

형광 단백질이 필요하면 원스톱 쇼핑이 가능한 Clontech에서

| Fruit Fluorescent Protein 시리즈 | Living Colors® Fluorescent Protein 시리즈

Clontech의 Living Colors® 형광 단백질 시리즈(9 종류)와 신제품 Fruit 형광 단백질 시리즈(6 종류)의 형광 단백질은 천연에 존재하는 산호나 해파리 유래의 형광 단백질 및 그 변이체로, 조건에 맞는 파장의 여기광을 흡수하여 강한 형광을 나타낸다. 기질이나 보조인자 없이 단백질 스스로가 형광을 나타내기 때문에, 생체내의 현상을 살아있는 그대로 형광 현미경이나 FACS(Flow cytometer) 등에서 실시간으로 관찰 가능하다. 여기서는 형광 단백질의 기초지식과 Clontech의 형광 단백질 제품의 선택 방법에 대해 소개하고자 한다.

■ 형광 단백질의 역사

녹색의 형광 단백질인 GFP(Green Fluorescent Protein)는 해파리 *Aequorea victoria* 에서 Aequorin의 청색광(Max 470 nm)을 녹색광(508 nm)으로 변환하는 단백질로 1962 년에 Simomura 등에 의해서 발견되었다. 1991년 GFP 유전자가 클로닝 되므로써, GFP는 여러가지 리포터로서 사용할 수 있게 되었다. 하지만, 초기 형광 단백질은 「형광강도가 떨어진다」, 「응집하기 쉽다」 「발색까지 시간이 걸린다」 「퇴색하기 쉽다」 등의 문제점이 있었다.

Clontech에서는 다년간 축적한 유전자 발현이나 형광 단백질에 관한 지식을 바탕으로 형광 단백질을 여러 가지 방법으로 개발하여 보다 밝고, 구조적으로 안정하며 검출시간도 짧은 형광 단백질 개발에 성공하였다.

해파리 이외에도 산호 유래의 적색 형광 단백질 DsRed를 개량하여 매우 다양한 형광 단백질을 만들어내고 있다(그림 1).

현재 판매중인 Living Colors® 형광 단백질 시리즈에는 8 종류의 RCFP(Reef Coral Fluorescent Proteins)와 AcGFP1이 있다. Reef Coral 유래의 RCFP에는 Cyan(남색)(AmCyan1), 녹색(ZsGreen1), 황색(ZsYellow1), 적색(DsRed-Monomer, DsRed2, DsRed-Express), 암적색(AsRed2, HcRed1) 등이 있다. RCFP는 강한 형광 강도를 나타내며 포유류 세포내에서 매우 안정적이기 때문에 세포를 장기간 관찰해야 할 실험의 경우 매우 적절하다. 해파리 *A. victoria*의 근친종 *A. coeruleascens*의 유전자를 변형한 AcGFP1은 선명한 녹색의 형광을 나타낸다. AcGFP1은 EGFP(GFP의 변이체)와 아미노산 level에서 약 94%의 상동성을 가지고 있으므로, 기존의 EGFP를 사용했던 실험에 동일하게 적용할 수 있다. 이러한 형광 단백질은 실험에 최적인 도구로 많은 연구자들이 애용하고 있으며, 문헌에도 다수 소개되어 있다.

