

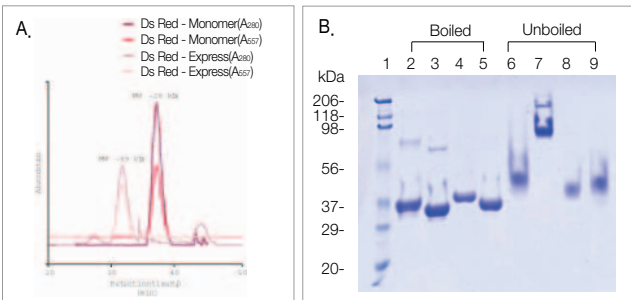
Living Color® DsRed-Monomer Fluorescent Protein

살아있는 세포의 단백질 연구를 위한 최고의 red fusion tag

- Fusion tag 적용에 최적
- Fusion protein에 다양하게 적용가능
- AcGFP1 green monomer와 dual labeling에 최적

DsRed-Monomer Fluorescent Protein은 *Discosoma masp.* reef coral 유래의 가장 최근에 만들어진 red fluorescent protein의 mutant 타입이다. DsRed-Monomer는 flow cytometry와 fluorescence microscopy를 이용한 multicolor detection에 최적이다. 종전의 DsRed protein은 tetramer 구조 때문에 fusion tag로 사용하기에는 한계가 있었다. 이러한 이유 때문에 개발된 것이 45개 amino-acid를 치환시킨 DsRed의 monomer version으로, DeRed-Express와 유사한 spectral property를 갖는다. DsRed-Monomer는 매우 안정하며, 종래 제품의 형광유지 시간보다 길게 형광을 유지한다. Chromophore(발색단)는 빠른 시간내에 최고 감도에 도달하기 때문에, transfection 후 12시간 이내에 관찰할 수 있다.

DsRed-Monomer를 fusion tag로 이용하여 다양한 기능을 가진 단백질과 subcellular location 등 다양한 역할을 규명할 수 있다. DsRed-Monomer는 mammalian cell과 적합성이 뛰어나고, 안정적인 transfection이 가능하여 clonal cell line을 만드는데 유용하게 사용되고 있다. 다른 모든 Living Color Fluorescent Protein과 같이 DsRed-Monomer도 다른 cofactor나 기질을 첨가하지 않고 관찰가능하기 때문에 살아있는 세포를 이용하여 여러 가지의 생물 반응을 밝혀낼 수 있는 noninvasive tool로 사용할 수 있다 (1-3).



Lane1: Marker, Lane2 : EGFP, Lane3 : DsRed-Express, Lane4:DsRed-Monomer, Lane5 : AcGFP1, Lane6 : EGFP, Lane7: DsRed-Express, Lane8: DsRed-Monomer, Lane9 : AcGFP1

그림 1. Living Colors DsRed-Monomer is a monomeric protein. Panel A. Recombinant DsRed-Express and DsRed-Monomer (100 μ g) were analyzed by FPLC gel filtration chromatography. Overall absorption (A280) and chromophore excitation (A557) of the eluted material were monitored simultaneously. DsRed-Monomer elutes from the column at a retention time (39 min) corresponding to a molecular weight of 28 kDa. The calculated molecular weight of DsRed-Monomer is 26.8 kDa. DsRed-Express is a tetrameric protein that elutes at an earlier retention time (33 min) corresponding to a molecular weight of 89 kDa. Panel B. Pseudonative gel analysis of proteins. The oligomeric structures of proteins are preserved during SDS PAGE analysis if samples are kept at 4 °C and not boiled prior to loading on a gel. Boiled and unboiled recombinant proteins (7.5 μ g) were separated by SDS PAGE electrophoresis (12% acrylamide). In both the boiled (denatured) and unboiled (undenatured) samples, DsRed-Monomer and EGFP run as uniform bands of ~30 kDa due to their monomeric structures. The unboiled (undenatured) DsRed-Express runs at a much higher molecular weight than its boiled (denatured) counterpart due to its tetrameric structure.

