

살아있는 세포에서 신속하고 가역적으로 단백질을 조절하는 새로운 시스템! ProteoTuner™ System

ProteoTuner™ System을 이용하여 세포, 생체내에서 빠르게 단백질 양을 조절

- 목적단백질을 빠르게 안정화 또는 불안정화
- 직접적으로 단백질 기능에 대한 정보 취득
- 단백질 발현 수준을 가역적, 반복적으로 정확한 조절

단백질 기능을 분석하는 것은 세포생물학 연구의 핵심이다. Dr. Thomas Wandless의 연구에 기초한 Clontech사의 새로운 ProteoTuner™ System을 이용하여, 단백질 자체의 발현정도를 조절함으로써 목적단백질의 기능을 직접적으로 규명할 수 있게 되었다. 본 기술은 이미 다양한 적용 및 생물체에서 성공적으로 작용하였고, 여러 우수한 논문에 게재되었다. ProteoTuner™ system은 FKBP 단백질 (destabilization domain 또는 DD)의 12kDa 변이체를 기반으로 하며, 이는 목적단백질에 tagging하여 발현시킬 수 있다. DD 융합 단백질은 Shield1이라 불리는 작은 막투과성 리간드(750 Da)가 존재할 때, proteasome에 의한 단백질 분해를 피할 수 있다(그림 1).

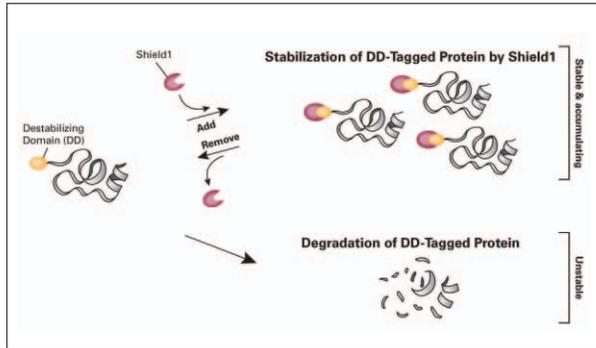


그림 1. Ligand-dependent, targeted, and reversible protein stabilization. A small destabilization domain (DD) is fused to a target protein of interest. The small membrane-permeable ligand Shield1 binds to the DD and protects it from proteasomal degradation. Removal of Shield1, however, causes rapid degradation of the entire fusion protein. The default pathway for the ProteoTuner Systems is degradation of the fusion protein, unless Shield1 is present.

■ 빠르고 분명한 결과

세포내 목적단백질의 양을 빠르게 변화시킴으로서 단백질의 기능에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있다. 단백질의 양을 간접적으로 조절하는 다른 시스템 (전사단계에서 조절)과는 다르게 본 시스템은 목적단백질 자체를 타겟으로하기 때문에 다른방법에 비해 매우 빠르게 반응한다. 이것은 Shield1 리간드 첨가 후 15~30분만에 DD 융합 단백질이 축적되는 것으로 확인할 수 있다.

Protein Regulation	Technology	CLONTECH Products
Transcriptional	Controllable Gene Expression	Tet-On®/Off® Systems 36-48 hr
Translational	RNA Interference	Knockout™ (Inducible) RNAi Systems 48-72 hr
Post-translational	Ligand-Dependent Protein Stabilization / Degradation	ProteoTuner™ 30 min-1 hr

Protein Regulation Technologies Available from CLONTECH

그림 2. ProteoTuner™ System is more rapid and targeted control of protein expression compared to transcriptional or translational regulation.

■ 단백질 안정화 조절

Shield1이 존재할 때, DD 융합 단백질은 안정화되고 세포내에 축적된다. 반대로 Shield1이 존재하지 않을 때 DD 융합단백질은 proteasome에 의해 빠르게 분해된다. 따라서 배양배지내의 Shield1의 양으로 세포내에 존재하는 DD 융합 단백질의 양을 조절할 수 있고(그림 3, 4), ~50~1,000 nM 범위안에서 Shield1의 농도를 증가시켜 단백질 안정화 정도를 증가시킬 수 있다.

pRetroX-PTuner Vector (TaKaRa Code 632171)에 DsRed-Express를 클로닝하여 이를 확인하였다. Vector를 포함하는 세포에 각기 다른 농도의 Shield1을 처리하여 flow cytometry로 형광 강도를 측정하였다. 높은 농도로 Shield1을 처리한 세포에서 높은 형광 강도를 나타내었고, 이는 안정화된 DD-DsRed-Express 단백질이 세포내에 다량으로 존재함을 나타낸다(그림 3).

