{Q&A}

Protein interaction 연구를 위한 가장 적합한 기술

Matchmaker 제품은 yeast two-hybrid와 one-hybrid 기술을 이용하여 protein-protein, protein-DNA의 새로운 interaction을 identifying, confirming, characterizing하는 다양한 제품과 서비스(Custom cDNA Library Construction과 Custom cDNA Array Analysis)를 제공한다. Creator™ Donor Vector로 Custom library construction은 protein function을 분석하기 위한 가장 적합한 방법이다. Creator Donor Vector로 만들어진 library로 protein localization, expression, purification을 위한 two-hybrid analysis를 하면, vector에서 다른 vector로 insert를 옮기는 전통적인 subcloning 단계가 필요 없어 훨씬 더 효율적인 분석이 가능하다.

Q_1... Yeast를 이용한 Two-Hybrid system은 무엇입니까?

A_1... 2개의 단백질간의 상호작용을 Reporter 유전자의 전사 활성을 이용하여 yeast내에서 검출하는 system으로, 2개 유전자의 상호작용을 확인하고, 기존의 유전자 산물과 상호작용하는 유전자의 영역 결정, 발현 library에서 상호작용을 나타내는 신규 유전자를 스크리닝 할 수 있다. Yeast 생체내(*in vivo*)에서 단백질간 상호작용을 검출할 수 있어 일시적인 상호작용도 고감도로 검출할 수 있으며, 검출할 때 별도의 단백질 정제나 항체가 필요 없다.

특정 유전자(bait)를 DNA 결합 도메인(DNA-BD)과 융합한 것과 그 유전자와 상호작용 한다고 생각되는 유전자(prey)를 전사 활성화 도메인(DNA-AD)과 융합시켜 yeast내에서 발현시킨다(GAL4 System에서 이 때 만들어지는 유전자 산물에, nuclear localization signal을 갖고 있어, 융합된 단백질은 yeast의 핵 내로 이동합니다). Reporter 유전자는 yeast의 염색체에 재조합하여, yeast 세포내에서 bait와 prey가 상호작용 하였을 경우만, reporter 유전자 상류의 전사가 활성화 되어 영양요구성유전자나 lacZ 유전자를 발현시킨다. 실제 실험에서는 배지 상에서 영양요구성의 회복이나, β-galactosidase 활성을 측정하여 상호작용을 검출한다. 또, 상호작용이 확인된 유전자는 회수하여, 다른 기능 해석에 이용할 수 있다.

Clontech에서는 2개의 단백질간의 상호작용을, yeast내에서 검출해 주시는 system 외에, 포유류 세포를 이용하는 Matchmaker Mammalian Two-Hybrid Assay Kit(Cat.No.630301)를 판매하고 있다.

Q_2... One-Hybrid법은 무엇입니까?

A_2... Matchmaker One-Hybrid System은 특이적인 DNA 서열에 결합하는 단백질을 검출하는 system이다. 목적하는 DNA 서열을 reporter 유전자 상류에 삽입하고 그 DNA 서열과 단백질간의 상호작용을 reporter 유전자의 전사 활성을 통하여 yeast에서 검출한다. DNA 결합 단백질은 AD와 융합하면 reporter의 전사가 활성화 된다. 이것을 이용하면 Two-Hybrid(GAL4)용 library에서 신규 DNA 결합 유전자를 스크리닝 할 수 있다(Clontech LexA library은 yeast YM4271가 wild type GAL4 유전자를 가지지 않기 때문에 GAL1 promoter를 발현하지 못합니다).

Q_3... Three-Hybrid법은 무엇입니까?

A_3... Clontech에서는 yeast GAL4 Two-Hybrid System에 다른 단백질을 발현시켰을 때 나타나는 단백질 상호작용(Three-Hybrid)을 검출하기 위한 vector를 판매하고 있습니다(p Bridge Three-Hybrid Vector Cat.No.630404). 제3의 단백질은 DNA-BD vector상에 methionine promoter와 재조합 되어있으며, methionine(-) plate에서 제3 단백질이 발현하여, 단백질-단백질간의 상호작용을 검출할 수 있다.

Q_4... Two-Hybrid system로 상호작용이 관찰되었을 경우는 실제로 상호작용이 있다고 결론 할 수 있습니까?

A_4... Two-Hybrid system를 이용한 assay로 상호작용이 양성으로 관찰되었다고 하더라도, 반드시 상호작용이 있다고는 결론 할 수 없다(false positive의 문제, 예, DNA-BD에 융합시킨 유전자가 단독으로 reporter 유전자의 전사를 활성화 해 버리는 경우). Clontech GAL4 Two-Hybrid system 3(Cat.No.630303)에서는 false positive을 줄이기 위해서 3 종류의 reporter 유전자를 가지는 AH109 yeast주를 이용하고 있다(상호작용 한 bait 단백질과 prey 단백질의 복합체가, 하나의 yeast내에서, 서열이 다른 3종류의 promoter의 전사를 활성화 한다).이 때문에, false positive의 문제가 크게 줄어들었으며, bait 단백질과 prey 단백질에 c-Myc, HA, 6XHN의 epitope tag가 있어, Immunoblotting, CO-IP 등으로 *in vitro*에서 확인할 수 있다.

