

Product News Letter 6호



Main Features of Overlap Cloning Kits

- No Restriction/Ligation (homologous recombination based)
- High Cloning Efficiency (>95%)
- Easy-to-handle Protocol (only one PCR is needed)
- No Additional Bases and Amino Acids in Final Vector Constructs
- Best Choice for High-throughput Cloning
- Rapid Pilot Study for Selection of Fusion Tag of Your Protein Expression

User's Guide for

Brickworld of Overlap Cloning : Fusion Protein Expression Vector Kits

- ✓ 제품 개발의 필요성
- ✓ 원리와 키트의 구성
- ✓ 사용 방법
- ✓ 실험 예
- ✓ 자주하는 질문



고객상담전화

042-581-8448

(주)엘피스바이오텍은 단백질
전문 생명공학 기업입니다

제품 개발의 필요성

1. 깔끔한 유전자/단백질 서열의 중요성

뉴스레터 4호 에서 소개한 **Overlap Cloner** 방식을 이용한 유전자 **cloning** 방법은 사용의 간편함을 두 번째로 돌릴 만큼 더 큰 장점을 가지고 있습니다. 그것은 기존의 **restriction/ligation** 방식으로 **cloning**한 유전자를 이용해 단백질을 발현하여 정제하다 보면 예상치 못한 결과들을 얻게 되는 경우가 많은데 **Overlap Cloning** 방식을 이용하면 이와 같은 문제점들을 깔끔히 해소할 수 있다는 것입니다.

Cloning 용 **vector**들은 물론 **expression** 전용 **vector**들의 경우에도 **MCS (multi cloning site)**에는 다양한 제한효소자리가 존재하며 실험자는 내 유전자에 적합한 제한효소 자리를 선정하기 위해 많은 시간과 노력을 투자하고 합니다. 특히나 단백질을 발현하는 경우라면 아미노산의 **coding** 순서를 맞춰야 하기 때문에 고민의 끝은 더 깊어지기 마련인데 어렵게 제한효소 자리를 선정하고 또한 **coding frame**까지 맞춰 발현을 했다 하더라도 이러한 재조합 **DNA**로부터 만들어지는 단백질들은 양 말단에 **MCS**로부터 유래하는 제한효소자리의 서열이 추가로 붙게 되어 깔끔하지 못한 단백질이 됩니다. 적게는 서너 개에서 많게는 수십 개의 아미노산들이 내 단백질에 추가됨으로써 발현을 하더라도 활성이 사라지는 등 예상치 못한 특성을 보일 수 있는 단점을 가지게 되는 것입니다.

이러한 이유로 인해 **100% native** 서열만으로 구성된 유전자와 이로부터 어떤 군더더기 서열도 없는 단백질을 만들어 낼 수 있는 **vector**를 디자인하여 제조한다는 것은 그 시작부터 무척이나 어려운 일로 인식되어 온 것이 사실입니다.

지난 20 여 년간 이와 같은 문제점을 해결하고자 다양한 원리의 **LIC (ligation independent cloning)** 방법들이 개발되어 소개되어 왔으나 그 방법이 기존의 것에 비해 조금 더 간단해졌다는 것 외에는 **vector**나 **insert DNA**를 준비하는 과정이 기존의 방법과 별반 다르지 않고 또한 군더더기 서열이 필연적으로 포함될 수밖에 없는 까닭에 그 어떤 방법들도 보편적인 방법으로는 자리매김하지 못했습니다. 이러한 이유로 인해 사용이 간편하면서도 또한 **vector** 서열을 내 마음대로 재단할 수 있어서 단 한 개의 군더더기 서열 없이도 내 유전자를 자유로이 **cloning**할 수 있는 방법의 필요성이 더 절실했습니다.

이번 뉴스레터에서는 대장균 발현용으로서 각종 **fusion protein** 들을 발현하는 **vector**들을 디자인하여 준비하고 **Overlap Cloning** 방법을 이용해서 유전자를 군더더기 서열 없이 그리고 아주 쉬운 조작만으로도 재조합 할 수 있는 방법과 이를 이용한 키트에 대해 소개하고자 합니다.

2. 다양한 발현 vector의 사용과 subcloning의 간편화 필요성

단백질을 발현하여 정제하다 보면 다른 종류의 **fusion protein**들을 사용할 필요성이 생기곤 합니다. 발현율이 낮다거나 또는 발현은 많더라도 **insoluble**로 발현한다거나, 마땅한 정제방법이 없는 경우에, 발현율을 높일 수 있고 **solubility**를 개선할 수 있으며 **affinity** 정제가 가능한 **fusion protein**들의 사용을 고려하게 됩니다. 이와 같은 경우에 있어서, 새로운 **fusion vector**로 내 유전자를 옮기는 일은 **cloning** 작업을 처음부터 다시 시작하는 것과 별반 차이를 보이지 않고 합니다. 발현 **vector**의 제한효소자리를 찾아 내 유전자를 넣을 수 있는지 확인해야 하고 또한 **coding frame**이 맞는지의 여부도 확인하는 과정을 꼭 거쳐야만 합니다. **pET** 시리즈의 발현 **vector**들처럼 **MCS** 부위와 **coding frame**이 여러 **vector**들의 많은 부분에서 일치하게 디자인한 경우라면 **subcloning** 작업이 다소 쉬워질 수는 있겠지만 **coding frame**을 맞추는 일은 여전히 귀찮고 어려운 일일 수 밖에 없습니다. 같은 **vector**를 **coding frame**에 따라 **a, b, c vector**로 나누어 별도로 판매하는 일이 아이러니로 느껴질 수 밖에 없지만 어쩔 수 없는 현실이었습니다.

MCS의 구조가 전혀 다른 종류의 발현 **vector**를 사용해야 하는 상황이라면 차라리 **PCR primer**를 다시 디자인해서 **cloning**을 처음부터 다시 하는 것이 더 편한 선택일 수도 있습니다. 물론 **Gateway cloning** 방법과 같이 **recombinase** 방식으로 **subcloning**을 쉽게 할 수도 있겠지만 앞서 언급했듯이 **Gateway** 방식은 **site-specific recombinase**를 사용하는 방식이어서 **recombination**에 필요한 핵심서열들이 결국은 불필요한 군더더기 서열이 될 수 밖에 없는 단점을 가질 수밖에 없습니다.

Overlap Cloning 방식은 단 한번의 **PCR**로 준비한 **DNA**를 전혀 다른 종류의 **vector**들에 동시다발적으로 **cloning**할 수 있는 편리함을 보장해 주고 있으며 제한효소자리를 찾거나 제한효소 자리 내에서 **coding frame**을 맞추거나 하는 불필요한 작업을 없앤 혁신적인 **cloning** 방법이라 감히 말할 수 있습니다. 이는 대장균 발현 **vector**들에만 국한되는 내용은 아니며 **mammalian vector**들은 물론 **viral vector**나 **yeast vector** 등 **DNA** 서열을 가진 것이라면 어떤 것이든 모두 적용되는 사항입니다.