이러한 결과는 Living Colors® DsRed Polyclonal Antibody (TaKaRa Code 632496)를 이용한 Western blot을 통해 확인하였다. DD-DsRed-Express는 CMV promoter에서 안정적으로 발현하는 DsRed-Express와 비교하여 안정적인 발현을 보였다(그림 3). Shield1이 낮은 농도로 존재할 때, Shield1의 농도와 분해되는 DsRed-Express 단백질의 양이 직접적으로 관련있음을 flow cytometry와 cell lysate를 통해 확인하였다(각각 그림 3, 4).

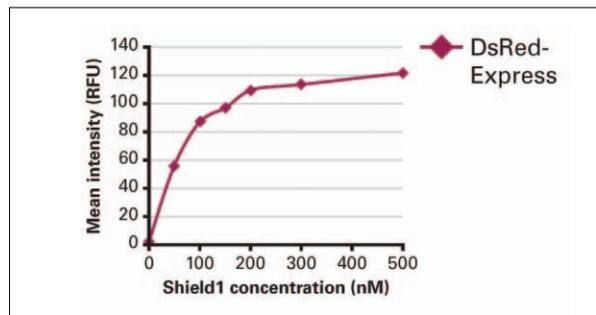


그림 3. The fluorescence intensity of DD-DsRed-Express is directly related to the concentration of the stabilizing ligand Shield1. Cells were infected with pRetroX-PTuner DsRed-Express and treated with different concentrations of Shield1. The amount of DD-tagged DsRed-Express stabilized by different concentrations of Shield1 was detected by fluorescence intensity 18 hr later, using a BD FACSCalibur™ flow cytometer. RFU = relative fluorescence units.

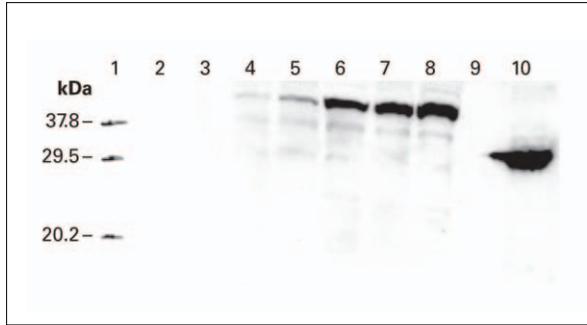


그림 4, DD-DsRed-Express fluorescence is directly related to the concentration of the stabilizing ligand Shield1. In order to visualize the amount of DD-DsRed-Express expressed in a cell, cells were infected with pRetroX-PTuner DsRed-Express IRES ZsGreen1 and treated with different concentrations of Shield1. The amount of DD-tagged DsRed-Express stabilized by different concentrations of Shield1 was detected via Western blot using the Living Colors DsRed Polyclonal Antibody. Lane 1 : molecular weight marker, Lane 2 : 1X loading buffer, Lane 3: untreated HeLa cells (no virus, no Shield1). Lane 4 : HeLa cells infected with the DD-DsRed Express construct; no Shield1, Lanes 5,8 : HeLa cells infected with the DD-DsRed-Express construct and treated with 50, 250, 500, and 1,000 nM Shield1 respectively. Lane 9 : 1X loading buffer, Lane 10 : HEK 293 DsRed-Express stable cell line.

■ 가역적이고 반복적인 시스템

ProteoTuner™ System은 단백질을 안정화시키는데 제한이 없고, 또한 기존에 처리했던 Shield1을 제거함으로써 목적 단백질을 불안정화시킬 수 있다. 따라서 동일한 세포세트를 이용하여 얼마든지 목적 단백질의 안정화, 불안정화를 반복할 수 있다.

빠르고 직접적으로 단백질의 발현을 조절하는 ProteoTuner™ System은 세포 내에서 목적단백질의 발현을 직접적이고, 선택적으로 조절하여 transient effect를 연구하는 획기적인 기술을 제공할 것이다.

ProteoTuner™ System- Technical Note 1

살아있는 세포에서 빠르고, 가역적으로 단백질 기능을 조절할 수 있는 획기적인 방법!

