

# Baculovirus를 이용한 단백질 발현

## BacPAK™ Baculovirus Expression System

- ▶ 생물학적 활성을 지닌 단백질을 높은 효율로 발현
- ▶ 특별히 제작된 BacPAK6 DNA로 100%에 가까운 재조합 효율
- ▶ 곤충세포를 이용한 간단한 실험
- ▶ Plaque assay로 인한 시간 소모없이 빠르게 baculovirus titration 가능
- ▶ Polyhistidine-tagged 재조합 단백질은 TALON® resin을 이용하여 간단히 정제
- ▶ 유전자로부터 단백질 정제까지 2주안에 해결!

Baculoviral expression system은 곤충 숙주세포로부터 다량의 재조합 단백질을 생산하기 위해 널리 사용되고 있다. 이러한 시스템은 크기, complexity, posttranslational processing 등으로 인해 세균안에서 발현하기 어려운 단백질에 특히 적합하다. 곤충세포에서 발현된 단백질은 유사한 posttranslational processing 과정으로 인해, 포유세포에서 일반적으로 발현되는 단백질과 거의 동등한 생물학적 활성 및 면역학적 반응성을 가진다. Baculovirus system의 또다른 장점은 cell line 구축 없이, 큰 단백질 또는 분비 단백질을 포함한 여러 단백질을 동시에 발현시킬 수 있다. 뿐만 아니라 baculovirus 유전자가 포유류 세포에 활성을 가지지 않으므로 바이러스 증폭이 불가능하고 complement system에 의해 빠르게 불활성화 되므로 사용이 안전하다.

Clontech의 BacPAK Baculovirus Expression System은 1~500 mg/liter 수준으로 목적 단백질을 발현시키는데 사용한다. 본 시스템은 재조합 단백질의 효과적인 발현을 위한 모든 것을 제공한다. Clontech에서는 발현, 분석, 정제 등의 BacPAK 시스템을 위한 다양한 기술을 제공한다. 따라서 BacPAK system의 모든 것을 한번에 이용할 수 있고, 또는 원하는 것에 맞춰 각각의 구성요소를 조합시켜 선택할 수도 있다(빠르고 정확한 cloning을 위한 In-Fusion™ 기술; 단백질 발현을 위한 BacPAK Baculovirus system; Clontech의 TALON resin을 이용한 6xHN tag 단백질 정제). Clontech의 baculovirus와 단백질 발현 관련 제품을 사용하기 위한 protocol에 대해 간략하게 기술하였다.

### 단계 1: Transfer vector에 목적유전자를 클로닝 (1~3일소요)

재조합 baculovirus 생산을 위해 첫번째 transfer vector의 multiple cloning site (MCS)에 목적유전자를 클로닝한다. Clontech의 BacPAK expression system은 목적유전자의 클로닝에 사용할 수 있는 transfer vector를 포함하고 있다. 다른 방법으로는 Clontech의 In-Fusion Ready BacPAK Vectors를 이용하면 첫번째 클로닝 과정을 생략할 수 있다(1; 그림 1). In-Fusion Ready Vectors는 선형화되어 있는 vector로 바로 사용할 수 있다(제한효소 처리, phosphatase 처리 또는 gel purification 필요 없음). 같은 PCR 산물을 이용하여 두개의 prelinearized vector에 N- 또는 C- 말단에 6xHN tag를 포함하는 목적유전자를 클로닝할 수 있다. Histidine-rich 6xHN tag는 immobilized metal chromatography (IMAC)를 이용하여 편리하게 단백질을 정제할 수 있으며, Clontech의 TALON resin을 추천한다.

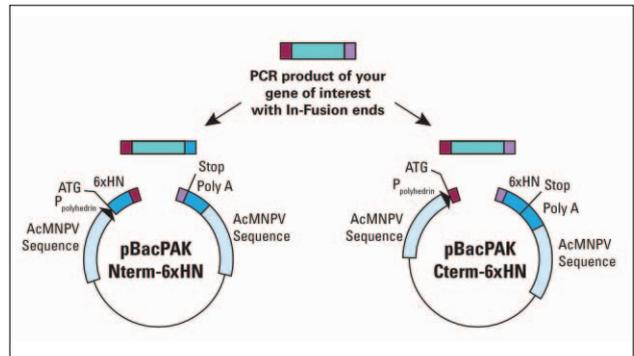


그림 1. Simplify recombinant baculovirus production with the In-Fusion Ready BacPAK Vector Set. Insert your gene of interest into the transfer vector, then transform into *E. coli*.

