

DsRed-Monomer 단백질과 형광이중표식에 최적, 밝은 Monomer 녹색 형광물질 Living Colors™ AcGFP1 Fluorescent Protein



- EGFP보다 밝은 Monomer 녹색 형광물질
- 융합단백질 tag로서 뛰어난
- 형광단백질로서의 기능성은 EGFP 단백질과 동등
- EGFP용 필터와 한체 사용 가능

Living Colors™ AcGFP1 Vectors는 기존의 유사 단백질과는 달리 녹색 형광단백질을 코드하고 있다. 이 vector는 목적 단백질과 융합하여 발현될 때 아주 우수한 성능을 보여준다. 또 flow cytometry나 형광현미경에서 multi-color에 최적이다.

AcGFP1 단백질은 jellyfish의 일종인 Aequorea coerulea에서 발견되어 많이 이용되고 있는 변이형 GRP 단백질(EGFP; 1)을 개선한 제품이다. AcGFP1 단백질은 EGFP 단백질과 아미노산 수준에서 94%의 homology를 갖고 있는 재조합 형광단백질로, human codon을 이용하기 위해 최적화된 open reading frame을 가지고 있다. 이러한 최적화를 통하여 AcGFP1 mRNA의 translation효율 상승은 곧 포유류 세포에서의 단백질 발현량의 향상으로 이어진다. 안정성이 뛰어난 AcGFP1 단백질은 아주 긴시간에 걸쳐 형광을 관찰할 수 있다. 발색은 빠른 시간내에 포화수준에 달하여 transfection 8~12시간 후에도 검출이 가능하다.

다른 Clontech Novel Fluorescent Proteins(NFPs)과 마찬가지로 보조인자나 효소기질 등의 필요없이 관찰할 수 있다²⁻⁴⁾.

AcGFP1 단백질은 목적으로 하는 단백질을 가시화하여 추적하기 위한 형광 tag로 이상적이다. 이 단백질은 지금까지 다양한 특성을 가진 수많은 단백질과 세포내 소기관과의 융합단백질 tag로서 사용되어 이미 그 유용성이 확인되고 있다. DsRed 단백질과 동시에 사용하여 세포내 소기관, 세포내 특정 위치를 가시화함으로써 2종류의 목적단백질을 동시에 multi-color표식에 최적이다(그림 1).

또한 AcGFP1 단백질은 세포내 특정 단백질의 추적 실험 등 세포를 사용한 다른 분석에서도 응용할 수 있다(그림 2). 또 목적 세포를 flow cytometry를 통해 쉽게 검출할 수 있다. NFPs 제품과 마찬가지로 AcGFP1 단백질은 포유류 세포에 독성이 적어 transfection을 통한 유전자 도입시 매우 안정적인 cell line를 만든다.

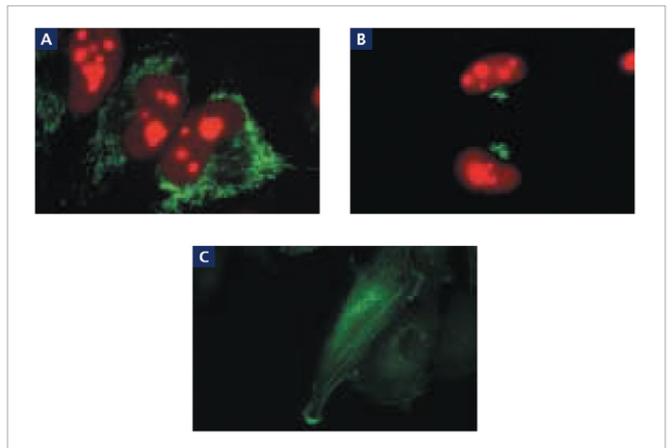


그림 1 Living Colors™ AcGFP1은 형광현미경이나 multi-color에 최적 AcGFP1 또는 DsRed2 단백질과의 융합단백질을 세포에 transfection 후 형광현미경으로 관찰하였다.