Laura A. Banaszynski¹, Ling-chun Chen², Lystranne A. Maynard-Smith¹, A. G. Lisa Oof², and Thomas J. Wandless²

¹ Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California 94305, USA

² Department of Chemical and Systems Biology, Stanford University, Stanford, California 94305, USA

특정 단백질의 기능을 빠르고 가역적으로 조절하는 방법은 복합적인 생물학적 시스템을 연구하기 위해 매우 필요한 도구이다. 이에, 막투과성의 리간드인 Shield1을 사용하여 가역적 방법으로 포유류 세포에서 특정단백질의 안정성을 조절하는 범용적인 기술을 개발하였다. 이를 위해, human FKBP 12 단백질의 변이를 이용하였는데, human FKBP 12는 포유류 세포에서 발현되었을 때 구조적으로 빠르게 분해되고, 이러한 불안정성 도메인 (destabilization domain 또는 DD)이 결합된 다른 단백질도 빠른 분해가 나타난다. 그러나 리간드 Shield1을 첨가하면 이 리간드가 불안정 도메인에 결합하여 분해되지 않도록 보호하기 때문에, 불안정 도메인이 결합된 단백질은 축적되어 세포내 기능을 발현하게 된다.

■ 리간드에 의해 조절되는 불안정성 도메인의 라이브러리 구축과 동정

리간드에 의해 안정화되는 변이를 동정하기 위해 황색형광단백질(YFP)의 형광을 지표로 FKBP12 융합단백질의 안정화에 대한 cell-based 스크리닝을 실시하였다. FKBP12 F36V 유전자 서열(이하 FKBP)을 토대로 error-prone PCR을 실시하여 20,000 sequences 이상의 라이브러리를 구축하고 YFP의 N-terminus에 클로닝하였다. 그런 다음 리간드에 의한 안정화여부를 실험하였다.

■ 불안정성 도메인의 특성

지속적인 분석을 통해 라이브러리에서 5개의 FKBP 돌연변이(F15S, V24A, H25R, E60G, L106P)를 선별하였다. 세포내 단백질 발현정도를 측정하기 위해, YFP와 융합된 불안정한 도메인을 안정적으로 발현시키는 세포에 Shield1을 첨가하지 않거나, 첨가한 후 용해하여 western blot으로 FKBP12-YFP를 확인하였다(그림 5). Shield1을 처리하지 않은 세포에서는 FKBP12 단백질이 검출되지 않은 반면, Shield1을 처리한 세포에서는 융합단백질이 강하게 발현된 것을 확인할 수 있었다(그림 5). 그런 다음 Shield1의 첨가와 제거에 따른 각 돌연변이의 반응을 실험하였다. Shield1의 부재시 5개의 돌연변이 모두 형광 발현 수준이 낮아졌고 대조군과 비교시 불안정화의 정도는 상이했다. Shield1을 1 μ M에서 0.1 nM로 10의 배수로 첨가하였을 때, 5개의 돌연변이 모두 형광이 증가했고 안정화 효율은 다양하게 관찰되었다(그림 6, Panel A). Shield1을 제거했을 때도, 각 돌연변이에 따라 불안정화된 융합단백질의 형광 감소 경향에도 차이를 나타내었다(그림 6, Panel B). 이 실험에서 돌연변이의 불안정화 정도와 분해 속도 사이의 상관관계를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 추가실험을 위해 돌연변이 L106P (이하 destabilization domain 또는 DD)를 선별하였다.

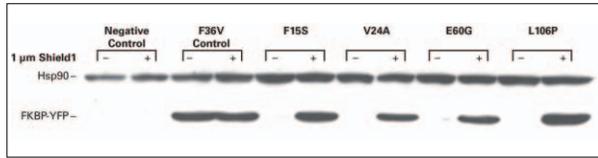


그림 5. FKBP mutants display Shield1-induced stability. Cells expressing FKBP-mutant YFP fusions and a negative control were either mock-treated or treated with 1 μM Shield1 for 24 hr. Lysate was analyzed by Western blot with an anti-FKBP antibody. Differing degrees of Shield1-induced stabilization could be observed for the different mutants analyzed. FKBP-YFP was not detected in lysate from mock-treated cells.

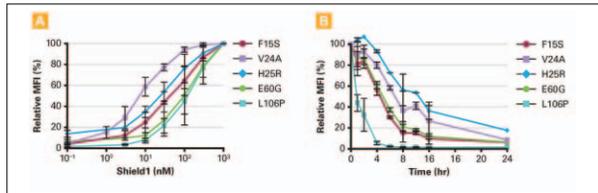


그림 6. Kinetics of Shield1-dependent stabilization. Panel A, NIH 3T3 cells stably expressing FKBP-mutant YFP fusions were treated with threefold dilutions of Shield1 (1 μM to 0.1 nM). Mutant V24A showed the most efficient rescue (EC₅₀ ~5 nM), whereas the more destabilizing L106P required higher concentrations of Shield1 (EC₅₀ ~100 nM) to stabilize the YFP fusion protein. Panel B, NIH 3T3 cells stably expressing FKBP-YFP fusions were treated with 1 μM Shield1 for 24 hr and then washed with media to remove Shield1. L106P was degraded most quickly, with protein levels becoming negligible within 4 hours. Changes in fluorescence were monitored by flow cytometry. MFI = mean fluorescence intensity.