### 단계 2 : 목적유전자를 발현하는 재조합 baculovirus 제작(3~4일 소요)

Transfer vector와 선형의 BacPAK6 baculoviral DNA를 Sf21 곤충세포에 cotransfection함으로써 목적유전자를 발현하는 baculovirus를 제작한다. 세포는 CO<sub>2</sub>를 필요로 하지 않고 trypsin 처리없이 monolayer에서 부유 배양으로 쉽게 전환되므로 다루기 편리하다. 적정 생장온도인 27 °C에서 세포는 단지 20~24시간만에 doubling 된다. 일단 곤충세포가 준비되고 목적유전자가 BacPAK transfer vector에 클로닝되면 (단계 1), plasmid와 선형의 BacPAK6 Viral DNA를 곤충세포에 cotransfection하여 재조합 baculovirus를 만든다(그림 2).

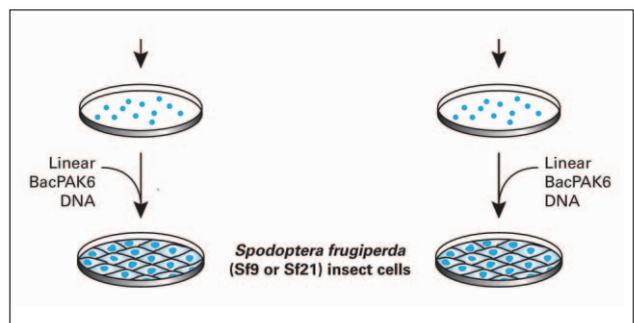


그림 2. Cotransfect pBacPAK plasmid (from 단계 1) and BacPAK6 linear DNA into Sf21 Insect Cells.

### 단계 3 : 바이러스 회수 및 증폭 (3~4일 소요)

일반적으로 96~99%의 재조합 효율을 보이므로, plaque 정제 필요없이 단백질 생산을 위해 바이러스를 증폭할 수 있다. 간단하게 형질전환된 세포로부터 배지를 회수하여 (단계 2) 3~4일간 재조합 바이러스를 증폭하기 위해 새로운 세포를 소량의 상등액에 첨가한다. 높은 titer의 stock 생산으로 단백질 발현본식 또는 재조합 단백질 생산을 위한 곤충세포 배양에 사용될 수 있다.

**단계 4 : 바이러스 titer 측정 (1~2일 소요)**

바이러스 stock의 titer를 확인함으로써 재조합단백질 생산을 극대화시킬 수 있다. Clontech에서는 기존의 titering 방법에 소요되었던 시간을 획기적으로 줄일 수 있는 새로운 titering 방법을 개발하였다. Clontech의 **BaculoELISA**와 **BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kits**를 이용하여 각각 24시간 또는 48시간 만에 감염을 위한 바이러스 활성과 바이러스 유래 단백질 발현을 측정할 수 있다.

**단계 5 : 유전자 발현 확인 (2~3일 소요)**

목적단백질을 대량으로 발현하기 전에 재조합 바이러스로부터 유전자 발현을 분석하고, 단백질 발현 과정의 시간경과 추이를 결정하기 위해 소규모 실험을 권장한다. 대부분의 단백질이 2~3일안에 최대 발현량을 나타낸다. 단백질 발현은 Western blotting이나 polyhistidine-tag antibody를 이용하여 확인할 수 있다. Clontech의 **Universal His Western Blot Kit 2.0** (그림 3)은 다양한 polyhistidine tag과 결합하는 TALON에 기초한 검출시약으로 0.5ng의 정제된 단백질도 검출할 수 있다(단계 7).

