

가용성 발현의 결정판 pCold TF DNA

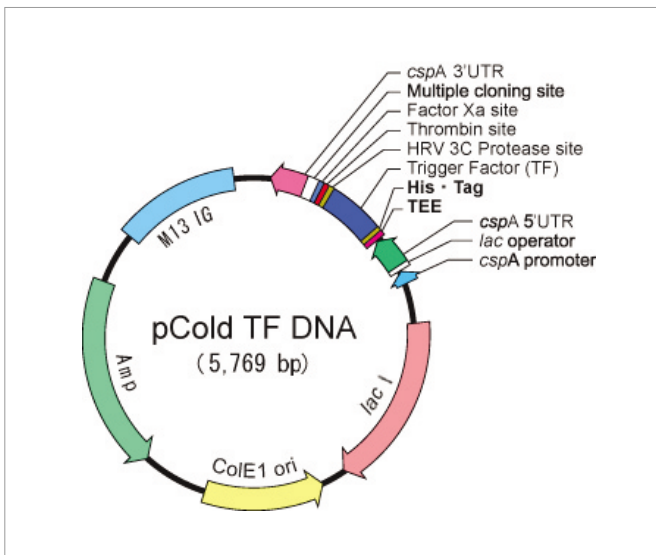
TaKaRa Code 3365

25µg

pCold TF DNA는 *E.coli* chaperon의 일종인 Trigger Factor : TF(48kDa)를 soluble tag로 발현하는 fusion cold shock expression vector이다. pCold DNA 시리즈와 같이 *E.coli* cold shock gene의 하나인 *cspA* promoter를 이용하고 있다. 이 *cspA* promoter의 downstream에 5' untranslated region(5'UTR), translation enhancing element(TEE)*, His-Tag sequence와 multicloning site(MCS)로 구성되어 있다. 또 *cspA* promoter의 downstream에는 발현을 제어하기 위한 *lac* operator가 삽입되어 있다. TF tag와 MCS 사이에 HRV 3C Protease, Thrombin, Factor Xa의 인식부위가 있어, 발현 후의 fusion protein으로부터 tag를 제거할 수 있다.

Cold shock 발현계는 저온으로 발현을 유도하기 때문에 host인 *E.coli*에서 유래된 단백질 합성을 억제하여 target protein만을 고효율로 얻을 수 있어, 기존의 *E.coli* 발현 방법과 비교하여 발현량이나 가용성에서 향상을 기대할 수 있다. 또한 TF의 soluble tag 기능 및 chaperone 기능으로 지금까지 발현이 힘들었던 유전자를 보다 높은 확률로 soluble protein으로 발현시킬 수 있다.

* translation enhancing element의 약어로 translation을 촉진하는 기능을 가진다.



GenBank Accession No. : AB213654

특징

- 높은 생산 효율: Target fusion protein이 host *E.coli* 내 단백질(cellular protein)의 최대 60%에 이른다.
- 발현효율의 향상: TF Tag의 효과로 T7계나 기존의 pCold 발현계에서는 발현되지 않았던 많은 단백질의 발현이 가능하다.
- 가용성 발현의 향상: T7계나 기존의 pCold 발현계에서는 불용성 발현이었으나 TF Tag의 효과로 많은 단백질이 가용성 발현한다.
- 간편한 정제: His-Tag를 이용하여 정제가 용이하며 정제 후엔 3 종류의 protease로 Tag 서열을 제거할 수 있다.
- 폭넓은 host에 사용 가능: *E.coli cspA*(cold shock protein gene) promoter에 의해 전사 되므로 거의 모든 *E.coli*를 host로 사용할 수 있다.

실험예

[가용성 발현량이 올라간 유전자의 예]

가용화하기 어려운 단백질 발현 예로 효소 단백질 B(분자량 63 k Da)를 이용하였다.

효소 단백질 B는 soluble tag로 알려진 Trx tag(약 12 kDa), Nus tag(약 55 kDa), GST tag(약 26 kDa)를 각각 융합하여 발현하는 T7 expression vector를 이용했을 경우, 거의 가용성 발현이 되지 못했다.

또, 가용화 발현이 뛰어난 pCold I DNA(단독 발현, chaperon co-expression)를 이용했을 경우에도 거의 가용성 발현이 나타나지 못했으나, Trigger Factor를 fusion시킨 pCold TF DNA를 이용했을 경우는, 목적 단백질 대부분이 soluble fraction에 얻을 수 있었으며, 다른 tag와 비교하여 가용성 발현량이 향상되었음을 알 수 있었다. (그림 1).