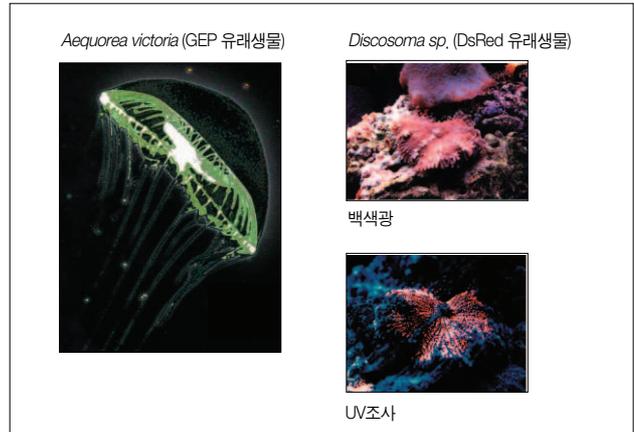


그림 1. 형광단백질의 유래생물

■ 형광 단백질의 구조

형광 단백질의 구조는 GFP를 중심으로 연구되었으며, 아미노산 배열이나 결정 구조 해석을 이용하여 분석한 결과, 접힌 β -sheet의 원통형 구조 내부에 형광 발색단이 있는 견고한 3차원 구조를 가지고 있으며, 각종 protease에도 강한 저항성을 가지고 있었다(그림 2). pH5~ 12에서 형광을 관찰할 수 있으므로 동결 용해나 약 70℃ 정도의 가열에 의해서도 형광은 손상되지 않는다. Clontech의 녹색 단량체(monomer) AcGFP는 약 24 kDa, 적색 단량체(monomer) DsRed-Monomer는 약 27 kDa이다. RCFP에는 dimer, tetramer type도 있으며, 모두 물리화학적으로 매우 안정적이고, pH 변화나 변성제, 유기용매에도 내성을 가지고 있다.



그림 2. GFP의 β -sheet 원통 구조

■ 형광 단백질의 검출

세포에 도입된 형광 단백질은 translation 과정 후 곧바로 형광을 나타내는 것이 아니라, 산소 존재하에서 서서히 발색단을 형성한다. 세포 자체가 갖고 있는 자가형광에 따라 다르지만, 포유류 세포에 transfection 후 빠른 경우 약 5 시간, 늦은 경우라도 약 72시간 내에 자가 형광과 구별할 수 있는 형광 관찰이 가능하다.

세포내에서 반감기는 24시간 이상으로 비교적 안정하다. 또한 장시간 관찰하고 싶은 경우에는 안정적으로 형질 도입하는 것도 가능하며, 지금까지 많은 트랜스제닉 동물과 재조합 식물을 만들 수 있었다.

Living Colors® 시리즈나 Fruit 시리즈는 형광 단백질을 검출하는 monoclonal antibody나 polyclonal antibody도 구비하고 있다(표 1), 이 항체에 의해 형광 단백질은 물론, 형광 단백질의 N-terminal, C-terminal 융합 단백질도 검출 가능하다.

■ Clontech 형광 단백질의 특성과 종류

Clontech의 형광 단백질 제품군은 489 nm~649 nm에 걸쳐 광범위한 파장을 커버하고 있으며, monomer, dimer, tetramer의 3가지 종류가 있다(표 2, 3). Tetramer는 형광 강도가 강하기 때문에, reporter로 최적이다. 목적 유전자와 형광 단백질을 융합하여 발현시킬 때는 입체 구조에 영향이 적은 monomer를 사용하는 것이 좋으며, 이중염색 혹은 다중염색을 하고자 할 때는 형광 파장이 떨어져 있는 형광 단백질을 선택하면 충분히 가능하다(그림 3).

표 1. Western Blot으로 검출가능한 항체 선택 가이드

Fruit Protein	TaKaRa Code	DsRed Monoclonal Antibody	DsRed Polyclonal Antibody
		632392, 632393 Mouse Monoclonal Antibody (1:500)	632496 Rabbit Polyclonal Antibody (1:1000)
mCherry	632522 632523 632524 632525	+++	+++
mRaspberry	632526	++	+++
mPlum	632527	+++	+++
mBanana	632528	+	+++
mOrange	632529	N.R.	+++
mStrawberry	632530	++	+++

N.R : not recommended

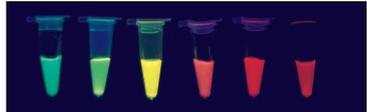
* Living Color Fluorescent Protein 검출용 항체에 대해서는 당사로 문의해 주십시오.

