

PCR 산물의 보다 빠른 direct cloning !!

AccepTor™ Vector Kit

pSTBlue-1 AccepTor™ Vector Kit
pETBlue-1 AccepTor™ Vector Kit

TaKaRa Code NV873 40반응

TaKaRa Code NV875 40반응

10반응, 20반응 Kit도 있습니다.

AccepTor™ Vector Kit는 반응산물에 3'-dA nucleotide 1개를 부가하는 Taq DNA Polymerase를 이용하여 증폭한 PCR 산물의 단순 cloning을 위해 개발한 제품이다.

AccepTor™ Vector는 EcoR V 부위를 절단하여 linear한 AccepTor™ Vector의 3' 말단에 dU가 부가되어 있어 PCR 산물과 직접 ligation할 수 있으며 dU 잔기는 형질전환 후에 dT 잔기로 바뀐다. 본 kit은 AccepTor™ Vector 외에 ligation 시약과 competent cell로 구성되어 있다. pETBlue 시리즈에는 발현용 competent cell(Tuner™ (DE3) pLacI Competent Cells)도 포함되어 있어 PCR산물의 cloning과 대장균 내에서의 발현까지 실시할 수 있다.



그림 1 각 AccepTor™ Vector의 모식도

■ Kit의 내용(40회용)

| | |
|------------------------------------|-----------|
| AccepTor™ Vector | 4×0.5 μg |
| Positive Control Insert | 10 μl |
| Clonables 2× Ligation Premix | 4×55 μl |
| Nuclease-free Water | 1.5 ml |
| NovaBlue Singles Competent Cells | 44×50 μl |
| Tuner™(DE3) pLacI Competent Cells* | 4×0.2 ml |
| SOC Medium** | 7, 9×2 ml |
| Test Plasmid | 10 μl |

* pETBlue-1에만 포함되어 있다.

** pETBlue-1은 9개, pSTBlue-1은 7개의 SOC Medium이 포함되어 있다.

■ 특징

- 제한효소가 필요 없다.
- 특별한 primer가 없다.
- PCR산물을 vector에 바로 ligation 한다.
- TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™, TaKaRa Z-Taq™ 등의 PCR산물의 cloning에 적합하다.
- 형질전환체의 Blue/White color selection이 가능하다.
- PCR종료 후 40분만에 형질전환 조작까지 완료할 수 있다.

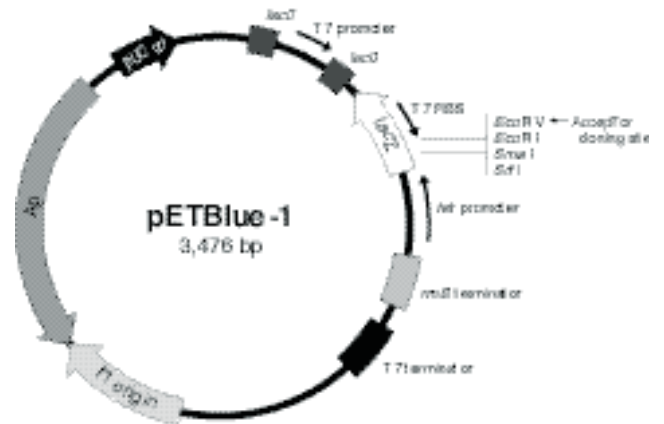
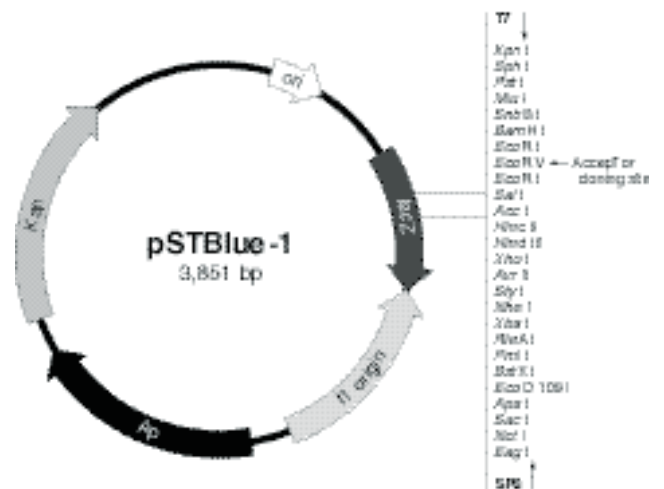


