

ExiProgen[™] **EC-Tagfree Protein Synthesis Kit**

Cat. No. K-7320



***ExiProgen*[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit**

User Guide

K-7320



Version No.: 3 (2022-06-23)

Please read all the information in booklet before using the unit



BIONEER Corporation

**Bioneer Global Center, 71, Techno-2-ro,
Yuseong-gu, Daejeon, 34013, Republic of Korea**

Tel: 1588-9788

Email: sales@bioneer.co.kr

www.bioneer.com

Intended Use

ExiProgen[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit is developed and supplied for research purposes only. Certain applications possible with this kit may require special approval by appropriate local and/or national regulatory authorities in the country of use.

Safety Warning and Precaution

Wear appropriate protection when handling any irritant or harmful reagents. The use of a laboratory coat, protective gloves and safety goggles are highly recommended. For more information, please consult the appropriate Material Safety Data Sheet (MSDS).

Warranty and Liability

All BIONEER products undergo extensive Quality Control testing and validation. BIONEER guarantees quality during the warranty period as specified, when following the appropriate protocol as supplied with the product. It is the responsibility of the purchaser to determine the suitability of the product for its particular use. Liability is conditional upon the customer providing full details of the problem to Bioneer within 30 days.

Quality Management System ISO 9001 Certified

Every aspect of our quality management system from product development, production to quality assurance and supplier qualification meets the world-class standards.

Patent

ExiProgen[™] and its kits are protected by the patents KR10-2011-0085824, PCT/KR2012/006715, KR10-2012-0138335, and KR10-2013-0022324.

Trademark

ExiProgen[™] is a trademark of BIONEER Corporation.

Copyright

Copyright 2022. BIONEER Corporation. All Rights Reserved.

Notice

BIONEER corporation reserves the right to make corrections, modifications, improvements and other changes to its products, services, specifications or product descriptions at any time without notice.

Contents

Product Information	1
Components	1
Storage	1
Specifications.....	2
Precautions	2
Introduction	3
Cell-free Protein Synthesis System	3
The <i>ExiProgen</i> [™] Protein Synthesis System	5
Product Description	7
Experimental Procedures	9
Components Details	9
Experiments Preparation	12
Protocols	16
Analysis of Sample	21
Maintenance	24
Troubleshooting	25
Appendix A: pBIVT Vectors	27
Appendix B: Screening of Template DNA Concentration	28
References	29
Ordering Information	31
Related Products	31
Explanation of Symbols	32

Product Information

Components

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit ①		
Components	K-7320 (8 rxn)	Storage
Cartridge ①	96-well x 1 ea	4°C
Dialysis tube	1 pack (16 ea/pack)	
Disposable filter tip	1 pack (8 ea/pack)	-
Protection Cover	1 ea	-

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit ②		
Components	K-7320 (8 rxn)	Storage
Cartridge ②	96-well x 1 ea	-20°C (<i>E. coli</i> extract recommended at -70°C or less)
<i>E. coli</i> extract	8-tube strip (Yellow) x 1 ea	
Master mix	8-tube strip (Violet) x 1 ea	
DEPC DW	8-tube strip (White) x 1 ea	
Storage buffer	35 ml x 2 bottle	
TEV protease	1.5 ml tube x 1 ea	
Positive control DNA	1.5 ml tube x 1 ea	

Storage

The Cartridge ① and Dialysis tube included in Kit ① should be stored at 4°C. The Cartridge ②, Master mix, DEPC DW, Storage buffer, TEV protease, and Positive control DNA included in Kit ② should be stored at -20°C. In particular, *E. coli* extract contains T7 RNA polymerase and ribosome, so it is recommended to store at a temperature below -70°C immediately upon receipt, and if the extract repeatedly frozen and thawed, the efficiency may decrease.

Specifications

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit	
	K-7320 (8 rxn)
Number of reactions (Up to 8 rxn/ 1 times)	8 rxn
Operating time	26 hours
Required sample DNA	1-6 µg [Plasmid DNA: 0.6 µg/kb (Vector)]
Yield	Up to 200 µg*

* **Note:** The protein yield can be varied depending on the type of target protein.

Precautions

The Cartridge ① and ② of this Synthesis Kit are each covered with sealing film in order to prevent cross-contamination, evaporation, or leakage of solutions inside. All of the plastic products and buffers in this kit are provided under nuclease- and protease-free condition, hence, please be careful not to contaminate any part of the kit with nuclease or protease.

Introduction

Cell-free Protein Synthesis System

Since protein composes essential components in biological reactions, such as enzymes, hormones, and structural proteins, researches on roles and structures of protein are being actively conducted in the post-genomic era. These studies start with producing a specific type of protein.

The various protein expression systems are based on different cell, such as *E. coli*, yeast, animal, and plants cells, which are used for production of recombinant proteins. In order to express proteins based on these systems, a vector containing target genes is transformed into cells and the cell line is cultured to express a large amount of protein. After that, cells are usually disrupted and proteins are purified from cell lysates. However, the general protein expression systems require much time and labor, as these have to go through a series of steps such as selection of: 1) strains, 2) cell lines stably expressing recombinant proteins, 3) cell culture, 4) cell disruption, and 5) protein purification. In addition, if the target protein is toxic to strains and cell lines, it takes several weeks or up to several months to synthesize a single protein because it is difficult to express a toxic protein and requires optimization of various conditions for its expression.