■ DD 융합 단백질의 발현 정도와 안정화를 신속하게 조절

RNAi에 의해 내생유전자가 silencing되는 효율과 목적 단백질이 DD에 융합하여 불안정화되는 효율을 비교하였다. Lamin A/C에 대한 siRNA를 HeLa cell에 도입하였을 때, 약 24시간만에 단백질 발현이 감소된 반면, DD-YFP로 안정적으로 발현하던 세포는 Shield1의 제거 후 4시간 이내에 거의 완벽하게 분해되었다. 이는 목적 단백질에 DD를 융합함으로써 배양 세포내에서 단백질의 안정화를 극적으로 감소시킴을 보여준다(그림 7)

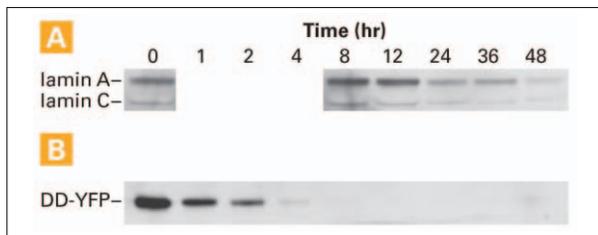


그림 7. Comparison of RNAi and the ProteoTuner systems. The time required for RNAi knockdown of lamin A/C (Panel A) was compared to the time required for degradation of DD-YFP upon removal of Shield1 from NIH 3T3 cells stably expressing the fusion protein (Panel B).

■ 단백질 발현 조절의 예측

DD가 FKBP의 리간드에 민감한 돌연변이라는 것을 입증하기 위해, DD-YFP를 안정적으로 발현하는 NIH 3T3 세포를 이용하여 Shield1의 다양한 농도에 따른 개체수를 일주일동안 관찰하였다(그림 8). 그림 2의 A에서 처리에 따른 반응 측정실험으로부터 예측한 것이 관찰된 형광발현 수준에 근접하는 것은 ProteoTuner™ System이 처리량에 의존적으로 조절됨을 확인시켜준다.

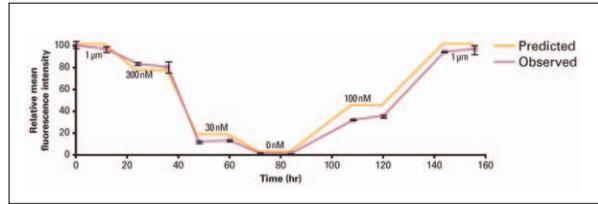


그림 8. Predictable and reversible, Shield1-dependent regulation of intracellular protein levels. NIH 3T3 cells stably expressing DD-YFP were treated with varying concentrations of Shield1 over the course of one week, and samples of the population were assayed by flow cytometry at the indicated time points. Predicted fluorescence is based upon the dose response experiment shown in Figure 2A. MFI = mean fluorescence intensity.

■ Shield1에 의한 세포형태 변화

다음으로 DD와 융합되어 구조적으로 활성화된 돌연변이, Cdc42 (Q61L) Shield1에 의해 안정화되는 것과 세포 형태 변화의 상관관계를 찾고자 했다. 이 작은 GTPase의 발현으로 세포 형태에 특징화된 변화를 일으켰다¹⁾. DD-Cdc42 (Q61L)를 발현하는 세포에 Shield1을 처리하면 개체군은 예측했던 대로 형태적인 변화를 보였다.

이러한 형태변화는 가역적으로 일어나, Shield1을 제거했을 때는 Shield1을 첨가하지 않았던 세포와 유사한 섬유아세포(fibroblast)형태로 변화하였다(그림 9).

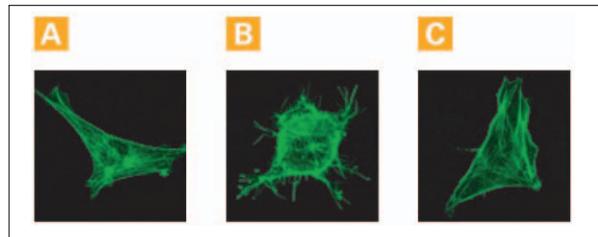


그림 9. Stabilization of DD-tagged Cdc42 (Q61L) with Shield1 results in predictable changes in cellular morphology. NIH 3T3 cells stably expressing fusions of a constitutively active small GTPase to the DD were split into three pools. The first population (Panel A) was mock-treated and the second population (Panel B) was treated with 1 μM Shield1 for 24 hr. The third population (Panel C) was treated with 1 μM Shield1 for 24 hr, then washed with media and cultured in the absence of Shield1 for 48 hr. Cells were serum-starved for 12 hr, fixed, stained with Alexa Fluor® 488-conjugated phalloidin, and visualized using confocal microscopy.