True monomer

DsRed-Monomer protein의 monomeric한 성질은 여러 가지 방법에 의해 확인되었다. FPLC gel filtration chromatography를 이용해 recombinant DsRed-Monomer를 분리한 결과 28 kDa molecular weight에서 하나의 peak를 얻을 수 있었다(그림 1. Panel A). Elution profile에서도 더 높은 분자량을 가진 molecule은 보이지 않았으므로, DsRed-Monomer protein이 확실한 monomer임을 입증하였다. Recombinant DsRed-Express protein은 tetrameric structure를 가지고 있기 때문에 DsRed-Monomer보다 빨리 elution 된다. DsRed-Monomer는 pseudonative gel electrophoresis 결과에서도 monomeric protein의 성질을 유지하고 있으며, enhanced green fluorescent protein(EGFP)과 AcGFP1 protein과 같은 monomeric structure의 패턴을 갖고 있는 것으로 확인되었다 (그림 1. Panel B). 따라서, DsRed-Monomer는 amino acid sequence의 서열을 이용한 계산값인 26.8 kDa의 분자량을 가진 monomeric protein임을 알 수 있다.

Protein	Excitation Max(nm)	Emission Max(nm)	Time to Detection (hr)	Relative Fluorescent Intensity	Quarternary Structure	Utility as a Reporter	Utility in Fusions
DsRed Monomer	556	586	12	Bright Fair	Monomer	Excellent	
DsRed Express	557	579	8-12	Extremely Bright	Tetramer	Excellent	Fair
DsRed2	563	582	24	Extremely Bright	Tetramer	Good	Fair

표 1. Spectral properties of DsRed proteins

Spectral properties

DsRed-Monomer의 특성 중 가장 중요한 것은 DsRed variant와 유사한 spectral property를 유지하는 것이다. 그 중 특히 DsRed-Express의 spectral properties와 유사하게 만들어졌다. DsRed-Monomer는 556 nm의 excitation maximum 파장과 586 nm의 emission maximum 파장을 가지고 있다 (표 1 & 그림 2). Spectral profile이 DsRed fluorescent protein variant와 유사하기 때문에, DsRed-Monomer는 standard existing filter set 혹은 Chroma Technology 사의 optimized custom-tailored를 이용하여 관찰 가능하다 (표 2).

DsRed-Monomer는 DsRed-Express보다 감도는 떨어지지만, flow cytometry와 fluorescence microscopy imaging에는 최적이다(그림 3~5). 또한 다른 red fluorescent protein보다 DsRed-Monomer는 다른 fluorescent protein과 multiplex로 분석하고자 할 때 최적의 protein이다.

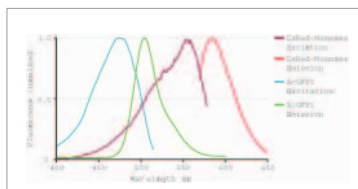


그림 2. Fluorescence excitation and emission spectra of DsRed-Monomer and AcGFP1

Description	Features
DsRed-Monomer/DsRed2/DsRed-Express Chroma No. 41002c	Exciter HQ545/30x Dichroic Q570LP Emitter HQ620/60m
DsRed-Monomer/DsRed2/DsRed-Express Chroma No. 42005	Exciter HQ540/40x Dichroic Q570LP Emitter HQ600/50m

표 2. Filter sets for DsRed-Monomer detection

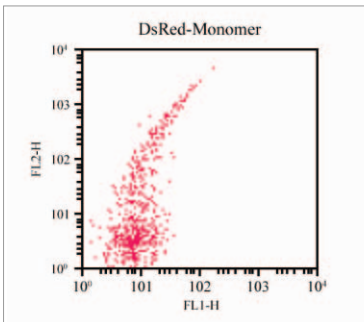


그림 3. Cells expressing DsRed-Monomer are easily detected by standard BD FACS™ analysis. HEK 293 cells were transfected with pDsRed-Monomer-N1 and analyzed using the 568 nm laser line of the BD FACSVantage™ SE Flow Cytometry System 24 hr post-transfection.

■ Excellent as a fusion tag

Target protein을 fluorescent protein으로 tagging할 때 가장 중요한 것은 fluorescent tag이 target protein의 기능에는 관여하지 않아야 한다는 것이다. 만약 fluorescent protein이 oligomer를 형성하는 성질이 강하다면, target protein의 원래 기능은 변할 수 있다. DsRed-Monomer는 monomer 구조를 가지고 있기 때문에 red fluorescent fusion tag로 사용하기는 최적의 조건이다. Mammalian cell에서 발현시킬 때, 이 protein은 매우 soluble 하며, 한 곳으로 뭉치지 않고 cytosol 내에 고루 분포한다(그림 4.)