To overcome the limitations of cell-based system, cell-free protein synthesis method and related products have been developed (Keum et al., 2009; Kim et al., 2007; Kim et al., 2011; Park & Hamad-Schifferli, 2010). Cell-free protein synthesis system is a technology for protein synthesis based on cell extract by transcribing and translating *in vitro*. To carry out protein synthesis *in vitro*, the following should be prepared: 1) cell extract including T7 RNA polymerase, ribosome, tRNA, and enzyme, and 2) protein expression solution containing a substrate and a substance that performs transcription and translation such as amino acids, rNTPs, and energy sources. After that, a gene encoding the target protein is added, and the reaction is conducted at an appropriate temperature and time to express the recombinant protein (Figure 1). In case of cell-free protein synthesis systems, the reaction duration is at least 1 to 3 hours, which can dramatically reduce the time taken for protein expression. In addition, it is easier to express proteins that show toxicity in cells because the expression is based on cell extracts, not living cells, and since it is an open system, conditions for protein expression can be easily adjusted (Hino et al., 2008).

Cell-free protein synthesis systems are widely used in enzyme engineering, protein labeling, research on protein-protein interaction mechanism, and research on protein active site (Forster et

al., 2004; Josephson et al., 2005; Keum et al., 2006; Kigawa et al., 2002; Ohashi et al., 2007; Villemagne et al., 2006).

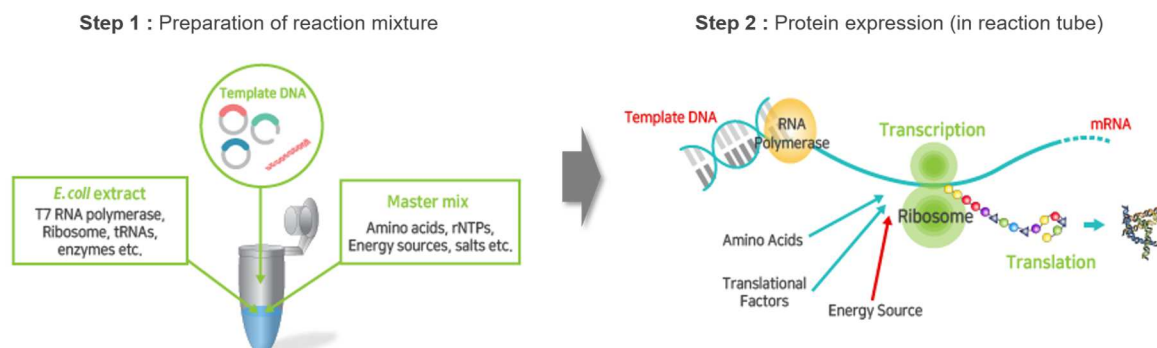


Figure 1. Principles of cell-free protein synthesis system.

The *ExiProgen*[™] Protein Synthesis System

BIONEER has developed *ExiProgen*[™], a fully automatic protein synthesis instrument that applies cell-free protein synthesis technology and affinity purification technology using magnetic nanoparticles. Therefore, high-purity proteins can be obtained quickly and fully automatically by using our protein expression and purification kits. Furthermore, the instrument *ExiProgen*[™] is highly versatile as it can fully automatically extract the required DNA and RNA from various samples using nucleic acid extraction kit series.

Our protein expression and purification kits use T7 expression system of *E. coli* and can be used immediately with template DNA (Ahn et al., 2008; Rungpragayphan et al., 2003). Protein synthesis using *ExiProgen*[™] allows the addition of template DNA to perform a series of processes, including protein expression and purification, to finally obtain samples containing target proteins.

Protein expression and purification kits are divided into three product groups (Figure 2): 1) Template preparation kits that produce template DNA used for cell-free protein expression, 2) *AccuRapid*[™] Kit Series that is responsible for easy manual expression or synthesis of recombinant proteins, and 3) *ExiProgen*[™] Kit Series that is responsible for an automatic expression or synthesis of recombinant proteins. Each protein expression and purification kit can express and synthesize proteins from µg up to mg scale.

In addition, there are other products that can be selected depending on the purpose of the experiment, such as a kit for improving protein expression efficiency, a kit solely for protein purification or buffer exchange, etc.

Please refer to the BIONEER's website (www.bioneer.com) for a detailed description of each kit.

