

단백질 발현 관련 제품

단백질 발현은 쉬운 과정이 아니지만 단백질 발현과 folding을 도와주는 제품들을 이용하면 좀더 쉽게 진행할 수도 있다. 활성 단백질을 생산하는 과정 중에는 많은 저해요소들에 의해 영향을 받을 수도 있고 그 중 어떤 요소에 의해서는 목적 단백질의 발현이 저해되어 원하는 결과를 얻지 못하는 경우도 있다.

목적 단백질의 생산 과정은 크게 유전자 클로닝, 단백질의 발현, 정제와 특성 확인, 4가지 단계로 구성되어 있다. 각 단계는 기능적인 단백질을 충분한 양 생산할 수 있도록 최적화 할 수 있으며 마지막으로 단백질의 구조분석(NMR, X-ray crystallography)의 과정을 통해 분석할 수 있다. 본 고에서는 단백질 생산 과정을 좀더 효과적으로 진행할 수 있는 Takara의 제품들을 소개하고자 한다.

무세포 단백질 합성 시스템 Human Cell-Free Protein Expression System

- 인간세포주 유래의 세포 추출액을 이용한 무세포 단백질 합성 시스템
- IRES 서열을 통해 번역 증강인자를 이용해 합성량을 향상시킴
- 전사부터 단백질 합성까지 1개의 tube에서 실시
- 150 kDa 이상의 고분자량의 단백질 합성에 적용 가능

Human Cell-Free Protein Expression System(Code 3281)은 인간세포주 유래의 세포 추출액을 이용한 무세포 단백질 합성 시스템으로 전사부터 단백질 합성까지 1개의 tube에서 실시할 수 있다. 본 시스템은 글라이코실화(glycosylation), 지방의 아실화(fatty acylation)와 같은 번역 후 변형이 필요한 기능성 단백질을 고발현할 수 있다. 또한 150~200 kDa의 고분자량의 단백질에서도 적용할 수 있다.

본 제품에 포함된 cell lysate는 *in vitro* 단백질 합성에 필요한 각종 번역과 신장에 필요한 요소가 포함되어 있다. 따라서 cell lysate에 In-Fusion과 같은 클로닝 기술을 이용하여 목적 유전자를 삽입한 pT7-IRES vector와 T7 RNA Polymerase, Mixture-3(APT 등과 아미노산류), Mixture-2(번역 증강 인자)를 첨가하면 실험이 가능하다(그림 1). Human Cell-Free Protein Expression System을 이용한 *in vitro* 번역은 *in vivo* 시스템에서는 발현시키기 어려운 치명적인 독성단백질의 합성, 또는 *in vivo* 시스템에서는 단백질이 분해되거나 불용성인 단백질 생산에 유용하며 high-throughput 실험에도 적용할 수 있는 단백질 기능과 특성 연구에 매우 적합한 시스템이다. 또한 원핵생물을 숙주세포로 사용하는 발현과는 다르게 글라이코실화나 인산화 등의 번역 후 변형이 가능하다.

