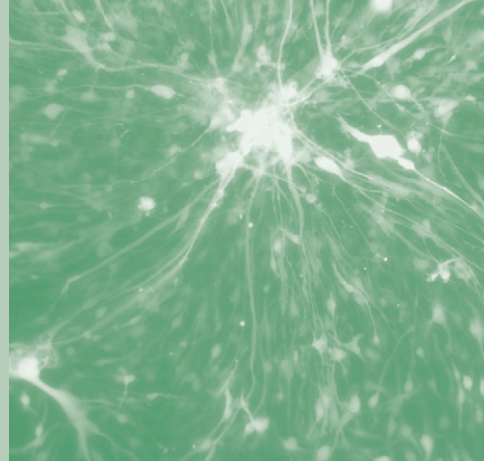


MazF(mRNA interferase)를 이용한 목적 단백질 유도발현 시스템 Single protein production system (SPP System™)



SPP System™ Set TaKaRa Code 3366
SPP System™ I TaKaRa Code 3367
SPP System™ II TaKaRa Code 3368

SPP System™ III TaKaRa Code 3369
SPP System™ IV TaKaRa Code 3370

- Single strand RNA의 ACA 서열을 특이적으로 절단하는 MazF를 함께 발현시키면 host 유래의 단백질 발현을 억제한다.
- 높은 효율로 가용화 발현을 하는 cold shock 발현 벡터계이다.
- 목적 단백질을 높은 효율로 발현 유도할 수 있기 때문에, 목적 단백질에 특이적인 stable isotope에 표식할 수 있다.

대장균의 단백질 MazF는 single strand RNA의 특정 서열(ACA)을 인식하여 절단하는 효소(mRNA interferase)라는 것이 발견되었다. 이 MazF를 이용하여 host 유래의 단백질 발현을 억제하고 목적 단백질만 높은 효율로 발현하는 기술이 개발되었다. 이 시스템을 single protein production(SPP) system이라고 한다. 당사에서는 이 시스템을 이용한 단백질 발현 Kit(SPP System™)을 출시하였다.

SPP System™의 개요

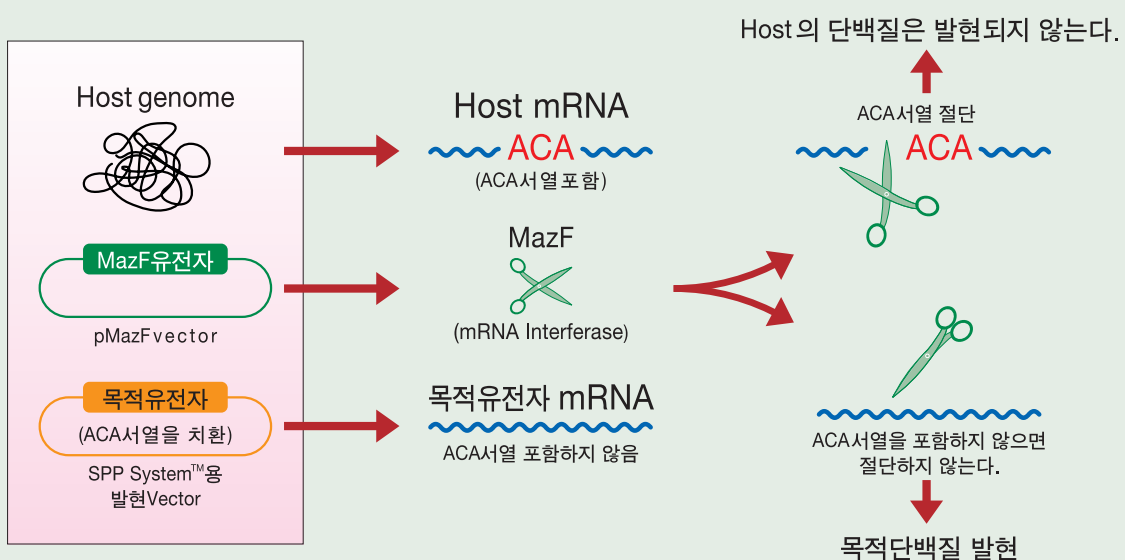
SPP System™에서는 아미노산 서열을 유지한 상태에서 발현시키고 싶은 유전자 내에 ACA 서열을 다른 서열로 치환시킨 후, MazF와 함께 발현시킨다.

