

단백질 고발현과 정제를 위한 최적화된 클로닝과 정제법 Bacterial Expression and Purification Starter Kits

- 폭넓은 적용: His-tagged 단백질의 정제와 발현
- N- & C-terminal 6 x HN-tagged vector가 제품에 포함
- T7 lac promoter를 채용한 pET-based 단백질 고발현 벡터
- 다양한 클로닝과 정제 방법 선택 가능
- CEP kit를 이용하면 유전자를 쉽게 클로닝

Clontech의 Bacterial Expression and Purification Starter Kit 제품군은 pET-based vector를 기반으로 코딩된 N-, C-terminal 6xHN fusion tags를 이용하여 T7 lac promoter로부터 his-tagged 단백질을 고발현시킬 수 있다. 본 제품군은 IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) resin과 발현된 his-tagged 단백질의 정제에 필요한 buffer도 제공하고 있다. EP나 CEP Starter Kit를 이용하면 목적 단백질의 발현과 정제를 완벽하게 진행할 수 있다.

■ 제품 개요

목적 유전자를 pEcoli 발현 vector에 클로닝하여 *E. coli* 에 형질전환 시킨 후, 발현된 N- 또는 C-terminal-tagged 단백질을 His60 Ni Superflow Resin 또는 HisTALON Resin을 이용하여 효과적으로 정제할 수 있다. EP와 CEP Starter Kit는 필요한 resin에 따라 선택적으로 사용할 수 있고 다양한 buffer를 단백질 추출과 정제에 이용할 수 있다.

EP (Express & Purify) Starter Kits는 전형적인 제한효소 클로닝에 적합하도록 설계된 환상 벡터를 포함한 pEcoli Expression System으로 구성되어 있다. 이러한 vector는 MCS (multiple cloning site)를 클로닝에 사용할 수 있다.

CEP (Clone, Express & Purify) Starter Kits에는 선형화된 벡터와 클로닝에 필요한 In-Fusion enzyme으로 구성된 pEcoli Linear Expression System이 포함되어 있다. 이 시스템은 편리하고 일관성 있는 directional PCR cloning에 적합하며

업그레이드한 In-Fusion cloning 기술로 쉽게 6xHN-tagged 단백질 발현 시스템을 제작할 수 있다.

■ 쉽고 편리하게 N-, C-terminal tag를 만드는 EP/CEP 시스템

EP 시스템은 MCS를 포함하는 pEcoli Circular vector를 제공하기 때문에 클로닝 방법에 맞춰 제한효소 사이트를 선택할 수 있다(그림 2).

ATG codon으로 시작한 전사 과정은 TAA stop codon으로 종료된다.

제한효소 사이트를 필요에 따라 tag를 포함하거나 제거할 수 있도록 선택할 수 있다.

CEP 시스템은 선형화된 벡터와 클로닝에 사용되는 In-Fusion enzyme을 제공한다. 하얀 색으로 표시된 부분(그림 2)은 *Sal* I과 *Hind* III

를 이용하여 제거된 부분이다. CEP 시스템은 Clontech 최고의 기술인 In-Fusion cloning 이용하여 목적 유전자와 선형화된 벡터를 In-Fusion reaction 혼합물에 섞어주기만 하면 매우 쉽게 클로닝 된다. In-Fusion cloning 방법은 기존의 방법에 비해 다음과 같은 장점이 있다. 우선, 제한효소 처리과정이 필요없기 때문에 하루 정도의 시간을 절약할 수 있고, 목적 유전자에 염기가 추가되지 않아 목적단백질만을 발현할 수 있다. 또한 추가적인 클로닝 작업이 필요없기 때문에 시간과 비용을 절감할 수 있게 된다.