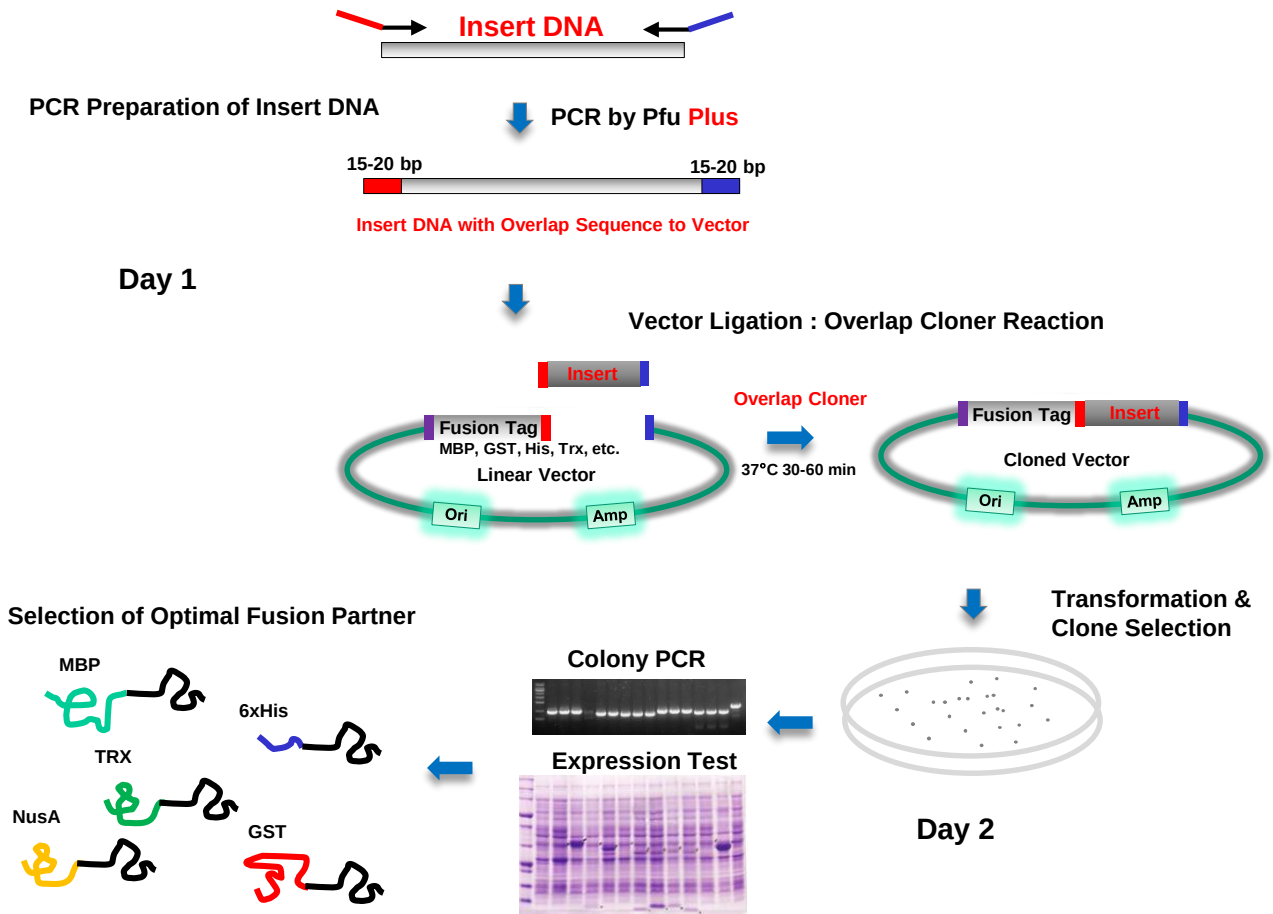
단백질의 발현율을 개선하고 또한 발현 단백질의 **solubility** 개선에 도움이 된다고 알려진 **fusion protein**들은 그 종류가 수십 가지가 넘으며 그 숫자는 현재도 계속 증가하고 있습니다. 단백질을 발현하고 정제 하다 보면 발현이 전혀 되지 않거나 발현산물의 세포독성으로 인해 대장균이 죽는 일은 다반사입니다. 발현은 되더라도 모두 **insoluble**의 불활성화 단백질로 쌓여 정제가 불가능한 경우를 만나게 되는 경우도 많으며 이런 상황을 접하게 되면 실험자는 깊은 좌절을 경험하고 합니다. 이때 생각해 볼 수 있는 유일한 해결책은 다른 **fusion protein**의 사용이지만 내 입맛에 딱 맞는 **vector**를 구하는 과정부터가 쉽지 않으며 또한 **vector**를 구했다 하더라도 **cloning** 방법을 처음부터 다시 고민해야 하는 문제점을 안고 시작하는 것이 일반적입니다.

만약 **cloning** 방법의 고민 없이 내 유전자를 **fusion vector**들에 동시다발적으로 넣어보고 이들 중 내 유전자에 가장 적합한 것만을 고를 수 있는 방법이 있다면 얼마나 좋을까? 라는 생각을 오랫동안 해온 바 있습니다. 이번 뉴스레터에서는 **Overlap Cloning** 방법의 장점을 최대한 살려 각종 **fusion vector**들에 내 유전자를 쉽게 넣고 비교 선별할 수 있는 방법과 이를 응용한 제품들의 구성 그리고 특징에 대해 소개하고자 합니다.

원리와 키트의 구성

Overlap Cloner 반응을 이용하면 두 개의 서로 다른 DNA 조각을 쉽게 이어 붙일 수 있습니다. 이때 두 DNA의 말단에는 일치하는 서열이 15 bp 이상만 존재하면 됩니다. 이러한 Overlap Cloner의 특징을 이용해 linearized vector와 이 vector의 양말단과 일치하는 서열을 갖는 insert DNA를 PCR 반응으로 각각 준비한 후 Overlap Cloner 반응과 반응산물의 transformation을 통해 원하는 vector construct를 높은 효율로 얻을 수 있습니다.

Summarized Experimental Scheme



위의 모식도는 전체적인 실험과정을 설명하고 있습니다.

1. Linearized vector의 양말단과 서열이 일치하도록 15-20 bp의 서열을 insert DNA의 PCR primer서열에 넣어 디자인하고 합성하는 과정
2. PCR 증폭반응을 통해 insert DNA를 준비하는 과정
3. Linearized vector와 insert DNA를 혼합한 후 Overlap Cloner 반응으로 이어 붙이는 과정
4. Overlap Cloner 반응산물을 대장균에 transformation하는 과정
5. 다음날 얻은 colony들을 소량 배양한 후 vector내 primer 쌍을 이용해 insert DNA의 존재여부를 colony PCR 반응으로 판정하는 과정
6. Colony PCR에서 양성인 clone을 배양해 induction하여 단백질의 발현여부를 확인하는 과정

PCR 증폭반응으로 insert DNA만 준비하면 모든 과정이 2일 내에 완료되고 또한 95-100%의 확률로 내가 원하는 유전자 construct를 얻을 수 있는 효율적인 방법입니다. 키트를 사용할 경우엔, 실험자는 Overlap Cloner 반응에 적합한 PCR primer만 디자인해서 합성하면 바로 실험할 수 있도록 키트에는 PCR 관련 효소들과 분석용 primer 그리고 competent cell 까지 모든 구성요소들을 포함하고 있습니다.

키트의 구성을 살펴보면,

키트의 구성

가장 기본적인 linearized vector는 fusion protein의 종류에 맞게 선택적으로 키트에 포함되어 제공됩니다. Overlap Cloner enzyme과 10x buffer가 별도의 튜브에 제공되며, insert DNA의 증폭에 사용할 Pfu plus와 colony PCR에 사용할 HiPi plus 효소가 5x 농축의 master mix 형태로 제공됩니다. 실험에서 얻은 형질전환 colony 들의 양성판정과 DNA의 서열분석에 사용할 수 있는 한쌍의 primer가 별도로 제공되며, Overlap Cloner 반응산물의 transformation에 필요한 DH5 α 대장균주도 함께 제공됩니다.