대부분의 host 단백질의 mRNA는 ACA 서열을 가지고 있기 때문에 MazF에 의해 분해되어 단백질의 발현이 억제된다. 그러나 ACA 서열이 없는 목적 단백질 유전자의 mRNA는 절단되지 않고 목적 단백질을 높은 효율로 발현시킬 수 있다. 본 제품에서는 기존의 cold shock 발현 벡터를 변형하여 사용하고 있으며 목적 단백질의 고순도 생산과 stable isotope 표식에 적합하다. Cold shock 발현 벡터계에서도 목적 단백질에 특이적인 stable isotope 표식이 가능하다. 그러나 본 제품에서는 목적 하지 않는 단백질 발현을 강력하게 억제하고, 보다 다양한 종류의 목적 단백질에 대해 더욱 높은 순도와 표식 효율을 얻을 수 있기 때문에 NMR 등에 의한 단백질 구조 해석에도 응용할 수 있다.

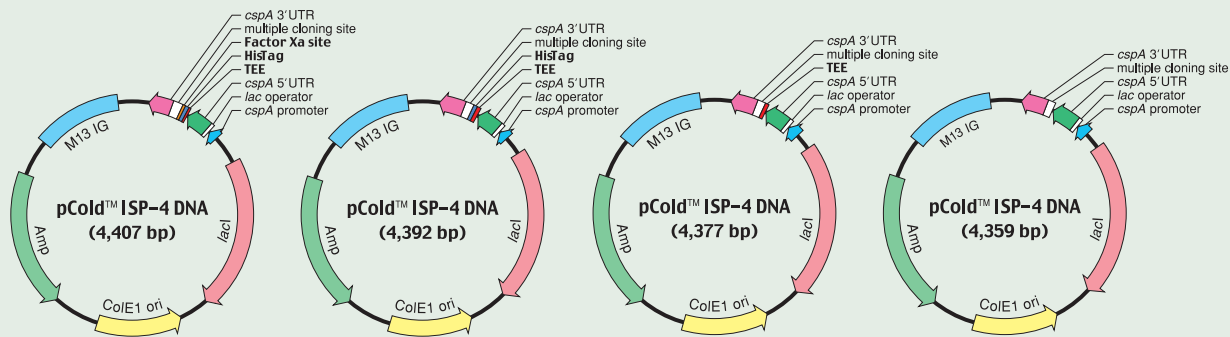
본 제품에는 전사영역 내의 ACA 서열을 다른 서열로 치환한 SPP System™용 cold shock 발현 벡터, pCold™(SP-4) DNA와 적당량을 발현하는 MazF 발현 plasmid가 포함되어 있다.

또한 목적 단백질 유전자내 ACA 서열을 다른 서열로 치환 및 pCold™(SP-4) 벡터로의 클로닝은 'SPP System™ 벡터 구축서비스'로 제공받을 수 있다.

