

Matchmaker™ Gold system 질문과 답변

■ Yeast Two-Hybrid Systems의 개념

Q1. Two-hybrid의 배경은 무엇입니까?

A1. Yeast two-hybrid 기술 (Y2H)는 주로 새로운 protein-protein interaction을 찾기 위해 사용되고 있습니다. 1989년 Fields and Song¹에 의해 발명된 이후, 최근까지 28,000 건 이상의 논문에서 거의 모든 생물학적 pathway 내의 interaction을 발견하는데 인용되고 있습니다.

Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (TaKaRa Code 630489)에서 목적 protein (“bait” protein ; 알고 있는 단백질로 직접 cloning)은 Yeast GAL4 protein의 DNA-binding domain (DNA-BD)과 융합되어 발현 후, 스스로 transcription을 활성화할 수 없으나 4개의 reporter 유전자의 상류에 위치한 GAL4-responsive promoter에 결합할 수 있습니다. 한편, 목적 protein (“bait” protein)과 상호작용 하는 partner protein (“prey” protein ; 미지의 단백질로 library 형태로 제공)은 Yeast GAL4의 transcriptional activation domain (AD)에 융합하여 transcription을 활성화시키는 역할을 합니다. 따라서 Prey protein이 bait protein과 상호작용할 때 GAL4 promotor의 activity가 회복되어 하나 또는 그 이상의 reporter protein이 활성화됩니다.

1. Fields, S. and Song, O. (1989) *Nature* 340(6230):245-247.

Q2. 왜 yeast를 사용합니까?

A2. Yeast는 살아있는 진핵세포 시스템으로 원핵세포인 박테리아만큼 사용이 쉽고 간편합니다. 이 기술이 일반화된 이후로 *S. cerevisiae*가 two-hybrid 숙주로 선호되는 여러 가지 중요한 이유가 있습니다. Yeast에서 발현된 protein은 3차 구조를 형성하고, neutral internal pH를 제공하며, disulfide bond와 일반적인 다른 진핵세포에서 일어나는 post-translational modification을 진행하기 때문입니다. 이러한 특징은 원래의 protein구조를 유지하고 protein-protein interaction을 촉진하는 매우 중요한 기능을 합니다. 추가적으로, yeast는 매우 쉽게 다룰 수 있고 genome 서열이 완벽하게 해석되어 있습니다. 또한, homologous recombination을 통해 yeast 내에서 직접 그리고 매우 쉽게 library를 구축할 수 있습니다. Mammalian two-hybrid system은 yeast two-hybrid 결과를 확인하는데 매우 이상적이지만, 다루기가 쉽지 않고 background가 높기 때문에 library를 선별하는 데는 유용하지 않습니다.

Q3. False positives와 background growth사이의 차이점은 무엇입니까?

A3. Protein-protein interaction을 선별하기 위해 HIS3 nutritional reporter만을 사용하는 Yeast two-hybrid 시스템은 종종 많은 수의 (i) background colony와 (ii) false positive를 생성합니다.

Background colony들은 nutritional reporter가 일부 발현이 되었거나 또는, 너무나 뻣뻣하게 plating되었을 경우 나타납니다. 반면, false positives는 bait와 독립적으로, prey proteins이 reporters의 upstream 서열을 인식하여 결합

하기 때문에 발생합니다.

Aureobasidin A (TaKaRa Code 630466)은 새로운 yeast two-hybrid 항생제로 저항성이 없는 모든 세포를 매우 효과적으로 죽이는 효능과 안정성 때문에 Matchmaker gold 시스템에서는 background colony growth가 거의 불가능합니다.

추가적으로 Matchmaker™ Gold는 false positives를 감소시킵니다. 왜냐하면 독립적으로 결합한 prey protein이 3 개의 recognition sequences에 결합해야 하고 4 종류의 reporters가 활성화되어야 하기 때문입니다. Matchmaker™ Gold는 3 개의 다른 bait recognition sequence/promoter에 의해 4 개의 진짜 reporter가 조절되어지는 yeast two-hybrid 전용 system입니다.

