

ColdShock 발현계와 Chaperone Plasmid의 병용 효과

pCold 벡터 시리즈 (TaKaRa Code 3360~3364)는 대장균 ColdShock 유전자 *cspA* promoter를 이용한 새로운 단백질 발현계이다. 목적 단백질의 발현량은 균체 단백질의 최대 60%, 신생 단백질의 90%에 달한다. 기존에 일반적으로 이용해 온 T7 발현계에서 발현되지 않았던 단백질이나 발현되어도 가용화가 어려운 단백질에서도 ColdShock 발현계를 이용함으로써 발현이 가능해진 경우나 가용화된 단백질의 비율이 향상되는 경우를 종종 볼 수 있었다. 그러나 목적 단백질에 따라서는 pCold 벡터를 이용하여도 충분한 발현이나 가용화가 어려운 경우도 있었다. 그럴 경우에는 반드시 Chaperone Plasmid Set (TaKaRa Code 3340)와 병용하여 사용할 것을 권장한다. 이번에는 pCold 벡터와 Chaperone Plasmid의 발현에 의해 목적 단백질의 발현 및 가용화 비율이 상당히 개선된 예를 소개하겠다.

ColdShock 발현 벡터

ColdShock 발현 벡터 pCold I~IV DNA는 모두 ColE1의 복제기점과 ampicillin 내성 유전자를 지닌 벡터이다 (Life Science & Biotechnology 31호 참조).

이번 실험에 사용한 pCold I DNA는 *cspA* promoter의 downstream에 있는 *lac* operator, 5' non-translation 영역, translation enhancing element (TEE), His-Tag 서열, Factor Xa 절단서열 및 multicloning site가 배치되어 있다 (그림 1).

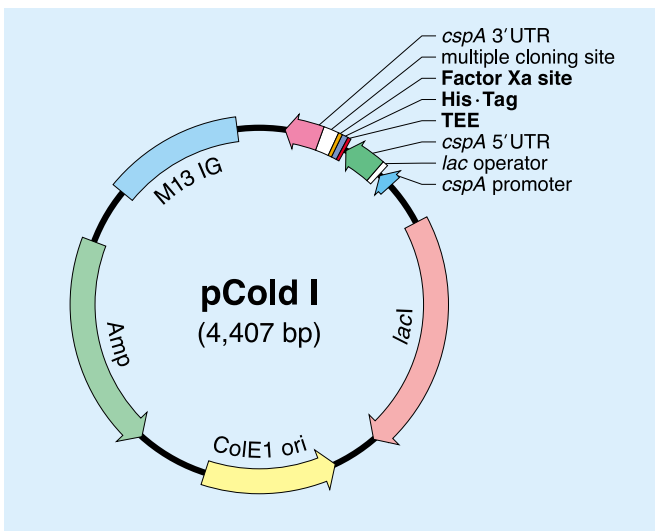


그림 1 ColdShock vector의 모식도

Chaperone Plasmid Set

Chaperone Plasmid Set는 단백질의 folding에 함께 작용한다고 알려져 있는 대장균 분자 Chaperone을 조합이 다른 Chaperone team으로 발현하도록 구축한 5종류의 plasmid 세트이다 (그림 2). pACYC의 복제기점과 chloroampenicol 내성 유전자를 이용하고 있어 대장균 내에서 pCold 벡

터와의 공존이 가능하며, Chaperone team의 공동발현에 의해 목적 단백질의 발현량과 가용화를 향상을 기대할 수 있다 (Life Science & Biotechnology 24호 참조).