[SPP 시스템의 원리]



[SPP System™ 용 Cold shock 발현 벡터의 개요]



내용(SPP System™Set)

SPP System™용 cold shock 발현 벡터

- pCold™ I (SP-4) DNA
- pCold™ II (SP-4) DNA
- pCold™ III (SP-4) DNA
- pCold™ IV (SP-4) DNA

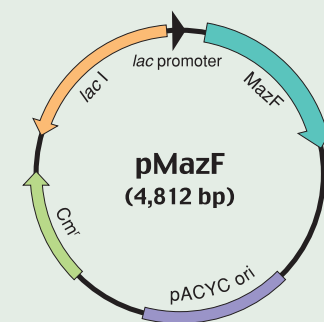
MazF 발현 plasmid

- pMazF DNA

Positive control

- pCold™ I (SP-4) envZB DNA : SPP System™용 대장균 유래 envZB 발현 plasmid(발현 단백질 추정 분자량 19.6 kDa)

[MazF 발현 plasmid pMazF의 개요]



목적 단백질의 SPP System™에 의한 발현방법

ACA 서열을 아미노산 서열이 바뀌지 않도록 다른 서열로 치환한 목적 단백질 유전자를 SPP System™용 cold shock 발현 벡터에 삽입하여 발현용 plasmid를 제작

↓

발현용 plasmid와 MazF 발현 plasmid로 host 대장균(BL21 등)을 형질전환 (Ampicillin과 chloramphenicol 중에서 선택)

↓

Ampicillin과 chloramphenicol을 포함하는 배지(Pulse-labeling 할 경우는 M9 glucose 배지와 같은 minimal 배지)에 형질전환체를 접종하고 37 °C에서 배양

↓

OD₆₀₀=0.5 정도로 배양액을 15°C에서 냉각한 후 45분간 방치

↓

배양액에 IPTG를 첨가한 후 15°C에서 24시간 더 배양 (Pulse-labeling 할 경우는 sampling할 때 방사성 동위원소 표식 아미노산을 첨가한 후, 15°C에서 15분간 더 방치)

↓

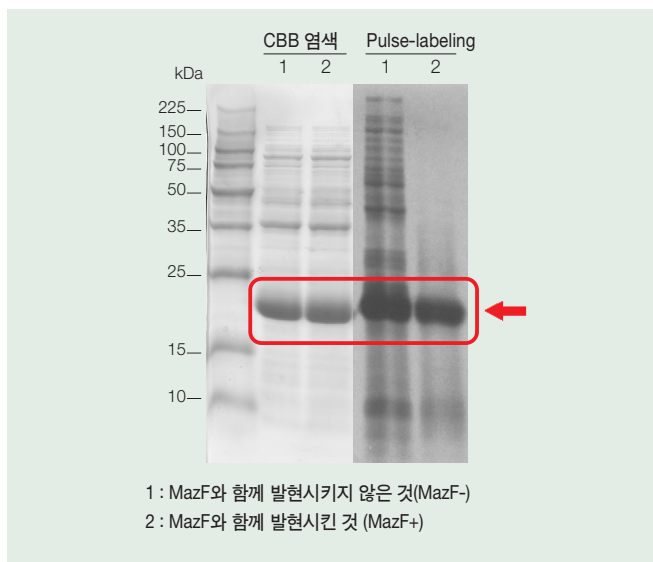
균을 모으고, 파쇄

↓

SDS-PAGE 등에 의한 목적 단백질 해석

발현시킨 것(MazF+)과 발현시키지 않은 것(MazF-)에서 발현예를 나타내었다.

Host에 대장균 BL21주를 사용하여 protocol에 따라 M9 glucose 배지를 사용하여 배양, 발현유도, pulse-labeling을 하였다. 일정량의 배양액을 시료로 하여 SDS-PAGE를 하였다. envZB의 발현량은 MazF+와 MazF-에서 동등하게 나타났다(그림 1). 반면 envZB 이외의 표식 단백질의 발현량은 MazF-에 비해 MazF+에서 크게 감소하였고(그림 1 pulse-labeling), MazF 단백질의 발현에 따라 host 유래의 새로운 단백질의 발현이 억제되고 있는 것을 알 수 있다.