1. Linearized vector : 20 μ l (100 ng/ μ l)
2. Colony PCR primer set : 100 μ l each (10 pmol/ μ l)
3. Overlap Cloner : 25 reaction
4. Overlap Cloner 10x buffer : 25 μ l
5. Control Insert DNA : 5 μ l (20 ng/ μ l)
6. Chemically competent DH5 α cell : 50 μ l x 20
7. Pfu plus 5x master mix : 200 μ l (50 reaction)
8. HiPi plus 5x master mix : 400 μ l (100 reaction)

필독 주의 사항 :

1. Vector의 promoter는 세가지 종류중 하나를 선택할 수 있습니다 (Arabinose inducible promoter, IPTG inducible Tac promoter, 그리고 T7 promoter)
2. Linearized vector의 promoter와 fusion protein들은 종류별로 개별 판매됩니다.
3. 아래의 도표에 표기된 fusion protein들 외에 다양한 종류의 fusion protein들도 제품으로 제공하고 있습니다 (secretory signal vectors, fluorescent proteins, small tag peptides)
4. pCMVT7 vector는 mammalian/E.coli dual expression vector로서 CMV promoter는 물론 BL21(DE3) cell에서 발현할 수 있는 promoter를 동시에 가지고 있습니다.

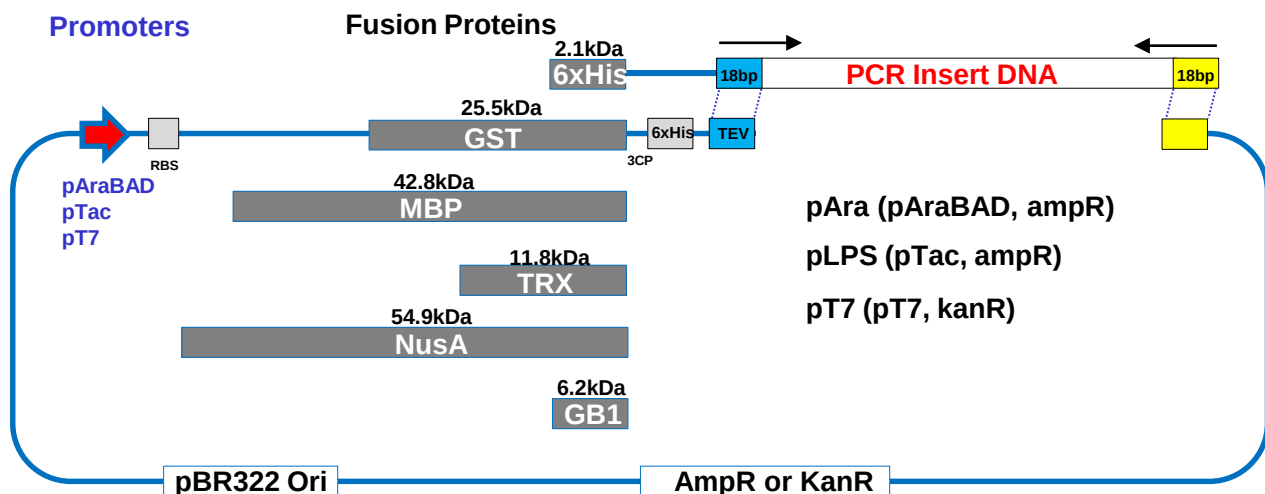
Molecular Characteristics of Fusion Proteins

Fusion Proteins	Size (kDa)	a.a	IP	Purification methods (b)	Site-specific cleavage
6xHis	2.1	18	-	IMAC	TEV protease
GST	25.5	218	6.1	IMAC, GSH resin	HRV 3C protease, TEV protease
MBP	42.8	390	5.0	IMAC, Amylose resin	HRV 3C protease, TEV protease
Trx	11.8	109	4.7	IMAC	HRV 3C protease, TEV protease
NusA	54.9	495	4.5	IMAC	HRV 3C protease, TEV protease
GB1	6.2	56	4.4	IMAC, IgG Fc resin	HRV 3C protease, TEV protease
No tag	-	-	-	-	-

Fusion Protein Size Calculation after Protein Expression

Size of fusion protein (from upper table)
 + 3.1 kDa of 3CP-6xHis-TEV cleavage site (GGGSGSLEVLFGQPHHHHHHENLYFQGS)
 + Your insert protein size

 Total Size of Expressed Protein



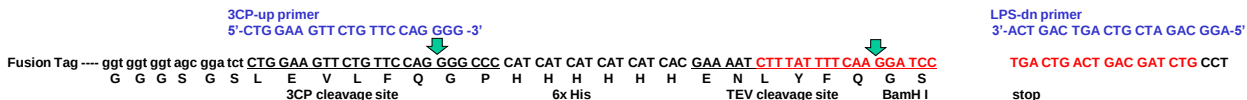
사용 방법

1. Insert DNA의 primer 디자인

발현하고자 하는 유전자 조각은 PCR 반응을 통해 증폭하여 준비할 수 있으며 실험자는 해당 유전자의 증폭을 위해 Overlap Cloner의 반응에 적합하도록 primer 쌍을 디자인해서 합성해야 합니다. 각각의 PCR primer는 모두 5' 말단에 linearized vector 부분과 상동서열을 갖는 18 base와 3' 쪽으로 유전자 특이적 서열을 갖는 구조를 가져야 합니다.

Overlap Cloner는 15 base 이상의 상동서열만 가지고 있으면 반응이 이루어지지만 18 base의 상동서열을 두어 반응을 보다 확실하게 하는 것이 좋습니다. 따라서 본 키트에서는 18 base의 상동서열을 권장하고 있습니다. Overlap Cloner 반응에 필수적인 상동서열은 키트에 제공되는 vector의 서열에 의존적이기 때문에 사용자는 별도의 구성으로 디자인할 필요가 없습니다.

Features of Vector Sequences



- Overlap sequences : red bold
upstream : **CTT TAT TTT CAA GGA TCC**
downstream : **TGA CTG ACT GAC GAT CTG**
- Colony PCR for clonal selection : 3CP-up & LPS-dn primer pair
- Sequencing primer : 3CP-up primer
- Caution : 발현된 단백질을 TEV protease로 절단할 경우 정제단백질의 N-terminal end에는 GS서열이 추가됩니다.
Fusion tag의 종류와 상관없이 (SUMO 제외) vector sequence의 기본적인 구조는 모두 동일합니다.

PCR Primer Design

Forward Primer : 5'-**CTT TAT TTT CAA GGA TCC** NNN NNN NNN NNN NNN NNN-3' (N=18-24, forward part of insert gene)

Reverse Primer : 5'-**CAG ATC GTC AGT CAG TCA** NNN NNN NNN NNN NNN NNN-3' (N=18-24, complementary sequence of down part of insert gene)
18 Base Overlap sequences to Vector

- Caution : PCR 반응의 annealing 온도는 유전자 특이적 부위의 서열이 갖는 Tm값만을 기준으로 설정해야 합니다.
insert DNA의 최초 서열에 ATG (Met) codon의 삽입 여부는 option 사항입니다. ATG codon을 넣지 않아도 발현에는 영향을 주지 않습니다.
reverse primer서열에는 TGA stop codon이 있기 때문에 insert DNA의 마지막에 stop codon을 넣지 않아도 무방합니다.

2. Insert DNA의 PCR 증폭

발현하고자 하는 유전자의 PCR 증폭은 키트에 포함된 Pfu plus 5x master mix를 이용할 것을 권장합니다. Pfu plus 효소는 proof-reading 활성을 가지고 있는 Pfu 계열의 효소로 구성되어 있기 때문에 PCR 과정에서 발생할 수 있는 돌연변이 도입을 최소화 할 수 있는 장점을 가지고 있으며 10 kbp 정도의 크기를 가지는 DNA도 무난하게 증폭할 수 있는 제품입니다.

