

T-vector와 expression vector가 하나로...

FOREX-T vector

[Full ORF Expression T-vector]

- 한번 클로닝으로 over expression을 확인

원하는 특정 단백질의 대장균 내 발현을 위해서는 일반적으로 강력한 promoter와 그에 적절한 숙주 세포를 선택하는 것이 중요한 문제이며, 이렇게 얻어지는 단백질의 산업화 대량 생산이 목적인 경우에는 생산성, 경제성 등의 문제가 더 고려되어진다. 기존 과발현 발현 시스템을 이용할 경우, 특정 숙주 세포만을 사용해야 하는 점, IPTG와 같은 유도물질을 첨가해야지만 단백질의 과발현이 이루어지는 점 등의 단점을 가지고 있다. 또한 과발현을 확인하기 위해서 만들어져야 하는 최종 과발현용 plasmid의 구축에 있어서도 몇 단계의 cloning 과정과 마지막으로는 특정 세포주에만 형질전환 시켜야 하는 번거로움을 가지고 있다.

FOREX-T vector를 이용한 발현 시스템은 앞에서 언급한 여러 가지 문제점을 해결할 수 있는 신규 발현용 시스템이다. FOREX-T vector 시스템은 유도물질의 첨가가 필요하지 않은 항시적 고발현 vector (pHCE DNA vector) 시스템으로부터 유래된 HCE promoter를 사용하고 있어 모든 대장균에서 적용되며, 이 promoter 하류에 높은 cloning 효율의 T-vector cloning site를 가지고 있는 고발현용 vector 시스템이다. 목적 유전자를 발현하기 위해 제한효소 인식부위를 새롭게 만들기 위한 발현벡터용 primer를 제조할 필요가 없으면서, 목적 유전자의 ORF용 primer를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 목적유전자를 T-vector cloning함으로써 간단하고 신속하게 목적 단백질을 발현시킬 수 있는 신규 vector 시스템이다.

특징

- 1) 목적 단백질을 coding하는 유전자 증폭 산물을 단 한번의 T-vector cloning 과정을 거쳐 최종 발현용 plasmid로 구축 가능
- 2) 높은 T-vector cloning 효율
- 3) 항시적 고발현 promoter인 HCE promoter를 사용
 - 유도물질 필요없이 모든 대장균을 숙주로 이용하여 발현 가능한 시스템
- 4) 목적 단백질 유전자를 증폭시키기 위한 primer의 5' -말단을 ATG로 시작할 경우, cloning 후 정방향으로 삽입되었을 때는 Nde I 제한효소 인식부위가 생성됨
- 5) Enterokinase cleavage site 함유
- 6) 게놈정보 이용 초고속 ORF 유전자 발현에 최적

실험 예

1) FOREX-T vector 발현 시스템을 이용한 TNF- 발현을 위한 T-vector cloning과 발현 확인

FOREX-T vector 시스템을 이용해서 특정 목적 단백질의 발현을 테스트 해보고자 그 대상으로 유용단백질인 인체 Tumor Necrosis Factor- (TNF-)를 선택하였다. 먼저, TNF-를 암호화하는 유전자를 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭시켜 약 500 bp의 DNA 단편을 얻어, FOREX-T vector에 ligation시켜, 대장균에 형질전환하였다.

TNF- 의 증폭용 primer의 경우, N-말단 primer 시작을 ATG의 A로 시작하였기 때문에 FOREX-T vector에 정방향으로 cloning 되면 Nde I 제한효소 인식부위가 생성되도록 하여 제한효소 처리만으로도 cloning 방향을 확인할 수 있도록 하였다. 얻어진 형질전환 균주 중 임의로 12개의 colony를 선택해 cloning 성공 여부를 확인해 본 결과, 모든 형질전환균주가 T-vector cloning

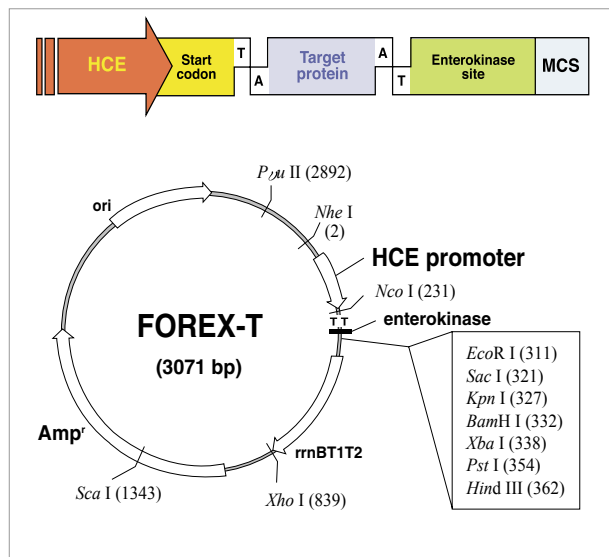


그림 1 FOREX-T vector 발현 시스템의 모식도

(효율 100%)이 이루어졌고, 이 중 50%에 속하는 6개의 형질전환체가 정방향으로 목적 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다 (그림 2. A). 정방향으로 목적 유전자가 삽입된 plamid를 가진 6개의 형질전환균주 중 5개가 항시적 고발현 됨을 확인하였다 (그림 2. B).