1 : MazF와 함께 발현시키지 않은 것(MazF-)
2 : MazF와 함께 발현시킨 것(MazF+)

그림 1 envZB 단백질의 발현(균체 가용성 단백질의 CBB 염색 및 pulse-labeling)

실험예 1 : Positive control envZB DNA의 발현 및 pulse-labeling 실험

Positive control pCold™ I (SP-4) envZB DNA를 사용하여 MazF와 함께

실험예 2 : Thioredoxin의 발현 및 pulse-labeling 실험

SPP System™용 cold shock 발현 벡터 pCold™ I (SP-4)~pCold™ IV(SP-4) DNA를 사용하여 MazF와 함께 발현시킨 것(MazF+)와 발현시키지 않은 것(MazF-)에서 thioredoxin 발현예를 나타내었다.

Host에 대장균 BL21주를 사용하여 protocol에 따라 M9 glucose 배지를 사용하여 배양, 발현유도, pulse-labeling을 하였다. 일정량의 배양액을 시료로 하여 SDS-PAGE를 하였다. 어떤 SPP System™용 cold shock 발현 벡터를 사용해도 thioredoxin 발현량은 MazF+와 MazF-에서 동일하였다(그림 2). 반면 thioredoxin 이외의 표식 단백질 발현량은 MazF-에 비해 MazF+에서 크게 감소하였다.

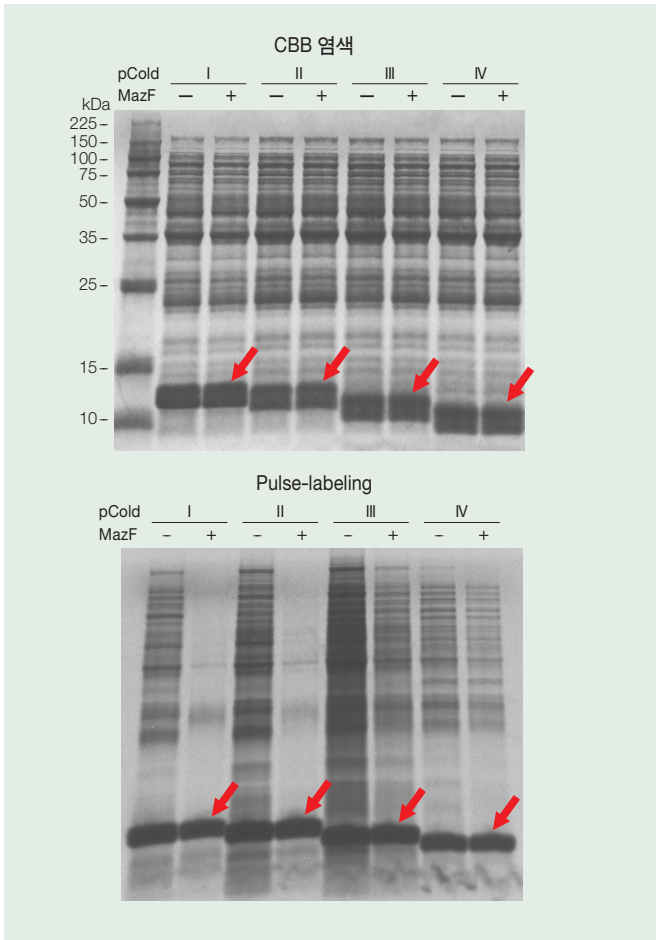


그림 2 Thioredoxin의 발현

실험예 3 : Eotaxin의 유도발현의 시간에 따른 변화

MazF와 함께 발현한 것(MazF+)와 발현하지 않은 것(MazF-)에서 eotaxin의 시간에 따른 발현 변화를 pulse-labeling하여 실험한 예를 나타내었다. SPP System™용 cold shock 발현 벡터는 pCold™ I (SP-4) DNA를, host는 대장균 BL21을 사용하여 protocol에 따라 M9 glucose 배지를 사용하여 배양, 발현유도를 한 후, 각 시간마다 sampling한 균체를 각각 pulse-labeling 하였다. 일정량의 배양액을 시료로 하여 SDS-PAGE를 하였다. Eotaxin 이외의 표식 단백질은 MazF-에 비해 MazF+에서 크게 감소하였다. Eotaxin의 발현량이 유지된 상태에서 그 이외의 표식 단백질 발현량이 감소한 상태가 발현유도 후 72 시간까지 지속되었다(그림 3).