표 2 각 AccepTor™ Vector의 cloning site

각 vector의 전체 염기서열과 map에 대해서는 Novagen사의 홈페이지(<http://www.novagen.com/>) 참조

각 vector의 특징

| 제품명 | 용도 | Vector의 특징 |
|----------------------------|---|--|
| pSTBlue-1 AccepTor™ Vector | PCR 산물의 subcloning, sequencing, <i>in vitro</i> transcription | <ul style="list-style-type: none"> SP6/T7 promotor가 cloning site의 양쪽에 존재 EcoR I 부위가 cloning site의 양쪽에 있어 insert를 잘라 낼 수 있음 |
| pETBlue-1 AccepTor™ Vector | PCR 산물의 subcloning, 대장균 내에서 단백질 발현(pET Vector와 같이 엄격한 제어 시스템과 높은 발현효율을 가지는 T7 expression vector이다.) | <ul style="list-style-type: none"> Tag은 없음 Insert에 ATG codon이 필요(5' 말단을 ATG로 한 sense primer를 사용하여 PCR할 경우 여분의 염기가 없는 native한 단백질 발현이 가능) |

실험예 : pET Blue-1 AccepTor™ Vector의 cloning 효율

TaKaRa Ex Taq™을 이용하여 증폭한 PCR산물을 pET Blue-1 AccepTor™ Vector Kit을 사용하여 cloning한 후 그 효율을 조사하였다.

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| 정제한 PCR 산물(약 0.3 kbp, 0.5 kbp, 1 kbp) | 1 µl (50 ng) |
| pET Blue-1 AccepTor™ Vector | 1 µl (50 ng) |
| Clonables 2× Ligation Premix | 5 µl |
| 멸균증류수 | 3 µl |
| total | 10 µl |

↓ 16°C, 30 min.

1 µl

↓

NovaBlue Singles Competent Cells 50 µl

(혹은 *E. coli* JM109 Competent Cells 100 µl)를 형질 전환

NovaBlue의 경우 :

얼음 위에서 5분동안 정치한 후 42°C에서 30초간 heat shock.

얼음 위에서 2분동안 정치한 후 250 µl SOC 배지를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양(시간을 단축한 형질전환 protocol : kit의 protocol)

JM109의 경우 :

얼음 위에서 30분동안 정치한 후 42°C에서 45초간 heat shock.

얼음 위에서 2분동안 정치한 후 900 µl SOC 배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양(보통 형질전환 protocol)

↓ Total Volume의 1/4량

↓

배지에 plating(1 mM IPTG, 0.02% X-Gal, 100 µg/ml Amp)

얻어진 colony 수

| Cloning에 이용한 insert | NovaBlue Competent Cells | | JM109 Competent Cells | |
|---------------------|--------------------------|------|-----------------------|------|
| | White | Blue | White | Blue |
| No Insert | 0 | 15 | 10 | 56 |
| 2 kbp | 8 | 20 | 60 | 80 |
| 0.5 kbp | 30 | 15 | 430 | 40 |
| 0.3 kbp | 95 | 19 | 830 | 10 |

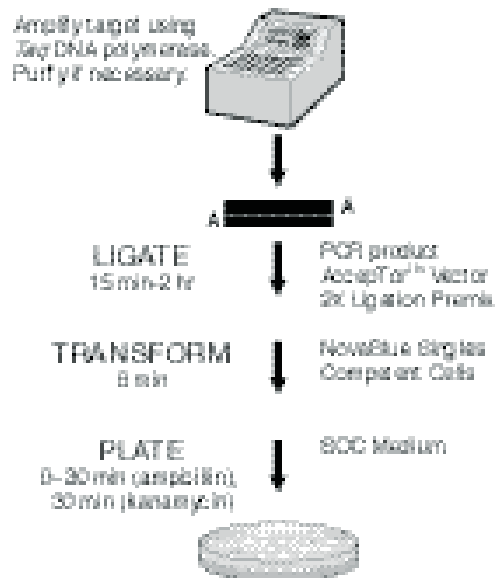


그림 3 AccepTor™ Vector의 실험 순서

흰색 colony 각 4개를 임의로 선택하여 하룻밤 배양한 후 플라스미드를 추출하였다. 추출한 플라스미드를 EcoR I, Bgl II (플라스미드 상의 인식부위)로 절단하여 insert의 길이로 모든 흰색 colony에서 목적 크기의 insert가 삽입되어 있음을 확인하였다.