Q_5... 대장균에 transformation된 yeast Two-Hybrid용 library 제품의 용도는?

A_5... Two-Hybrid용 cDNA library는 대장균을 이용하여 제작한다. Library는 plate에서 증폭하여 별도로 정제할 필요가 있다. 균일한 plasmid의 증폭을 위하여, plate상에서 배양할 것을 추천한다. Clontech에서는 미리 yeast내에 plasmid를 도입 한 library을 준비하고 있다(Pretransformed Matchmaker cDNA Library).

Q_6... 영양요구성 배지에 나타난 yeast colony에 목적 plasmid를 확인하려면?

A_6... Plasmid를 회수하여 PCR로 증폭하거나, 대장균 내에 다시 도입하여 확인할 수 있다. Yeast로 정제한 plasmid는 양이 적기 때문에 전기 영동으로 확인하기 힘들며, 대장균과 달리 간단하게 정제 할 수 없다. Yeast plasmid 정제용 Kit(YEASTMAKER Yeast Plasmid Isolation Kit Cat.No.63044)를 사용한 plasmid 정제를 추천한다.

Q_7... Yeast는 electrophoration으로 transformation이 가능합니까?

A_7... 상관없지만, library scale의 transformation에는 효율이 좋지 않기 때문에 적합하지 않다.

Q_8... Yeast Two-Hybrid용 yeast를 plate에 도말 하였으나, red(또는 분홍) colony와 white colony가 나타났다.

A_8... ade2 변이를 가지는 yeast주는 adenine 농도의 낮은 배지에서 연한 빨강(분홍)색의 colony를 형성하고, 시간 경과 함에 따라 붉은색으로 된다. 30℃에서 3~4일간 혼합 한 후, white colony나 직경 2 mm 이하의 colony를 사용하시기 바란다.

Matchmaker™ One-Hybrid & Two-Hybrid Systems

새로운 protein interaction의 screening 방법

Yeast Hybrid 기술의 원리

One-hybrid, two-hybrid 및 three-hybrid 방법은 protein interaction을 연구하기 위한 방법으로 eukaryotic transcription factor는 하나의 module이라는 개념에서 착안하였다. 즉, transcription-activating domains(AD)과 DNA-binding domains(DNA-BD)은 구조적으로 기능적으로 구별된다. 이러한 특징으로 yeast에서 다양한 fusion protein의 발현이 가능하고, 동시에 target DNA sequence에 binding하여 downstream의 nutritional reporter를 전사할 수 있도록 한다(그림 1).

Clontech Matchmaker Systems은 yeast transcription factor로 잘 알려진 GAL4의 transcription-activating domains(AD)과 DNA-binding domains(DNA-BD)을 이용한다. One-hybrid system에서 배지내 histidine이 없을 때 yeast host strain(His auxotroph)은 library protein과 DNA target sequence의 interaction으로 HIS3 reporter gene을 활성화한다.

Matchmaker system의 two-hybrid system은 두 protein의 interaction으로 multiple reporter gene을 활성화하여, 최소배지(defined nutritional drop-out medium)에서 host가 자라도록 한다 (그림 1).