Panel A: HEK 293 cells에서 pAcGFP1-Mito(mitochondria)와 pDsRed2-Nuc(nucleus)
 Panel B: HEK 293 cells에서 pAcGFP1-Golgi(Golgi apparatus)와 pDsRed2-Nuc(nucleus)
 Panel C: HeLa cells에서 pAcGFP1-Actin(actin)

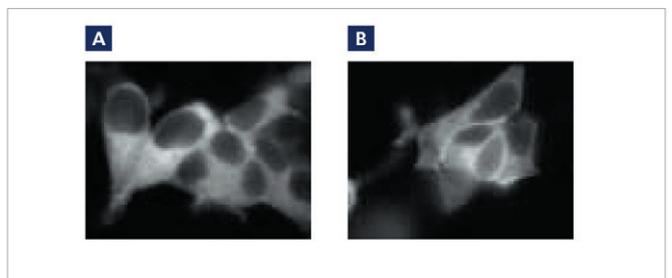


그림 2 Protein Kinase C α(PKC α)의 활성화를 Living Colors™ AcGFP1으로 모니터링할 수 있다.

Panel A: HEK293 cell에 PKCa와 AcGFP1과의 융합단백질을 코드하고 있는 plasmid를 stable transfection하였다.

Panel B: 같은 세포를 PMA 1.5 μg/ml에서 3분간 처리한 후 PKC α의 활성화를 유도하였다. PKC α와 AcGFP1과의 융합단백질이 세포질에서 세포막으로 이동하는 것이 확인되었다. 이 실험 결과는 기존에 보고된 PKC α의 이동 양상과 일치함을 확인할 수 있었다.

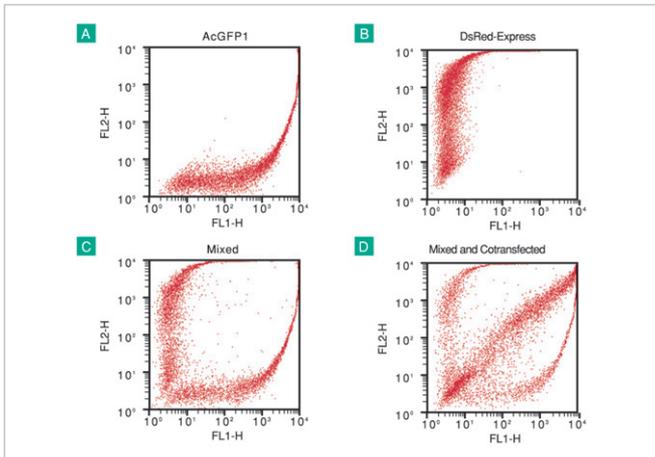


그림 3 표준 FACS로 AcGFP1을 발현한 세포의 검출
HEK293 세포에 construct를 transfection하고 24시간 후에 flow cytometry로 검출하였다.
Panel A, pAcGFP1만
Panel B, pDsRed-Express만
Panel C, 세포에 pAcGFP1 또는 pDsRed-Express를 transfection하였다. 2개의 세포를 분석 전에 혼합하였다.
Panel D, 세포에 pAcGFP1과 pDsRed-Express를 co-transfection하였다. 해석 전 Panel C의 혼합물이 첨가되었다. Co-transfection한 집단은 대각선을 따라 나타나고 있다.

