

*	분류번호	III-9
---	------	-------

제 목	HIV-1 reverse transcriptase 및 protease의 유전자 cloning
연구자	최 관용
소 속	포항공과 대학 생명과학과
내 용	<p>(목 적)</p> <p>항 AIDS 약물의 약효 검색계를 위한 cell-free system의 대상 HIV-1의 계속적인 복제에 필요한 reverse transcriptase와 virus의 복제 과정 중 polyprotein을 자르는 protease의 유전자를 분리하여 분자클로닝을 시도하여 대량 생산하므로서 in vitro assay계에 활용하고자 이실험을 실시하였다.</p> <p>(방 법)</p> <p>Reverse transcriptase의 경우 pol gene coding region(2.9kb)을 제한 효소로 digestion하여 plasmid vector인 pKK233-3에 subcloning하여 이로부터 얻어지는 재조합 유전자를 이용하여 <u>E.coli</u> JM109를 transform 시킨 후 reverse transcriptase의 유전자의 발현을 유도하였다.</p> <p>Protease의 유전자의 발현을 <u>E.coli</u>에서 시도하기 위하여 강력한 promoter를 가진 여러 plasmid에 클로닝을 하였고, 이들 재조합 유전자를 여러 제한 효소를 이용하여 구조를 확인하였다. HIV-1 유전자 내부에 있는 pol gene과 env gene 일부를 자른 후 tac promoter를 가지고 있는 pMAL:cRI vector, T7 promoter를 갖고 있는 pT7-7 vector, Trp promoter를 갖고 있는 pTrp vector에 각각 subcloning을 하였다.</p> <p>(결 과)</p> <p>Reverse transcriptase가 유도되는 것을 SDS-PAGE 및 효소활성 분석으로 확인할 수 있었으며 효소의 정제를 위한 예비실험으로 ammonium sulfate 및 DEAE cellulose ion exchange chromatography를 시행하였을때 specific activity의 증가를 보여주므로서 reverse transcriptase의 분자클로닝 후 발현된 효소가 활성을 갖고 있음을 알 수 있었다.</p> <p>pMAL:cRI 재조합 유전자에 있는 protease의 유전자 발현을 유도했을때 <u>E.coli</u>세포의 성장에 toxic하게 작용함을 관찰할 수 있었다. 이는 발현된 protease가 <u>E.coli</u>의 번식에 영향을 주는 것으로 믿어지며 protease의 유전자 발현을 위한 host의 선택, inducer의 첨가시간 등 실험조건의 확립이 필요할 것으로 사료된다.</p>