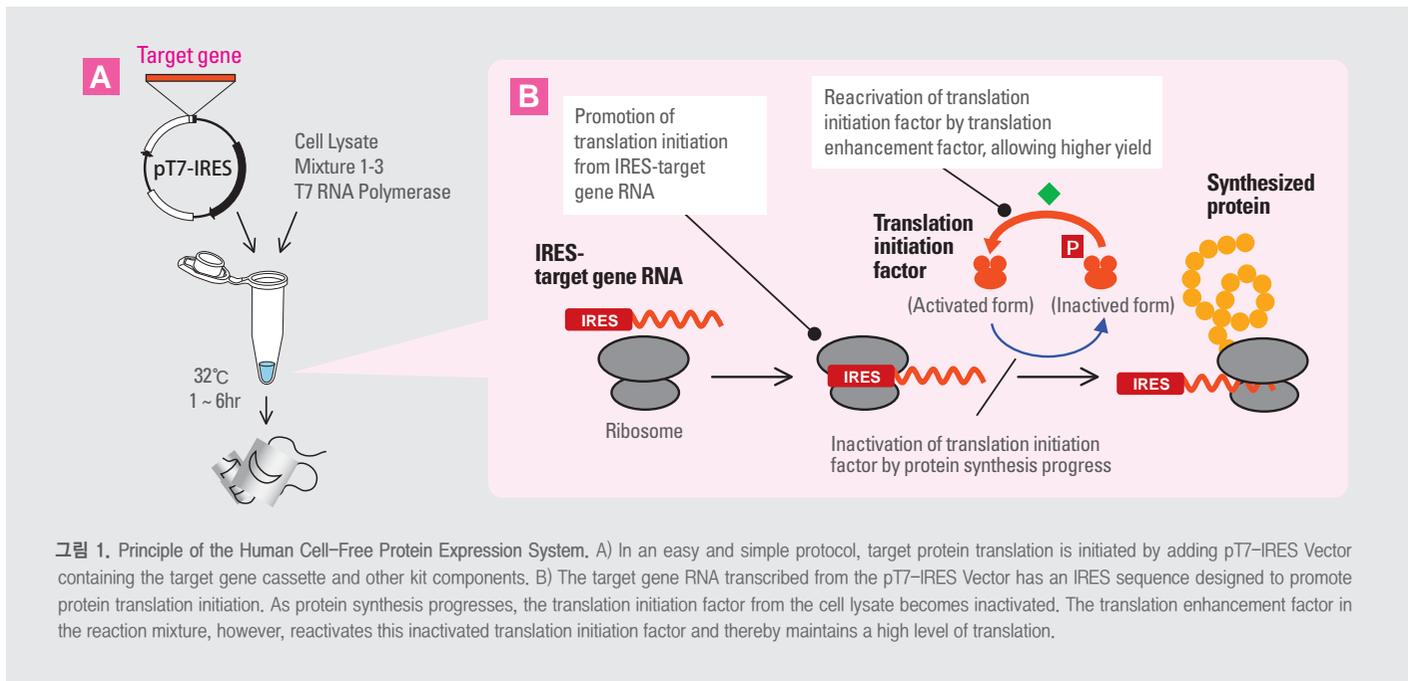


그림 1. Principle of the Human Cell-Free Protein Expression System. A) In an easy and simple protocol, target protein translation is initiated by adding pT7-IRES Vector containing the target gene cassette and other kit components. B) The target gene RNA transcribed from the pT7-IRES Vector has an IRES sequence designed to promote protein translation initiation. As protein synthesis progresses, the translation initiation factor from the cell lysate becomes inactivated. The translation enhancement factor in the reaction mixture, however, reactivates this inactivated translation initiation factor and thereby maintains a high level of translation.

Code	제품명	용량	프로모터	정제 Tag	Tag 절단
3281	Human Cell-Free Protein Expression System	10 회	T7	-	-
3290	pT7-IRES His-N DNA	20 µg	T7	His	Factor Xa
3291	pT7-IRES His-C DNA	20 µg	T7	His	-
3292	pT7-IRES Myc-N DNA	20 µg	T7	Myc	-

단백질 대량 분비 발현 시스템 Brevibacillus Expression System

- 분비형 단백질이나 다양한 효소 등의 효율적인 발현
- 숙주의 protease 유전자 억제로 목적 단백질이 분해되지 않고 배지로 분비
- 대장균과 달리 균체내 독성(endotoxin)을 만들지 않음
- 활성단백질이 생산되며 배양과 취급 및 살균이 용이

*Brevibacillus choshinensis*는 단백질을 대량 발현하는 능력이 있는 그람양성 균주로 *Brevibacillus* Expression System II(Code HB200)를 이용하면 목적 단백질을 분비되는 형태로 효과적으로 생산할 수 있다. 이 시스템은 활성 단백질을 대량 생산할 수 있고 일반적으로 진행생물의 단백질에 필요한 disulfide bond의 형성이 가능하기 때문에 진행생물의 단백질 발현에 매우 적합하다. 또한 protease에 의한 단백질의 손상이 거의 없다. 표 1에서는 다양한 생물 유래 효소와 단백질이 효과적으로 발현된 것을 확인할 수 있다.

*B. choshinensis*는 세포질에서 가용성 단백질로 생산되는 세포내 단백질의 생산에 적합한 매우 뛰어난 숙주이다. 또한 히스티딘 태그(His-tag)를 포함한 pNC-HisE, pNC-HisF, pNC-HisT, pNI-His vector를 사용하면 목적 단백질을 효과적으로 정제할 수도 있다.