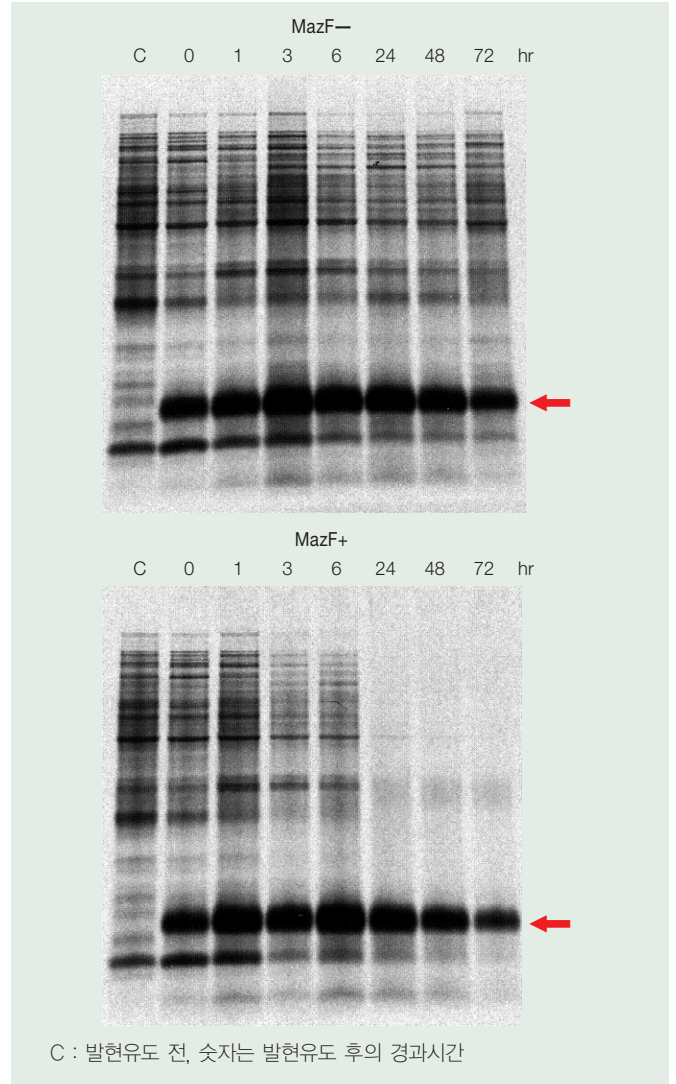


그림 3 Eotaxin의 발현(pulse-labeling)

【참고문헌】

- 1) Suzuki, M. *et al*: Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase.(2005) *Mol. Cell*, **18**, 253-261.
- 2) Zhang, Y. *et al*: Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase.(2004) *J. Biol. Chem.*, **280**, 3143-3150.
- 3) Zhang, Y. *et al*: MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. (2003) *Molecular cell*, **12**, 913-923.
- 4) Qing, G. *et al*: Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*.(2004) *Nature biotechnology*, **22**, 877-882.
- 5) D. M. Glover, B. D. Hames 공동역음, -기본기술- 제1장 대장균 형질전환기술(1997) 「DNA cloning 1」, 가토 이쿠노신(加藤郁之進) 번역, p.1-35.

관련 제품

· pCold™ 벡터 시리즈	3360~3364
· TaKaRa competent cell BL21 (100 μl x 10개)	9126
· IPTG(5 g)	9030
[His tag 정제 Kit]	
· TALON purification Kit (1 Kit)	635515
	(Clontech 제품)