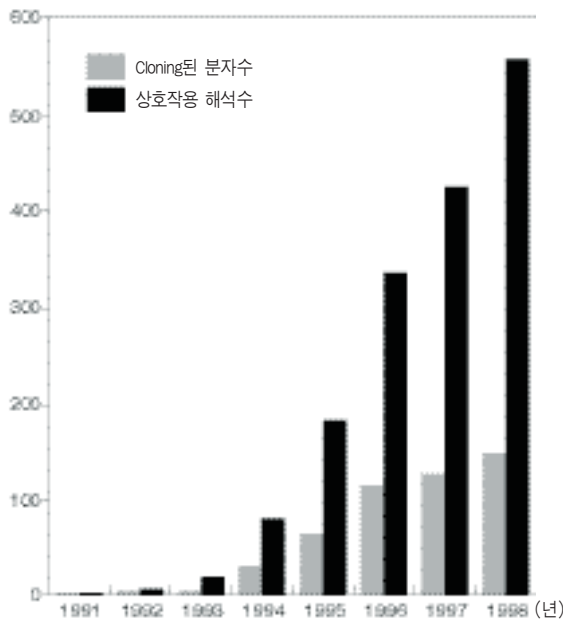
표에서 보는 바와 같이 NovaBlue를 이용하여 배양시간을 단축한 형질전환을 한 경우 기존의 protocol과 비교하여 colony의 수는 적지만 insert를 포함하는 양성 clone을 얻을 수 있었다. pT7Blue T-Vector(TaKaRa Code NV004)로 동일한 실험을 하였을 때 거의 같은 colony수를 얻었다. 따라서 AccepTor™ Vector는 3'-dA 돌출말단을 가지는 PCR산물의 cloning에 유효하며, 그들의 cloning효율은 pT7Blue T-vector와 거의 동일하였다.

pAUR123을 이용한 효모 Tri-Hybrid법으로 Tyrosin Kinase 정보 전달계의 해석

Kurume 대학 분자생명과학연구소 Sasaki Atsuro, Sasaki Mika, Yoshimura Akihiko

Two-hybrid법은 효모세포 내에서 일어나는 분자간 상호작용을 분석하기 위한 세포내 해석법으로, 많은 유전자가 cloning 되었고 다양한 상호작용 해석에 널리 이용되고 있다(그림 1). Two-hybrid법은 약한 상호작용도 검출이 가능하며, 큰 실험기구를 이용하지 않고 간단하게 실험할 수 있으며, 효모 이진 하지만 세포내의 생리 조건 하에서 반응하는 특징을 갖고 있다. 효모는 동물 세포와 비교할 때 세포 내 구조와 대사 경로 등 유사한 점이 있지만 tyrosin 특이적인 kinase가 없는 것이 genome 해석으로 알려져 있다. 효모 Two-hybrid법으로 tyrosin kinase 정보전달 해석시 tyrosin kinase를 bait하여 사용하였다. 그러나 cytokine 수용체와 SH2 domain(인산화 tyrosin과 결합하는 domain) 상호작용과 같이 tyrosin kinase 활성이 없는 분자인 경우, 효모 내에서는 tyrosin 인산화가 일어나지 않아 검출할 수 없다. 이에 TaKaRa에서는 효모발현형 vector-pAUR123을 이용하여 제 3의 단백질로 tyrosin kinase JAK2의 촉매영역인 JH1과 GST(Glutathion S-Transferase)의 융합단백질 GST1-JH1을 효모주에서 발현시켰다.

그 결과 효모 내 bait의 tyrosin 인산화가 인정되고 GST-JH1의 도입으로 tyrosin 인산화 의존성 상호작용을 검출할 수 있었다(그림 2). GST-JH1/pAUR123 형질전환효모의 선택 마커는 Aureobasidin A이고 plasmid나 효모주도 현재 사용하고 있는 Two-hybrid 시스템을 그대로 사용할 수 있다. pAUR123과 tyrosin kinase를 사용하는 Tri-hybrid 시스템으로 tyrosin kinase 정보전달분자의 해석과 스크리닝이 가능해졌다. 또한 Two-hybrid 시스템과 pAUR123을 사용하여 삼량체 복합체 해석에도 응용할 수 있다.