표 1. Examples of protein expressed using *B. choshinensis* expression system

Protein	Origin	Production(g/L)
Enzymes		
Alpha-Amylase	<i>B. licheniformis</i>	3.7
Sphingomyelinase	<i>B. cereus</i>	3.0
Xylanase	<i>B. halodurans</i>	0.2
CGTase	<i>B. macerans</i>	1.5
Chitosanase	<i>B. circulans</i>	1.4
Hyperthermophilic protease	<i>A. pernix</i>	0.1
Hyperthermophilic nuclease	<i>P. horikoshii</i>	0.7
PDI	Human	1.0
Antigens		
Surface antigen	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9
Surface antigen	<i>T. pallidum</i>	0.8
Cytokines		
EGF	Human	1.5
IL-2	Human	0.6
NGF	Mouse	0.2
IFN- γ	Chicken	0.5
TNF- α	Cow	0.4
GM-CSF	Cow	0.2
GH	Flounder	0.2

Code	Vector Name	Vector Type E	Expression Vector	Lac Operator	His-Tag	Sec Signal Peptide	Construct in	Protease Cleavage site	X-terminator
HB200	<i>Brevibacillus</i> Expression System II	-	-	-	-	-	-	-	-
HB123	pNC-HisE (5,263 bp)	Shuttle Vector	Secretory	Yes	Yes	Yes	<i>E. coli</i>	Enterokinase	No
HB121	pNC-HisT (5,260 bp)	Shuttle Vector	Secretory	Yes	Yes	Yes	<i>E. coli</i>	Thrombin	No
HB122	pNC-HisF (5,260 bp)	Shuttle Vector	Secretory	Yes	Yes	Yes	<i>E. coli</i>	Factor Xa	No
HB132	pNI-His DNA (5,079 bp)	Shuttle Vector	Intracellular	Yes	Yes	No	<i>E. coli</i>	Enterokinase	No
HB131	pNI DNA (5,055 bp)	Shuttle Vector	Intracellular	Yes	No	No	<i>E. coli</i>	No	No
HB111	pNY326 (3.4 Kb)	Expression	Secretory	No	No	Yes	<i>Brevibacillus</i>	No	Yes
HB112	pNCMO2 (5.2 kb)	Shuttle Vector	Secretory	No	No	Yes	<i>E. coli</i>	No	Yes
HB114	pNY326-BLA	Positive Control	Secretory	Includes a gene encoding <i>Bacillus licheniformis</i> α -amylase (55 kDa)					
HB116	<i>Brevibacillus</i> Competent Cells	-	-	-	-	-	-	-	-

License Notice [L39]

가용성의 분비형 단백질 발현에 최적 *B. subtilis* Secretory Protein Expression System

- 재조합 단백질의 가용화 발현과 분비 발현에 뛰어남
- 중.대형 배양 조건으로 스케일업할 때 숙주 적응 용이
- disulfide (S-S) bond를 가진 단백질과 같이 복잡한 구조의 단백질 발현에 적합
- 재조합 단백질 정제가 용이함

Code	제품명	용량
3380	<i>B. subtilis</i> Secretory Protein Expression System	10 회

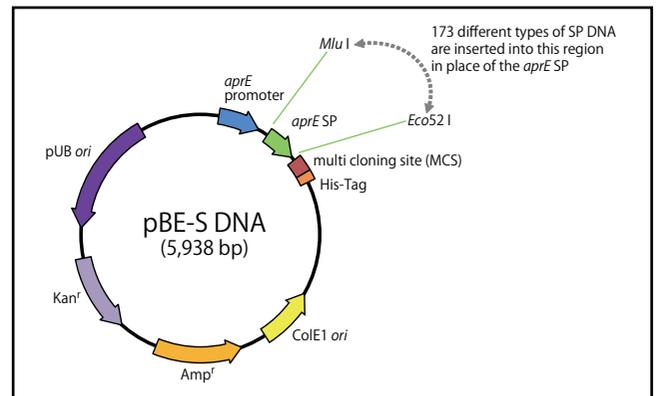


그림 1. Vector map for pBE-S DNA, a *B. subtilis*/*E. coli* shuttle vector used with the *B. subtilis* Secretory Protein Expression System.

높은 발현 효율과 가용성 단백질 생산 대장균 Cold Shock 발현 시스템 – pCold 시리즈

- 배양액을 15°C로 냉각하는 것만으로 효율적으로 발현 유도
- 기존 대장균 발현시스템에 비해 단백질 생산 효율과 가용성 향상
- 다양한 대장균 선택이 가능하며 여러 종류의 vector 중 선택 가능

Cold Shock 발현계는 37°C로 배양하던 대장균의 배양 온도를 저온으로 옮기면, 생육이 일시적으로 정지하여 대부분의 숙주 단백질의 발현은 감소하지만 Cold Shock Protein으로 불리는 CSPs는 특이적으로 증가한다. 이 기작을 이용해 다카라바이오와 미국 뉴저지의대 치과대학의 Masayor Inouye 교수의 공동 연구를 통해 cold shock expression vector 「pCold시리즈」가 개발되었다. 기존 대장균 발현 시스템보다 목적 단백질을 고효율, 고순도로 얻을 수 있다.