Primer 부분에서 증폭하고자 하는 유전자 부위에 해당하는 서열의 Tm 값을 계산하여 Tm 값과 같거나 또는 낮은 온도로 annealing 온도를 설정하면 되고, 증폭하고자 하는 유전자의 template에 따라 PCR cycle을 조정해주면 됩니다. Vector에 삽입되어 있는 유전자를 증폭하고자 하는 경우에는 10 ng 수준의 vector DNA를 PCR template로 사용하고 20-25 cycle 정도의 PCR 반응을 수행하면 이후 반응에 필요한 충분한 양의 DNA를 얻을 수 있습니다. 유전자의 PCR template가 cDNA이거나 또는 genomic DNA인 경우라면 기존의 RT-PCR 방법을 따르되, gene copy 수에 따른 증폭산물의 양을 고려하여 cycle 수를 적절히 조정해 주어야 합니다. DNA의 크기에 따라 달라지지만 Overlap Cloner 반응은 한 반응당 10-100 ng 수준의 소량 DNA만 있으면 가능하므로 PCR 반응의 cycle 수는 PCR 과정에서 발생할 수 있는 서열에러방지를 위해 가능한 최소화 해주는 것이 좋습니다.

PCR mix 준비

- 4 µl Pfu plus 5x master mix
- 0.5 µl forward primer (10 pmol/µl)
- 0.5 µl reverse primer (10 pmol/µl)
- 1 µl template DNA (vector DNA, RT cDNA, genomic DNA)
- 14 µl DW

PCR amplification profile

- initial denaturation 94°C : 3 min
- denaturation 94°C : 20 sec
- annealing 50-60°C : 20 sec (Primer의 유전자 특이적 부위의 Tm 값만을 기준으로 Tm 값과 같거나 1-4°C 낮게 설정)
- extension 72°C : 1 min/kbp (증폭할 DNA의 크기에 맞게 설정)

총 PCR cycle 수는 PCR 반응 후 최종 산물의 양을 기준으로 결정해야 합니다.

PCR cycle number

	권장량	PCR cycle수
1. gene clone in vector	1-10 ng DNA	20-25
2. RT products	10-50 ng RNA	30-50
3. genomic DNA	10-100 ng DNA	20-35

RT 반응산물을 template로 넣어 PCR 반응을 하는 경우에는 사용한 total RNA를 기준으로 첨가량을 결정하되 전체 반응 volume의 1/20 전후를 사용하는 것이 바람직하며 RT 반응에 넣어주는 total RNA는 반응당 1 µg을 넘지 않는 것이 좋습니다. mRNA는 조직이나 세포에 따라 특이적인 양상을 보이고 있으며 또한 조직이나 세포에 따라 존재하는 copy 수가 다르므로 해당 유전자를 원활히 증폭하기 위해서는 조직특이적 발현여부를 사전에 반드시 확인해야 하며 또한 PCR cycle 수의 증감을 통한 증폭효율 테스트를 해보는 것이 바람직합니다.

3. PCR 증폭산물의 정제

Overlap Cloner 반응에 사용할 insert DNA는 agarose gel 정제를 권장합니다. PCR 반응산물에는 육안으로는 확인되지 않을지라도 다량의 비특이적 증폭산물이 포함되어 있을 수 있으며 이러한 비특이적 DNA 들은 cloning 후 정제를 알 수 없는 false positive clone으로 나타날 수 있기 때문입니다. 따라서 agarose gel 전기영동을 통한 크기확인을 한 후 예상 크기의 DNA만을 확실히 정제해서 사용하는 것이 좋습니다.

4. PCR 증폭산물의 정량 및 Overlap Cloner 반응준비

Agarose gel로 정제한 insert DNA는 나노드롭이나 기타의 정량방법을 통해 µl 당 10-100 ng 수준이 되도록 준비하면 됩니다.

Overlap Cloner는 vector와 insert DNA의 비율이 1:1 (몰비)이 되게 사용하는 것이 가장 이상적이지만 몰비에 있어서 5배 정도까지 차이 나게 사용해도 insert DNA의 준비만 철저하다면 원하는 결과를 얻는 데는 문제가 없습니다.

키트에 포함되는 linearized vector의 크기를 4-6 kbp 라고 했을 때 (vector backbone의 종류와 fusion protein의 종류에 따라서 크기는 달라지지만 평균적인 크기를 고려했을 때), 사용하는 insert DNA의 양은 크기에 따라 달라지며 대략적인 양은 아래와 같습니다.

200 bp 미만 : 5 ng
 200-500 bp : 10 ng
 500 bp 이상 1 kbp 미만 : 20 ng
 1-3 kbp : 50 ng
 3-6 kbp : 100 ng
 6-10 kbp : 200 ng

그럼에도 불구하고 사용할 vector의 정확한 크기를 기준으로 insert DNA의 크기에 따라 아래와 같이 몰비를 계산해서 사용량을 결정하면 최상의 좋은 결과를 얻을 수 있습니다.

반응에 사용할 Insert DNA의 양 (ng) = 100 ng vector DNA / (vector DNA의 크기 : insert DNA의 크기)

5. Overlap Cloner 반응

1 µl linearized vector DNA (100 ng/µl)
 X µl insert DNA
 1 µl 10x Overlap Cloner reaction buffer
1 µl Overlap Cloner enzyme
 Adjust the reaction to 10 µl with DW
 Incubate at 37°C for 1 hr

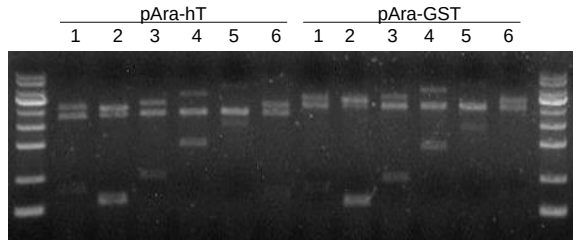
6. Overlap Cloner 반응결과 확인 및 transformation

Overlap Cloner 반응은 반응산물의 agarose gel 전기영동만으로도 반응여부를 어렵지 않게 확인할 수 있는 장점이 있습니다. 반응 산물 중 5 µl 정도를 0.7% agarose gel 에 loading 한 후 전기 영동 하면 vector DNA와 insert DNA는 물론 두 DNA의 합산 크기에 위치하는 부분에서 hybrid band가 나타납니다. Hybrid band의 생성과 양적 변화를 확인하여 정상적인 반응의 성공여부와 반응 정도를 짐작할 수 있습니다.

다음에 있는 결과는 크기가 다양한 insert DNA들을 Overlap Cloner로 반응했을 때 나타나는 band들의 양상을 보여주고 있습니다.

Agarose gel 전기영동결과 hybrid DNA의 양이 적거나 또는 없는 경우라면 반응시간을 늘려줌으로써 hybrid DNA의 양을 늘릴 수 있고 그 양이 많을 수록 형질전환효율은 증가합니다.

Overlap Cloner 반응산물의 전기영동 결과



Control DNA

1. dsRed	702 bp, 27kDa
2. Max	483 bp, 18.3kDa
3. CCND2	870 bp, 33.1kDa
4. Rel	1860 bp, 68.5kDa
5. GyrA	2628 bp, 97kDa
6. CAT	660 bp, 25.7kDa

10 μ l에서 Overlap Cloner 반응 후 5 μ l를 0.7% agarose/TAE gel에서 전기영동한 결과

Transformation에는 전체 반응산물 중 1-2 μ l 만 사용해도 충분한 효율의 결과를 얻을 수 있습니다.

키트에는 50 μ l로 개별 분주 된 DH5 α competent cell이 포함되어 있으며 0.5-1 $\times 10^8/\mu$ g DNA의 효율을 보이고 있습니다.

-70°C에 보관한 competent cell을 얼음 위에서 약 10 여분간 녹인 후 Overlap Cloner 반응 산물 1-2 μ l를 첨가하고 잘 섞어준 후 20분간 얼음 위에 정치합니다.

42°C에서 45초간 heat-shock을 주고 450 μ l의 LB 배지를 첨가한 후 37°C shaking incubator에서 1시간 동안 recovery를 합니다.

Recovery 한 competent cell의 일부 또는 전부를 적절한 항생제 첨가 배지에서 배양하는데, recovery한 대장균 전체를 도말 하고자 하는 경우에는 배양액을 spin-down하여 cell을 침전시킨 후 도말 하기 편리한 부피로 다시 풀어주고 도말 하면 됩니다.