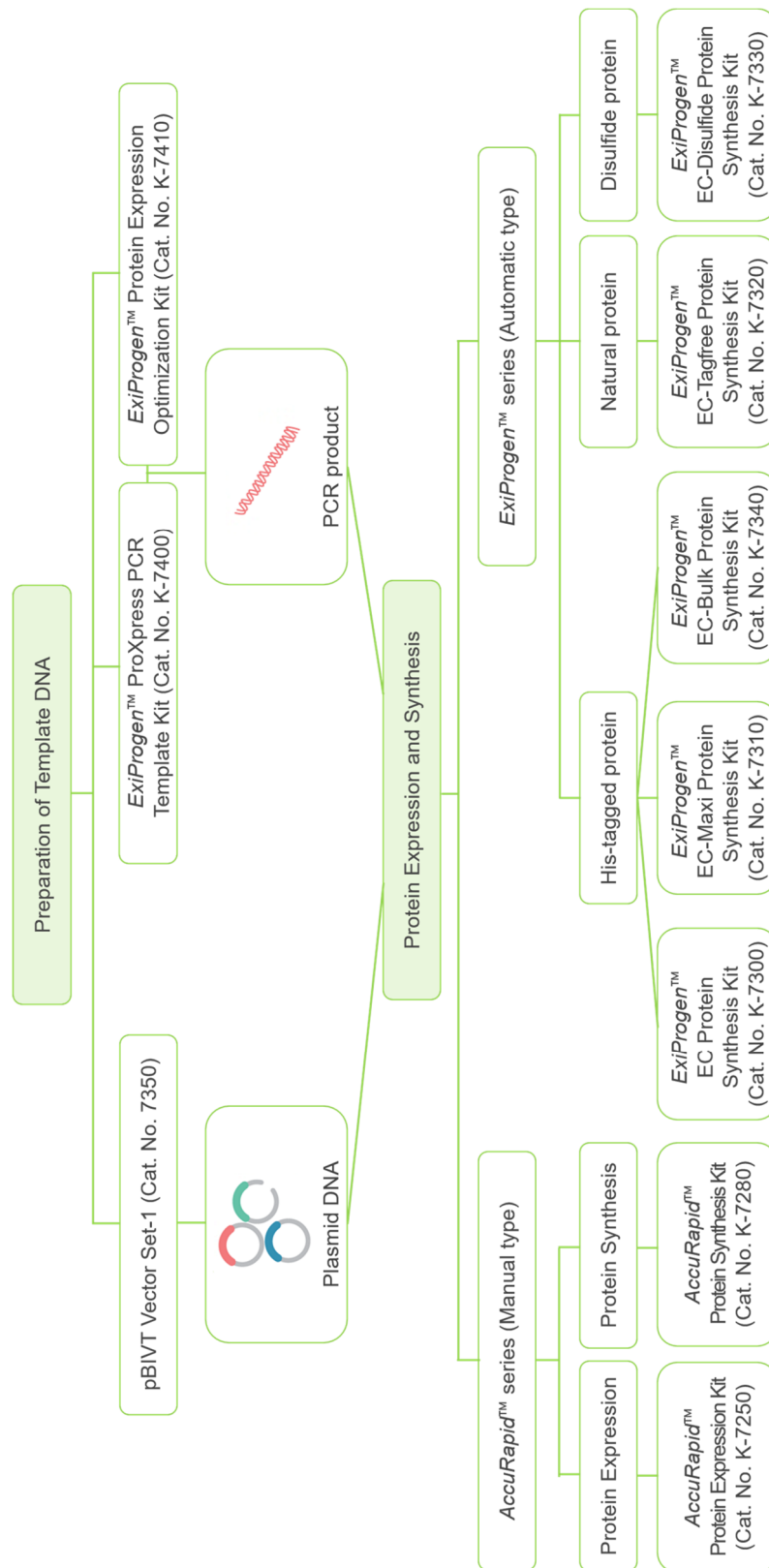


Figure 2. Product information related to protein expression and synthesis.

Product Description

ExiProgen[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit can be applied to *ExiProgen*[™], a fully automated protein synthesis and nucleic acid extraction system developed by BIONEER, and up to 200 µg of 8 different histidine tag-free proteins can be obtained with high purity in a single reaction.

This product uses Stepwise Exchange Cell-Free (SECF) protein synthesis technology to create an optimal environmental for protein expression. During dialysis using a membrane, by-products of protein expression are removed, and at the same time, energy source and amino acids are continuously supplied to the reaction mixture (Figure 3) (Kim & Choi, 1996; Lim & Kim, 2019). The optimized protein expression environment leads to high protein synthesis yield.

The expressed protein is purified by affinity method using histidine tag. After purification, TEV protease acts on the TEV cleavage site that connected the target protein and histidine tag, finally obtaining histidine tag-free protein (Figure 4) (Li et al., 2013).

All reactions including protein expression/purification and buffer exchange through dialysis are carried out fully automated. Therefore, the user only needs to add the target DNA, and 8 different types of final target proteins can be recovered in a dissolved state in a storage buffer.

