

고효율의 가용성 단백질 발현에 최적!!

# ColdShock 발현 vector

pCold I DNA	TaKaRa Code 3361	25 $\mu$ g
pCold II DNA	TaKaRa Code 3362	25 $\mu$ g
pCold III DNA	TaKaRa Code 3363	25 $\mu$ g
pCold IV DNA	TaKaRa Code 3364	25 $\mu$ g

대장균 ColdShock 유전자 *cspA*의 promoter를 이용한 새로운 단백질 발현 vector이다.

- 목적 단백질 발현은 균체 단백질의 최대 60%이다.
- 종래 발현계에서 발현되지 않는 단백질을 발현할 수 있다.
- 종래 발현계에서 불용화되는 단백질을 가용화하여 발현할 수 있다.
- 목적 단백질이 신생 단백질의 최대 90%에 달해, 동위원소 표시에도 유용하다.
- 다양한 대장균주에 사용 가능하다.

단백질 구조나 기능의 규명은 post-genome의 중요한 연구 대상으로, 고효율 단백질 생산시스템은 그 연구에 필수적인 기반 기술이다. 재조합 단백질 생산에는 대장균을 숙주로 하는 발현계가 널리 이용되고 있다. 대장균 발현계는 취급이 간편하며, 비용이 저렴하다는 이점이 있지만, 유전자에 따라서 발현이 어렵거나 발현 단백질이 불용화 될 가능성이 있다.

이 같은 문제를 해결하기 위해 당사는 미국 뉴저지 의과 치과대학의 이 노우에 마사요리 교수와 공동연구를 통해 대장균의 저온 발현 유전자 (ColdShock 유전자)를 이용한 고효율 단백질 발현 vector를 개발하였다. 본 제품은 단백질의 기능 해석 및 구조 해석을 비롯한 단백질 연구의 중요한 도구가 된다.

## 제품의 개요와 특징

대장균의 배양 온도를 저온으로 낮추면 생육이 일시적으로 정지하고 대부분의 대장균 단백질 발현은 감소하지만, ColdShock 단백질이라고 불리는 단백질은 특이적으로 발현이 유도된다. 본 제품은 ColdShock 유전자의 하나인 *cspA* 유전자 promoter를 이용하고 있으며, 이 *cspA* promoter

downstream에는 *lac* operator, 5' untranslated 영역 (*cspA* 5' UTR), translation enhancing element (TEE), His·Tag 서열, Factor Xa 절단서열 및 multi-cloning site가 있다.

*lac* operator는 발현을 제어하는 작용을 하며, TEE 서열은 번역을 촉진하는 작용을 한다. His·Tag 서열, Factor Xa 절단서열은 단백질 정제와 정제 후의 Tag 제거에 유용하다. 본 제품에는 TEE 서열, His·Tag 서열, Factor Xa 절단서열 유무에 따라 서열이 달라지는 pCold I ~ IV 4종류가 있으며, 목적에 맞게 최적의 vector를 선택할 수 있다. 또한 본 제품은 대장균에서 유래하는 *cspA* promoter를 이용하고 있으므로, 거의 모든 대장균주를 발현용 숙주로 이용할 수 있다.

## 목적유전자의 발현방법

- 목적유전자를 ColdShock vector에 삽입하고 발현용 plasmid를 제작(cloning)
- ↓
- 발현용 plasmid로 숙주 대장균 (BL21 등)을 형질 전환(Transformation)
- ↓
- Ampicillin을 포함한 배지에 형질전환체를 접종하고, 37°C에서 배양
- ↓
- OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.5 부근에서 배양액을 15°C로 냉각하고 30분간 방치
- ↓
- 배양액에 IPTG를 첨가하고, 15°C에서 24시간 진탕배양
- ↓
- 집균, 파쇄
- ↓
- SDS-PAGE에 의해서 가용성 및 불용성분획에서의 목적산물의 유무 및 발현량을 확인