■ 결론

DNA와 mRNA 수준에서 유전자 기능을 조절하는 기술은 다양하고, 특정유전자에 의해 코딩되는 단백질 산물의 변환을 위한 효과적인 실험 방법이다. 그러나, 직접적으로 단백질을 조절하는 실험은 특히 포유류 세포에서 제한적이다. 작은 분자로 단백질 안정화를 조절할 수 있는 “하나의 리간드-하나의 도메인(single ligand-single domain)” 시스템을 발전시켰고, 이것은 관심 있는 어떤 단백질이든 리간드 결합 도메인(ligand-binding domain (the DD tag))과 융합시켜 이 리간드가 없을 때는 단백질이 분해되도록 하는 기술에 기반을 두고 있다. 이 DD (destabilization domain)에 Shield1 리간드가 결합했을 때 융합단백질을 안정화시키고 목적 단백질이 분해되지 않도록 보호한다. 이 시스템은 다양한 DD융합단백질에 Shield1 의존적 안정화를 부여하여, 단백질 수준에서 직접 유전자 기능을 조절할 수 있는 새로운 기술이다.

기생충(apicomplexan parasites)의 유전자 기능분석은 단백질 레벨을 빠르고 쉽게 조절할 수 있는 역유전학(Reverse genetic) 틀의 부재로 한계가 있어 왔다. 그러나 최근 개발된 ProteoTuner 기술을 이용하면 리간드에 의해 조절가능한 DD (destabilization domain)를 목적 단백질에 융합시켜서, *T. gondii* 단백질의 안정화를 가역적이고 빠르게 조절할 수 있게 되었다. 이로 인해 기생충이 숙주 세포에 침입하고 세포내 성장을 하는 동안에 역할을 하는 단백질의 기능을 효율적으로 분석할 수 있게 되었다.

■ 서론

생존과 관련된 기능을 밝히기 위한 조건적 변이체 연구가 기생충 (*Apicomplexan parasites*)에서 많이 수행되었음에도 불구하고, 발현 스위치의 느린 활성화(slow kinetics)로 인하여 형태학적 결과가 분석될 때까지 하위 조절단계(down regulation)에 수 시간에서 여러 날이 소요되는 연구의 한계가 있다³.

포유류 세포에서 단백질 양을 신속하게 조절하는 방법이 최근 개발되었다. 목적 단백질에 연결된 DD (destabilization domain)가 합성 리간드와 가역적 결합으로 선택적인 안정화가 가능하다. Rapamycin-binding protein인 FKBP12의 돌연변이로부터 만들어진 DD tag는 Shield1이 없을 경우 프로테오솜에 의해 단백질이 빠르게 분해된다. 그러나 막투과성의 리간드인 Shield1이 DD tag에 결합하면 프로테오솜에 의한 분해로부터 DD tag 융합 단백질을 보호하고, 세포내 단백질의 양이 빠르게 증가하게 된다⁴.

ProteoTuner 기술을 기생충에 적용할 수 있는지를 확인하기 위해 모델 시스템으로 *T. gondii* 를 사용하였다. 황색형광단백질(YFP)의 N말단(N-terminus)에 DD를 연결시켜 ProteoTuner 시스템을 평가한 결과, 세포내와 세포외의 기생충(intra- and extracellular parasites)에서 각각 유도한지 20분 이내와 1시간 이내에 DD-YFP 융합 단백질(DD-YFP fusion protein)이 검출되었다 (data not shown), 이는 ProteoTuner 시스템이 *T. gondii*에서 성공적으로 작동하는 것을 알 수 있었다.

■ ProteoTuner 시스템을 이용한 기능 분석

T. gondii-특이적 단백질 연구에 초점을 맞춰, DD-융합 단백질 시스템 (ProteoTuner 시스템)을 테스트하기 위해 이미 tetracycline-inducible system을 이용하여 기능적으로 자세히 연구된 motor 단백질인 TgMyoA의 조건적 변이체⁵를 선택하였다.

TgMyoA의 N 말단에 DD와 myc tag (DD-MyoA)를 포함하고, 강력한 프로모터인 p5RT70에 의해 조절되는 TgMyoA를 안정적으로 발현하는 기생충을 만들었다⁶. 또한 DD-MyoA를 발현하여 Shield1에 의한 조절이 가능한 형질 전환 기생충을 만들었다(clonal transgenic parasites).