위와 같이 했을 경우, 약 200-500개의 형질전환 colony가 나타나며 (키트에 포함된 control insert DNA를 기준으로 transformation한 전체 competent cell을 도말 했을 경우), 대략 20 시간 정도면 적절한 크기의 colony를 얻을 수 있습니다.

7. Clone 확인과 단백질발현 확인

LB plate에 형성된 colony들 중 2-3개를 따내어 각각 1.5 ml tube (1 ml LB/항생제)에서 5-6 시간 배양하면 육안으로도 확인할 정도로 대장균이 자라있는 것을 확인할 수 있습니다. 성장이 확인된 대장균 배양액으로부터 1 μ l를 취하여 colony PCR을 하면 insert DNA가 정상적으로 도입되었는지를 짧은 시간 내에 확인할 수 있으며 또한 inducer를 첨가한 후 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 발현 여부를 어렵지 않게 확인할 수 있습니다 (T7 promoter를 가지는 vector의 경우에는 키트에 포함된 DH5 α 균주에서는 직접 발현이 되지 않으며 반드시 발현균주인 BL21(DE3)로 다시 transformation을 해주어야 합니다).

Colony PCR mix 준비

- 4 μ l HiPi plus 5x master mix
- 0.5 μ l 3CP-up primer (10 pmol/ μ l)
- 0.5 μ l LPS-dn primer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l E.coli growth
- 14 μ l DW

PCR amplification profile

- initial denaturation 94°C : 3 min
- denaturation 94°C : 20 sec
- annealing 58°C : 20 sec
- extension 72°C : 1 min/kbp (insert DNA의 크기에 맞게 설정)

PCR cycle은 30 정도로 설정하며, 키트에 포함된 primer가 아닌 insert DNA에 특이적인 primer를 colony PCR에 사용하고자 할 경우에는 annealing 온도를 사용할 primer 쌍의 Tm 값을 기준으로 설정하면 됩니다.

Colony PCR에서 양성으로 판정된 clone은 plasmid DNA를 준비하여 서열분석 작업을 하거나 직접 induction test를 해서 단백질 발현 분석을 할 수 있습니다.

Overlap Cloner는 평균적으로 95% 이상의 cloning 효율을 보이고 있기 때문에 high-throughput cloning 작업을 해야 하는 경우에도 한두 개 만의 colony만을 취해도 높은 성공률로 원하는 clone을 확보할 수 있으며 1차 colony 배양액을 이용해서도 직접 발현을 해볼 수 있어 시간적으로나 경제적으로도 큰 이점을 얻을 수 있습니다.

Induction test (araBAD promoter를 갖는 pAra vector와 Tac promoter를 갖는 pLPS vector 종류에 한정됨)

1 ml culture

Add 1 μ l 20% arabinose or 1 μ l 1 M IPTG (final 0.02% or 1 mM)

Shaking incubation at 37°C for 3 hr

Spin-down cell pellet and discard media

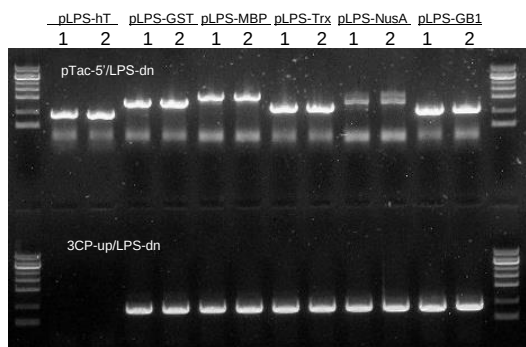
Add 50-100 μ l 1x SDS-PAGE sample buffer (pellet의 크기에 따라 volume을 조정)

Vortex and boil for 5 min

Spin-down and load into SDS-PAGE gel

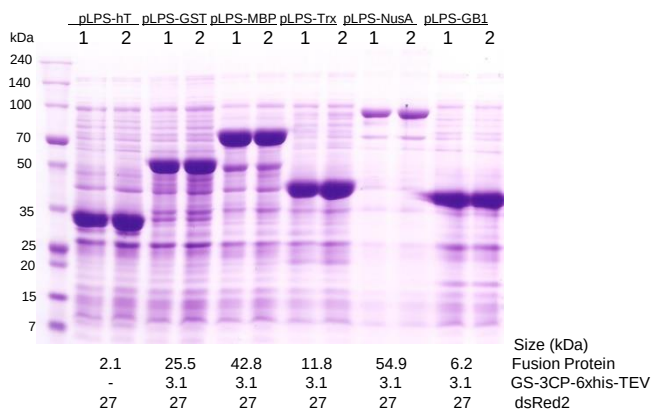
Control Experiment : pLPS Vectors

Colony PCR of 2 separate colonies



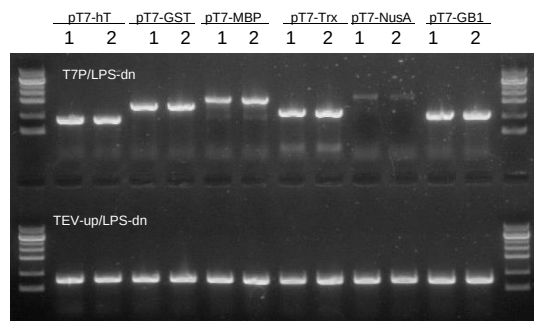
Insert DNA : control dsRed2 gene

Protein induction test of 2 separate colonies



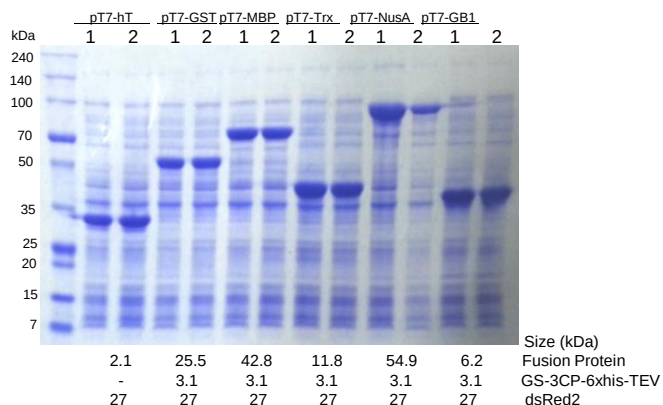
Control Experiment : pT7 Vectors

Colony PCR of 2 separate colonies

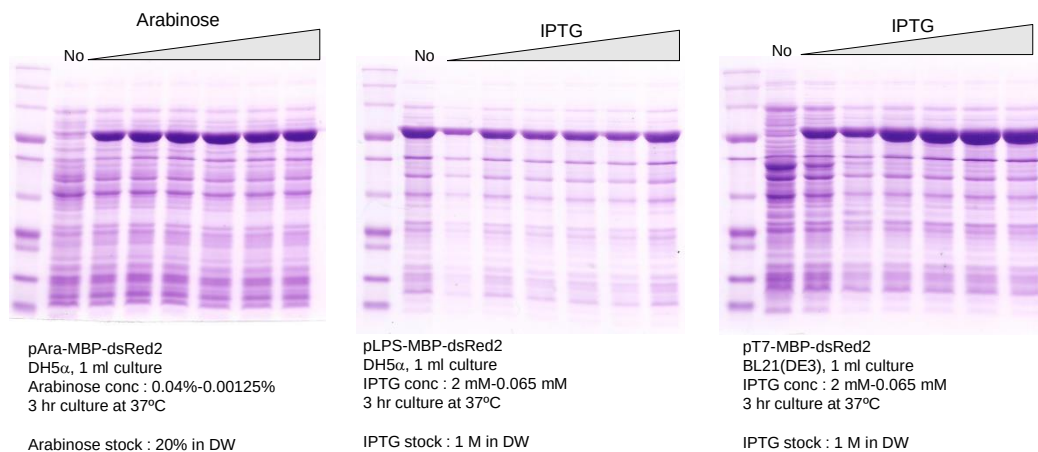


Insert DNA : control dsRed2 gene

Protein induction test of 2 separate colonies



Control Experiment : inducer concentration vs Expression level



Arabinose stock : 20% in DW

IPTG stock : 1 M in DW

IPTG stock : 1 M in DW

자주하는 질문

1) Overlap Cloner Fusion Protein Vector 키트를 사용하고자 하는데, 월 준비해야 하나요?

