

Chaperone Plasmid Set

TaKaRa Code 3340 1 Kit(각 plasmid 1 µg)

Postgenome의 연구과제로 단백질의 구조해석·기능해석이 중요하게 대두되고 있다. 단백질의 구조해석·기능해석은 “어떻게 고효율로 재조합 단백질을 발현 시킬 것인가”가 핵심요소이다.

재조합 단백질을 발현시키기 위해서 대장균을 숙주로 하는 방법이 가장 많이 이용되고 있으나, 대장균에서 외래 단백질을 발현 시켰을 경우 불용성 발현 단백질인 inclusion body를 형성하거나 protease에 의해 분해 되는 경우가 있다. 이러한 것은 발현시킨 단백질의 folding을 저해하여(그림 1) 단백질 기능연구의 큰 장애로 작용한다.

단백질의 folding에 관여하는 chaperone 분자가 알려짐에 따라 *in vivo*에서 단백질의 folding 기작을 규명하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다.

TaKaRa에서는 (주)HSP 연구소의 chaperone 연구를 단백질 발현용 시약에 응용한 Chaperone Plasmid Set(TaKaRa Code 3340)를 신발매하였다. 본 제품은 chaperone 단백질을 목적 단백질과 함께 발현시키는 시스템으로 inclusion body의 형성과 protease에 의한 단백질의 분해를 방지하여 발현 단백질의 회수율을 높이는 효과가 있다.

■ 특징

단백질 folding에 관여하는 chaperone 분자가 한 개의 발현 plasmid상에 위치하고 있어 매우 고효율로 작용할 수 있다. 또 본 제품의 plasmid에는 pACYC 유래의 복제기점이 사용되어 있고 pET 등 ColE1 ori를 가지는 단백질 발현 vector와 coexpression이 가능하다.

본 제품에는 5종의 재조합 chaperone team plasmid가 set로 포함되어 있어(표 1 및 그림 2 참조) 목적 단백질과 각각의 사용 발현 vector, 숙주에 가장 적합한 chaperone team을 선택할 수 있다.

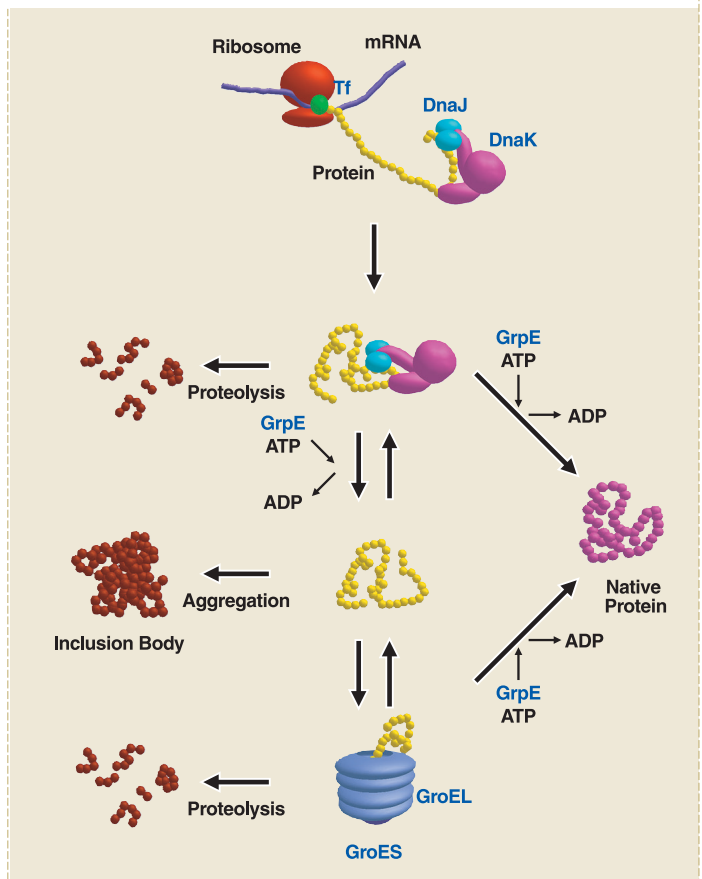


그림 1 *in vivo* 단백질 합성계에서 chaperone의 이동(참고문헌 1의 가설로부터)

표 1 본 제품*중의 각 plasmid에 코딩되는 chaperone team

No.	Plasmid	Chaperone	Promotor	Inducer	Resistant Marker	참고문헌
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	<i>araB</i> <i>Pzt1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm	3, 4
2	pGro7	groES-groEL	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	3
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	3
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	Cm	4
5	pTf16	tig	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	4

* : (주)HSP 연구소에서 특허를 받아 다카라바이오(주)가 제조한 제품이다.