* 필자가 medline을 통해 조사한 결과
* 필자의 연구실에서 몇 개의 분자를 cloning하고 있다.¹⁻⁷⁾

그림 1 Two-hybrid법을 사용한 예

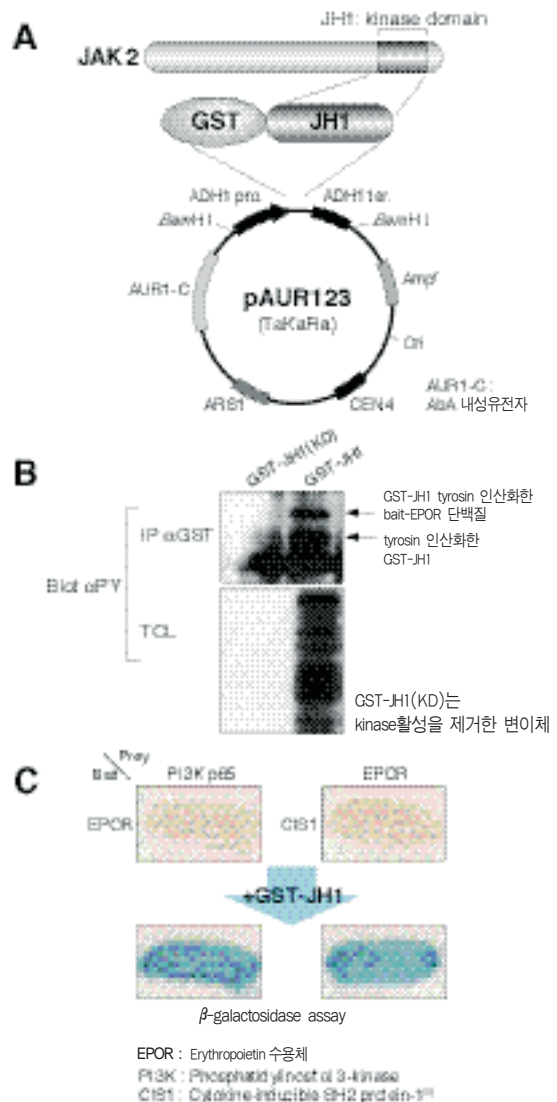


그림 2 GST-JH1에 의한 Tri-hybrid system

■ 원리

그림 3과 같이 tyrosin kinase(여기서는 GST-JH1)를 사용한 상호작용 해석 및 스크리닝 방법으로는 (A)bait를 tyrosin 인산화하는 방법과 (B)prey를 tyrosin 인산화하는 방법이 있다. 또 Tri-hybrid를 사용한 삼량체 복합체의 분석법도 있으며 삼량체는 (C)adapter를 이용한 결합과 (D)두개의 분자에 의존하여 결합하는 양식이 있다. (C)의 경우는 EGF 수용체를 bait로 하고 SOS를 prey로 하였다. Reporter 유전자의 활성화는 adapter 분자 Grb2 의존적이며 스크리닝으로 Grb2를 얻을 수 있다.⁹⁾ (D)는 필자의 연구실에서 클로닝 된 cyclinE와 p21의 복합체에 결합하는 분자 Ceb1을 사용하였다.⁶⁾ Adapter로 RNA를 사용하고 RNA와 단백질의 상호작용을 해석한 예¹⁰⁾와 protease의 기질을 동정하는 방법으로 tri-hybrid를 사용한 예도 있다.¹¹⁾

■ 재료

· Two-hybrid용 vector 및 library

필자는 pBTM116으로 Lex A 시스템과 효모 L40주, library는 주로 CLONTECH사에서 판매하는 전사활성화영역과 융합시킨 것을 사용하였다. GST-JH1의 번역개시부위에 COSAK서열을 첨가하고 pAUR123에 재조합하였으며(그림 2A) Aureobasidin A(이하 AbA) 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유 배지에서 형질전환체를 선택하였다. 이는 AbA 농도조건 검토실험에 의한 것으로 0.1~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 GST-JH1이 충분히 발현하지만 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서는 약간의 비형질전환 colony가 생기고 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 형질전환 효율이 감소하여 효모주의 작용농도에 영향을 미칠 수 있으므로 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 설정하였다.