표 2. Living Colors® 형광 단백질의 특성

Protein	Excitation Max(nm)	Emission Max(nm)	Time to Detection	Relative Fluorescent Intensity	Quaternary Structure	Utility as a Reporter	Utility in Fusion Protein
Reef Coral Fluorescent Proteins(RCFPs) ... Coral 유래							
DsRed-Monomer	556	586	12	Bright ++	Monomer	Fair ++	Excellent ++++
DsRed2	563	582	24	Very Bright +++	Tetramer	Good +++	++
DsRed-Express	557	579	8~12	Very Bright +++	Tetramer	Excellent ++++	Good +++
AsRed2	576	592	8~12	Very Bright +++	Tetramer	Good +++	++
HcRed1	588	618	16	Bright ++	Dimer	+	++
AmCyan	458	489	8~12	Very Bright +++	Tetramer	Good +++	++
ZsYellow	529	539	8~12	Very Bright +++	Tetramer	Good +++	++
ZsGreen	493	505	8~12	Extremely Bright ++++	Tetramer	Excellent ++++	++
AcGFP1 Fluorescent Proteins ... Jellyfish 유래							
AcGFP1	475	505	8~12	Very Bright +++	Monomer	Excellent ++++	Excellent ++++

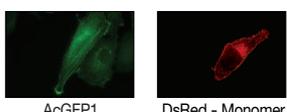
• UV 조사한 Living Colors® 형광단백질

Oligomers Tetramer는 형광강도가 강해 Reporter로 최적!



AmCyan ZsGreen ZsYellow DsRed AsRed2 HcRed1

Monomers 단량체는 컴팩트하여 융합 단백질로 최적!



AcGFP1 DsRed - Monomer

형광단백질의 2중 염색

그림 3. 형광 단백질의 염색 화면



표 3. Fruit 형광 단백질의 특성

Protein	Excitation Max(nm)	Emission Max(nm)	Relative Fluorescent Intensity	Quaternary Structure	Utility as a Reporter	Utility in Fusion Protein	특징
Fruit Fluorescent Proteins(RCFPs) ... Coral 유래							
mBanana	540	553	Fair +	Monomer	Fair ++	Excellent ++++	
mOrange	548	562	Extremely Bright ++++	Monomer	Excellent ++++	Excellent ++++	FRET 사용가능
mStrawberry	574	596	Bright ++	Monomer	Good +++	Excellent ++++	
mCherry	580	610	Bright ++	Monomer	Good +++	Excellent ++++	FRET 사용가능
mRaspberry	598	625	Bright ++	Monomer	Fair ++	Excellent ++++	
mPlum	590	649	Bright ++	Monomer	Fair ++	Excellent ++++	

■형광 단백질 vector 선택

Clontech에서는 형광 단백질을 가지고 있는 약 80 종류의 vector를 보유하고 있다. 목적 단백질 N-terminal 또는 C-terminal에 형광 단백질을 융합시켜 발현하는 범용적인 vector부터, 세포내 소기관을 조사할 수 있는 vector, IRES 서열을 이용하여 형광 단백질을 발현하는 vector, promoter 활성 검출용 vector, 바이러스 marker vector 등 다양한 용도의 vector를 가지고 있다 (그림 4).

또 발현계에 따라 포유류 세포용 vector와 세균용 vector 2가지 타입을 가지고 있다. 포유류용 vector는 포유류 codon 사용 빈도에 최적화되어 있기 때문에 human cell내에서 효율적인 발현이 가능하다. 세균용 vector는 대장균을 이용한 assay 이외에 형광 단백질을 제한효소로 잘라 원하는 vector에 옮겨 사용하기 위한 유전자 공급원으로도 사용 가능하다. 식물이나 효모 등의 실험에는 세균용 vector에서 형광 단백질 유전자를 원하는 발현계의 vector로 옮겨 사용해야 한다.

포유류 세포용

목적 유전자와 형광 단백질(FP)을 융합시켜 발현하고 싶다

목적 유전자와 형광 단백질(FP)을 동시에 발현하고 싶다

살아있는 세포중의 세포 골격이나 소기관의 구조 및 기능을 연구하고 싶다

Promoter 활성을 연구하고 싶다

Proteasome 활성을 조사하고 싶다

N-terminal 혹은 C-terminal fusion vector
pFP-N1 or pFP-C1

[사용가능한 FP]
AcGFP1
AmCyan1
AsRed2
DsRed2
DsRed-Express
DsRed-Monomer
HcRed1
ZsGreen1
ZsYellow1
mCherry