전형적인 monomer

AcGFP1 단백질의 Monomer로 특성은 다음의 3가지 독립된 실험으로 확인하였다. 첫째, recombinant AcGFP1 단백질을 FPLC gel filtration chromatography법으로 분석한 결과 분자량 24 kDa에 해당하는 위치에 용출시킬 수 있었다(그림 4, Panel A). 또, sucrose density ultracentrifugation으로 분석한 결과 AcGFP1 단백질의 fractionation profile이 monomer임을 나타내고 있었고 EGFP와 거의 일치하고 있었다(그림 4, Panel B). 마지막으로 recombinant AcGFP1 단백질을 SDS-PAGE로 monomer EGFP 단백질과 다량체인 DsRed-Express 단백질 비교한 결과, AcGFP1 단백질이 monomer라는 사실을 보여주는 결과가 나왔다(그림 4, Panel C). 이상의 결과는 본 단백질의 아미노산 서열에 의한 이론값 26.9 kDa의 분자량과 거의 일치한다.

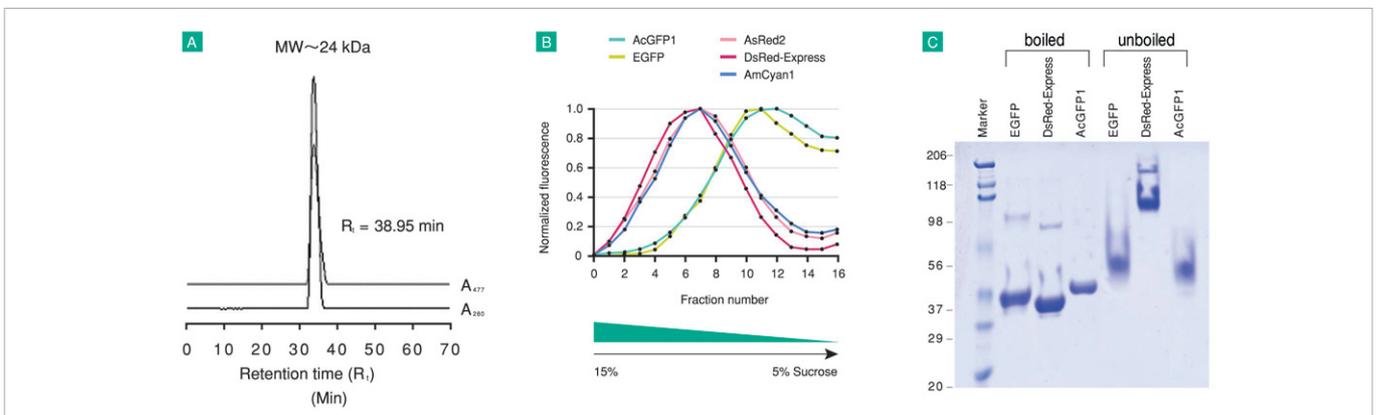


그림 4 AcGFP1은 Monomer 단백질
Panel A, Recombinant AcGFP1 단백질을 FPLC gel filtration chromatography로 분석하였다. 280nm에서 단백질의 흡광도(A280)와 477nm의 여기 흡광을 용출되는 분획에서 연속 측정하였다. AcGFP1 단백질은 분자량으로 24kDa위치에서 용출되었고, 단백질의 계산값은 26.9kDa이다.
Panel B, Recombinant AcGFP1 단백질을 sucrose density ultracentrifugation을 사용하여 분석하였고 AcGFP1 단백질의 fractionation profile은 EGFP와 거의 일치하였다.
Panel C, AcGFP1 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. Oligomer 형태를 취하는 단백질의 대부분은 전기 영동 전 열처리로 denaturation하지 않고 시료를 4℃에 보존하면 SDS-PAGE 중에도 그 상태를 그대로 유지한다. Boiled(denatured), unboiled (undenatured)조건 하에서 recombinant EGFP, DsRed-Express, AcGFP1 7.5 μg을 SDS-PAGE(12% acrylamide gel)에서 분석하였다. EGFP와 AcGFP1 단백질은 변성/비변성 조건에서 30 kDa 부근에서 단일 밴드로서 Monomer라는 사실을 확인할 수 있었다. 한편, 비변성조건에서의 DsRed-Express 단백질의 경우 변성조건과 비교하여 매우 커다란 분자량으로 전기영동되면서 oligomer 로 보이고 있다. EGFP와 AcGFP1 단백질은 변성/비변성 조건 모두 ~30kDa 위치에 단일 밴드로 나타났고 이로 Monomer라는 사실을 확인할 수 있었다.
* SDS-PAGE에서는 조금 고분자량 쪽으로 이동한다.