Transgenic DD-MyoA가 안정화되면 기생충 체내에 존재하는 TgMyoA가 지속적으로 감소되었다 (그림 10, A). 이는 Tetracycline-inducible system을 사용하여 TgMyoA의 과발현을 조절했을 때 유사한 실험이 보고되었고, 이것은 내부에 존재하는 TgMyoA가 관찰된 것과 같이 감소하는 것은 전사 후 이라고 추측해 왔다⁷. 그러나 DD 융합 시스템을 이용하여 실험한 결과 체내에 존재하는 TgMyoA가 전사 후가 아닌 번역 후에 조절되는 것임을 확인하였다.

이는 TgMyoA의 비정상적 과발현이, motor complex를 안정화시키는 myosin light chain (TgMLC)과 같은 결합 대상을 두고 체내의 TgMyoA와 경쟁관계로 놓인 것으로 보인다⁸. 단백질에 "tagging"은 단백질의 기능에 저해를 줄 가능성을 가지고 있으나, DD 서열 자체에 의해서는 단백질 기능에 영향을 끼치지 않는다.

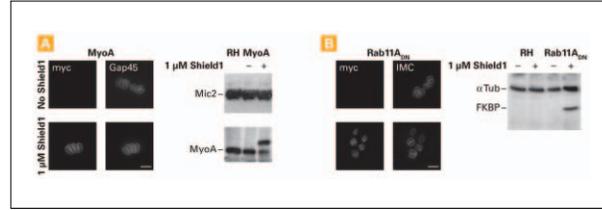


그림 10. Functional analysis of essential proteins using the ProteoTuner System. Immunofluorescence and Western blot analyses were performed on *T. gondii* parasite strains expressing DD-MyoA (Panel A) and DD-Rab11ADN (Panel B). Both visualization methods confirm that the DD fusion proteins are stabilized in the presence of Shield1. Immunofluorescence analyses were performed 4 hr after induction with Shield1, using monoclonal anti-myc (clone 9E10, Sigma) and either anti-Gap45⁹ or polyclonal anti-IMC1¹⁰. Scale bar, 10 μm. Western blot analyses using these antibodies were performed on the same parasite strains, grown in the presence or absence of Shield1 for 48 hr (DD-MyoA) or for two hr (DD-Rab11ADN) before analysis.

■ ProteoTuner 기술을 이용한 dominant negative 변이 실험

필수 유전자의 기능을 조사하기 위한 일반적인 접근방법은 dominant negative alleles의 과발현에 의한 표현형의 결과를 통한 검증이다. Dominant negative의 Shield1 의존적 안정화를 이용하여 small G protein인 Rab11A의 기능을 특징을 밝히기 위해 ProteoTuner™ System을 사용하였다.

TgRab11A (N126)의 dominant negative는 GTPase 도메인을 비활성화시킨다. DD-Rab11ADN을 안정적으로 트랜스펙션했을 때, 1 μM Shield1를 첨가한 후 2시간내에 Rab11ADN이 관찰되는 clonal 기생충을 분리하였다 (그림 10, B). RH 야생형(RHwt) 기생충과 비교하면 Shield1이 없을 때 성장 분석에서 정상적인 플라크 형성이 관찰되었다. 그러나, Shield1이 있을 때는 성장을 관찰할 수 없었고, 이는 dominant negative G protein의 발현이 기생충 성장에 유해한 것을 증명한다.

Rab11A가 세포내와 세포외 기생충에서 다른 역할을 하는지를 검증하기 위해, 빠른 유도조절 장점이 있는 ProteoTuner™ System을 이용하였다. 세포외 기생충을 Shield1이 첨가 또는 첨가되지 않은 채 20분간 미리 배양한 것을, 숙주세포에 침투하도록 3시간 동안 놓아 두었다. 그런 후 남아있는 기생충을 제거했다. 추가로 세포내 기생충을 Shield1이 첨가 또는 첨가되지 않은 채 16시간 동안 배양하고, 기생충의 침입과 복제를 분석하였다. 정상 RHwt 기생충은 Shield1으로 처리시 침입이나 복제에 저해를 받지 않은 반면, 세포외 기생충에서 DD-Rab11ADN의 안정화는 숙주세포로 침입하는 기생충의 침입력을 Shield1을 처리하지 않은 기생충에 비해 85% 이하로 감소시켰다(그림 11). 이는 Rab11A가 숙주세포로의 침입과 기생충의 세포내 번식(복제 또는 성숙)에 관여함을 알려준다. 이런 결과들은 Rab11A가 세포외와 세포내 기생충 모두에서 필수적임을 나타내고, 이러한 실험한 사용된 ProteoTuner™ System 기술이 세포외와 세포내 기생충의 단백질 기능을 분석하는데 사용될 수 있음을 보여준다.