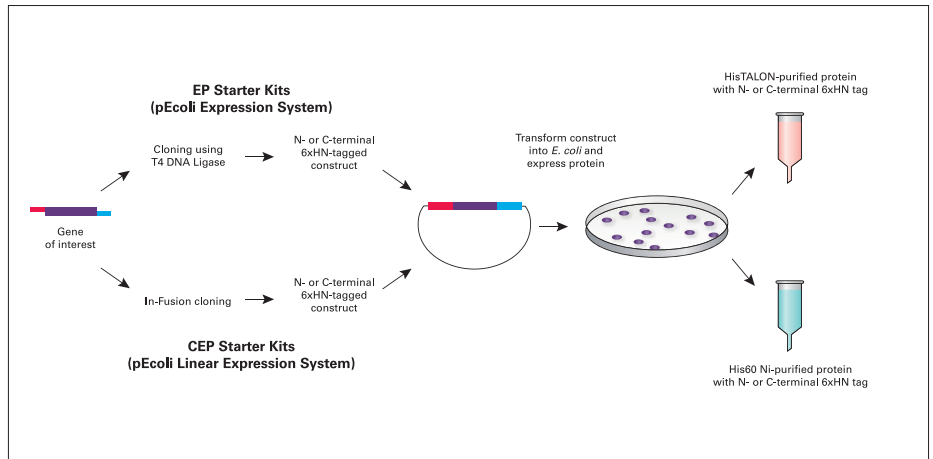


그림 1. Overview of the Bacterial Expression & Purification Protocol

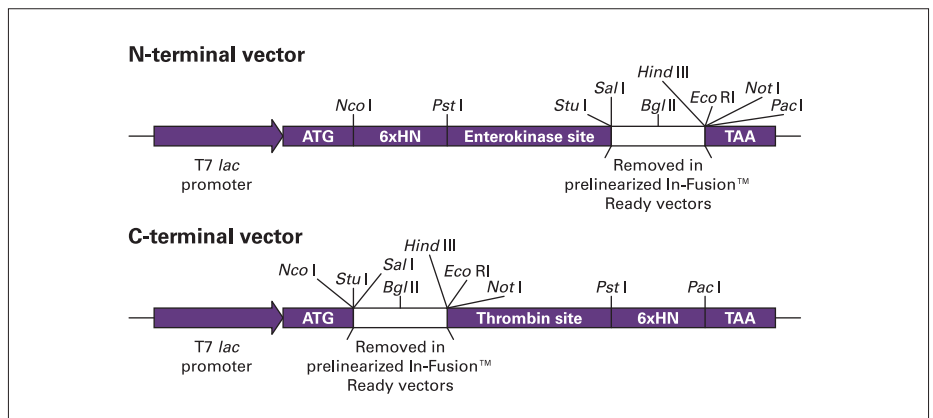


그림 2. Cloning options when using the EP and CEP Starter Kits. Features of the multiple cloning sites of our pEcoli Expression Vectors are shown (not to scale). Convenient restriction sites (indicated) allow inclusion or removal of tags as needed. The unshaded region is removed in our pEcoli Linear Expression Vectors using *Sal* I and *Hind* III restriction enzymes.

continued...

■ 최고의 순도를 위한 HisTALON 정제법

CEP TALON Starter Kit는 N-terminal 6xHN-tagged AcGFP1 (6xHN-AcGFP1), C-terminal 6xHN-tagged AcGFP1 (AcGFP-6xHN)을 발현 시키는 BL21 E. coli를 제작하는데 사용하였다. 발현된 단백질은 HisTALON Cartridge를 이용하여 정제하였다(그림 3). 고순도의 정제를 위한 시간은 단백질 당 24분 미만이 소요되고, 단백질 추출부터 희석까지의 소요시간은 총 1시간 미만이다.

■ 최고의 결합 능력을 가진 His60 Ni 정제법

신제품 His60 Ni Superflow resin은 최대 60mg/ml (6xHN-AcGFP1)의 정제에 의해 결합능력을 측정)의 매우 높은 결합 용량을 가진다(그림 4). His60 Ni Superflow의 flow rate는 Batch/gravity purification 방식이나 FPLC 방법을 사용하는 연구자들에게 제품에 대한 만족도를 높여 줄 것이다. 본 제품은 resin의 금속 이온 탈락을 최소화하였고, 동일한 단백질의 정제에 재사용이 가능하다.

■ 목적 단백질의 최상의 정제를 위한 선택

EP, CEP Starter Kit에는 벡터와 컨트롤, resin과 단백질 추출, 정제에 필요한 buffer가 포함되어 있다. pEcoli Expression System과 EP Starter Kit에는 환상벡터가, pEcoli Linear Expression System과 CEP Starter Kit에는 선형 벡터가 포함되어 있다. 세부적인 제품 가이드는 표1을 참조하십시오.

■ 참고문헌

1. Moffatt, B.A. and Studier, F.W. (1986) *J. Mol. Biol.* 189(1):113-130.
2. His60 Ni Superflow Resin—60 mg/ml Binding Capacity. (July 2009) *Clontechiques XXIV*(3):5.