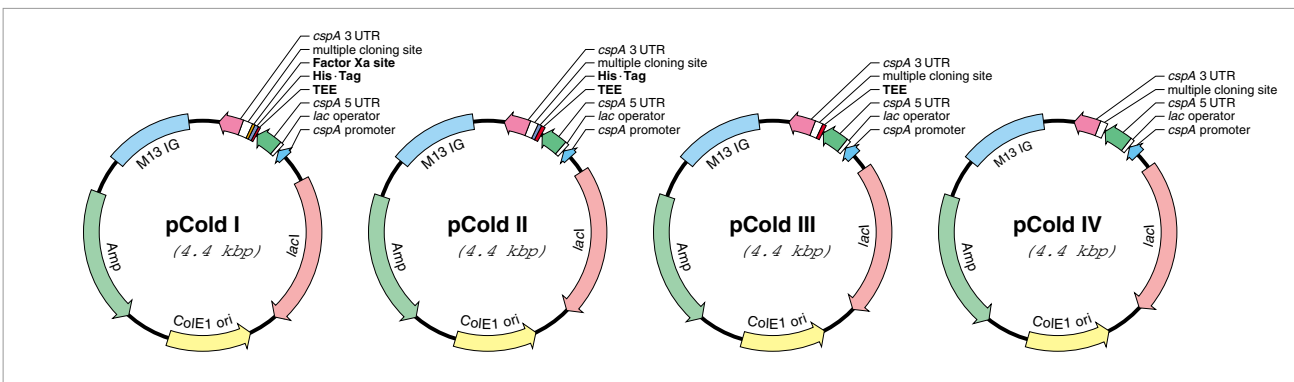


그림 1 ColdShock vector의 개략도

**실시 예**

T7 promoter에 의한 발현계에서 발현량이나 가용성 발현에 문제가 있는 유전자에 대해서 ColdShock vector로 발현을 시도한 예를 아래에 보여주고 있다. ColdShock 발현 vector로 pCold I DNA를 이용하고, 발현용 숙주로는 BL21을 사용하였다. T7 promoter에 의한 발현은 통상대로 IPTG를 첨가한 후 37°C에서 배양하였다.

**(1) 발현이 가능해진 유전자의 예**

사람 유전자 A (추정분자량 31 kDa)는 T7 발현계에서는 발현이 확인되지 않았지만, ColdShock 발현계에서는 발현이 확인되었다 (그림 2).

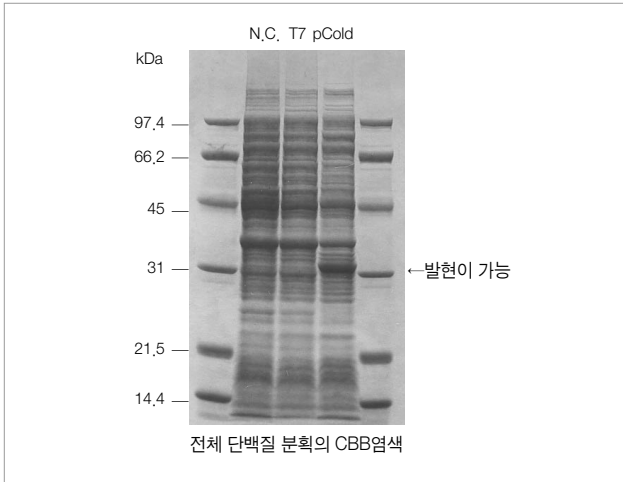


그림 2 사람 유전자 A의 발현

**(2) 발현량이 증가한 유전자의 예**

호열균 유전자 B (추정분자량 30 kDa)에서는 T7 발현계에 비해 가용성 정도가 향상됨과 동시에 발현량도 증가하였다 (그림 3).