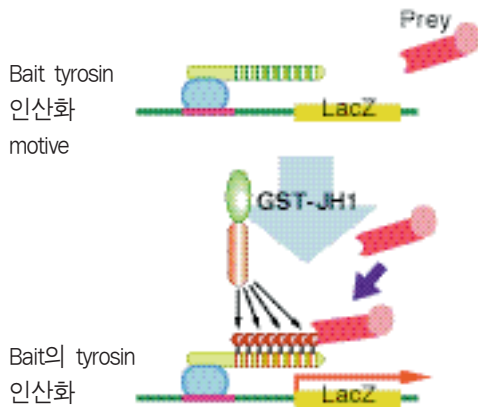
· 효모 형질전환 시약

Salmon sperm DNA를 10 mg/ml의 농도로 TE Buffer로 용해하고 초음파처리 후 열변성하였다.

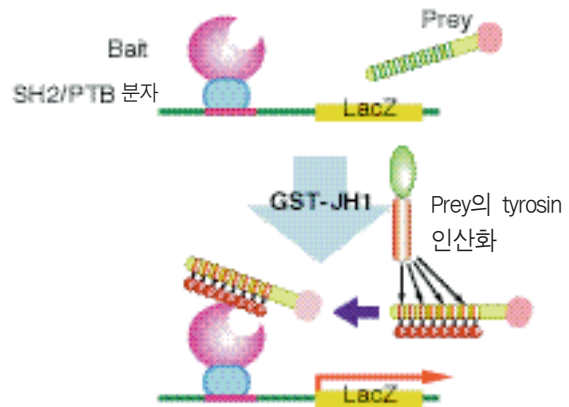
용액 A : 100 mM Lithium Acetate, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA.

용액 B : 용액 A에 40% Polyethylene Glycol (#4000)을 첨가(사용시 조제).

A Bait를 tyrosin 인산화



B Prey를 tyrosin 인산화



C Adapter분자를 이용한 결합양식



D 이량체를 인식하는 결합양식

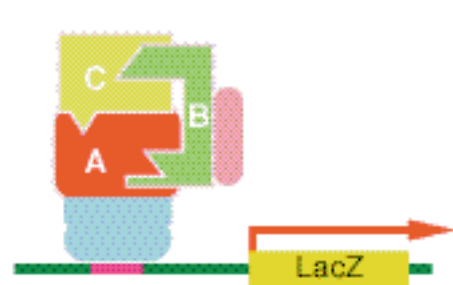


그림 3 Tri-hybrid에 의한 상호작용의 해석 모델

■ 방법

pAUR123을 사용한 효모의 형질전환
(스크리닝은 각 kit의 protocol 및 문헌¹²⁾ 참조)

적절한 영양배지 10 ml에 효모를 30°C에서 하룻밤 진탕배양한다.



YPD배지 10 ml를 첨가하여 2시간 정도 진탕 배양 한다.



집균후 멸균수 10 ml로 세정하고 원심분리한다.



용액 A 2 ml에 균체를 현탁하고 salmon sperm DNA 10 µl와 0.1~1 µg의 pAUR123을 넣은 원심튜브에 100 µl씩 분주한다.



용액 B를 600 µl 첨가하여 가볍게 vortex한 다음 30°C에서 30분간 진탕한다.



DMSO 70 µl를 가하여 42°C로 15분간 처리한 다음 얼음안에서 냉각한다.



500 µl TE에 현탁하여 0.3 µg/ml의 AbA를 포함하는 적절한 영양 배지 플레이트에 100 µl씩 도포한다.



30°C에서 배양한다.

2~3일에 AbA 내성 colony가 형성된다.

pAUR123의 형질전환효율은 통상의 영양요구성 배지에서 선별한 경우와 비슷하다. GST-JH1/pAUR을 AbA가 없는 액체 배지에서 배양하면 GST-JH1/pAUR가 없는 효모를 얻을 수 있다. 보통 YPD 배지에서 2일간 배양하므로써 25% 전후의 유전자가 결실되었다.