저희 엘피스바이오에서 제공하는 Overlap Cloner Fusion Protein Vector Kit는 cloning에 필요한 모든 구성 요소들을 제공하고 있습니다. 사용자께서는 유전자 특이적이며 cloning하고자 하는 해당 vector의 말단과 상동성을 갖는 38-40 mer 정도의 PCR primer만 매뉴얼에 명시된 방법으로 디자인해서 합성하면 됩니다. PCR에 필요한 효소 믹스는 물론 clone 확인에 사용할 PCR 효소 믹스와 primer 쌍 그리고 transformation에 필요한 competent cell 까지도 모두 포함되어 구성하고 있습니다. 따라서 사용자께서는 PCR과 gel purification만 수행해 매뉴얼대로 실험을 하시면 2-3 일 내에 원하시는 결과를 얻을 수 있습니다.

2) 단백질을 대장균에서 발현하여 정제하고자 하는데 어떤 fusion protein 이 좋은가요?

단백질의 발현 정제에 있어서 어떤 vector와 fusion protein이 좋은지에 대한 정답은 없습니다. 단백질의 기원에 따라 그리고 단백질의 구조나 안정성에 따라 단백질의 발현양상은 예측하기 어려운 것이 사실입니다. 따라서 특정 단백질의 발현과 정제를 위한 최적 조건을 찾기 위해서는 사용자께서 여러 시스템을 직접 비교 테스트해보는 것이 최선의 방법입니다.

3) 제한효소/Ligase를 이용한 방법과 비교하여 Overlap Cloner를 이용한 cloning 효율이 더 좋은지요?

저희 엘피스 바이오에서 제공하는 Overlap Cloner Cloning Kit는 완전히 새로운 개념의 cloning 방법으로서 기존의 방법들과는 원리부터가 다른 제품입니다. Overlap Cloner의 특징은 일반적인 ligation 방법과는 달리 어느 위치든지 cloning이 가능하고 여러 DNA 조각들도 한번에 이어 붙여서 cloning할 수 있다는 것입니다. 어느 반응이나 마찬가지로 Overlap Cloner의 사용에 있어서도 최적의 조건이 필요하고 이에 따라 나오는 최종적인 효율은 달라질 수 있습니다. 보편적인 ligation 방법의 경우에도 DNA의 상태나 반응 조건에 따라 효율적인 측면에서 많은 편차를 보이듯이 Overlap Cloner를 사용할 때 또한 최적화 조건에 따라 효율이 달라질 수 있으므로, 효율적인 측면에서는 두 가지 방법을 직접 비교할 수는 없고, 반응이 간편하다는 점에서 정수를 더 주어야 할 것으로 판단됩니다. 또한 Overlap Cloner를 이용하는 cloning에서는 제한효소자리를 찾는 데 귀중한 시간을 낭비하지 않아도 됩니다. 또한 여러 DNA 조각들을 이어 붙이는 실험에서 제한효소 자리를 찾느라 골머리를 싸매지 않아도 됩니다.

4) 상동 서열의 길이가 꼭 15 bp 이상 이어야 하는지요?

Overlap Cloner에 사용하는 enzyme mix의 기본적인 기능 테스트 결과 최소한의 상동 서열이 15 bp 이상 이어야 한다는 것을 알 수 있었습니다. 일반적으로, 15-20 bp가 적당한 길이로 되어 있으며, 그 이상의 상동 서열도 가능하지만, primer 제작과 PCR 반응으로 cloning에 사용할 insert DNA를 얻어야 하므로 이에 따른 효율 문제 등을 고려했을 때, 본 연구소에서 권장하는 상동 서열의 길이는 최소 15 bp에서 20 bp 정도입니다. 제한효소를 이용해 vector와 insert DNA를 준비하는 경우 overlap서열은 100 bp 이상이 되어도 무난하지만 overlap 서열이 길어질 수록 transformation 효율은 감소하는 경향을 보이고 있습니다. 따라서 DNA를 준비하는 최소비용을 고려하고 효율극대화를 고려했을 때 최소 15-20 bp의 overlap 서열을 이용하는 것이 최상의 조건이라 할 수 있습니다. DNA의 말단에 비매칭 서열이 존재해도 cloning은 되지않는 비매칭서열의 길이에 따라 효율은 급격히 감소합니다.

5) Transformation 후 colony 개수가 매우 적은 경우엔 무엇이 문제인가요?

Overlap Cloner는 일반적인 cloning 방법과 마찬가지로 vector DNA와 insert DNA의 기본적인 반응 양 (50 - 100 ng)과 물비 (1:1) 등의 최적화 조건을 필요로 하는 방법입니다. 따라서, 이러한 조건들이 맞지 않을 경우, transformation 효율이 매우 낮아질 수도 있습니다. 10 μ l 표준반응용액에서는 vector의 양을 50-100 ng으로 사용하는 것이 가장 효율적입니다. 반응의 전체 볼륨을 늘려야 하는 경우에는 vector DNA는 물론 insert DNA의 양과 넣어주는 enzyme mix의 양도 비례하여 늘려주어야 합니다. 더불어 vector DNA와 insert DNA의 물비 (양적 비율이 아닙니다)는 항상 1:1로 맞춰주는 것이 가장 높은 효율을 얻는 방법입니다. Transformation 효율이 낮아질 수 있는 또 하나의 원인은 cloning을 위해 준비한 DNA들의 정제도에 문제가 있는 경우입니다. DNA에 오염될 수 있는 phenol, ethanol과 같은 유기용매는 효소반응을 저해하며, EDTA는 효소반응을 정지시킬 수도 있습니다. 따라서 충분한 wash를 거쳐 PCR purify 또는 gel extraction을 한 DNA만을 반응에 사용해야 합니다.

6) Insert DNA의 크기에는 제한이 없는지요?

Overlap Cloner는 insert DNA의 크기 제한 없이 사용할 수 있습니다. 50 bp 미만의 작은 크기부터 수 kb의 크기를 가진 insert DNA를 사용해도 무방합니다만 크기가 커질 수록 대장균의 transformation 효율이 급격히 떨어지므로 이점을 사전에 충분히 감안해서 실험을 해야 합니다. 일반적인 ligase를 이용한 방법과 비교를 했을 때, 크기가 큰 insert DNA의 경우 cloning 효율이 더 좋으며, 이론적으로는 수십 kb의 insert DNA도 기존의 방법보다 높은 효율로 cloning 할 수 있습니다. 10 kb 정도의 insert DNA는 어렵지 않게 cloning 되는 결과를 얻었습니다. 다만 문제는 대장균의 transformation 효율이 DNA의 크기에 비례하여 떨어진다는 점입니다. DNA의 크기가 10 kb를 넘는 경우 이에 따라 더 높은 효율의 transformation 방법을 생각해 봐야 합니다 (가령 electro-transformation).

7) Vector DNA와 insert DNA의 비율은 어떻게 계산해야 하나요?