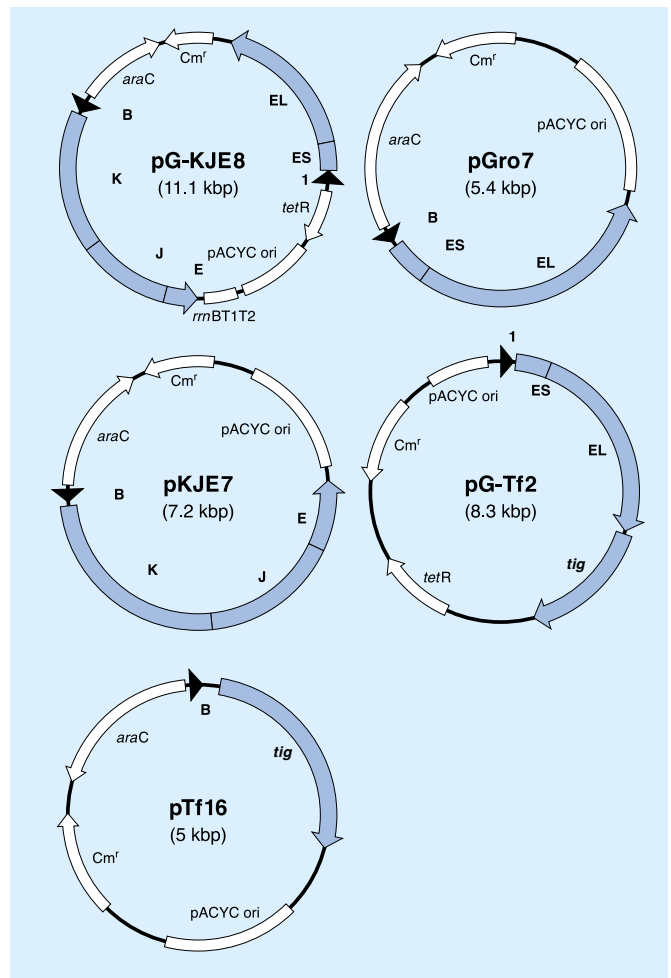


그림 2 Chaperone plasmid의 모식도

이번 실험에 사용한 Chaperone Plasmid pG-Tf2는 tig 서열, groES 및 groEL이 Chaperone team으로서 작용하도록 구축되어 있으며, Chaperone team의 발현은 *Pzt1* promoter (tetracycline에서 유도)로 제어된다.

pCold I DNA와 pG-Tf2와의 공동발현에 의한 목적 단백질의 발현방법

대장균 숙주로서 BL21 strain을 이용하여 다음의 순서로 공동발현 실험을 하였다.

1. 공동발현계의 구축

- ① Chaperone Plasmid pG-Tf2로 BL21 Competent Cells를 형질전환한다 (chloroampenicol에서 선택)
- ② 형질전환체 (BL21/pG-Tf2)를 액체배양하여 competent cell을 제조한다.
- ③ 목적 유전자를 삽입한 pCold I DNA로 BL21/pG-Tf2 strain을 형질전환한다 (chloroampenicol과 ampicillin에서 선택).
- ④ 공동발현 대장균을 얻는다.

2. 공동발현 실험

- ① pCold I DNA와 pG-Tf2의 공동발현 대장균을 plasmid 선택 약제 (chloroampenicol과 ampicillin) 및 Chaperone 발현용 antibiotic (1 ng/ml tetracycline)을 포함한 L 배지에서 37°C로 배양한다.
- ② OD₆₀₀=0.4~0.5 부근에서 배양액을 15°C로 냉각하여 30분간 방치한다.
- ③ 배양액에 0.5 mM IPTG를 첨가하고 15°C에서 다시 24시간 진탕 배양한다.
- ④ 집균, 과쇄하여 SDS-PAGE로 전체 단백질 분획으로부터 가용성 분획의 목적 단백질에 대한 발현량을 확인한다.

비교실험으로 pCold I DNA를 이용한 발현 실험에서는 목적 유전자를 포함한 pCold I DNA를 이용하여 형질전환한 BL21 strain을 ampicillin이 포함된 L배지에서 OD₆₀₀=0.4~0.5 정도까지 배양하고 배양액을 15°C에서 30분간 방치한 후, 배양액에 0.5 mM IPTG를 첨가하여 다시 15°C에서 24시간 진탕 배양했다.

실험 예1 : 가용화 촉진 예

Human 유전자A (추정 분자량 70 kDa)는 pCold I DNA 단독 발현계에서는 거의 전부 불용성 발현이 되었지만, Chaperone Plasmid pG-Tf2를 공동 발현계에서는 가용성 분획의 발현량이 현저히 증가하였다 (그림 3).