ProteoTuner System - Technical Note 2

■ 톡소플라즈마 (*Toxoplasma gondii*) 에서 단백질 레벨의 신속한 조절 방법

Carolina Agop-Nersesian^{1,3}, Angelika Herm-Gotz^{1,3}, Sylvia Munter^{1,3}, Joshua S. Grimley², Thomas J. Wandless², Friedrich Frischknecht¹ & Markus Meissner¹

¹Hygieneinstitut, Department of Parasitology, University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 324, D-69120 Heidelberg, Germany.

²Department of Chemistry and Systems Biology, Stanford University, 269 Campus Drive, Stanford, California 94305, USA.

³These authors contributed equally to this work.

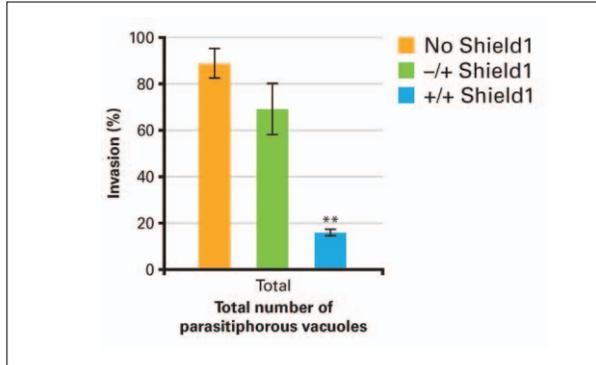


그림 11. Quantification of invasion and replication of parasite strain DD-Rab11ADN. Total number of parasitophorous vacuoles was determined. Mean values of three independent experiments ± s.d. are shown (?/+, parasites treated with Shield1 after invasion; +/-, parasites treated with Shield1 before and after invasion). Asterisks indicate a significant difference in total invasion between parasites not treated with Shield1 and parasites treated with Shield1 before and after invasion (P < 0.01, two tailed Student's t-test).

■ Apicomplexan 기생충 시스템에 적용 가능한 ProteoTuner™ 기술

DD 시스템이 *T. gondii*에 적용될 수 있었지만, 어떤 단백질들은 DD같은 tag로 결합되면 기능을 발휘하지 못할 경우도 있다. 가능성 있는 또다른 한계점은 모든 융합 단백질들이 프로테오솜에 의해 분해되지 않을 수도 있다는 점이다. 그러나 ProteoTuner 시스템의 빠른 유도조절은 세포외와 세포내 기생충의 단백질 레벨을 특이적으로 조절 가능하게 하고, 기생충의 라이프사이클 동안에 특정 프로세스를 정확하고 상세하게 기능 분석이 가능하다. 일반적으로 단백질 기능 분석을 위해 dominant negative 변이체를 이용한다. ProteoTuner 시스템을 사용하면 *T. gondii*에서는 이와 같은 dominant negative 변이체를 이용한 실험이 가능하며, 또한 *P. falciparum*⁽¹⁾에서도 적용 가능성이 있어 apicomplexans 연구에 범용적으로 적용될 가능성이 있다.

[참고문헌]

- 1) Heo, W.D., and Meyer, T. (2003). *Cell* 113(3):315-328.
- 2) Banaszynski, L.A., et al. (2006) *Cell* 126(5):995-1004.
- 3) Meissner, M, et al. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75(5):963-975.
- 4) Banaszynski, L.A, et al. (2006) *Cell* 126(5):995-1004.
- 5) Meissner, M, et al. (2002) *Science* 298(5594):837-840.
- 6) Soldati, D, & Boothroyd, J.C. (1995) *Mol. Cell Biol.* 15(1):87-93.
- 7) Meissner, M, et al. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(22):E115.
- 8) Herm-Gotz, A, et al. (2002) *EMBO J.* 21(9):2149-2158.
- 9) Gaskins, E, et al. (2004) *J. Cell Biol.* 165(3):383-393.
- 10) Mann, T, et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(43):41240-41246.
- 11) Armstrong, C.M, & Goldberg, D.E. (2007) *Nat. Methods* 4(12):1007-1009.
- 12) Herm-Gotz, A, et al. (2007) *Nat. Methods* 4(12):1003-1005. Erratum in: (2008) *Nat. Methods* 5(1):113.