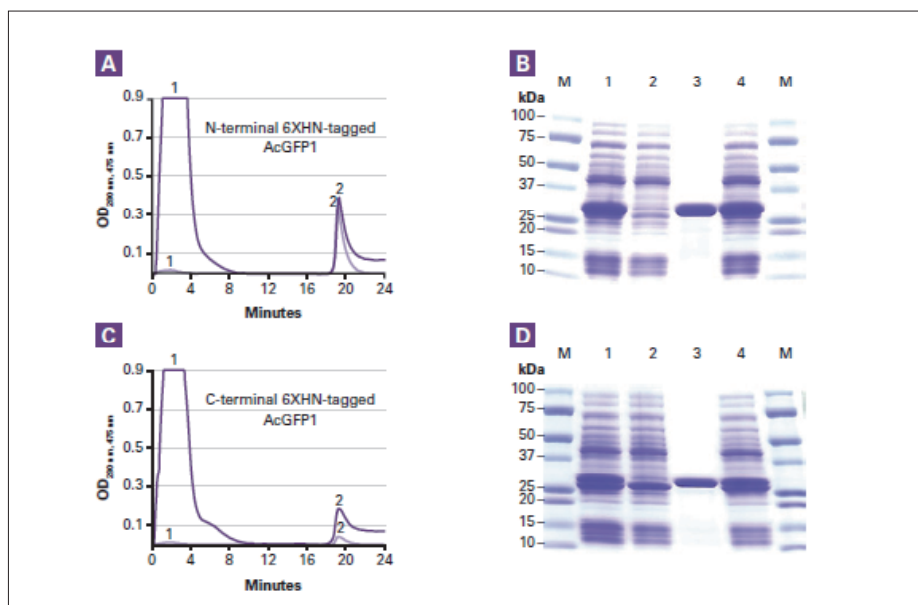


그림 3. Excellent purity is obtained when using HisTALON Cartridges for purification. The CEP Starter Kit was used to generate BL21 *E. coli* expressing N-terminal 6xHN-tagged AcGFP1, as seen in Panels A & B; and C-terminal 6xHN-tagged AcGFP1, as seen in Panels C & D. HisTALON Cartridges were used to purify the expressed proteins. The absorbance profiles at 280 nm (upper set of peaks) and fluorescence profiles at 475 nm (lower set of peaks) for each elution are shown in Panels A & C. Peak 1 is the nonadsorbed material, and Peak 2 is the eluted target protein. The SDS-PAGE analysis results (using a 4-20% gradient gel for each purification) are shown in Panels B & D. Lane 1: Starting BL21 *E. coli* extract, Lane 2: Nonadsorbed material, Lane 3: Eluted 6xHN-tagged AcGFP1, Lane 4: Starting BL21 *E. coli* extract, Lane M: Molecular weight marker.

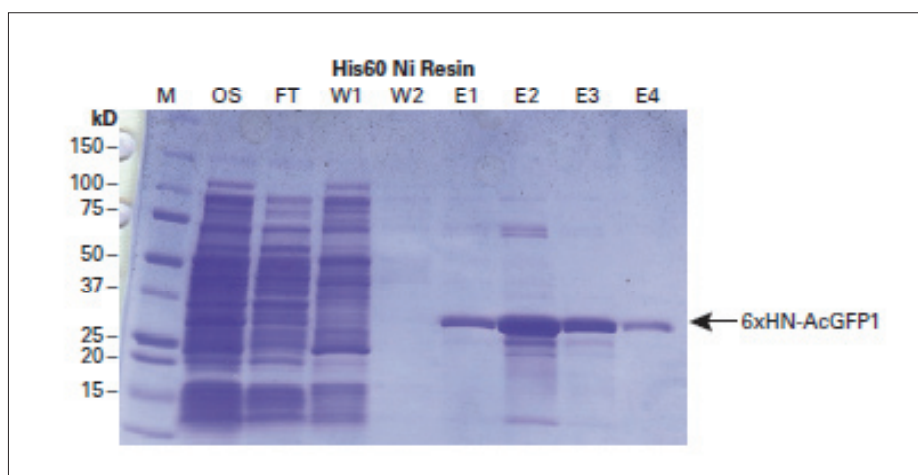


그림 4. Use His60 Ni Superflow for the highest binding capacity. The CEP His60 Ni Superflow Starter Kit was used to generate and purify 6xHN-AcGFP1. Lane M: Molecular weight marker, Lane OS: Clarified lysate with expressed 6xHN-AcGFP1, Lane FT: Nonadsorbed material, Lanes W1 and W2: Wash, Lane E1-E4: Eluted 6xHN-AcGFP1 fractions.