■ 실험예

그림 3과 같이 (A), (B)의 방법으로 스크리닝하였다. (A)의 경우 erythropoietin 수용체(EPOR)의 Y479를 포함하는 영역을 bait로 사용하였다. 그 결과 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)의 p85 및 p55γ subunit를 얻었다(표). Y479는 PI3K의 SH2 domain을 포함하는 subunit의 결합부위로 알려져 있으며 (A) 방법으로 Y479 특이적 분자를 얻었다. (B)는 PI3K의 SH2 domain을 bait로서 사용하였다. 그 결과 90개의 양성 clone이 얻어지고 IRS-1(Insulin Receptor Substrate-1)을 포함하는 7 group로 나눌 수 있었다. IRS-1과 PI3K의 상호작용은 잘 알려져 있지만 나머지 clone은 생리적인 의미는 불분명하지만 sequencing의 결과 모든 clone에서 YxxM이라는 PI3K SH2 domain의 인식서열이 확인되었다.

표 Tri-hybrid에 의한 스크리닝 결과

| Bait | positive clone | GST-JH1 | | | | source |
|------------|----------------|---------|-----|------|-----|---------------------|
| | | LacZ | His | LacZ | His | |
| EPOR Y479 | PI3K p55γ | × | × | ⊙ | ⊙ | Fetal liver library |
| | PI3K p85α | × | × | ⊙ | ⊙ | 2 × 10 ⁶ |
| EPOR p55γ | IRS-1 | × | × | ⊙ | ⊙ | B cell library |
| SH2 domain | Pelota | × | × | ⊙ | ⊙ | 1 × 10 ⁶ |
| | Cathepsin S | × | × | ⊙ | ⊙ | |
| | elf3 | × | △ | ⊙ | ⊙ | |
| | IK factor | × | △ | ⊙ | ⊙ | |
| | unknown 1 | × | × | ⊙ | ⊙ | |
| | unknown 2 | × | × | ⊙ | ⊙ | |

■ 고찰

본 고에서 GST-JH1을 사용한 Tri-hybrid 시스템을 소개하였다. 이 방법은 tyrosin kinase를 가지지 않는 효모를 사용하여 tyrosin kinase 정보전달계의 해석에 널리 이용할 수 있는 방법이다. 또 제 3의 vector를 사용하여 해석하는 영역만을 bait로 Two-hybrid 시스템을 사용할 수 있지만 3차 의존적 뿐만 아니라 2차 의존적으로 상호작용하는 clone도 얻어진다. 제 3의 단백질을 유도 발현하고 효모에서 제거하는 시스템을 조합하면 보다 강력한 방법이 될 것이며 Tri-hybrid법을 이용한 3차의 상호작용 해석법은 더욱 더 발전될 것이다.

[참고문헌]

- 1) Yokouchi, M., Suzuki, R., Masuhara, M., Komiya, S., Inoue, A., and Yoshimura, A., (1997) *Oncogene* **15**, 7-15.
- 2) Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, S., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanikura, Y., Komiya, S., and Yoshimura, A., (1997) *Nature* **387**, 921-924.
- 3) Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M. (1999) *FEBS lett.* **447**, 5-9.
- 4) Mitsui, K., Matsumoto, A., Ohtsuka, S., Ohtsubo, M., and Yoshimura, A., (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 457-464.
- 5) Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Hone, W.C., Zhang, H., Yoshimura, A., and Baron, R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31707-31712.
- 6) Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., Norwood, T.H., Okabayashi, K., Miyamoto, C., Tanaka, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 115-122.
- 7) Masuhara, M., Nagao, K., Nishikawa, M., Sasaki, M., Yoshimura, A., and Osawa, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 697-703.
- 8) Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N.A., Gillbert, D.J., Copeland, N.G., Hara, T., and Miyajima, A. (1995) *EMBO J.* **14**, 2816-2826.
- 9) Zhang, J., and Lautar, S. (1996) *Anal. Biochem.* **242**, 68-72
- 10) SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wichens, N. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8496-8501.
- 11) Kamada, S., Kusano, H., Fujita, H., Ohtsu, M., Koya, R.C., Kuzumaki, N., and Tsujimoto, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8532-8537.
- 12) Sasaki, A., Endo, T., Yoshimura, A. (1999) *실험의학* **17**, 2579-2583.

[제품리스트]

| 제품명 | TaKaRa Code | 포장량 |
|-------------|-------------|-------|
| pAUR123 DNA | 3602 | 20 µg |