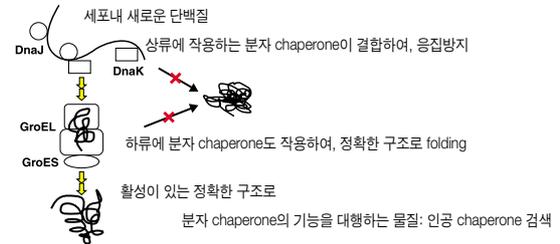


Refolding CA Kit를 이용한 단백질의 refolding

Refolding CA Kit(TaKaRa Code 7350: Life Science & Technology 21호 참조)는 각종 계면활성제와 고중합도 cycloamylose(이하 CA)를 사용하여 inclusion body 또는 변성 단백질을 활성 단백질로 refolding시키는 조건 검토용 kit로, 모든 조작이 1.5 ml의 tube 안에서 이루어지므로 신속, 간편하다.
본 고에서는 refolding kit를 이용한 “단백질 refolding법”의 기초적인 데이터와 실험을 소개하고자 한다.

2. 본 제품의 특징

- 세포 내에서의 동일한 과정으로 단백질을 folding시켜 시험관내에서 재구성할 수 있다.



1. 기존의 refolding 방법

- 변성제(Guanidine-HCl, 요소)로 변성 구조 unfolding 후,
- 1) 희석 투석법
투석 등을 이용하여 변성제 농도를 서서히 낮춰 단백질의 refolding 촉진.
 - 2) Refolding on resin
Resin에 단백질을 tagging하여 고정 시킨 후 변성제 농도를 서서히 낮춰 단백질의 refolding 촉진.
 - 3) Dilution additive methods
단백질의 응집 방지 또는 refolding 촉진 물질을 첨가한 상태로 희석투석하여 단백질의 refolding을 촉진시킨다.
*Polyethyleneglycol, 계면활성제, Arginin 등

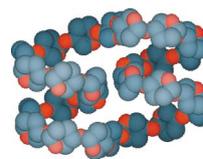
인공 chaperone 검색

1. 단백질 refolding 과정(2단계)
 - 1) 단백질의 응집 방지
 - 2) 단백질의 folding 촉진
- ↓
2. 각 단계에서 효과적으로 작용하는 인공 chaperone 검색
 - 1) 계면활성제
 - 2) 환상당질(계면활성제와 결합하는 능력을 이용)

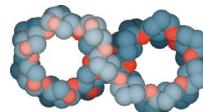
기존방법의 문제점

- 1) 조작이 복잡
→ 대량 시료 처리 곤란
- 2) 긴 시간 소요(수일간)
- 3) 낮은 효율성
- 4) 활용범위가 제한적이므로 목적 단백질에 맞는 조건 검토 필요

CA: 고중합도 cycloamylose

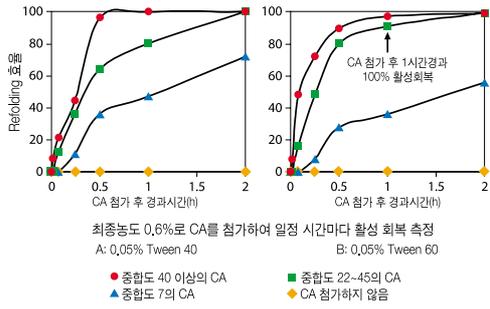


17~수백 개의 glucose가 환상형으로 연결된 신규당질



내부에 공동 부분이 있고, 이곳에 각 물질 결합 가능(결합능)
중합도 26의 CA 결정구조

CA에 의한 Citrate Synthase 활성회복의 일시적 변화



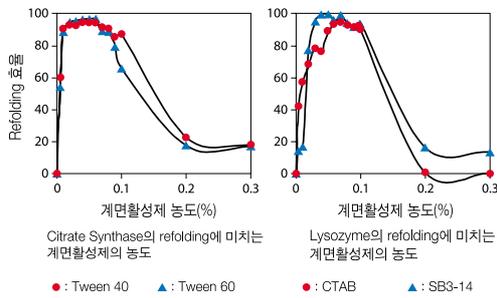
4. Inclusion body 적용 예와 troubleshooting

Inclusion body 현탁액 (~10 mg/ml protein)

- ↓ ← GdnCl(6 M: final concentration)
DTT(40 mM: final concentration)
(RT, 1 h)
- ↓ ← 70 vol, 0,05% detergent buffer(2 mM DL-cystine)
(RT, 1 h)
- ↓ ← CA solution(0,6%: final concentration)
(RT, 1~ overnight)
- ↓ ← 15,000 rpm × 10 min
- sup
(refolded protein)

· SDS-PAGE에서 용해 확인
· 활성 확인

Refolding에 미치는 계면활성제의 농도 영향

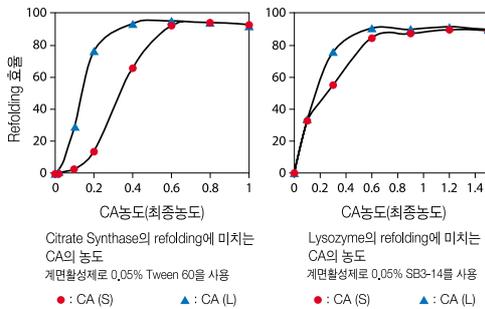


Unfolding

Inclusion body 현탁액의 단백질 농도
 Kit의 Protocol: ~10 mg/ml
 (변성액 A₂₈₀: 20~30 정도)