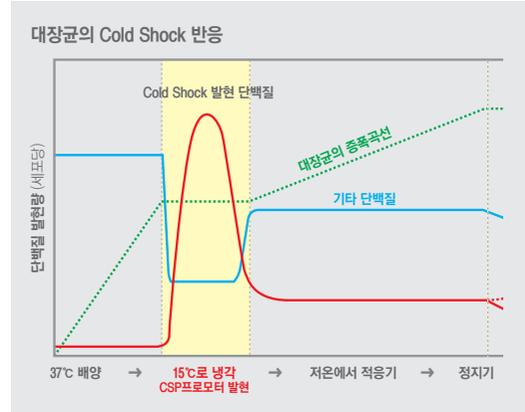


그림 1. 대장균의 cold shock 반응

Code	제품명	용량	GenBank Accession No.	Trigger Factor ¹	ProS2 Tag ¹	TEE 서열 ²	His Tag	Factor Xa 절단 서열
3365	pCold TF DNA	25 µg	AB213654	○	-	-	-	-
3371	pCold ProS2 DNA	25 µg	-	-	○	○	○	○
3361	pCold I DNA	25 µg	AB186388	○	-	○	○	○
3362	pCold II DNA	25 µg	AB186389	○	-	-	○ ³	○ ³
3363	pCold III DNA	25 µg	AB186390	○	-	-	-	-
3364	pCold IV DNA	25 µg	AB186391	○	-	-	-	-
3360	pCold Vector Set	pCold I-IV 각각 5 µg						

¹: 가용화 태그 ²: TEE 서열 : translation enhancing element의 약자. 번역을 촉진하는 기능. ³: Thrombin, HRV 3C Protease 절단 서열도 포함.

License Notice [L13a, L43, M9, M10]

단백질 가용화를 위한 Refolding CA Kit

제조합 단백질을 발현시켰을 때 불용화 inclusion body가 축적되는 경우 단백질 활성 회복을 위해 요소나 guanidine과 같은 변성제로 inclusion body를 unfolding 시킨 후 투석이나 희석을 통해 변성제를 제거하여 refolding 시키는 방법이 일반적이다. 그러나 이런 refolding 방법은 많은 시간과 노력이 소요되고 효율이 낮은 경우가 많다. 본 Refolding CA Kit(Code 7350)은 새로운 인공 샤페론chaperon 기술을 채용하여 2단계 과정을 통해 최적화된 inclusion body 단백질의 refolding 조건을 찾을 수 있다. Cycloamylose(CA)를 첨가하면 단백질과 계면활성제의 복합체에서 계면활성제가 제거되고 단백질이 고차구조로 refolding 한다(그림 1).

Code	제품명	용량	개요
7350	Refolding CA Kit	25 회	Inclusion Body의 Refolding 조건 검토에 최적 Kit
7351	Refolding CA Large Kit	1 Kit	Refolding CA Kit로 조건 검토를 한 후 scale up하여 refolding 조작

References

1. Machida, S., et al. (2000) *FEBS Lett.* 486(2):131-135.
2. Sundari, C.S., et al. (1999) *FEBS Lett.* 443(2):215-219.
3. Daugherty, D.L., et al. (1988) *J. Biol. Chem* 273(51):33961-33971.

License Notice [L22, L23]