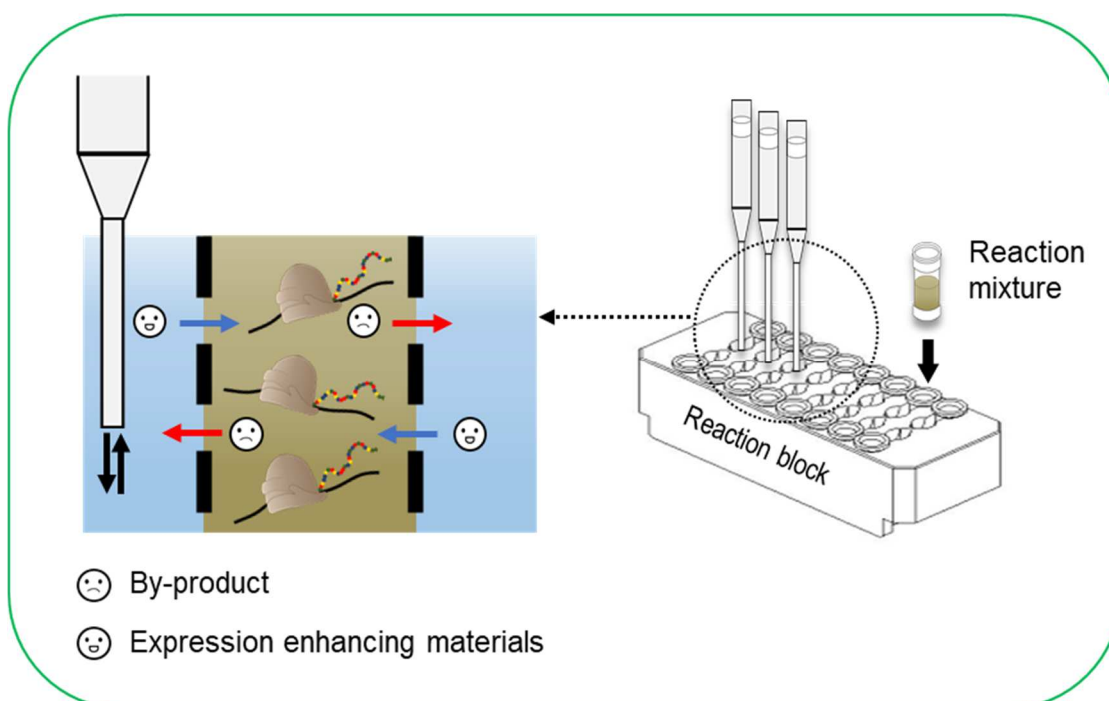


Figure 3. SECF Principles of *ExiProgen*[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit.

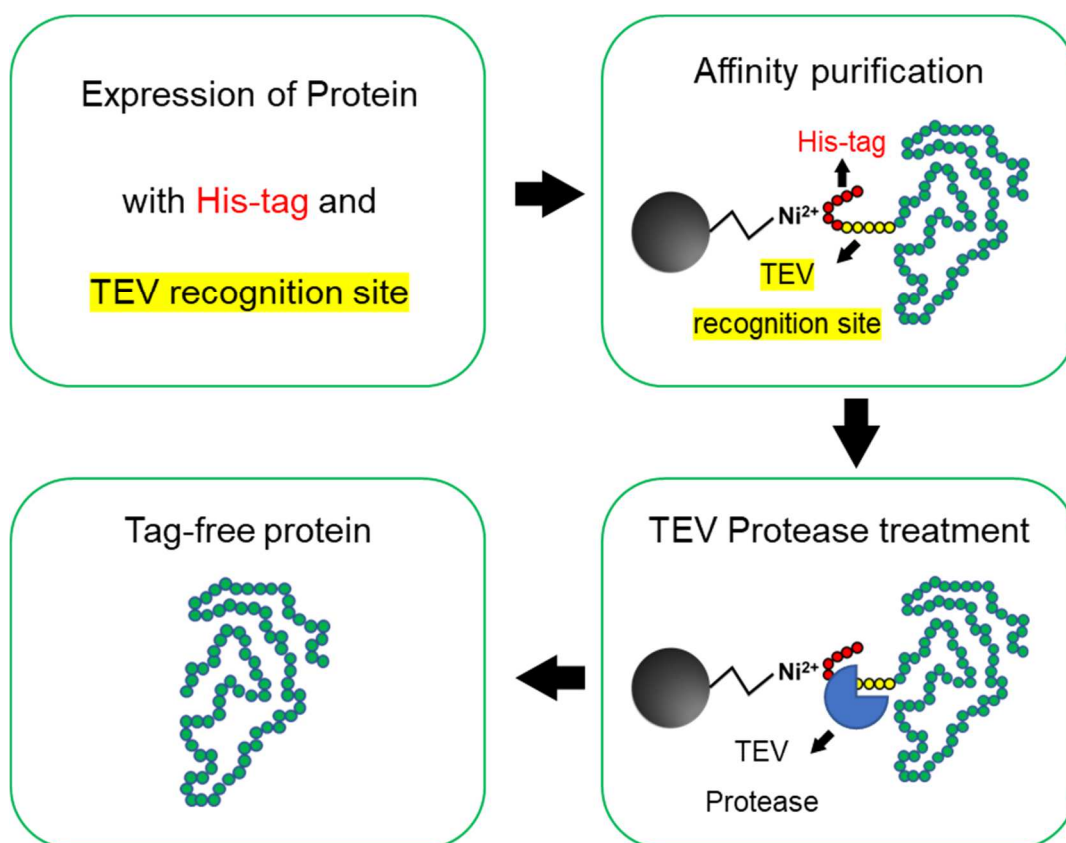


Figure 4. Principles of *ExiProgen*™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit.

Experimental Procedures

Components Details

1. Cartridges

F2					0.9 ml
F1					0.3 ml
E2					0.9 ml
E1					0.9 ml
D2					0.9 ml
D1					0.9 ml
C2					0.9 ml
C1					0.9 ml
B2					0.9 ml
B1					0.9 ml
A2					0.25 ml
A1					1 ml

Ni-NTA magnetic bead

Binding/Washing buffer

Buffer to set equilibrium so that expressed protein sample can be bound onto Ni-NTA magnetic bead, and after binding of the target protein, used for washing process to remove impurities.