Vector DNA와 insert DNA의 비율은 molar ratio (몰비) 1:1로 하는 것이 가장 좋은 효율을 보입니다. 일반적으로 vector와 insert DNA의 크기가 같을 경우 같은 양의 비율로 반응 시키면 됩니다. 그러나 대부분은 insert DNA의 크기가 vector DNA와 다르므로 크기에 따른 몰비를 계산해서 1:1 정도가 되게 맞추어 반응시키는 것이 좋습니다. 이를 수식으로 만들어보면 다음과 같습니다

$$\text{Insert DNA의 양} = (\text{Insert DNA의 크기} / \text{Vector DNA의 크기}) \times \text{Vector DNA의 양}$$

예를 들어, vector DNA 크기가 3 kbp, insert DNA가 1 kbp 크기라면, 100 ng의 vector DNA를 사용하고자 할 때, insert DNA는 33 ng를 넣어주면, 몰비가 1:1이 됩니다.

8) 일반적인 ligation방법에서처럼 overnight 반응도 가능한지요?

기존의 유사한 키트들의 경우엔 짧은 반응시간 또는 높은 온도 등의 까다로운 반응조건들을 제시하고 있지만, 저희 엘피스바이오의 Overlap Cloner는 37°C 온도에서 반응시간의 제약 없이 그리고 전처리나 후처리 과정 없이도 충분한 cloning 효율을 보이고 있으며, overnight 반응 시에도 주목할만한 효율의 변화가 없는 것으로 확인되고 있습니다. 이러한 점에서 타사 제품들과는 차별화된다고 볼 수 있습니다.

9) Insert DNA는 꼭 정제해서 사용해야 하는지요?

Overlap Cloner의 경우에는 DNA의 정제후 사용을 필히 권장하고 있습니다. 그 이유는 PCR buffer나 제한 효소 buffer에 포함된 성분들이 cloning 반응의 저해요소로 작용할 수 있기 때문입니다. 또한, PCR을 이용해 insert DNA를 준비하는 경우 template로 사용한 DNA의 오염이 background로 나타날 수 있으므로 template DNA를 제거하는 과정을 거치거나 (가령 Dpn I 처리), gel extraction 또는 PCR purification을 병행하여 DNA를 정제한 후 cloning 반응에 사용하는 것이 좋습니다.

10) Transformation을 하기 전 효소반응을 정지시키는 과정이 필요하거나 또는 반응산물의 정제과정이 필요한가요?

Overlap Cloner는 상당히 안정적인 효소반응을 이용하므로 heat inactivation과 같은 효소반응 정지과정이 불필요하며 반응산물을 ice에 둘 필요도 없습니다. 반응이 끝난 후 바로 transformation에 이용하거나 또는 장기보관할 경우 반응산물을 -20°C에 보관하시었다가 나중에 사용하시면 됩니다. 또한 반응 후 반응산물을 특별히 정제해 사용할 필요도 없습니다. 반응산물 1-2 μ l를 직접 transformation에 사용할 수 있으며 정제를 해도 transformation 효율에는 크게 영향을 주지 않습니다. Electro-transformation을 하는 경우, 반응용액에 존재하는 salt가 spark를 일으킬 수 있으므로 정제를 권하지만 40 μ l의 electro competent cell을 사용하고 단지 1 μ l 미만의 반응산물만을 transformation에 사용하는 경우라면 굳이 정제를 하지 않더라도 salt에 의한 spark는 일어나지 않습니다.

11) 반응으로 생성된 hybrid DNA는 어떤 형태인가요?

Overlap Cloner를 이용하여 만들어진 DNA hybrid는 ligation을 이용한 반응에서 처럼 두 DNA 분자가 공유결합으로 붙어 있지 않은 상태입니다. 상동서열의 DNA 교환에 의해 수소결합으로 base pairing만 되어 있고 양끝에 nick이 형성되어 있는 상태이므로 반응산물의 온도를 높이면 두분자는 그대로 떨어지는 구조입니다. 따라서 반응산물에 높은 온도를 가하게 되면 두 DNA는 떨어지므로 transformation 효율에 영향을 줄 수도 있습니다. Nick을 가지고 있는 plasmid DNA는 대장균내로 들어가게 되면 repair과정을 거쳐 정상적인 closed circle 형태의 온전한 plasmid DNA가 됩니다

12) Overlap Cloner kit의 보관 기준은 어떤지요?

본 kit의 보관은 일반 효소의 경우처럼 -20°C에서의 보관을 권장하고 있습니다. -20°C에서는 최소 1년간은 뚜렷한 활성저하를 보이지 않습니다. 모든 효소제품들과 마찬가지로 반복적인 제품의 온도변화는 효소의 활성에 치명적인 영향을 줄 수도 있습니다. 키트에 포함되는 competent cell은 -70°C에 보관해야 하며 급격한 온도 변화는 transformation 효율을 저하시키는 가장 큰 이유가 됩니다. 따라서 제품을 받는 즉시 competent cell은 -70°C에 보관하고 나머지 구성품들은 -20°C에 보관하면 됩니다.

Trouble Shooting

문제점	가능한 원인	해결방안
Transformation 후 colony 숫자가 매우 적거나 거의 없는 경우	Transformation 효율이 너무 낮은 경우	보관이나 사용상의 문제로 competent cells의 transformation 효율이 떨어진 경우일 수 있습니다.pUC와 같은 표준 plasmid를 이용해 최소 $1 \times 10^7/\mu\text{g}$ DNA 이상의 효율을 보이는지 확인해 보아 합니다.
	적절한 antibiotics를 사용하지 않은 경우	Antibiotics selection을 통한 cloning을 위해서는 사용한 vector DNA가 가지고 있는 antibiotics resistance 유전자에 해당하는 antibiotics를 사용해야 합니다. 일반적으로 pAra, pLPS 계열의 vector는 ampicillin을 사용하며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 LB plate에 넣어줘야 합니다. pT7 계열의 vector는 kanamycin을 사용해야 합니다.
	너무 많은 양의 반응액을 transformation에 사용한 경우	일반적인 transformation protocol에 따라 DNA 양을 사용하고, 경우에 따라 반응액이 competent cell에 toxic 할 수 있으므로, TE buffer나 증류수에 희석해서 (1:5-1:10) 사용하여 결과를 보기 바랍니다.
	Vector 또는 insert DNA의 양이 너무 적은 경우	Overlap Cloner는 상동 서열을 인지하여 연결해 주는 기작으로 작동하기 때문에 충분한 DNA의 양이 필요합니다. 따라서, 최소 50 ng 이상의 vector DNA와 insert DNA가 필요하며, 크기에 따라 다르되 권장 양인 50-200 ng의 DNA를 이용하여 반응시키기 바랍니다.
	Vector 또는 insert DNA에 최소15 bp 이상의 상동 서열이 존재하지 않는 경우	PCR을 이용하여 insert DNA를 준비한 경우, 사용한 primer의 염기 서열이 제작한 염기 서열과 맞는지 확인해 보아 합니다. Primer 합성과정에서 중간 또는 말단에 맞지 않는 염기 서열이 의도치 않게 들어갈 수 있으며 이런 경우 cloning 효율은 급감합니다. DNA를 준비하는 과정에서 손상 발생이 생길 수 있으며 이 경우에도 같은 문제가 발생할 수 있습니다. DNA 준비 과정에도 주의가 필요합니다.
	Overlap Cloner enzyme mix가 적절히 보관되지 않은 경우	Overlap Cloner enzyme mix는 -20°C에서 보관해야 하며, 장시간 상온 보관시 성능이 크게 떨어지며, 또한 반복된 freezing 과 thawing으로 인해 성능이 떨어질 수 있습니다.
	Overlap Cloner의 반응온도와 반응 시간이 적절치 않은 경우	Overlap Cloner enzyme의 반응 시간은 본 연구소의 테스트 결과 overnight 반응시에도 크게 떨어지지는 않으나, 약 3 시간 이내에서 가장 높은 효율을 얻을 수 있고, 37°C온도에서 가장 효율이 높은 것으로 확인되었습니다. 따라서 이에 준하는 조건에 맞춰 반응을 하는 것이 좋습니다.
	발현하는 유전자가 대장균에 toxic한 경우	Cloning하고자 하는 유전자의 발현산물이 대장균의 성장에 영향을 미치는 경우입니다. Background 발현이 많은 pLPS 계열의 vector는 사용을 피하고 pAra vector를 사용하여 필요한 경우 glucose 첨가배지를 사용해야 합니다.
대부분의 transformation colony가 insert DNA를 가지고 있지 않거나 또는 다른 서열의 DNA를 가지고 있는 경우	Contaminated DNA가 반응에 포함 되었을 경우	PCR을 이용해 얻은 insert DNA에는 template DNA가 완전히 제거되지 않고 남아 있을 수 있습니다. Circular 형태의 DNA는 transformation에 우선적으로 사용되므로 이러한 DNA의 오염이 있는 경우 얻어지는 대부분의 colony는 의도하지 않았던 다른 DNA를 가지고 있을 확률이 높아집니다. 가끔적 size구분이 가능한 gel purification 방법으로 DNA를 준비하는 것이 유리합니다. 또한 정제 과정이나 DNA 준비과정에서 각종 시약이나 전기영동 장치에 오염되어 있던 DNA가 반응에 오염되어 transformation후 엉뚱한 colony로 출현할 가능성도 있습니다. 주변환경은 언제나 청결해야 합니다.
	Insert DNA가 비특이적 PCR 반응물인 경우	비특이적 PCR 산물을 반응에 그대로 사용한 경우 예상했던 것과는 완전히 다른 서열의 cloning 결과를 얻을 수도 있습니다. PCR 조건이 적절한지 확인을 해야 합니다. Primer 조건이나, annealing 온도, 사이클 조건 등 최적화 조건을 확인하고, 최종 산물을 제한 효소 절단 같은 방법을 통해 미리 검증한 후 반응에 사용하면, 이런 문제를 줄 일 수 있습니다.
단백질 발현의 문제	단백질의 발현이 되지 않거나 되더라도 적은 경우	Cloning과 발현은 항상 일치하는 것이 아닙니다. 특히 이중 단백질의 경우 여러 가지 이유들로 인해 대장균에서 정상적으로 발현하는 경우가 오히려 더 적습니다. 이는 codon usage의 문제일 수도 있으며, 발현산물의 구조적 그리고 안정성의 문제일 수도 있습니다. 발현 가능한 조건을 여러 면에서 철저히 찾아보아야 합니다.
	발현한 단백질이 insoluble 인 경우	많은 이중단백질들은 구조적 문제로 인해 많은 발현량에도 불구하고 기능이 없는 상태로 대장균내에 축적되곤 합니다. 배양조건이나 induction 조건을 바꿔가며 soluble로 발현할 수 있는지 확인해 보아 합니다.
	발현한 단백질이 정제되지 않는 경우	단백질의 구조적 문제일 가능성이 높습니다. Vector를 바꿔보거나 fusion protein과 insert DNA 사이에 보다 긴 linker서열을 넣어 단백질의 구조가 resin binding을 방해하지 않도록 조정해 주어야 합니다.