Q4. 왜 실험에 사용하는 bait에 대하여 auto-activation 테스트를 해야 합니까?

A4. Bait가 eukaryotic transcription factor라면 prey protein과 interaction 없이도 스스로 yeast reporters를 활성화시킬 가능성이 있습니다.

Q5. Transmembrane protein도 bait가 될 수 있습니까?

A5. 가능합니다. 그러나 two-hybrid 시스템은 일반적으로 protein의 cytoplasmic domain 간의 interactions 조사는 한계가 있습니다. Matchmaker™ Gold reporter가 세포 핵 내에 위치하기 때문에 검출되기 위해서는 bait-prey interaction은 핵 내에서 발생해야만 합니다. Target protein이 정확하게 folding하고 핵에 위치하는 한 (모든 Matchmaker™ vector들은 bait와 prey protein에 핵 내 위치하도록 시그널을 준다.) library protein과의 interaction을 검출할 수 있습니다. 이것은 일반적으로 bait로 부터의 signal peptide와 transmembrane domain을 제거하는 것이 바람직합니다. Transmembrane proteins에 대한 two-hybrid interactions 관련 많은 자료들이 있으며 그 중 몇 개를 소개합니다.

- Hopkinson, S.B. & Jones, J. C. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**(1):277-286
- Traweger, A. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(12):10201-10208
- Tian, X. Y. *et al.* (2001) *Reproduction*, **121**(6):873-880
- Daniel, J. M. & Reynolds, A. B. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**(5):3614-3623.
- Rochdi, M. D. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**(18):18981-18989.

Q6. Yeast two-hybrid 분석할 수 있는 protein의 최대와 최소 size는 얼마입니까?

A6. 최소 8 amino acids² 부터 최대 750 amino acids³까지의 protein이 yeast two-hybrid로 성공적이었다고 보고 되고 있습니다.

- 2. Heery, D. M. *et al.* (1997) *Nature* **387**(6634):733-736.
- 3. Schaefer B. C., Ed. (1997) *Gene Cloning and Analysis: Current Innovations*, (Horizon Scientific Press), pp11-28.

Matchmaker™ Gold system 질문과 답변

■ Yeast 배양

Q7. YPDA와 YPD 배지의 차이는 무엇입니까?

A7. YPD (TaKaRa Code 630409)는 “Yeast Peptone Dextrose” 배지의 약자로 amino acids, salts, dextrose (glucose), 그리고 그외 yeast 생육을 빠르게 하는 영양 배지입니다. YPDA (TaKaRa Code 630464)는 YPD에서 120 mg/L adenine hemisulfate가 첨가된 배지로 ADE2 mutant allele를 가진 yeast strains이 pink 또는 red로 변하는 것을 방지합니다 (이하 참조). Clontech의 YPDA에는 adenine hemisulfate의 최종 농도가 표준 protocol에서 사용하는 농도 (40 mg/L)보다 3 배 더 높습니다. 만약 다른 sources의 배지를 사용하면 Matchmaker™ yeast strains은 pink 또는 red로 변할지도 모릅니다.

Q8. Matchmaker™ Gold에 사용되는 Aureobasidin A의 기능은 무엇입니까?

A8. Matchmaker™ Gold System은 Aureobasidin A (AbA)라는 *S. cerevisiae*에 대해 매우 강한 독성을 가진 항생제에 대하여 내성을 갖게 하는 매우 독특한 reporter로 AUR1-C 유전자를 지니고 있습니다. 매우 안정적인 antifungal depsipeptide에 대한 내성을 이용하면 선별 영양 배지만 사용할 때 필요했던 별도의 최적화 과정 없이도 간편하게 Y2H library screening에 이용할 수 있습니다.

Q9. Matchmaker™ System에서 blue/white screening 시 X- α -Gal 대신 X-Gal을 사용할 수 있습니까?