Sterile distilled water

Used for tip cleaning before elution.

L2					1.2 ml
L1					1 ml
K2					1 ml
K1					1 ml
J2					1 ml
J1					1 ml
I2					1 ml
I1					1 ml
H2					1 ml
H1					1 ml
G2					1 ml
G1					0.3 ml

Feeding buffer

Protein expression solution for SECF reaction and contains NTP, amino acids, and energy sources.

Storage buffer

After protein purification, the buffer for storing the final target proteins.

TEV protease and reaction buffer

(When adding 100 µl of TEV protein, final volume)

Used for removal of 6x histidine-tag.

2. *E. coli* extract

E. coli extract included in Kit ② is a cell lysate and supplies T7 RNA polymerase, ribosome, tRNA, etc., required for protein expression. It is provided as an 8-tube strip and **130 µl** is dispensed in each tube.

3. Master mix

Master mix, a components of Kit ②, contains NTPs, amino acids, energy source and salt necessary for protein expression. It is supplied as an 8-tube strip, and **220 µl** is dispensed in each tube.

4. DEPC DW

DEPC DW is used to adjust the final volume of the protein expression solution, and it is supplied as an 8-tube strip, and **130 µl** is dispensed in each tube.

5. Dialysis tube

Dialysis tube, which is specifically manufactured by BIONEER, is used to continuously supply the energy source from the feeding buffer to the reaction solution during protein expression, and to exchange the purification buffer into storage buffer after purification of a target protein. It is provided in 20% ethanol and each tube is individually packaged, so as many can be used as needed according to the need. Before use, it is required to remove 20% ethanol and rinse it out with sterile distilled water for once.

6. Storage buffer

The composition of the storage buffer provided in the kit is as follows.

- Buffer composition: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.05% (v/v) NaN₃, 50% (v/v) glycerol, pH 7.6

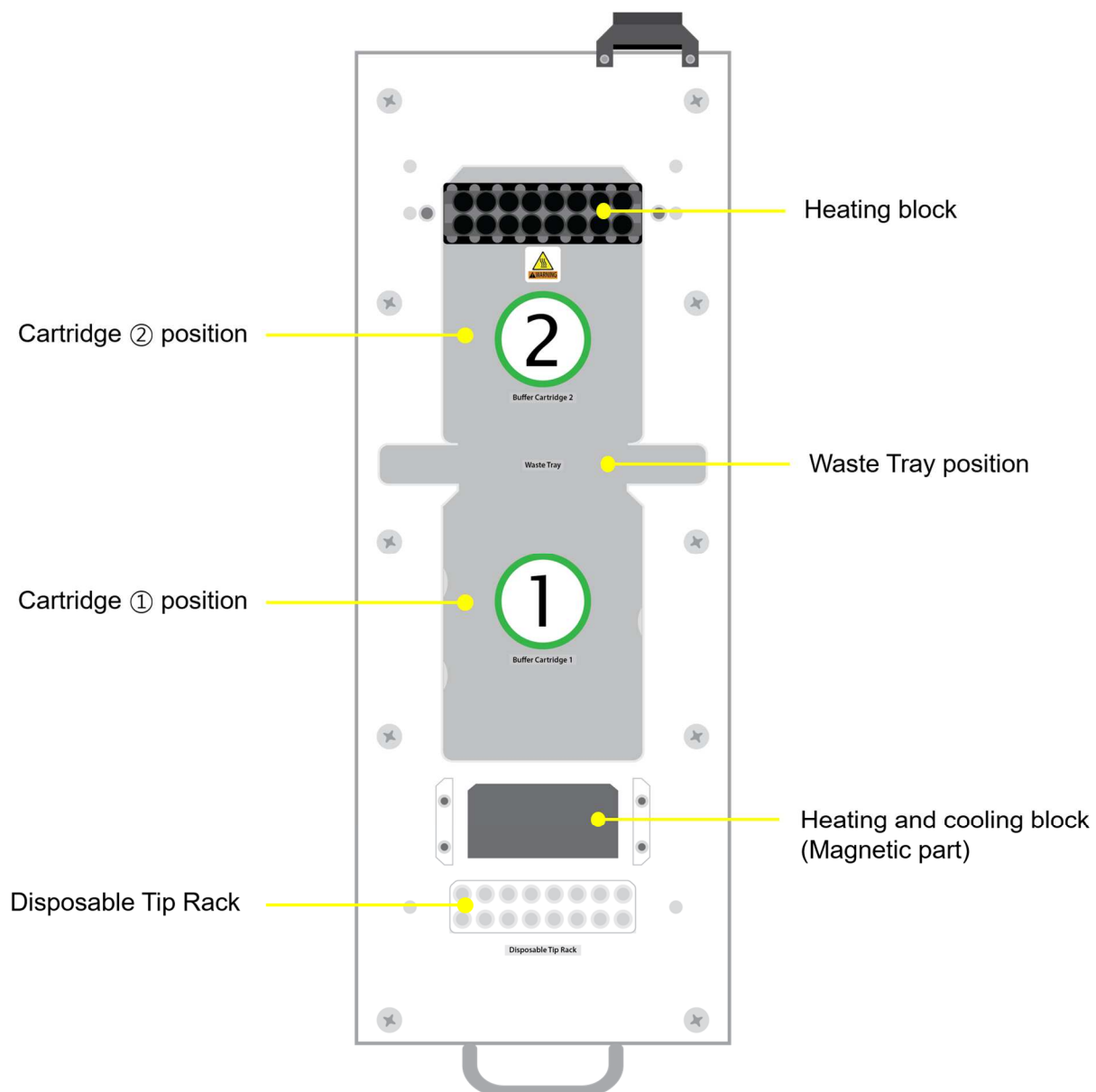
Storage buffer is provided in the bottle, and just before use, dispense 1 ml to each of the column of rows G2-J1 of Cartridge ②. If you want to use a buffer with a different composition, you can manufacture it according to the required composition. However, 10% or higher concentration of glycerol must be added to the buffer. If not, a large amount of storage buffer will flow into the Dialysis tube due to the concentration difference between the solutions, leading to the overflow of the solution containing the purified protein out of the Reaction block.