단백질 고발현과 정제를 위한 최적화된 클로닝과 정제법

Bacterial Expression and Purification Starter Kits

표 1. 목적단백질의 최상의 정제를 위한 제품 선택 가이드

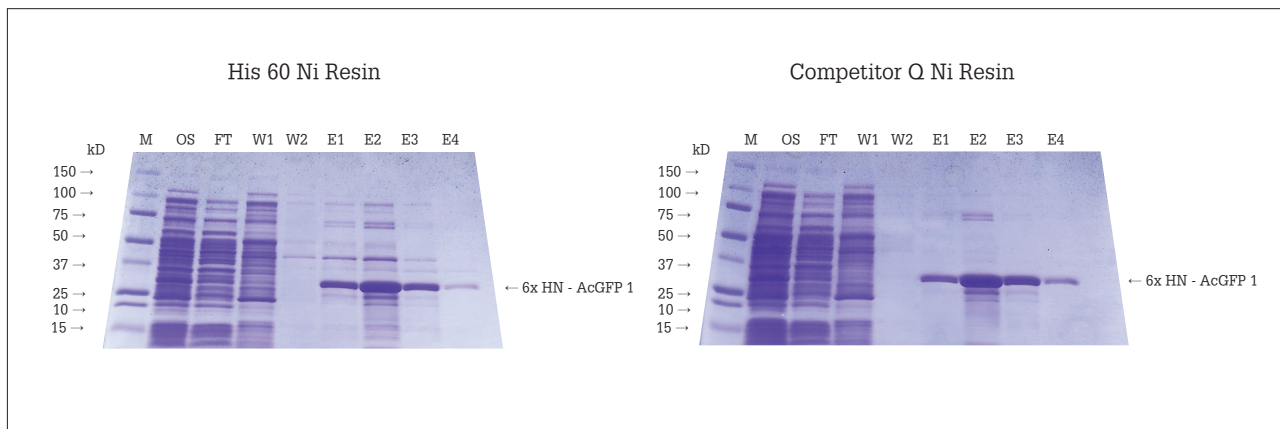
Product Name	Vectors	In-Fusion Mix	TALON Co Resin		His60 Ni Resin		Purification Method			Performance				
			Resin	Prepacked Resin	Resin	Prepacked Resin	Gravity-Flow	Batch	FPLC	Purity	Binding Capacity	Native Purification (with β ME) (pH Elution)		
Circular pEcoli Vectors														
pEcoli Expression System	○													
EP TALON Starter Kit	○		○				○	○			○○○	○	○○○	○○○
EP HisTALON Gravity Column Starter Kit	○			○			○				○○○	○	○○○	○○○
EP HisTALON Cartridge Starter Kit	○			○					○		○○○	○	○○○	○○○
EP His60 Ni Superflow Starter Kit	○				○		○	○	○		○○	○○○	○	○○
EP His60 Ni Gravity Column Starter Kit	○					○	○				○○	○○○	○	○○
Linear pEcoli Vectors														
pEcoli Linear Expression System	○	○												
CEP TALON Starter Kit	○	○	○				○	○			○○○	○	○○○	○○○
CEP HisTALON Gravity Column Starter Kit	○	○		○			○				○○○	○	○○○	○○○
CEP HisTALON Cartridge Starter Kit	○	○		○					○		○○○	○	○○○	○○○
CEP His60 Ni Superflow Starter Kit	○	○			○		○	○	○		○○	○○○	○	○○
CEP His60 Ni Gravity Column Starter Kit	○	○				○	○				○○	○○○	○	○○

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
pEcoli Expression System	each	631417
EP TALON Starter Kit	20 prep	631426
EP HisTALON Gravity Column Starter Kit	20 prep	631419
EP HisTALON Cartridge Starter Kit	20 prep	631421
EP His60 Ni Superflow Starter Kit	20 prep	631420
EP His60 Ni Gravity Column Starter Kit	20 prep	631416
pEcoli Linear Expression System	each	631418
CEP TALON Starter Kit	20 prep	631427
CEP HisTALON Gravity Column Starter Kit	20 prep	631423
CEP HisTALON Cartridge Starter Kit	20 prep	631424
CEP His60 Ni Superflow Starter Kit	20 prep	631425
CEP His60 Ni Gravity Column Starter Kit	20 prep	631422

* License Notice : [11], [12], [13], [14], [15]

His-Tagging된 단백질 정제가 필요할 때 His60 Ni Superflow Resin



(Superior yields and better purity were obtained when using His60 Ni Superflow for purification as compared to Competitor Q's Ni resin.)
Clontech's pEcoli Linear Expression System was used to express 6xHN-AcGFP1 in *E. coli*. Equivalent amounts of the same sample were used for comparing His60 Ni Superflow Resin purification (Panel A) with Competitor Q Ni Resin purification (Panel B). Lane M: Molecular weight marker, Lane OS: Original sample, Lane FT: Flowthrough, Lanes W1 and W2: Wash, Lane E1-E4: Eluted 6xHN-AcGFP1 fractions.

- His-Tagged 단백질을 최대 60 mg/ml 까지 결합
- Batch/gravity-flow 방식이나 FPLC를 이용한 단백질 정제에 적용가능
- Bacterial, mammalian, baculovirus-infected cell 등에서 발현된 다양한 샘플로부터 단백질을 one-step 정제
- 높은 결합 능력과 낮은 Ni 이온의 누수율

제품명	용량	TaKaRa Code
His60 Ni Superflow Resin	10 ml	635659
	25 ml	635660
	4 x 25 ml	635661
	250 ml	635662
	2 x 250 ml	635663
	4 x 250 ml	635664
His60 Ni Gravity Columns	5 columns	635657
His60 Ni Buffer Set	20 purifications	635665
His60 Ni Gravity Column Purification Kit	20 purifications	635658