ProteoTuner™ System 제품은 plasmid 또는 retroviral vector 그리고 Living Colors® Fluorescent Protein marker가 포함되거나 또는 포함되지 않은 총 4 종류의 형태로 판매되고 있다(표 1). Shield1은 시스템에 포함되어 있고, 별도로 구매가능하다.

표 1 : Six Single-Vector ProteoTuner™ Systems Now Available

System	TaKaRa Code	Vector Type	Antibiotic Resistance ¹	Fluorescent Protein
ProteoTuner™ System	632172	Plasmid	Kanamycin /G418	None
ProteoTuner™ IRES2 System	632168	Plasmid	Kanamycin /G418	AcGFP1
Retro-X™ ProteoTuner™ System	632171	Retroviral	Ampicillin /Puromycin	None
Retro-X™ ProteoTuner™ IRES System	632167	Retroviral	Ampicillin /None	ZsGreen1
Lenti-X™ ProteoTuner™ System	632173	Lentiviral	Ampicillin /Puromycin	None
Lenti-X™ ProteoTuner™ Green System	632175	Lentiviral	Ampicillin /None	ZsGreen1

¹ Bacterial/eukaryotic

ProteoTuner™ System Components (TaKaRa Code 632172)

- pPTuner Vector
- Shield1

ProteoTuner™ IRES2 System Components (TaKaRa Code 632168)

- pPTuner IRES2 Vector
- Shield1

Retro-X™ ProteoTuner™ System Components (TaKaRa Code 632171)

- pRetroX-PTuner Vector
- Shield1

Retro-X™ ProteoTuner™ IRES System Components (TaKaRa Code 632167)

- pRetroX-PTuner IRES Vector
- Shield1

Lenti-X™ ProteoTuner™ System (TaKaRa Code 632173)

- pLVX-PTuner Vector
- Shield1

Lenti-X™ ProteoTuner™ Green System (TaKaRa Code 632175)

- pLVX-PTuner Green
- Shield1

■ 관련제품군

제품명	Size	TaKaRa Code
Shield1	60 µl	631037
	200 µl	631038
Living Colors® DsRed Polyclonal Antibody	100 µl	632496
Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System	each	630930
Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression System	each	630934
Knockout™ Single Vector Inducible RNAi System	each	630933

※ License Notice [5] [7] [8]

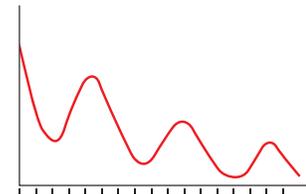
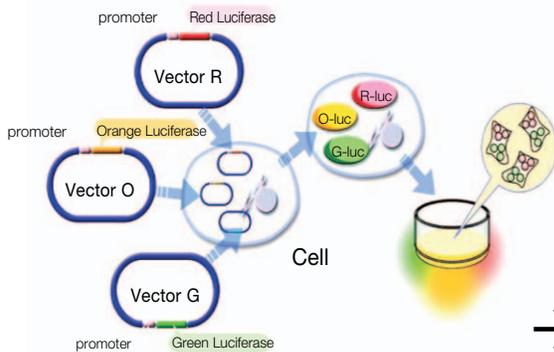
Real Time Gene Expression Measurement in Living Cells

ATTO AB-2550 Kronos Dio



- 광전자 증폭관을 검출기로 사용하는 Luminometer
- 35mm culture dish에 cell culture 하면서 유전자 발현을 수일~수십일에 걸쳐 일정시간 간격으로 monitoring 할 수 있는 Luminometer
- 내부는 장시간 배양이 가능하도록 공기순환방식에 의한 온도 control뿐만 아니라 CO₂ Sensor 부착으로 CO₂ 도입이 가능한 system
- 광학 filter가 내재되어 있어 발광색이 다른 luciferase 를 사용하여 최대 3종류의 유전자 발현을 monitoring 하는 Multi-color assay에 사용 가능
- Dual Luciferase assay, Repoter gene assay
- Promoter 전사활성 측정, 약물동태 연구 등

→ Kronos Dio를 이용한 측정과정



- 일정 간격으로 발광 측정
- 온도 및 CO₂ Control
- Filter 내장, 색분리 기능
- PC제어
- 배양조건 monitoring 가능 (온도, CO₂ 농도)

샘플제조

- Reporter Gene을 도입한 세포, 조직절편에 발광기질을 배양에 첨가한다.
- Kronos Dio에 culture dish를 set 한다.

Real Time 측정

- Kronos Dio 내부는 배양에 적합한 온도로 일정하게 보존 된다.
- CO₂ 의 도입도 가능하며, 일정 시간 간격으로 발광을 측정하고 target gene의 발현을 monitoring 한다.