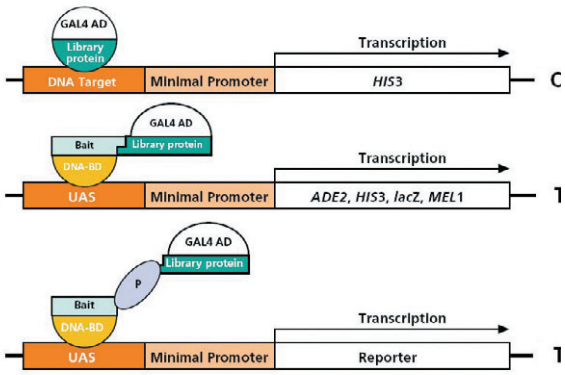
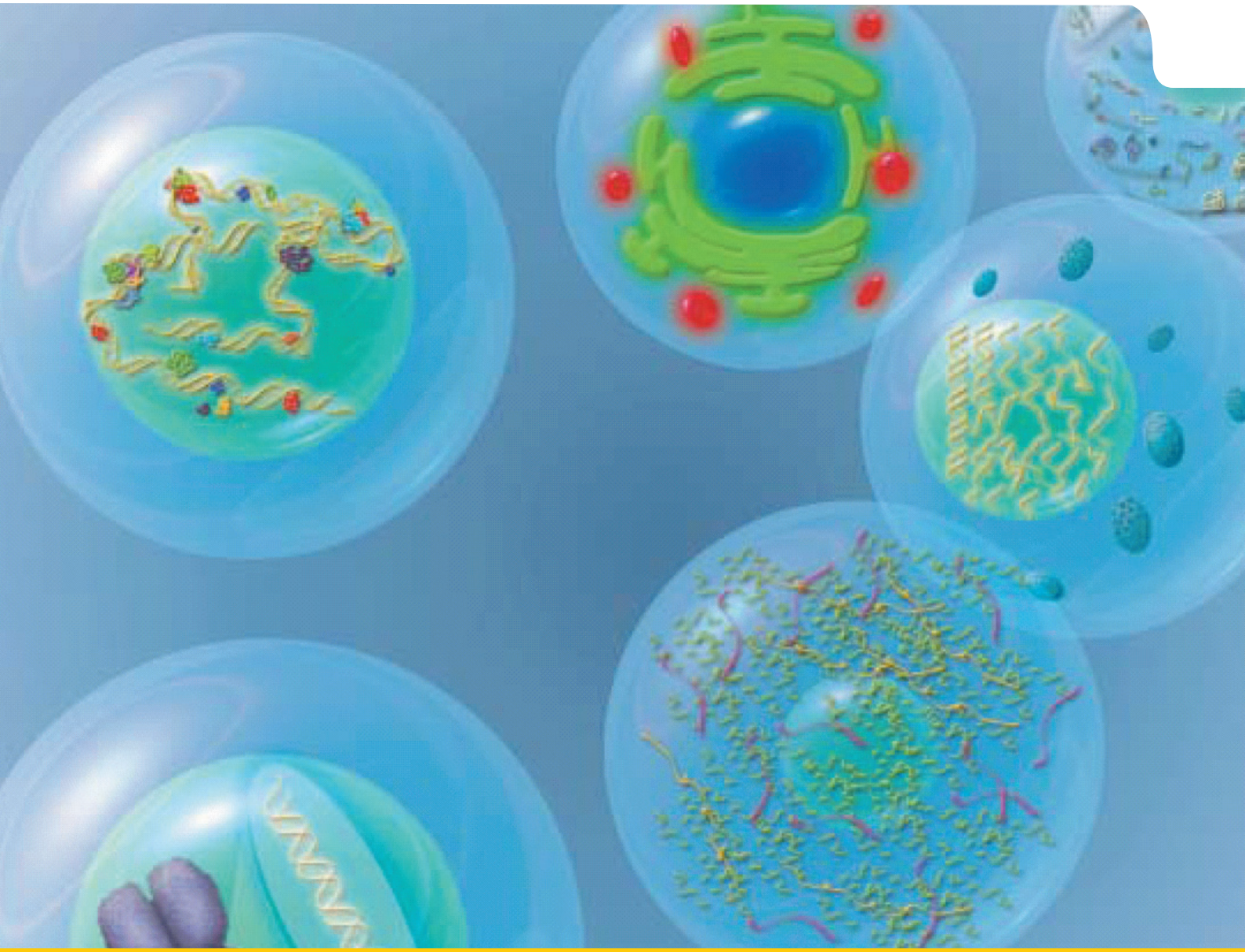


그림 1. Yeast hybrid technology.
Matchmaker systems은 one-hybrid, two-hybrid, three-hybrid interaction을 검출하기 위하여 transcriptional assay를 이용한다. Bait와 library plasmid로 transformation된 yeast reporter strain은 GAL4 DNA-BD 또는 AD와 fusion된 유전자를 발현시킨다. Library protein이 protein(two-hybrid)이나 DNA target(one-hybrid)과 interaction하면 host strain은 promoter의 downstream에 위치한 reporter gene을 발현시킨다. 3번째 protein(P)을 통해 나타나는 protein interaction이나 three-hybrid interaction은 pBridge vector(TaKaRa Code 630404)를 사용하여 검출할 수 있다.
UAS = GAL4-responsive upstream activating sequence.

Clontech은
Takara의 새로운 가족입니다.



Clontech은 gene discovery, regulation, function과 관련한 다양한 제품을 공급합니다.
또한 gene expression analysis, subcellular localization, apoptosis, signal transduction 연구에 필수적인
30여개의 특허를 보유하고 있습니다.

Clontech은 전세계 최초 상업적인 antibody microarray를 소개하여 한번의 실험으로 수백개의
cellular protein을 연구하는 유용한 Tool을 제공하고 있습니다.

Clontech은 fluorescent proteins, apoptosis detection systems,
cDNA arrays, tet-regulated gene expression systems, retroviral expression systems로
정평있는 R&D 100 awards를 수상한 바 있습니다.

TaKaRa