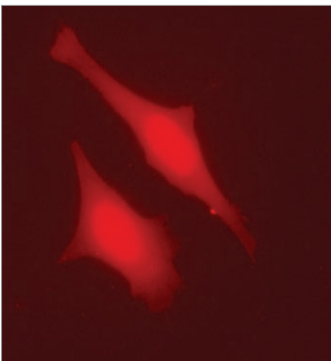


그림 4. DsRed-Monomer is soluble when expressed in mammalian cells, HeLa cells were transfected with pDsRed-Monomer-N1 and fixed in 4% paraformaldehyde 24 hr post-transfection, DsRed-Monomer displays an even, consistent, and homogeneous distribution.

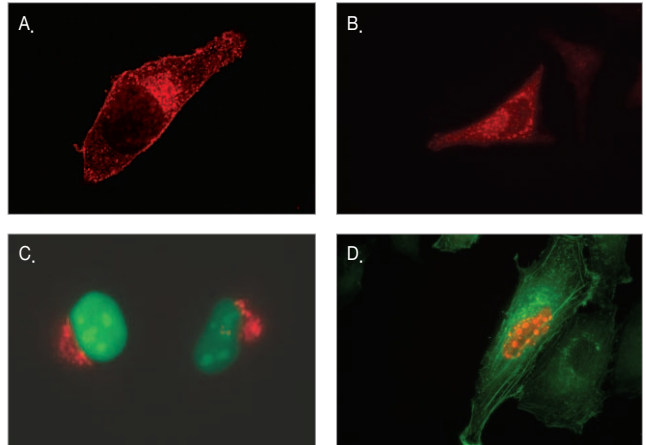


그림 5. DsRed-Monomer performs well in protein fusions and multicolor applications. Various DsRed-Monomer fusions were transiently transfected in HeLa cells and visualized by fluorescence microscopy. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde 24 hr post-transfection. Panel A, DsRed-Monomer-Caveolin fusion, Panel B, DsRed-Monomer-Rab5 GDP/GTP GTPase exchange factor homologue fusion, Panel C, DsRed-Monomer-Golgi (trans Golgi stack) and AcGFP1-Nuc (nucleus), Panel D, DsRed-Monomer-Lamin B fusion and AcGFP1-Actin

Reference

1. Reef Coral Fluorescent Protein Vectors(July 2003) Clontechiques XVIII(3):6-7.
2. Matz, M. V., et al. (1999) Nature Biotechnol, 17:969-973, Erratum in: Nature Biotechnol, (1999) 17:1227.
3. Living Colors™ DsRed-Express(July 2003) Clontechiques XVII(3):16.
4. Living Colors™ DsRed Polyclonal Antibody (Jan 2003) Clontechiques XVIII(1):11.

■ Product list

Living Colors® DsRed-Monomer	Products Size	Cat. No.
pDsRed-Monomer Vector	20 µg	632467
pDsRed-Monomer-N1 Vector	20 µg	632465
pDsRed-Monomer-C1 Vector	20 µg	632466
pDsRed-Monomer-Actin Vector	20 µg	632479
pDsRed-Monomer-Golgi Vector	20 µg	632480
pDsRed-Monomer-F Vector	20 µg	632493
pDsRed-Monomer-Hyg-N1 Vector	20 µg	632494
pDsRed-Monomer-Hyg-C1 Vector	20 µg	632495
pDsRed-Monomer-N In-Fusion Ready Vector	1 µg	632498
pDsRed-Monomer-C In-Fusion Ready Vector	1 µg	632499
pRetroQ-DsRed Monomer-N1 Vector	20 µg	632507
pRetroQ-DsRed Monomer-C1 Vector	20 µg	632508
pDsRed-Monomer-Mem Vector	20 µg	632512
pDsRed-Monomer-Mem Hyg Vector	20 µg	632513
pDsRed-Monomer-F Hyg Vector	20 µg	632514
rDsRed-Monomer Protein	100 µg	632503