- 완전히 변성된 구조를 풀어 놓는 것이 중요
- 하룻밤 변성시켜도 refolding 효율 변함없음

Refolding에 따른 CA의 농도 영향



계면활성제의 선택

Kit에는

CTAB
SB3-14
Tween 40
Tween 60

 4 종류 표준 첨부

성 공 률 : SB3-14 > CTAB >> Tween 60 > Tween 40
 취급용이: SB3-14 > CTAB >>> Tween 40 > Tween 60
 Tween 40, 60 사용 예 : 당단백질 실험

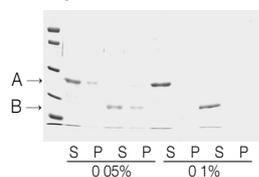
기존 방법과 본 제품 비교

- 1) 간단한 조작
자동화, 대용량으로 반응이 용이
- 2) 넓은 활용 범위
목적 단백질에 따라 조건 검토 불필요
- 3) 신속한 실험
6시간 정도 소요
- 4) 높은 활성률
80%이상 활성 회복

계면활성제의 사용법

계면활성제의 취급법

- 계면활성용액은 실온에 장시간 방치 금지
- 농도: 표준농도 0,05%, 실험 농도 0,1~0,15%
- Inclusion body로 발현한 단백질 A, B의 refolding에 대한 계면활성제농도

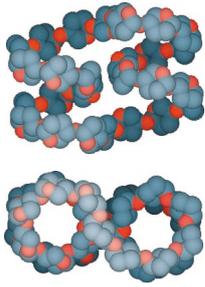


계면활성제 첨가: 1시간 반응

0,1%로 농도를 높이면
 90%이상이 가용화되어 회수가 가능

S: 가용성 부분
 P: 침전부분

CA용액의 취급법



환상구조는 인공 chaperone의 기능에 필수적

- 1) 세균 오염방지
- 2) 아밀라아제 등 오염방지



- 멸균수로 희석
- 실온에서 장시간 방치 금지

CA의 농도는 0.6%로 충분
(반응액 중의 최종농도)

5. Refolding 용액에서 계면활성제 제거

Refolding 용액

↓
(2h, 혼합)

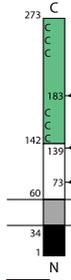
↓
용액 회수

← 1/5 Vol. BioBeads*
* 비극성 polystyrene의 흡수제(BIO-RAD 사)

이온계: 95%이상 제거 가능
비이온계: 90% 정도 제거

Refolding 후 수일 동안 방치 가능

Inclusion body를 사용한 refolding



대장균 내 inclusion body로 대량 축적된 수용체(human 유래)의 ligand를 특이적으로 인식하여 refolding

대상: C-type lectin-like oxidized LDL receptor(hLOX-1) 인간 대동맥 내피유래

- Scavenger 수용체 family
생체내 이물질, 노폐물(변성 LDL, 세균 등)의 인식/제거에 관여
- Type 2형의 막 단백질
- 분자내 3군데 S-S결합
- 당 사슬의 부가가 예상되는 서열 3곳(실체는 183, 139등 2곳)
- 분자량: 30,939(당사슬 부가시 40,000)

■ : C-type lectin-like domain(CTLD)

□ : 세포외 영역

6. 방향 전개

- 1) Refolding CA Kit의 유효성 평가
적용 예 축적, Troubleshooting 출실
- 2) Refolding 후의 용액 취급법에 관한 정보 제공
- 3) Refolding된 단백질의 구조에 관한 정보 축적
- 4) Refolding 구조의 해석
- 5) 보다 넓은 활용 범위 적용

CTLD 및 세포외 영역의 대량조제법

대장균내 inclusion body로 대량 축적 → Refolding하여 해석에 사용

Inclusion body 원탁액

- ↓ -- GdnCl(5 M: final concentration)
DTT(40 mM: final concentration)
(RT, 1 h): A₂₈₀=25⁺
- ↓ -- 70 vol, 0.1% CTAB/PBS(-) (2 mM DL-cystine)
(RT, 1 h)
- ↓ -- CA solution(0.6%: final concentration)

(RT, 1~ overnight)

- ↓ -- 15,000 rpm × 10 min

Refolded CTLD

Refolded extracellular domain

*1: LowpH 정황: 25~30 mg/ml

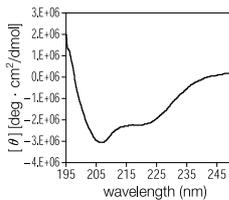
*2: 계면활성제용액 중 unfolding 용액을 첨가



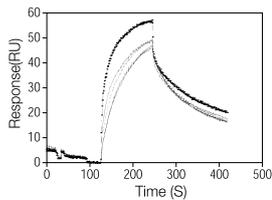
Refolding 전후 시료의 SDS-PAGE 결과

Refolding 후, 90%이상 가용성 단백질로 변환됨을 확인
(ligand 결합능 검출제).

1: Inclusion body; 2: Refolding 처리 후 상청(CTAB 처리); 3: Refolding 처리 후의 침전; 4: Refolding 처리 후의 상청(SB3-14 처리); 5: Refolding 처리 후의 침전



Refolding 후 세포외 영역의 CD
CA refolding법으로 2차 구조 형성



BIACORE 3000에 의한 세포외 영역과 ligand인 변성 LDL의 상호작용

CA refolding법으로 재구성한 영역을 사용하여 각종 ligand의 kinetics 해석, Affinity 해석 가능 확인.