표 1 AcGFP1 protein의 특징

Protein	Excitation Max(nm)	Emission Max(nm)	Time to detection(hr)	Relative fluorescent intensity	Quaternary structure	Utility as a reporter	Utility in fusions	Extinction Coefficient(M ⁻¹ cm ⁻¹)	Quantum Yield
AcGFP1	475	505	8-12	Bright	Monomer	Good Excellent	Good Excellent	32,500	0.82
EGFP	484	510	8-12	Bright	Monomer	Good Excellent	Good Excellent	23,000	0.70
ZsGreen	493	505	8-12	Extremely Bright	Tetramer	Excellent Fair	Excellent Fair	43,000	0.91

EGFP용 필터와 항체 사용 가능

AcGFP1 단백질의 스펙트럼 특성은 최대 여기파장 475nm, 최대형광파장 505nm이다(표 1, 그림 5). 본 단백질은 EGFP 단백질과 비슷한 스펙트럼 특성과 형광강도를 가지고 있기 때문에 EGFP나 FITC용 필터로 검출이 가능하다. 또 Chroma Technology Corporation사에서 판매하는 표준 현미경필터도 적용 할 수 있다(표 2).

Full-Lenth A.v. Polyclonal 및 GFP Monoclonal antibody 등 당사의 풍부한 Living Colors™ Antibodies 제품을 이용하여 AcGFP1 단백질을 Western blot과 IP(immunoprecipitation)로 간단하게 검출할 수 있다(표 3).

다양한 vector 제공

Clontech은 다양한 AcGFP1 vector를 갖추고 있어 다른 용도에 적용 할 수 있다. Source vector나 reporter 분자(RES 2 서열 포함)로 목적 단백질과 N 단말, C 단말 부위에 선택적 융합하여 AcGFP1 단백질을 발현시키는 vector 등이 있다. Actin용 vector나 골지체용 vector 등 세포내 소기관이나 특정 위치를 표시하는 vector도 있다. Clontech의 AcGFP1 Acceptor vector를 사용하면 AcGFP1의 N 단말이나 C 단말 부위의 cloning이 가능하며 높은 범용성 Creator 시스템을 구축할 수 있다⁹⁾. Clontech는 다양한 용도에 사용할 수 있는 각종 vector를 제공하고 있다.

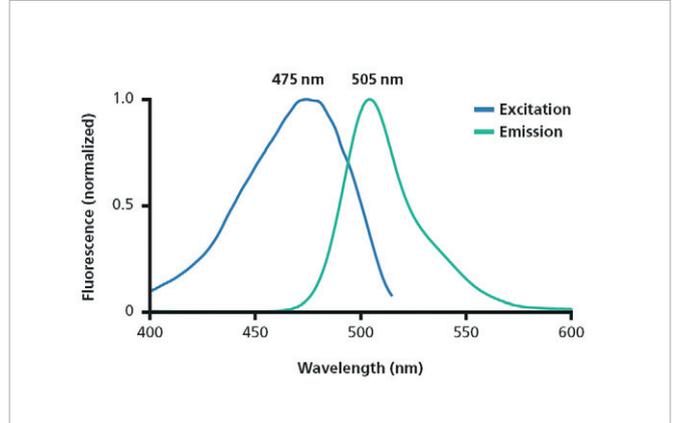


그림 5 AcGFP1의 emission 형광 스펙트럼

표 2 AcGFP1을 검출하기 위한 Filter set

Description	Features
EGFP/AcGFP1 Chroma No. 32000	Exciter D425/60x Dichroic 470DCXR Emitter D510/40m
EGFP/AcGFP1 Preferred Set Chroma No. 41017	Exciter HQ470/40x Dichroic Q495LP mitter HQ525/50m