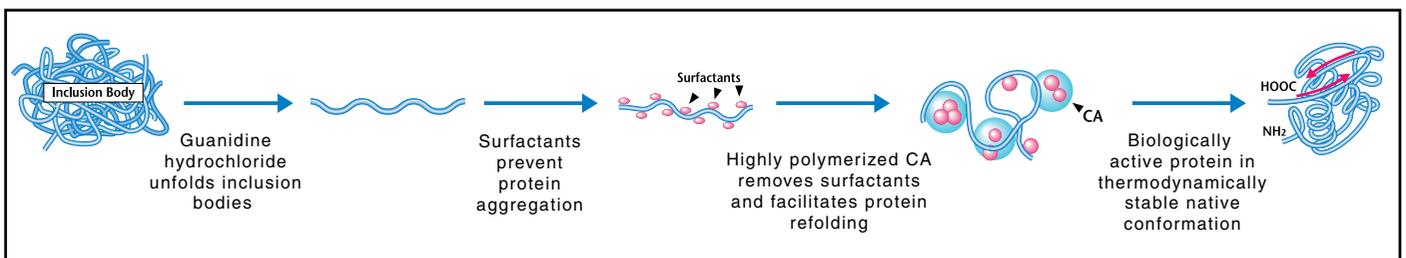
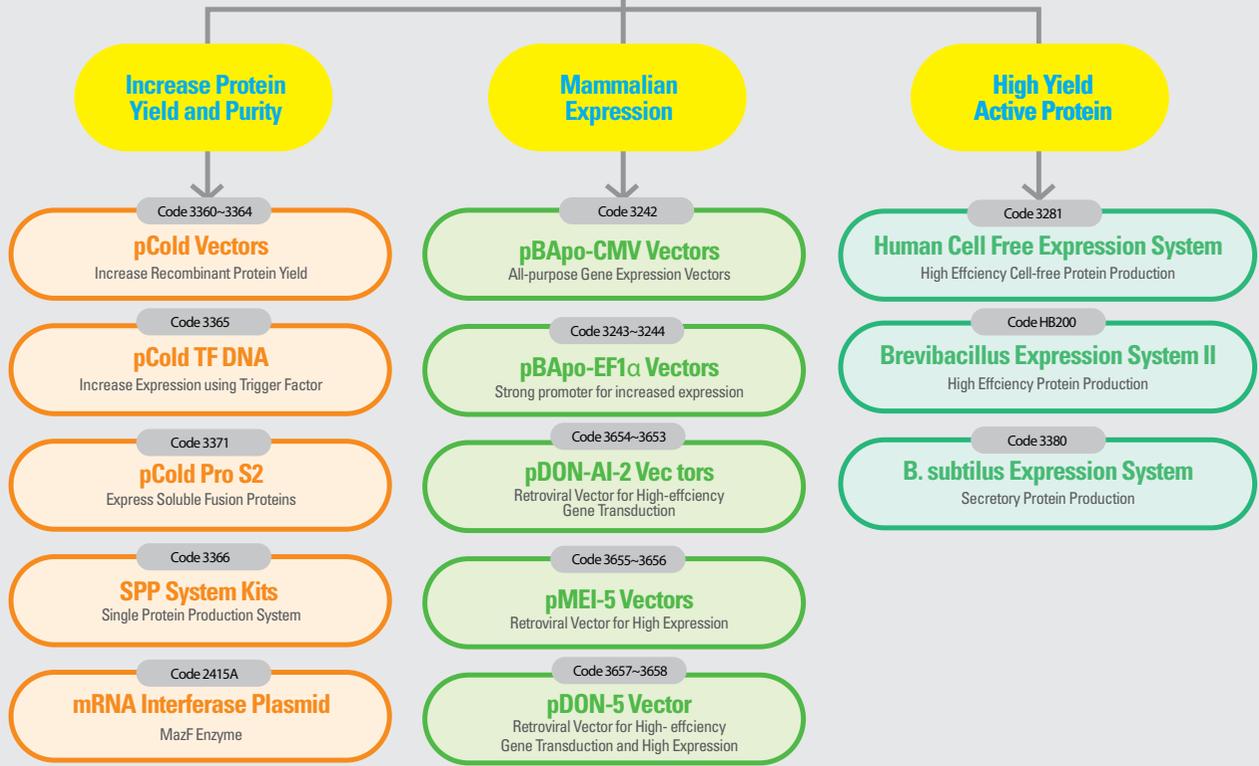