7. TEV protease

TEV protease is used to remove 6x histidine-tag, and just before use, **dispense 100 µl to each column of the row G1 of Cartridge ②.**

3. Note

Structure of *ExiProgen*™ Baseplate



Experiments Preparation

Preparation of Template DNA

The template DNA must have “T7 promoter - Ribosome binding site (RBS) – 6x histidine tag – **TEV cleavage site** - Target gene - T7 terminator” structure to apply for ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit (Figure 5). Proteins synthesized based on this sequence will have an additional Glycine (or Serine) amino acid in front of the target protein after the purification process. The position X can be any of 20 amino acids, while the DNA sequence provided as a positive control encodes Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly.

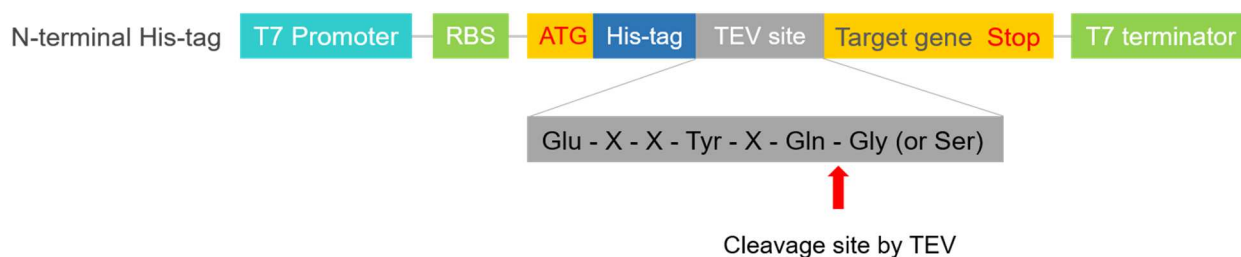


Figure 5. Template DNA structures and TEV site sequences for ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit.

For cloning of a target gene, pBIVT Vector Set-1 (Cat. No. K-7350, see Appendix A.) can be used as an expression vector, and pK7, pIVEX, pET vector can be used elsewhere.

DNA sequences must be optimized in order for *E. coli* codon to maximize protein synthesis, and if it is difficult to optimize codon, template DNA (vector) can be synthesized through our Gene Synthesis Service (Trotta, E., 2011). In addition, since it is provided as cloned into our *in vitro* translation vector, pBT7-N-His vector and pBT7-C-His vector, it can be applied quickly and easily. For more information, visit the website (www.bioneer.com).

Example of Template DNA Preparation

1. When using user's expression vector

After constructing a PCR product containing TEV cleavage site* between the 6x histidine tag and the target gene, clone it into the desired expression vector.

* **Example:** GAAAACTTATATTTTCAGGGC, Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly

2. When using Positive control DNA as an expression vector

Prepare the primers as follows to obtain the PCR product.

Forward primer:

5'- CGCCTACGGATCCGAAAACTTATATTTTCAGGGCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
*Bam*H I TEV site Overlapping sequences to target gene (18-mer)

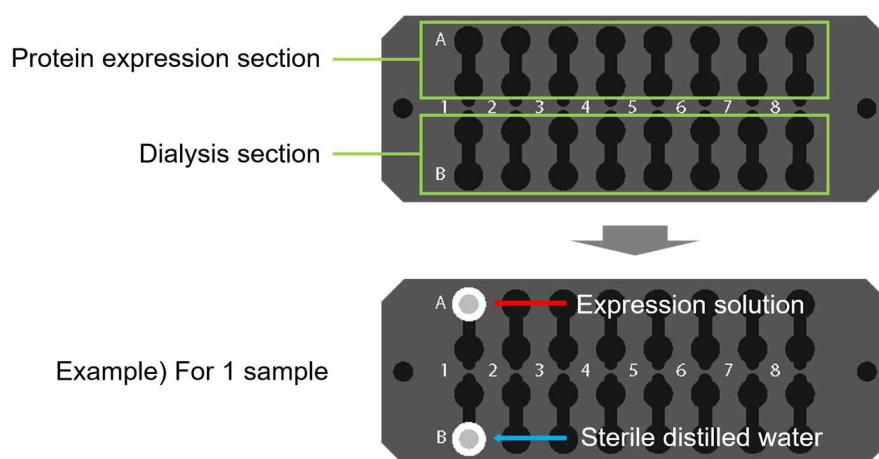
Reverse primer:

5'- CGCCTACGCGGCCGCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
Not I Overlapping sequences to target gene (18-mer)

The prepared PCR product can be cloned into positive control DNA.