표 3 AcGFP1 Antibody 리스트

Antibody name	Code	Antibody characteristics	Application	
			Western	IP
A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)	632380	Affinity-purified mouse monoclonal (IgG2a)	+++	Not determined
Full-Length A.v. Polyclonal Antibody	632359	Rabbit polyclonal serum, generated using full-length GFP protein	+++	+++
A.v. Peptide Antibody (Polyclonal) antibodies to GFP	632377	Rabbit polyclonal, mixture of three affinity-purified	++	++
GFP Monoclonal Antibody	632375	Affinity-purified mouse monoclonal	+++	Not determined

Product List

living Colors™ AcGFP1 Products

제품명		Size	Code
AcGFP Vector Set	 *	3 vectors	632426
pAcGFP1 Vector	 *	20 µg	632468
pAcGFP1-1 Vector	 *	20 µg	632497
pAcGFP1-Actin Vector	 *	20 µg	632453
pAcGFP1-C Actin Vector	 *	3 vectors	632486
pAcGFP1-C1 Vector	 *	20 µg	632470
pAcGFP1-C2 Vector	 *	20 µg	632481
pAcGFP1-C3 Vector	 *	20 µg	632482
pAcGFP1-Endo Vector	 *	20 µg	632490
pAcGFP1-Golgi Vector	 *	20 µg	632464
pAcGFP1-Hyg-N1 Vector	 *	20 µg	632489
pAcGFP1-Hyg-C1 Vector	 *	20 µg	632492
pAcGFP1-Mito Vector	 *	20 µg	632432
pAcGFP1-N Vector	 *	3 vectors	632485
pAcGFP1-N1 Vector	 *	20 µg	632469
pAcGFP1-N2 Vector	 *	20 µg	632483
pAcGFP1-N3 Vector	 *	20 µg	632484
pAcGFP1-Nuc Vector	 *	20 µg	632431
pAcGFP1-Tublin Vector	 *	20 µg	632488
pAcGFP1-Mem Vector	 *	20 µg	632491
pIRES2-AcGFP1 Vector	 *	20 µg	632435
pLP-AcGFP1-C Acceptor Vector	 *	20 µg	632471
pLPS-AcGFP1-N Acceptor Vector	 *	20 µg	632472

*영리목적으로 사용할 경우, 구매 전 별도의 라이선스 계약이 필요합니다.

 표기가 있는 제품은 구매 전 별도의 license 동의서가 필요합니다.

[References]

1. Gurskaya, N. G. *et. al.*, (2003) *Biochem. J.* **373**:403-408.
2. Reef Coral Fluorescent Protein Vectors (July 2003) *Clontechniques XVIII*(3):6-7.
3. Matz, M. V., *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* **17**:969-973. Erratum in: *Nature Biotechnol.* (1999) **17**:1227.
4. BD Living Colors™ DsRed-Express (July 2003) *Clontechniques XVII*(3):16.
5. Creator™ System Overview (October 2001) *Clontechniques XVI*(4):5-6.

관련제품

- A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)(Cat. Nos. 632380 & 632381)
- Full-Length A.v. Polyclonal Antibody(Cat. Nos. 632359 & 632360)
- GFP Monoclonal Antibody(Cat. No. 632375)
- A.v. Peptide Antibody (Polyclonal)(Cat. Nos. 632377 & 632376)

Living Colors™ Protein License Program

AcGFP1은 당사의 license program을 통하여 영리 목적으로 사용할 수 있는 제품입니다. 이 프로그램에는 AcGFP, DsRed, HcRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, ZsYellow와 variants가 포함됩니다. 보다 자세한 문의는 당사 연구 지원사업부(031-739-3320)으로 문의하시기 바랍니다.