A9. 아니요. X-Gal과 X- α -Gal은 동일하지 않습니다. X-Gal은 *E. coli* 효소 β -galactosidase (*lacZ*)의 기질이지만 X- α -Gal은 yeast 효소 alpha-galactosidase (Mel1p)의 기질로 사용됩니다. X- α -Gal은 Matchmaker™ Gold System에서 blue/white colony Screening에 사용됩니다. Mel1p는 protein-protein interaction에 의해 MEL1 유전자를 활성화시키면 yeast에서 분비 됩니다.

Q10. 왜 때때로 YPD 배지에서 자란 yeast colony들이 pink 또는 red로 변하니까?

A10. Red 색소는 adenine이 적은 배지에서 자라면, ADE2 또는 ADE1 strains에서 축적된 purine 전구체 ADE2 mutants에 의해 발생합니다. Clontech은 이런 색소가 축적되는 것을 방지하기 위해 120 mg/L adenine hemisulfate가 들어간 배지인 YPDA에서 모든 yeast strains을 키울 것을 권장합니다. 이 색소는 특성이 잘 알려지지 않았지만, 몇몇 화학적 분석이 1967에 발표되기도 했습니다. 색소는 vacuole⁵에 축적되고 450-490 nm 파장에서 형광을 내는 것으로 보여집니다.

4. Smirnov, M. N. et al. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27(3):299-304.

5. Weisman, L. S. et al. (1987) *J. Cell. Biol.* 105(4):1539-1547.

Q11. Agar 배지 만드는 것을 실패합니다. 무엇이 원인일까요?

A11. Agar를 정확한 양 (20 g/L)를 넣었다고 추정할 때 과도한 autoclave와 낮은 pH 때문일 수 있습니다. 정제된 물이 산성인 경우, 121°C에서 15 분간 autoclave하기 전 minimal SD 배지는 pH5.8로 맞춰야 하고 YPDA는 pH6.5로 맞춰야 합니다.

■ Yeast Two-Hybrid Libraries

Q12. Mate & Plate™ library는 무엇입니까?

A12. Mate & Plate library (TaKaRa Code 630468 외 다수)는 MAT α haploid yeast (Y187)에 transform된 후 사전에 분주된 library입니다. Bait를 발현시키는데 사용하는 Y2HGold와 AH109의 yeast MAT α two-hybrid reporter strain과 함께 mating할 수 있습니다. Y2HGold bait를 SD/-Trp배지에서 하룻밤 동안 간단히 배양한 후, 다음날 library 중 1 개의 tube에서 잘 섞어 줍니다. 그런 다음 mating이 일어나도록 하룻밤 더 incubation하고 난 후, SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA에 diploid cell을 도말하여 Y2H interaction이 일어난 colony들을 선별합니다.

Q13. 판매되는 library가 없을 경우 스스로 원하는 library를 만들 수 있는 방법은 무엇입니까?

A13. Clontech에서는 Make Your Own “Mate & Plate™” Library System (TaKaRa Code 630490)을 적극 추천합니다. Yeast two-hybrid library를 만드는 이 보다 더 간단한 방법은 없으며 Mate & Plate™ 법이 screening하는 가장 쉬운 방법입니다.

Q14. 시료가 충분하지 않습니다만 원하는 library를 만들 수 있을 까요?

A14. 가능합니다. Make Your Own “Mate & Plate™” Library System (TaKaRa Code 630490)은 SMART 기술을 이용하여 cDNA를 합성하기 때문에 매우 소량의 시료라 하더라도 가능합니다. 예를들면, 초기 100 ng의 total RNA로도 library를 제작할 수 있습니다.

Q15. 기존 library가 Matchmaker™ Gold와 함께 사용할 수 있는지 어떻게 확인해야 합니까?

A15. Clontech에서는 다른 유래의 yeast two-hybrid library는 테스트하지 않았습니. 그러나 이론상으로는 prey (library) vector가 LEU2 marker로 선별되는 library라면 Matchmaker™ gold와 함께 할 수 있을 것으로 생각합니다.

* License Notice : [16, 17, 18]