그림 1. Principle of the Refolding CA Kit

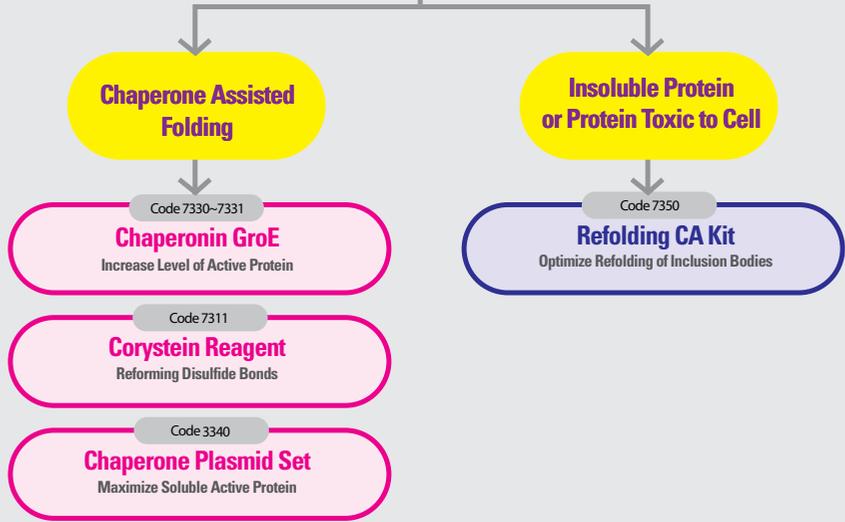
Takara's Protein Products



Protein Expression Products



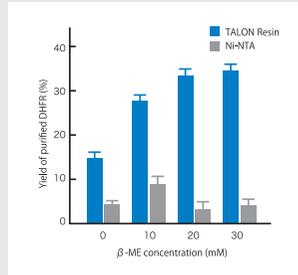
Protein Folding Products



His-tag된 단백질의 고순도 정제 TALON - Co²⁺ Resin 시리즈

- Histidine에 특이성이 높은 Co²⁺ resin 사용으로 비특이적 결합이 적어 고순도 정제 가능
- 금속이온의 탈락이 거의 없어 비특이적 단백질 오염 적음
- 생물학적 활성이 있는 목적 단백질의 회수율 극대화
- 다양한 정제 조건의 적용이 가능 - 6M guanidine 적용 가능

TALON Resin는 비변성 조건에서도 안정적으로 흡착



β-ME에서 TALON Resin과 Ni-NTA를 이용해 세포 추출물로부터 6×His DHFR을 정제하였다. TALON Resin은 비변성 조건에서도 안정적으로 흡착하여 높은 정제 효율을 보인다.

Code	제품명	용량	Resin	충전 columns / Cartridge	Buffer (lysis/wash/elution)
635502	TALON Metal Affinity Resin	25 ml	●		
635503		100 ml	●		
635506	TALON Superflow Metal Affinity Resin	25 ml	●		
635507		100 ml	●		
635655	HisTALON Gravity Columns	1 ml×5		●	
635654	HisTALON Gravity Columns Purification Kit	1 kit		●	●
635650	HisTALON Superflow Cartridges	1 ml×5		●	
635683	HisTALON Superflow Cartridges	5 ml		●	
635682	HisTALON Superflow Cartridges	5 ml×5		●	
635649	HisTALON Superflow Cartridge Purification Kit	1 Kit		●	●
635681	HisTALON Superflow Cartridge Purification Kit	1 Kit		●	●

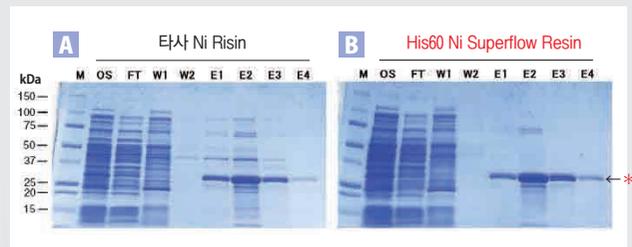
License Notice [K44]

His-tag된 단백질의 고효율 정제 His60 Ni - Ni²⁺ Resin 시리즈

- Ni²⁺ Resin 중 최고의 binding capacity (60 mg His-tagged protein/ml Resin)
- Batch/gravity flow 적용 제품과 FPLC 적용 제품, 모두 보유
- 변성 또는 비변성 조건으로 사용 가능

pEcoli Linear Expression System를 이용하여 6×HN tagged AcGFP1 단백질을 발현시켰다. 타사 동등 제품(패널 A)과 Clontech의 His60 Ni Superflow Resin(패널 B)를 각각의 추천 조건으로 6×HN tagged AcGFP1 단백질이 동량 포함된 샘플을 정제했다. His60 Ni Superflow Resin으로 정제시 더 높은 순도로 단백질을 정제했다.

His60 Ni Superflow Resin은 높은 수율 정제가 가능!



