

살아있는 세포의 단백질 연구에 최적인 Red Fusion Tag Living Colors® DsRed-Monomer Fluorescent Protein



- Fusion Tag 응용에 이상적
- 다양한 종류의 단백질과 융합 검증
- AcGFP1 green Monomer와 dual labeling에 최적

Living Colors® DsRed-Monomer(이하 DsRed-Monomer 또는 Monomer DsRed)는 *Discosoma sp.* reef coral 유래의 적색 형광단백질을 유전자 재조합 기술로 변형시킨 새로운 형광단백질이다. DsRed-Monomer는 flow cytometry 또는 형광현미경을 사용한 multi-color 응용에 최적이다. 초기에 개발된 DsRed 단백질은 단백질끼리 tetramer를 형성하기 때문에 fusion tag로 이용하는데 있어 한계가 있었다. 이에, 45 amino acid를 치환하고 DsRed-Express 단백질과 유사한 특성을 갖는 새로운 monomer 형태의 DsRed-Monomer를 개발하였다. DsRed-Monomer는 매우 안정적이어서 긴 시간 동안 형광을 관찰할 수 있다. 또한, 형광 발현이 단시간에 최대강도에 도달하기 때문에 transfection 후 12시간 내에도 검출이 가능하다. DsRed-Monomer를 fusion tag로 사용하는 것은 여러 기능을 갖거나 다양한 subcellular 위치를 갖는 여러 종류의 단백질에서 검증되었다. DsRed-Monomer는 포유류 세포와 적합성이 좋아, transfection 결과 안정된 cell line을 얻을 수 있다. 다른 Living Color® Fluorescent Proteins과 마찬가지로 외부에서 특별한 보조인자나 효소기질의 추가 없이도 세포내 검출이 가능하고, 이는 살아있는 세포내에서 다양한 생물 반응을 연구하는 비침습적 방법으로 매우 유용한 수단이 되고 있다.

True Monomer

DsRed-Monomer 단백질이 monomer로서 작용한다는 것은 여러 실험에서 확인되고 있다. 재조합 DsRed-Monomer 단백질을 FPLC gel filtration chromatography로 분석하면 분자량 28 kDa에 해당하는 위치에 단일 Peak로 나타난다(그림 1, Panel A). 또한, 원래 분자량보다 높은 분자량으로 분석되는 단백질은 나타나지 않았기 때문에, DsRed-Monomer가 실제 monomer로 존재하고 있음을 강하게 시사한다. 한편, 재조합 DsRed-Express 단백질은 tetramer 구조를 취하기 때문에 DsRed-Monomer 단백질보다 빨리 용출된다. 또한, pseudonative gel electrophoresis 해석 결과에서도 EGFP나 AcGFP1과 동일한 패턴을 보이고 있다(그림 1, Panel B). 이러한 결과는 DsRed-Monomer 단백질이 아미노산 서열에 기초하여 계산된 26.8 kDa의 분자량을 가진 monomer로서 존재하고 있다는 것을 보여주고 있다.

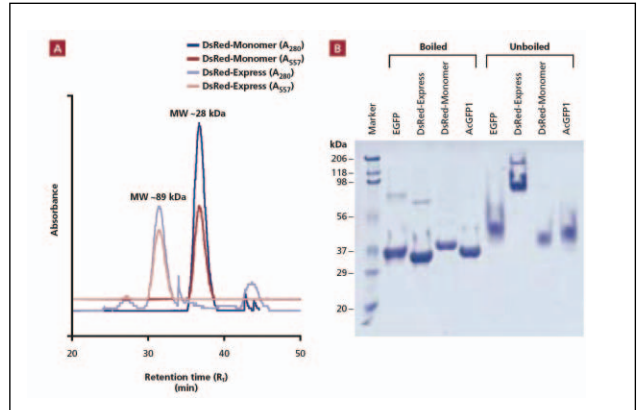


그림 1. Living Colors® DsRed-Monomer is a monomeric protein, Panel A, Recombinant DsRed-Express and DsRed-Monomer (100 μg) were analyzed by FPLC gel filtration chromatography. Overall absorption (A280) and chromophore excitation (A557) of the eluted material were monitored simultaneously. DsRed-Monomer 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 μg) 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.

Protein	Excitation Max (nm)	Emission Max (nm)	Time to Detection (hr)	Relative Fluorescent Intensity	Quaternary Structure	Utility as a Reporter	Utility in Fusions
DsRed-Monomer	556	586	12	Bright	Monomer	Fair	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

스펙트럼 특성

DsRed-Monomer 단백질은 기존의 DsRed 변이체인 DsRed-Express의 주요 특성을 유지하고 있다. DsRed-Monomer는 Excitation max(입사 최대파장) 556nm, Emission max(출사 최대파장) 586nm이다(표 1, 그림 2). 이는 Clontech의 다른 DsRed 단백질 variant와 거의 동일하여 일반적인 표준 필터로 검출할 수 있고, Chroma Technology Corporation사에서 판매되는 주문제작 필터 등도 사용할 수 있다(표 2). DsRed-Monomer 단백질은 DsRed-Express 단백질보다 다소 형광 강도가 낮은 점(표 1)은 있으나, 형광현미경이나 flow cytometry 등에 문제없이 적용할 수 있다(그림 3~5). 또한, Clontech의 다른 적색 형광단백질과 마찬가지로 다른 색깔의 형광 단백질과 이중 형광으로 표식하여 다중검출이 가능하다.