Before You Begin

1. Take out the Cartridge ② from the Kit ② box and thaw at room temperature.
2. Take out *E. coli* extract, Master mix, DEPC DW according to the number of reaction samples from the Kit ② box and thaw it on ice. If necessary, take out the Positive control DNA tube and thaw it together.
 - * **Note:** It takes about 2 hours for the solution to completely thaw. Before use, make sure that all the solutions are completely thawed.
 - * **Note:** The Positive control is provided with pBIVT-(TEV site)-AcGFP and is approximately 3.8 kb (28 kDa).
3. Prepare the Reaction block (ExiProgen™ accessory).
4. Take out twice as many Dialysis tube as the number of samples from Kit ① box. After taking out the Dialysis tube with tweezers, use a pipette or shake it up and down to remove the ethanol inside. Then, rinse inside and out of the tube using a squeeze bottle containing sterile distilled water.
 - * **Note:** Sterile distilled water is not provided, so please prepare it.
5. Completely remove the water inside the Dialysis tube using a pipette, and install it on the Reaction block as shown below. Fill the tube in row B with **500 µl of sterile distilled water**.



6. Take out Cartridge ①, Disposable filter tip, and Protection Cover from the Kit ① box and prepare it.

7. Preparation of protein expression solution

Before starting protein synthesis with *ExiProgen*[™], the protein expression solution containing the DNA to be expressed must be prepared.

- 1) Prepare protein expression solution using pre-thawed *E. coli* extract, Master mix, and DEPC DW. After spin down each tube, mix the solution with a pipette before use.

Components	Sample	Positive control DNA
Template DNA	X µl	6 µl
<i>E. coli</i> extract	120 µl	120 µl
Master mix	210 µl	210 µl
DEPC DW	(120-X) µl	114 µl
Total volume	450 µl	450 µl

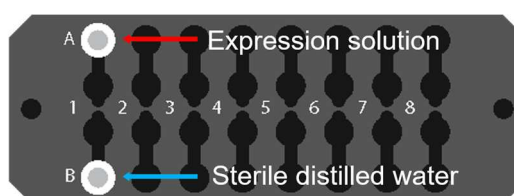
* **Note:** Amount of template DNA – Plasmid DNA: 0.6 µg/kb (Vector)

Example) When using Plasmid DNA containing insert DNA with a size of 5 kb and a concentration of 100 ng/µl
→ Use 30 µl (= 3 µg)

* **Note:** For optimal protein synthesis, please refer to Appendix B. and conduct screening of template DNA concentration in advance.

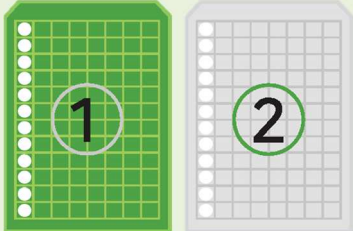
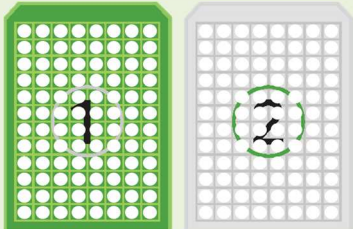
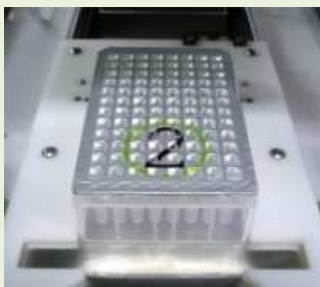
- 2) Add each **protein expression solution** prepared above into the tubes in **row A** of the Reaction block.

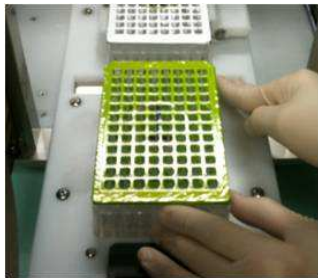
Example) For 1 sample



- 3) Finish the preparation for the experiment by installing the Protection Cover on the Reaction block.