IRES expression vector
pIRES2-FP

[사용가능한 FP]
AcGFP1
ZsGreen1
DsRed2
DsRed-Express

Subcellular Localization vector

[표적이 될 수 있는 세포내 소기관]
• Endosome • 핵
• 미토콘드리아 • Tubulin
• 소포체 • 세포막
• 골지체
• Peroxisome
• Actin filaments

[사용가능한 FP]
AcGFP1
DsRed-Monomer
DsRed2
HcRed1

Promoterless vector

[사용가능한 FP]
AcGFP1
DsRed2
DsRed-Express
HcRed1
ZsGreen1
mCherry

Proteasome sensor vector
pZsProSensor-1

세균 · 효모* · 식물* 용

Fluorescent Protein Basic vector

- pAcGFP1
- pAmCyan
- pAsRed2
- pDsRed2
- pDsRed-Express

- pDsRed-Monomer
- pHcRed1
- pZsGreen
- pZsYellow
- pmCherry
- pmPlum

- pmOrange
- pmBanana
- pmStrawberry
- pmRaspberry
- pGFP
- pGFPuv

* 유전자를 잘라, 효모, 식물용 vector에 옮겨 사용해 주십시오.

그림 4. 형광 단백질 벡터 선택 가이드

■ Fruit 형광 단백질 신발매

2007년 8월에 발매한 Fruit 형광 단백질은 캘리포니아 대학 Roger Tsien 박사등에 의해 개발된 산호 유래의 형광 단백질이다. 형광색이 과일색을 닮아 황색(mBanana), 오렌지색(mOrange), 적자색(mPlum, mRaspberry, mStrawberry, mCherry)과 같은 이름을 붙였다.

기존의 Living Colors® 형광 단백질 시리즈에 Fruit 형광 단백질 시리즈를 추가하여 복수의 목적 단백질에 대해 세포내에서 국재화를 연구하는 경우 등에 선택사항의 폭을 넓혔다. 이것들은 모두 monomer로, 융합 단백질 이용에 최적이다. 또 mCherry는 세포내에서 일어나는 단백질간의 상호작용이나 분자 단위의 현상을 검출하는 FRET 해석에도 이용할 수 있다.

■ 결론

형광 단백질은 단지 미지 기능 단백질의 국재를 연구하는 형광 tag로서 뿐만 아니라 promoter 활성을 모니터링하는 리포터로서 혹은 세포 소기관 등을 살아있는 상태에서 염색하는 마커로서 포유류 세포 · 효모 · 식물 · 균류와 여러 가지 실험계로 폭넓게 활용하고 있다.

Living Colors® 형광 단백질 및 Fruit 형광 단백질 제품 주문시에 반드시 라이선스 확인서가 필요합니다. 확인서를 기입하신 후 다카라코리아 전문판매점으로 제출해 주시기 바랍니다. 영리목적으로 사용할 경우는 Clontech과 라이선스 계약을 협의해야 합니다. 다카라코리아 (02-2081-2510)로 연락 주시기 바랍니다.

[참고문헌]

1. DsRed-Monomer와 GFP를 reporter로 사용한 논문

Link, CD., et al.:Conversion of Green Fluorescent Protein into a Toxic, Aggregation-prone Protein by C-terminal Addition of a Short Peptide,(2006) *J. Biol. Chem.*, **281** (3), 1808-1816.

2. Living Colors® 시리즈의 형광단백질(AmCyan, AsRed, DsRed,ZsGreen, ZsYellow)을 식물형질전환에 이용한 논문

Wenck A., et al. :Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation, (2003) *Plant Cell Rep.*, **22** (4), 244-251
(Clontechiques Oct, 2006 P22-24)

3. 효모에 DsRed를 localization reporter로 이용한 논문

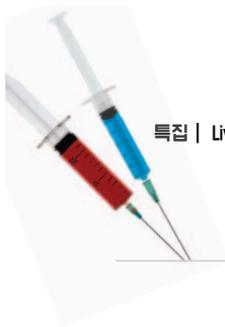
Rodrigues, F., et al.:Red Fluorescent Protein(DsRed) as a Reporter in *Saccharomyces cerevisiae*, (2001) *Journal of Bacteriology*, **183** (12),3791-3794.