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

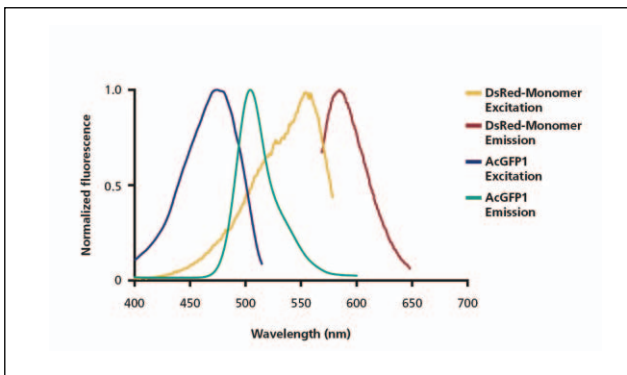


그림 2. Fluorescence excitation and emission spectra of DsRed-Monomer and AcGFP1.

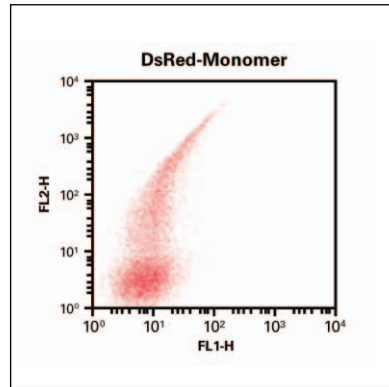


그림 3. Cells expressing DsRed-Monomer are easily detected by standard BD FACS™ analysis. HEK 293 cells were transfected with pDsRed-Monomer-N1 and analyzed using the 568 nm laser line of the BD FACSVantage™ SE Flow Cytometry System 24 hr post-transfection.

Fusion tag로 최적

이상적으로는 형광 tag는 목적단백질의 생물학적 기능에는 영향을 주어서는 안된다. 만일 형광 단백질이 oligomer를 형성하려는 성질이 강하면, tag가 융합된 단백질의 원래 기능을 변경하거나 방해할 가능성이 있다. DsRed-Monomer는 전형적인 monomer 특성을 갖고 있기 때문에 적색 형광 fusion tag로 사용하는데 최적이다. 포유류 세포에서 DsRed-Monomer를 발현시키면 높은 가용성을 나타내며 세포질 내에 응집없이 균일하게 분포된다(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.

DsRed-Monomer를 다양한 종류의 목적단백질과 융합시켜 그 세포내 분포를 검토한 결과, tag로서의 유용성을 다시 한번 확인할 수 있었다(그림 5). Tetrameric DsRed 등과는 잘 작용하지 않던 actin 및 Golgi 융합 단백질을 포함하여 검토한 모든 단백질들은 세포내 원래 장소에 위치함을 확인할 수 있었다. DsRed-Monomer-Actin 융합 단백질은 actin filament system으로 정확하게 도입되어 cytoskeletal network, ruffling edge, filipodia에 존재하고 있다는 것이 확인되었다. 이는 DsRed-Monomer가 fusion tag로 매우 뛰어난 성질을 가지고 있다는 것을 보여준다.

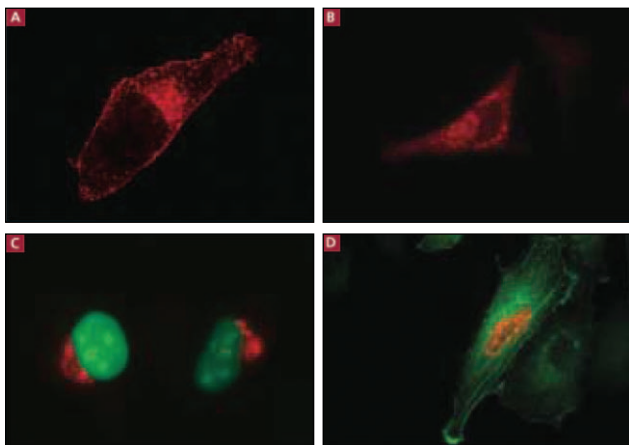


그림 5. DsRed-Monomer performs well in protein fusions and multicolor applications. Various DsRed-Monomer fusions were transiently transfected in HeLa cells and visualized by fluorescence microscopy. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde 24 hr post-transfection. Panel A, DsRed-Monomer-Caveolin fusion, 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.

Retroviral Cloning Vectors 및 prelinearized In-Fusion Ready Vectors를 포함한 DsRed-Monomer vector들은 다양한 실험에서 매우 강력하고 편리한 방법이 될 것이다.

DsRed-Monomer는 Living Colors DsRed Polyclonal Antibody (TaKaRa Code 632496)로 쉽게 모니터링 할 수 있다. 이 polyclonal Ab는 full-length DsRed-Express에 대한 rabbit polyclonal serum으로 wild-type DsRed 및 모든 변이체를 인식할 수 있다. Western blot이나 immunoprecipitation 등으로 DsRed-Monomer를 검출할 수 있다.

References

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. Creator™ System Overview (October 2001) *Clontechiques* XVI(4):5-6.
5. Colors™ DsRed Polyclonal Antibody (Jan 2003) *Clontechiques* XVIII(1):11. Living Colors™ DsRed-Monomer

■ 관련제품

Products	Size	TaKaRa Code
pDsRed-Monomer-N1 Vector	20 µg	632465
pDsRed-Monomer-C1 Vector	20 µg	632466
pDsRed-Monomer Vector	20 µg	632467
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
pDsRed-Monomer Protein	100 µg	632503
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
DsRed Polyclonal Antibody	100 µl	632496