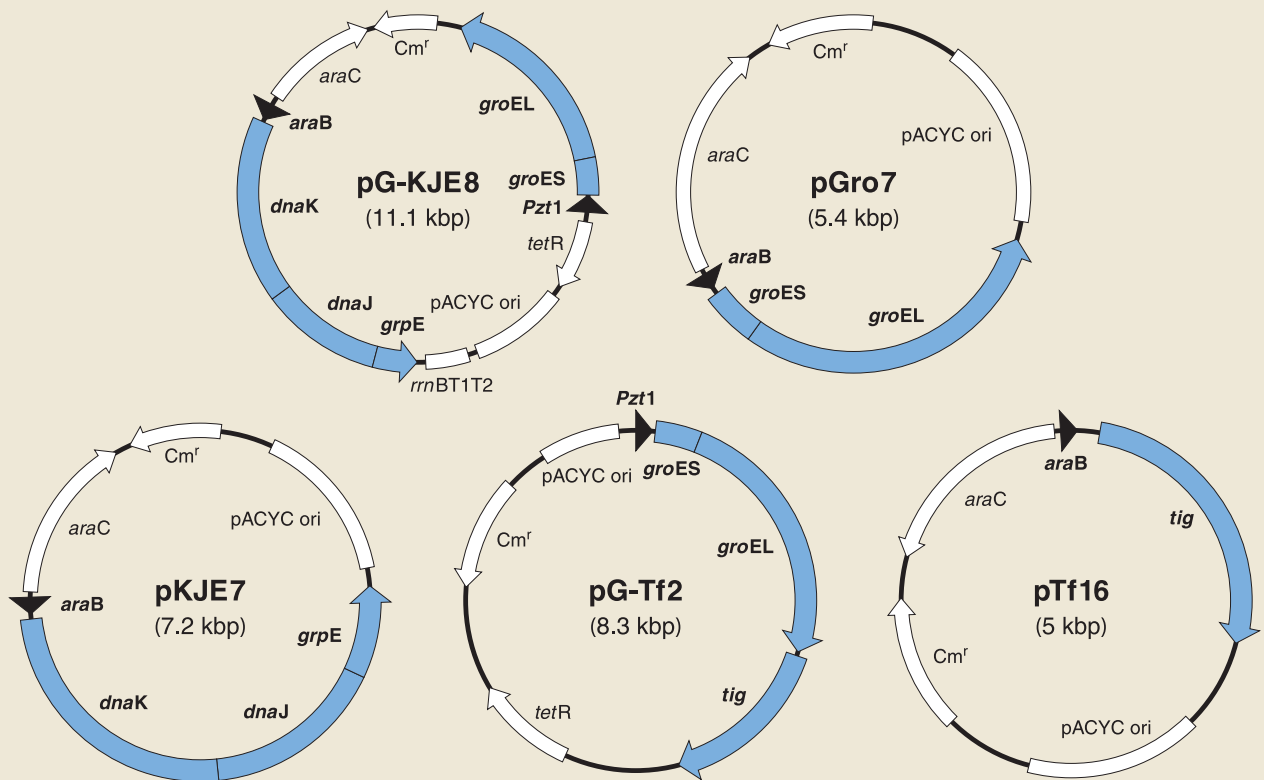


그림 2 Chaperone plasmid의 모식도

■ 실험순서

(1) Coexpression의 구축

Chaperone plasmid (No.1~5중 하나)
 ↓
 발현용 competent cell*을 형질전환 한다.
 (Chloramphenicol로 선별)
 ↓
 형질전환체를 액체배양하여 competent cell을 제조한다
 ↓
 앞서 제작한 competent cell을 목적 단백질의 발현 plasmid*로 형질전환 한다.
 (Chloramphenicol과 plasmid 선택용 시약으로 선별)
 ↓
 Coexpression 대장균

*발현용 숙주 및 plasmid는 chloramphenicol 내성을 가지지 않고, pACYC의 복제기점을 가지지 않는 것을 사용한다.

(2) Coexpression 실험

예) *lac* promotor 하류에 목적유전자를 투입한 pUC계 plasmid와의 coexpression의 경우

(1)에서 제작한 coexpression 대장균

↓
 Plasmid selective antibiotic(chloramphenicol 또는 ampicillin)과 chaperone 발현용 antibiotic*(arabinose 또는 tetracycline)을 함유한 L 배지에서 30~37℃ 온도로 배양
 ↓
 OD₆₀₀이 0.4~0.6일때 IPTG 첨가
 ↓
 1~4시간, 30~37℃에서 배양
 ↓
 SDS-PAGE, 활성측정 등으로 목적산물의 발현 양과 가용화 양을 측정

* 사용하는 chaperone plasmid에 따라 다르다.

【참고문헌】

- 1) Thomas, J. G., et al.(1997) *Appl. Biochem. Biotech.* **66**, 197-238.
- 2) 柳, 西原(1999)「Bioscience 와 Industry」 **57**, 38-.39
- 3) Nishihara, K., et al.(1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694-1699.
- 4) Nishihara, K., et al.(2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884-889.