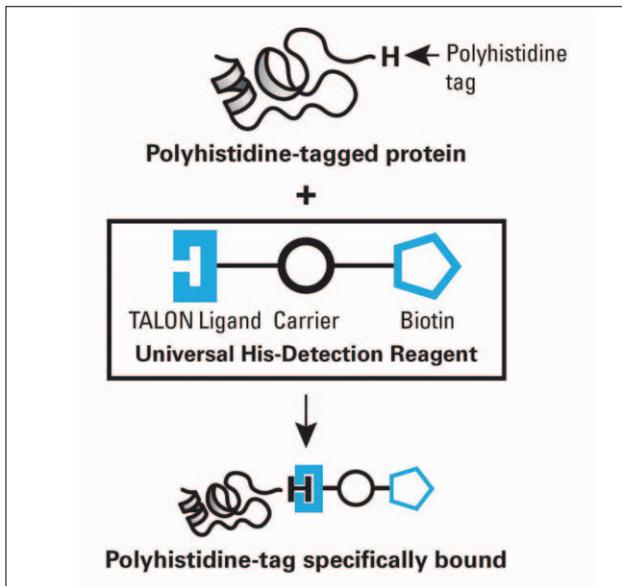


그림 3. Analyze expression of your protein of interest with the Universal His Western Blot Kit 2.0.

**단계 6 : 목적단백질의 대량 발현**

단계 5에서 결정된 최적 조건을 이용하여 단백질 발현량을 늘린다. 단계 4에서 결정된 최적화 감염 multiplicity를 사용하면 다량의 바이러스로 인한 반복 감염없이 모든 세포에서 동시에 감염이 일어날 것이다. 적절한 시간에 세포를 회수하여 원심분리하고 pellet을 얼린다. 단백질 정제를 위해 다음단계로 넘어 간다.

**단계 7: 목적 단백질의 정제 (1시간 소요)**

**TALON<sup>®</sup> Single Step Columns**으로 polyhistidine-tagged 단백질을 간단하게 정제한다(그림4). 본 컬럼은 초기 정제단계(세포 용해, 원심분리, resin 결합)를 간단히 하기 위해 기존의 TALON resin에 **TALON x Tractor Buffer**가 포함되어 있다. 따라서 전체 단백질 정제과정을 1시간안에 끝낼 수 있다.

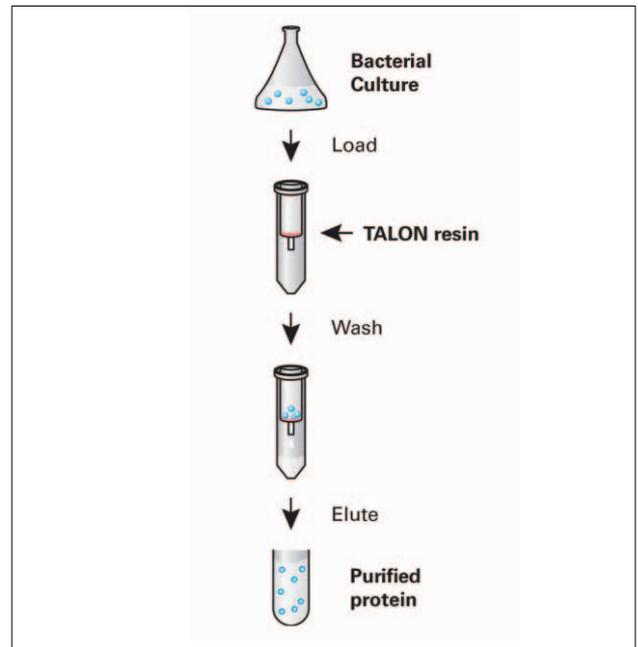


그림 4. Extract and purify your target proteins in one step with TALON Single-Step Columns.

**■ 관련제품**

제품명	Size	TaKaRa Code
BacPAK Baculovirus Expression System	each	631402
In-Fusion Ready BacPAK Vector Set	3 vectors	631410
In-Fusion 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit	8 rxns	639609
BacPAK6 DNA (Bsu36 I digest)	5 trnsfxns	631401
IPLB-Sf21 Insect Cells	1 vial	631411
BacPAK Complete Medium	1 L	631403
BacPAK Grace' s Basic Medium	500 ml	631404
BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit	each	631406
BaculoELISA Titer Kit	each	631412
Universal His Western Blot Kit 2.0	each	635642
TALON Single Step Columns (5 ml)	25 columns	635628
TALON Single Step Columns (20 ml)	10 columns	635632

**참고문헌**

1. In-Fusion<sup>™</sup> Ready BacPAK Vector Set (July 2006) Clontechiques **XXI** (2):18-19.
2. BaculoELISA Titer Kit (April 2007) Clontechiques **XXII** (2):8-9.

※ License Notice : [32, 33]