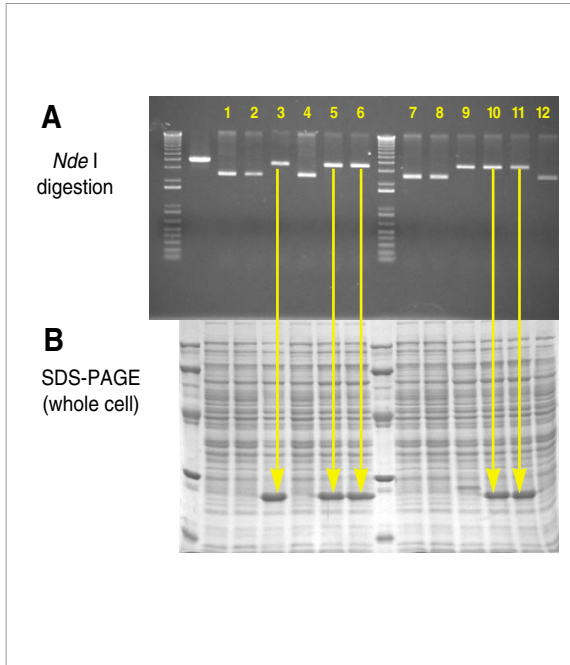


그림 2 FOREX-T vector를 이용한 T-vector cloning 효율과 그 발현

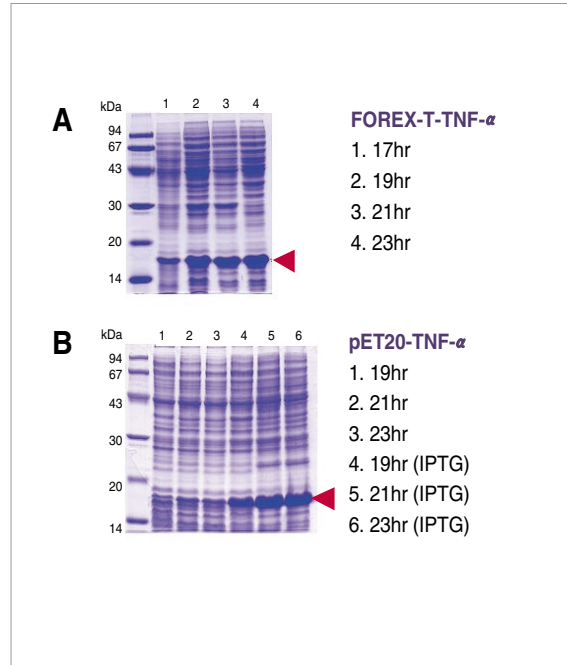


그림 3 기존 pET 발현 시스템과 신규 FOREX-T vector 발현 시스템을 이용한 목적단백질 (TNF- α)의 발현 비교

2) 신규 FOREX-T vector 발현 시스템과 기존 pET 발현 시스템을 이용한 TNF- α 발현 비교

기존 pET 발현 시스템의 경우에는 유도물질인 IPTG를 처리해야 목적단백질의 발현이 유도되는 특성을 가진다. 이러한 유도물질의 처리는 그 자체만으로 산업적 대량생산에 문제점으로 지적될 수 있는 고가의 비용 소모가 있을 뿐만 아니라, 이 물질을 처리한 후 숙주 세포주의 성장이 억제되면서 단백질의 발현이 이루어지는 단점을 가지고 있다. 신규 FOREX-T vector 시스템의 경우 유도물질이 필요없는 항시적으로 고발현되는 HCE promoter를 사용한 시스템으로 세포성장 및 균체 증가에 따라서 목적단백질의 지속적인 고발현이 이루어지며, 세포주의 성장도 계속적으로 이루어진다.

FOREX-T vector 시스템을 이용한 TNF- α 발현은 17시간 이후부터 지속적으로 증가된 발현을 보이며 (그림 3. A), pET 발현 시스템을 이용한 TNF- α 발현의 경우에는 유도물질 (IPTG)를 처리한 경우에만 19시간 이후부터 그 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다 (그림 3. B).



(주)바이오리더스: <http://www.bioleaders.co.kr> 전화: 042-586-7678/7679 팩스: 042-586-7673
 다카라코리아바이오메디칼(주): <http://www.takara.co.kr> 전화: 02-577-2002 팩스: 02-577-3691

Takara