않는 시료(-))를 ³⁵S-Methionine의 존재하에 표준 반응조건으로 *in vitro* 전사/번역반응을 하였다. 타사 제품을 이용한 반응은 각 사의 표준 실험방법에 따랐다. 반응산물을 SDS-PAGE한 후 fluorography로 검출하였다(그림 1A). 또 반응산물은 TCA 침전으로 ³⁵S-Methionine의 함유량을 측정하였다(표 1). 그 결과 EcoPro™ System을 이용할 경우 가장 높은 효율로 완전한 크기의 단백질이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

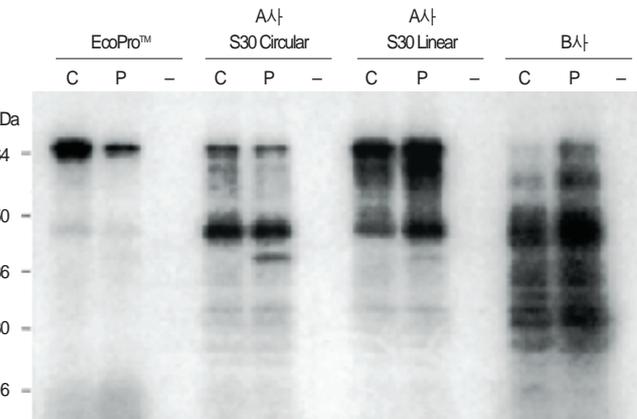


그림 1 EcoPro™ System과 타사 제품과의 비교

표 1 각 시료의 TCA 침전물의 ³⁵S-Methionine 함유량

System	Template	³⁵ S-Met 함유량*
EcoPro™	plasmid	44
EcoPro™	PCR 산물	42
A사 Circular DNA용	plasmid	25
A사 Circular DNA용	PCR 산물	23
A사 Linear DNA용	plasmid	22
A사 Linear DNA용	PCR 산물	24
B사	plasmid	24
B사	PCR 산물	18

* DNA를 포함하는 시료와 포함하지 않는 시료(-)의 CPM 비율을 나타낸다.

■ Biotin-tRNA, Streptavidin AP LumiBlot™ Kit을 이용한 검출

EcoPro™ System을 이용하여 그림 2와 같이 β -glucuronidase (GUS), firefly luciferase (fLUC)를 코드하는 plasmid(C)나 PCR산물(P)을 시료로 표준조건에서 반응하였다. Biotin-tRNA는 그림 2에 표시한 양만큼 첨가하였다. 반응산물을 SDS-PAGE로 영동한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Streptavidin AP LumiBlot™ Kit을 이용하여 biotin 표식된 번역산물을 검출한 결과는 그림 2와 같다.

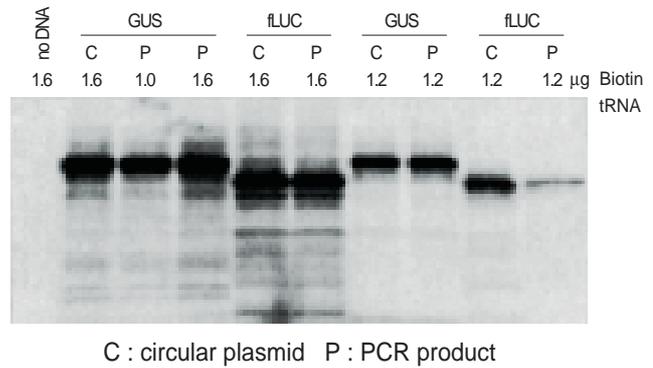


그림 2 Biotin tRNA를 첨가한 EcoPro™ System으로 생성된 단백질의 화학발광검출

■ EcoPro™ System과 EcoPro™ T7 System과의 비교

EcoPro™ 및 EcoPro™ T7 System을 이용하여 2종류의 plasmid DNA template(대장균 promoter만 포함하는 GUS, 대장균 및 T7 promoter를 함유하는 GUS)를 시료로 rifampicin이 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우 두가지로 나누어 전사/번역반응을 실시하였다(그림 3). Rifampicin(대장균 RNA polymerase 저해제)이 없는 경우는 두 시스템에서 전체 길이를 포함하는 GUS 단백질이 고효율로 검출되었지만 rifampicin이 있는 경우는 EcoPro™ T7 System에서만 발현되었다. 이와 같이 EcoPro™ T7 System은 필요에 따라 rifampicin을 첨가하여 T7 promoter의 발현을 선택적으로 조절할 수 있다.

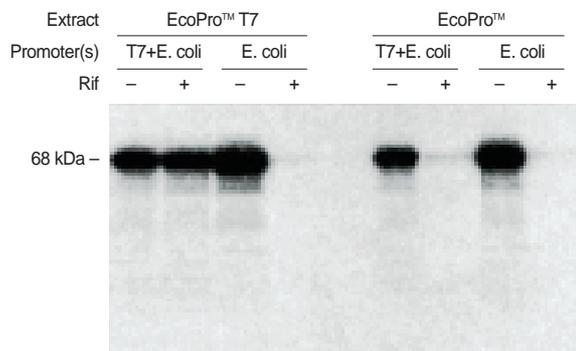


그림 3 *E. coli* promoter에서의 발현에 미치는 rifampicin의 영향
250 µg/ml rifampicin을 첨가한 조건과 첨가하지 않은 조건에서 반응을 하였다. 반응산물은 SDS-PAGE 후 fluorography로 검출하였다.