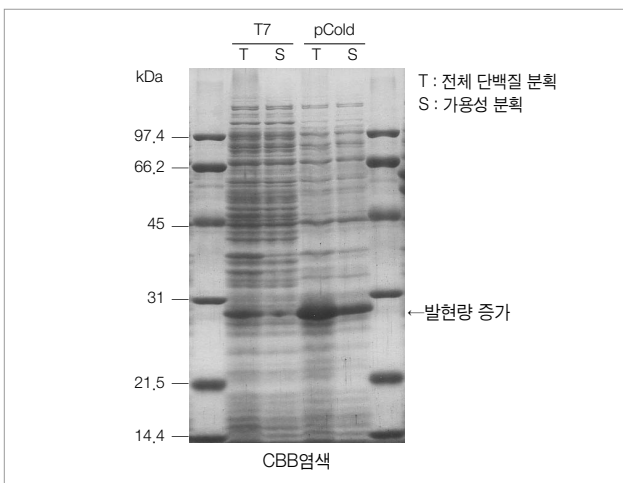


그림 3 호열균유전자B의 발현

**(3) 가용성 발현량이 증가한 유전자의 예**

사람 유전자 C (추정분자량 80 kDa)는 T7 발현계에서 대부분이 불용성 발현이다. 한편 ColdShock 발현계에서는 가용성 분획의 발현량이 현저히 증가하였다 (그림 4).

ColdShock 발현계는 T7 발현계에 비해 목적산물의 발현량 및 가용성 정도가 향상되는 것으로 기대한다.

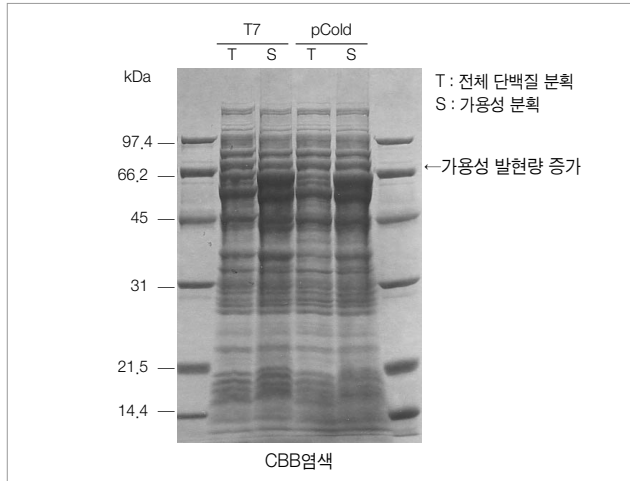


그림 4 사람 유전자 C의 발현

**(4) Pulse label 실험을 통한 비교시험**

사람유전자D (추정분자량 12 kDa)를 pulse label로 표식하고, 양쪽 발현계를 비교하였다 (그림 5). T7 발현계에서는 목적단백질 이외의 대장균 단백질도 표식되지만, ColdShock 발현계에서는 표식 단백질의 대부분이 목적유전자의 발현산물이며, 목적유전자가 특이적으로 발현 유도됨을 알 수 있다.

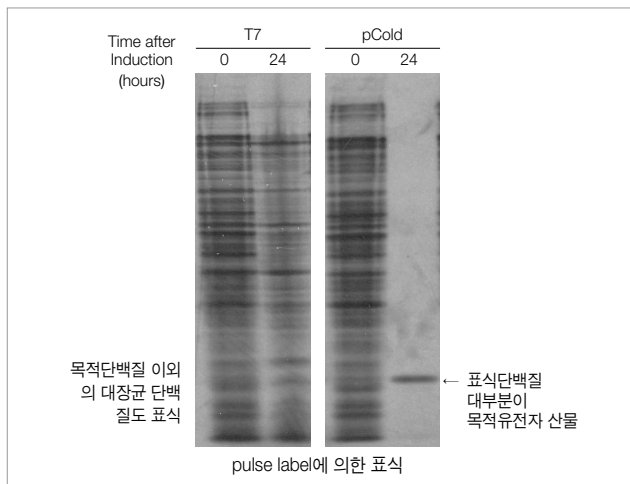


그림 5 사람 유전자 D의 pulse label

ColdShock 발현계는 동위원소 표식 단백질 조제 및 재조합 단백질 발현 시스템으로서 매우 유용하다.