M : 분자량 마커
OS : original sample
FT : flow sample(로딩 후 획득되는 샘플)

W1, W2 : Wash
E1-E4 : Elution
* 6×HN-AcGFP1

Code	제품명	용량	Resin	충전 columns / Cartridge	Buffer (lysis/wash/elution)
635660	His60 Ni Superflow Resin	25 ml	●		
635661		25 ml x 4	●		
635657	His60 Ni Gravity Columns	1 ml x 5		●	
635658	His60 Ni Gravity Columns Purification Kit	1 kit		●	●
635675	His60 Ni Superflow Cartridges	1 ml x 5		●	
635680	His60 Ni Superflow Cartridge	5 ml x 1		●	
635679	His60 Ni Superflow Cartridges	5 ml x 5		●	

UV Transilluminator에서 2분이면 Protein Band 확인 가능 Western Blot 실험 – nUView Precast Gel 시리즈

nUView precast gel은 자외선에서 2분만 노출시키면 단백질밴드를 눈으로 확인할 수 있어(그림 1) 기존 SDS-PAGE로 전기영동 후 Coomassie Brilliant Blue(CBB)로 염색/탈색의 과정에 소요되는 시간을 단축할 수 있으며 nUView precast gel에서 확인된 단백질을 western blotting이나 MALDI/TOF 분석과 같은 다음 실험에 곧바로 이용할 수 있는 장점이 있다. Gradient gel(8~16%, 4~20%)과 일반 gel(8%, 10%, 12%)로 구분되며, 각각 10-well, 12-well, 15-well 또는 17-well 형태로 판매하고 있다. 4°C에서 최장 18개월간 보존할 수 있다.

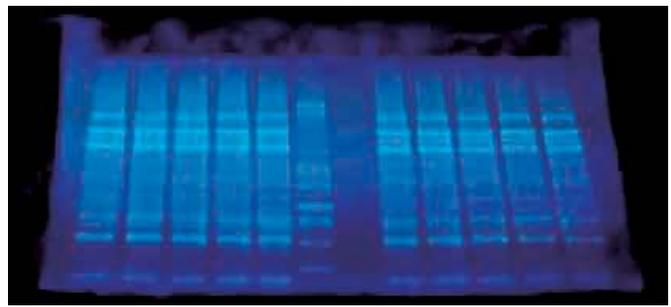
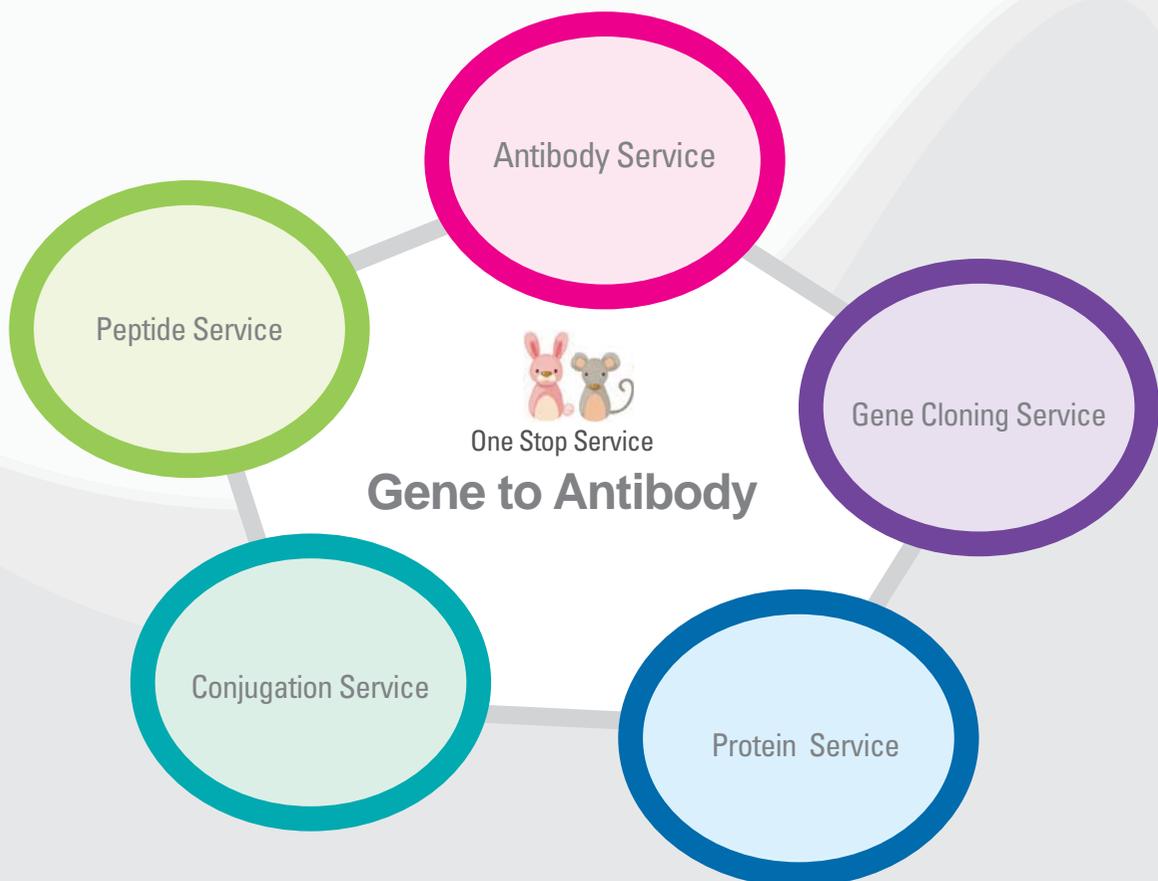