제품군 (준비중입니다)

Basic Fusion Proteins

Cat No.	Vector Name	Promoter	Fusion	Size(bp)	Reactions	Antibiotics	Expression Strain	Inducer
EBK-1021	pAra-hT	pAraBAD	6xHis	3,375	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1022	pAra-GST	pAraBAD	GST	4,059	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1023	pAra-MBP	pAraBAD	MBP	4,563	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1024	pAra-Trx	pAraBAD	Trx	3,732	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1025	pAra-NusA	pAraBAD	NusA	4,890	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1026	pAra-GB1	pAraBAD	GB1	3,573	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1027	pAra-No	pAraBAD	No	3,324	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1121	pLPS-hT	pTac	6xHis	3,822	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1122	pLPS-GST	pTac	GST	4,506	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1123	pLPS-MBP	pTac	MBP	5,010	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1124	pLPS-Trx	pTac	Trx	4,179	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1125	pLPS-NusA	pTac	NusA	5,337	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1126	pLPS-GB1	pTac	GB1	4,020	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1127	pLPS-No	pTac	No	3,771	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1221	pT7-hT	pT7	6xHis	5,049	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1222	pT7-GST	pT7	GST	5,733	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1223	pT7-MBP	pT7	MBP	6,237	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1224	pT7-Trx	pT7	Trx	5,406	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1225	pT7-NusA	pT7	NusA	6,564	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1226	pT7-GB1	pT7	GB1	5,247	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG
EBK-1227	pT7-No	pT7	No	4,998	20	Kanamycin	DE3 <i>E. coli</i> strain	IPTG

Special Fusion Proteins

Cat No.	Vector Name	Promoter	Fusion	Size(bp)	Reactions	Antibiotics	Expression Strain	Inducer
EBK-1031	pAra-ompF	pAraBAD	ompF	4,492	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1032	pAra-ompA	pAraBAD	ompA	4,444	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1033	pAra-osmY	pAraBAD	osmY	4,008	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1034	pAra-FcBD	pAraBAD	FcBD	3,987	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1035	pAra-ABD	pAraBAD	ABD	4,002	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1036	pAra-dsbC	pAraBAD	dsbC	4,113	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1037	pAra-slyD	pAraBAD	slyD	3,993	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1038	pAra-SAV	pAraBAD	Streptavidin	3,762	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1039	pAra-BAP	pAraBAD	BCCP	3,873	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose

Secretory

Cat No.	Vector Name	Promoter	signal/Fusion	Size(bp)	Reactions	Antibiotics	Expression Strain	Inducer
EBK-1051	pAra-BhT	pAraBAD	pelB/6xHis	3,442	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1052	pAra-ThT	pAraBAD	torA/6xHis	3,495	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1053	pAra-FhT	pAraBAD	ompF/6xHis	3,433	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1054	pAra-AhT	pAraBAD	ompA/6xHis	3,430	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1055	pAra-ChT	pAraBAD	dsbC/6xHis	3,432	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose

- N-term에 TEV site가 없는 vector도 주문제작 가능함

Fluorescent Proteins : Bacterial and/or Mammalian Expression

Cat No.	Vector Name	Promoter	Fusion	Reactions	Antibiotics	Expression Strain	Inducer
EBK-1071	pAra-NFP-C	pAraBAD	NFP N-tagging	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1072	pCMVT7-NFP-C	pCMV/T7	NFP N-tagging	20	Kanamycin	Mammalian/BL21(DE3)	IPTG
EBK-1073	pCMVT7-hT-NFP-N	pCMV/T7	NFP C-tagging	20	Kanamycin	Mammalian/BL21(DE3)	IPTG

- NFP : GFP, Red를 포함하여 총 7 종류의 형광 단백질들로서 구입가능한 형광단백질 fusion vector들에 대해서는 문의바람
 - pCMVT7 vector는 mammalian cell과 E.coli에서 모두 발현이 가능하도록 CMV promoter와 T7 promoter를 가지고 있음
 - NFC-C vector는 형광단백질이 N 말단에 위치하며 NFC-N vector는 형광단백질이 insert gene의 C 말단에 위치하는 vector임

Small Tagging Peptide : Bacterial and/or Mammalian Expression

Cat No.	Vector Name	Promoter	Fusion	Reactions	Antibiotics	Expression Strain	Inducer
EBK-1081	pAra-Small Tag -C	pAraBAD	N-tagging	20	Ampicillin	all <i>E. coli</i> strain	Arabinose
EBK-1082	pCMVT7-Small Tag-C	pCMV/T7	N-tagging	20	Kanamycin	Mammalian/BL21(DE3)	IPTG

- 6xHis, HA, MYC 등을 포함해 총 6 종류로서 구입가능한 vector들에 대해서는 문의바람
 - Small Tag-C vector는 tag서열이 insert protein의 N 말단에 위치함

제품의 특성상 샘플제공은 불가합니다