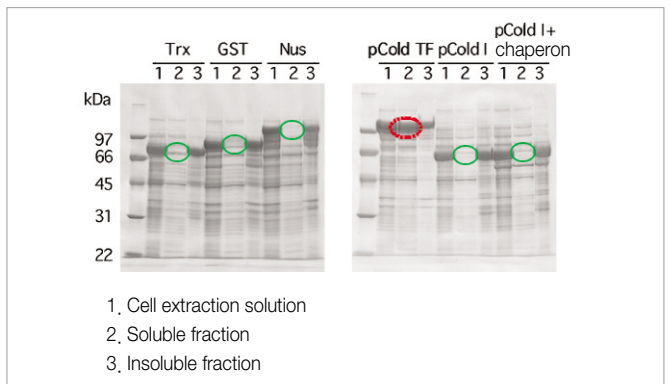


그림 1, Enzyme Protein B의 발현

대장균 Cold Shock 발현계를 이용한 단백질발현 서비스

■개요

대장균 cold shock 발현계를 비롯한 발현계 구축이나 vector계의 스크리닝 및 단백질의 발현·정제 등을 할 수 있습니다. Cold Shock 발현계에서는 가용성 발현 향상을 기대 할 뿐만 아니라, 저온 발현에 의해 대부분의 대장균 단백질의 발현이 감소하기 때문에 목적 단백질만을 효율적으로 회수할 수 있습니다. 입체 구조 해석을 목적으로 한 동위체 표식이나 SeMet 표식도 가능합니다. 미생물로부터 동물세포까지 광범위한 단백질 발현 서비스를 제공합니다.

〈참고〉

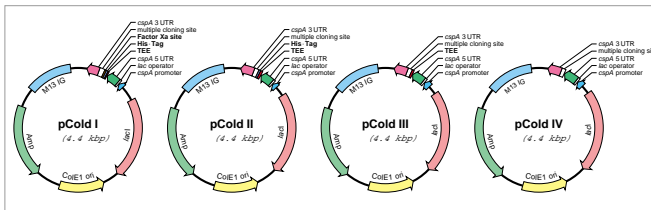
배양은 비병원성 미생물, 세포에 한정합니다. 재조합체의 경우는 사전에 안전성을 증명하는 자료를 확인하는 경우가 있습니다.

〈단백질 발현〉

■서비스 내용

Cold Shock vector에 유전자를 클로닝하여 발현 vector를 구축합니다. 구축한 Plasmid DNA를 대장균에 형질 전환하여, SDS-PAGE(CBB염색)로 발현 유무, 발현량, 가용성 등을 제공합니다.

본 서비스는 다 검사 대상 물체에서의 발현 검토가 가능합니다. Plate 단위로 클로닝하여 발현 확인 하는 것으로, 96개 클론을 1개월 이내에 해석이 가능합니다.



■선택 사항

● *in vivo* folding

대장균 유전자를 공발현시켜 발현량이나 가용성을 증가시킵니다.

● 재조합 단백질의 발현조건 최적화

목적으로 하는 재조합 단백질의 수량을 증대하거나 가용성 단백질로서 발현하도록 배양 조건, 유도 조건의 최적화를 실시합니다. 검토 항목은 유도 타이밍, 유도 물질의 농도, 유도 후의 온도나 배양 시기등입니다.

● 재조합 단백질의 대량 발현

검토한 발현 조건을 기초로 배양 scale-up합니다.

● *in vitro* refolding

활성화 단백질을 목적으로 「Refolding CA Kit(Code 7350)」를 사용하여 단백질, 효소를 refolding합니다. 본 kit을 이용하여 inclusion body를 형성한 재조합 단백질을 효율적으로 refolding하는 조건 검토 후, 효율적인 refolding 조작을 실시합니다.

■의뢰시의 주의점

본 서비스에 사용하는 pCold vector는 New Jersey의 -치과 대학 및 QIAGEN사의 라이선스를 받아 제조, 판매하고 있습니다. 본 제품은 연구 목적으로만 사용 가능합니다. 본 제품 또는 본 제품을 이용하여 제조한 것을 상업적으로 사용하는 경우는 별도 상업 이용 계약을 체결해야 합니다. 또한 본 제품 구성 부분 또는 그 유도체 및 제조된 산물을 제삼자에게 무료 배포, 판매 할 수 없습니다.

〈단백질 정제〉

■서비스 내용

● His·Tag융합 단백질의 정제

재조합 미생물을 배양·파쇄 후, His·Tag specific affinity column으로 정제합니다.

● 단백질의 정제

의뢰 샘플로 크로마토그래피를 실시하여 효소 등의 단백질을 정제합니다.

〈미생물 배양 Plasmid DNA 조제〉

■서비스 내용

적합한 배양 배지 및 배양 조건에 따라 미생물(재조합체 및 비 재조합체)의 배양을 합니다. 시험관 스케일에서 3 L, 20 L, 100 L의 Jar ferment에 배양합니다.

■가격·납기

서비스 항목	가격	표준 납기
단백질 발현 vector 구축(Cold Shock)*1	1,400,000원~	4주~
순서 확인	1,000,000원~	
<i>in vivo</i> folding	4,800,000원~	4주~
재조합 단백질의 발현조건 최적화	3,500,000원~	4주~
재조합 단백질의 대량 발현	별도 상담	
<i>in vitro</i> refolding	2,400,000원~	4주~
Tag 융합 단백질의 정제		
3 L	4,800,000원~	4주~
20 L	7,700,000원~	4주~
단백질의 정제	별도 상담	
미생물 배양*2		4주~
0.5 L	1,200,000원~	
3 L	2,400,000원~	
20 L	3,800,000원~	
100 L	12,000,000원~	
PlasmidDNA, genomeDNA조제 2.5 mg~	2,000,000원~	4주~
Endotoxin free kit 처리필 2.5 mg~	4,000,000원~	4주~

*1: 발현을 확인할 수 없는 경우, 별도 가격이 부가됩니다.

*2: 배지 조성이나 배양 조건에 의해 달라집니다.