그림 1. 2 minutes visualization under UV light

Code	제품명	용량	개요
NN10-010	nUView Precast Gel, NN Cassette, 10%, 10well	10 packs	10% gel Life Technologies Tank 적합
NN10-420	nUView Precast Gel, NN Cassette, 4-20%, 10well	10 packs	4-20% Gradient gel
NB10-010	nUView Precast Gel, NB Cassette, 10%, 10well	10 packs	10% gel Bio-Rad Tank 적합
NB10-420	nUView Precast Gel, NB Cassette, 4-20%, 10well	10 packs	4-20% Gradient gel

항체 제작 서비스도 다카라코리아와 함께~





Protein Transfection Reagent

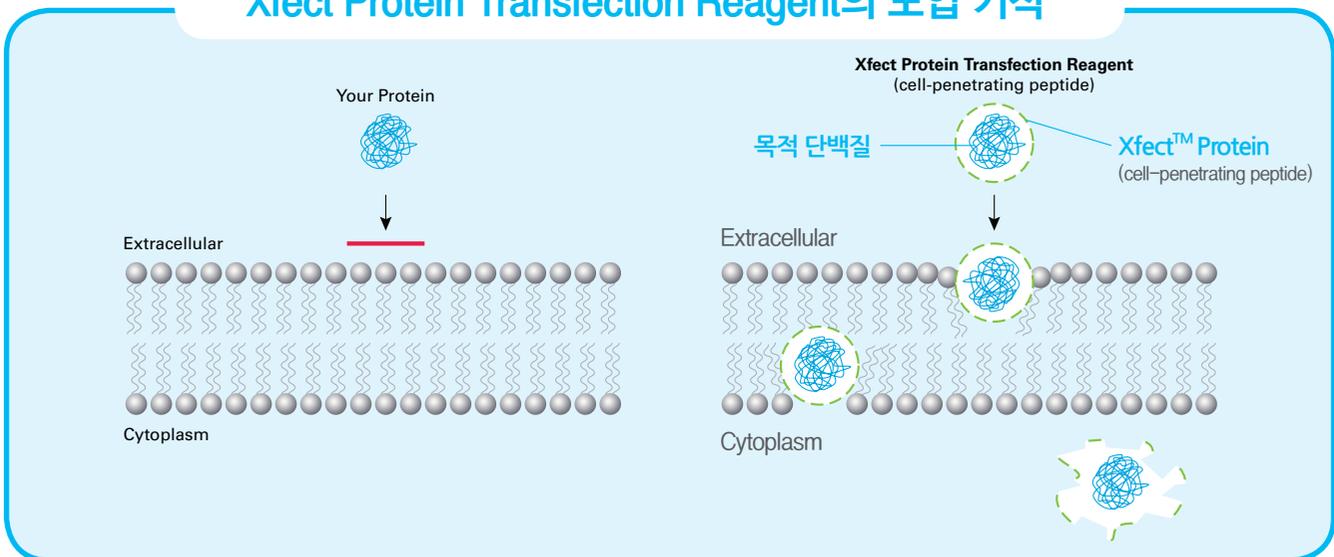
Xfect Protein Transfection Reagent

- Faster than DNA transfection, because it bypasses transcription & translation
- Ideal for studying transient effects of proteins
- Avoids potentially harmful, random DNA integration into target cells' genomes

Code	제품명	용량
631323	Xfect Protein Transfection Reagent	30 rxns
631324		100 rxns



Xfect Protein Transfection Reagent의 도입 기작



Xfect Protein Transfection Reagent는 세포 투과성 펩티드(CPP ; cell-penetrating peptide)를 채용해 단백질의 활성을 유지한 상태로 고효율로 포유류세포로 도입할 수 있다.