4. Mouse로 유방암 세포 전이를 ZsGreen을 이용하여 모니터링한 논문

Harrell JC., et al. : Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Metastasis: Altered Hormonal Sensitivity and Tumor Aggressiveness in Lymphatic Vessels and Lymph Nodes, (2006) *Cancer Research*, **66** (18), 9308-9315
(Clontechiques July 2007 P10-13)

5. GFP/mCherry를 이용한 FRET 해석

Tramier M., et al. :Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. (2006) *Microscopy Research and Technique*, **69** (11), 933-939



■ 관련제품

Vector	TaKaRa Code	Size
포유류 범용 reporter! N-terminal 융합 형광 단백질 발현 vector Host cell : 포유류 세포 Promoter : CMV IE		
pAcGFP1-Hyg-N1	632489	20 μ g
pAcGFP1-N1	632469	20 μ g
pAcGFP1-N2	632483	20 μ g
pAcGFP1-N3	632484	20 μ g
pAcGFP1-N (In-Fusion Ready)	632501	1 μ g
pDsRed-Monomer-Hyg-N1	632494	20 μ g
pDsRed-Monomer-N1	632465	20 μ g
pDsRed-Monomer-N (In-Fusion Ready)	632498	1 μ g
pmCherry-N1	632523	20 μ g
C-terminal 융합 형광 단백질 발현 vector Host cell : 포유류 세포 Promoter : CMV IE		
pAcGFP1-Hyg-C1	632492	20 μ g
pAcGFP1-C1	632470	20 μ g
pAcGFP1-C2	632481	20 μ g
pAcGFP1-C3	632482	20 μ g
pAcGFP1-C (In-Fusion Ready)	632500	1 μ g
pDsRed-Monomer-Hyg-C1	632495	20 μ g
pDsRed-Monomer-C1	632466	20 μ g
pDsRed-Monomer-C (In-Fusion Ready)	632499	1 μ g
pmCherry-C1	632524	20 μ g
Promoter 활성 연구에 적합 Promoterless 형광 단백질 vector Host cell : 포유류 세포 Promoter : 없음		
pAcGFP1-1	632497	20 μ g
pmCherry-1	632525	20 μ g

Vector	TaKaRa Code	Size
안정 발현 세포주의 선택용! IRES 형광 단백질 발현 vector 1 Host cell : 포유류 세포 Promoter : CMV IE		
pIRES2-AcGFP1	632435	20 μ g
살아있는 세포내의 세포 골격이나 소기관의 구조 기능의 해석용! Subcellular localization vector Host cell Host cell : 포유류 세포 Promoter : CMV IE		
pAcGFP1-Actin	632453	20 μ g
pDsRed-Monomer-Actin	632479	20 μ g
pAcGFP1-Endo	632490	20 μ g
pAcGFP1-Golgi	632464	20 μ g
pDsRed-Monomer-Golgi	632480	20 μ g
pAcGFP1-Mito	632432	20 μ g
pAcGFP1-Nuc	632431	20 μ g
pAcGFP1-1 Tubulin	632488	20 μ g
pAcGFP1-Mem	632491	20 μ g
pAcGFP1-Mem Hyg	632509	20 μ g
pDsRed-Monomer-Mem	632512	20 μ g
pDsRed-Monomer-Mem Hyg	632513	20 μ g
pDsRed-Monomer-F	632493	20 μ g
pDsRed-Monomer-F Hyg	632514	20 μ g
pAcGFP1-F	632511	20 μ g
pAcGFP1-F Hyg	632510	20 μ g
세균계 assay나 유전자 공급원으로 적합! 형광 단백질 basic vector Host cell : 세균 Promoter : lac		
pAcGFP1	632468	20 μ g
pDsRed-Monomer	632467	20 μ g
pmCherry	632522	20 μ g
pmRaspberry	632526	20 μ g
pmPlum	632527	20 μ g
pmBanana	632528	20 μ g
pmOrange	632529	20 μ g
pmStrawberry	632530	20 μ g

* : Living Colors® 시리즈 AcGFP 및 DsRed-Monomer vector 제품과 Fruit 형광 단백질 vector 제품만 게재하였다. 이외의 다른 형광 단백질 vector에 대해 자세한 정보는 홈페이지 www.clontech.com 참조.

※ License Notice : [21]