실험 예2 : 발현 · 가용화 성공 예

Human 유전자B (추정 분자량 24 kDa)는 pCold I DNA 단독 발현계에서는 발현이 거의 보이지 않았지만, Chaperone Plasmid pG-Tf2와 공동 발현을 수행하자 목적 단백질 발현이 확인되었을 뿐 아니라 거의 대부분 가용화되었다 (그림 4).

결론

이번에 소개한 실험 예 이외에도 ColdShock 발현 벡터와 Chaperone Plasmid Set를 병용함으로써 목적 단백질의 발현량, 가용화 비율이 현저히 개선되는 사례를 종종 볼 수 있었다. 만약 발현하고자 하는 단백질이

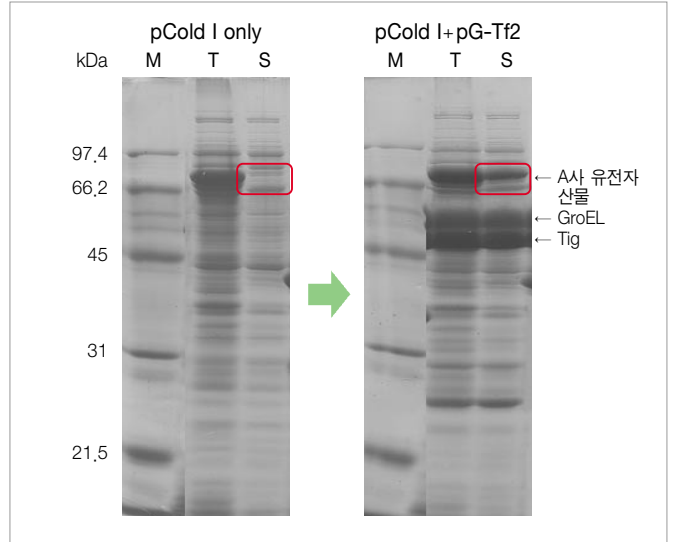


그림 3 pG-Tf2에 의한 가용화 촉진의 예

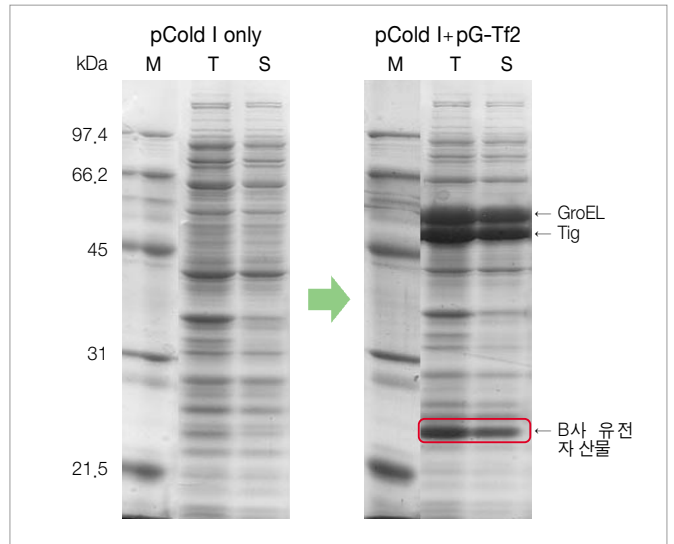


그림 4 발현 · 가용화의 성공 예

pCold 벡터를 이용해도 충분한 발현, 가용화에 이르지 못할 경우는 꼭 한 번 Chaperone Plasmid와의 공동발현을 권장한다. 또한 여기에서 데이터는 기재하지 않지만, pCold 벡터를 이용한 발현계는 Chaperone Plasmid Set 중의 tig 서열을 포함한 Chaperone team과의 공동발현으로 더 좋은 결과를 나타내는 경향을 보인다. pCold 벡터와 병용할 경우에는 pG-Tf2 또는 pTf16과 공동발현을 검토해볼 것을 권장한다.

이 밖에 당사에서는 각 Chaperone Plasmid를 포함한 대장균 BL21주의 Competent Cells 발매를 예정하고 있다.

관련제품

- pCold I DNA TaKaRa Code 3361
- pCold Vector Set TaKaRa Code 3360
- Chaperone Plasmid Set TaKaRa Code 3340