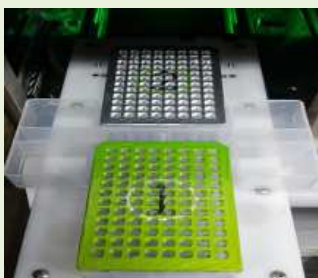
Protocols

Steps	Procedure Details
Example 1) For 1 sample  Example 2) For 8 samples 	1. Punch holes in the sealing films of Cartridge ① and ② using 6 Hole Punch (<i>ExiProgen</i>™'s accessory) according to the number of samples. * Note: Refer to the left pictures and punch holes depending on the required number of samples. 2. Add 1 ml of storage buffer to each column of the rows G2-J1 and 100 µl of TEV protease to the columns of the row G1 of Cartridge ②. * Note: If you want to use a buffer with a different composition, you can manufacture it according to the required composition. However, 10% or higher concentration of glycerol must be added to the buffer. If not, a large amount of storage buffer will flow into the Dialysis tube due to the concentration difference between the solutions, leading to the overflow of the solution containing the purified protein out of the Reaction block.
	3. Open the door of <i>ExiProgen</i>™ and pull out the baseplate completely.
	4. Load Cartridge ② in the position of ② on the baseplate. * Note: Place the row L of Cartridge ② in the direction of the Heating block first and then install it, and afterwards check if it is properly fixed.



5. Load Cartridge ① in the position of ① on the baseplate.

*** Note:** There are silicon rings embedded on both sides of the Cartridge ① installation position. Place the left side first, and then the right side.



6. Install Waste Tray between Cartridge ① and ②.

*** Note:** Follow the exact installation order of Cartridge ② → Cartridge ① → Waste Tray. Ensure that Cartridges and Waste Tray are firmly installed, without showing any movement.



7. Install Reaction block prepared in pp. 14-15 to the Heating and cooling block (Magnetic part) of the baseplate.

*** Note:** Ensure that the row A of the Reaction block is located towards the inside of the instrument and the row B towards the Disposable Tip Rack.



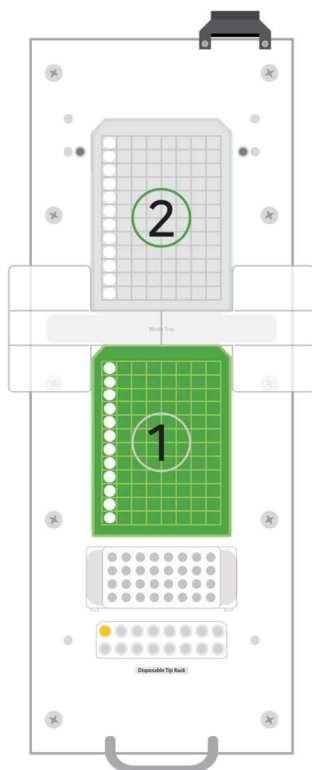
8. Place Disposable filter tips in **row B** of Disposable Tip Rack according to the number of samples.

*** Note:** Tips should be placed in the corresponding positions with the punched holes of the Cartridges. Do not insert tips in the corresponding positions of the cartridge that are not punched.

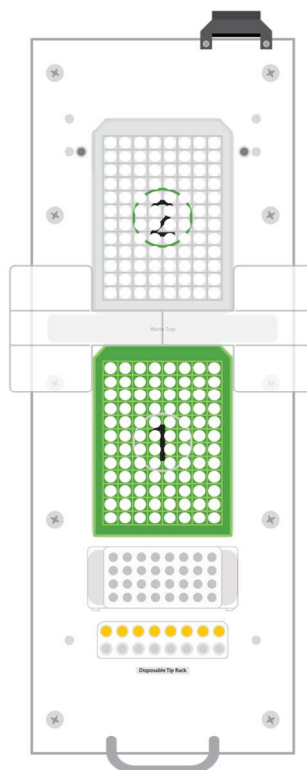
9. Finally, confirm holes in the cartridges and position of samples and tips (Refer to the pictures on page 18). Push the baseplate completely until you hear the click sound, then close the door.

*** Note**

Example 1) For 1 Sample



Example 2) For 8 Samples



10. Turn on the *ExiProgen™* and tap 'Press to start' button. When the 'Press to start' button is pressed, the *ExiProgen™* screen appears as shown in the lower left, and after the scroll bar moves, it moves to the next screen.

*** Note:** This process initializes the X, Y, Z axis values of the equipment. If the next screen does not proceed normally, turn off the power of the equipment and contact the A/S center.



11. In the MENU screen, press 'Start' button to select a proper protocol.



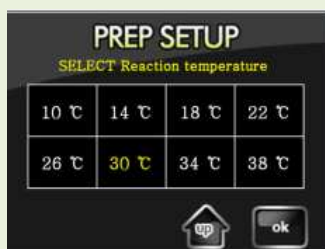
12. The PREP SETUP screen appears as shown in the left, and a screen to select the protocol number for each kit appears. Press '**904**' to confirm that the following information is displayed on the screen, and then press the 'Enter' button.

Prep Type: Protein

Sample SRC: Synthesis_TF



13. After selecting the protocol, the screen to select the Elution volume appears. It is used for nucleic acid extraction, and when using this kit, please press the 'ok' button to move next steps.



14. After the Elution volume selection screen, the screen to select protein synthesis temperature appears. When using this kit, please select **30°C** and press the 'ok' button.



15. When the 'CHECK LIST' screen appears, confirm once again that cartridges and other accessories are fixed to each location properly, and then click the 'ok' button.



16. When the 'Running Mode' screen appears as shown on the left, finally check the following information and click the 'RUN' button. After this, the instrument starts and it takes approximately **26 hours** to finish run.

Prep Type: Protein

Sample SRC: Synthesis_TF



17. 'Work Completion' screen appears when the protocol is completed. Remove all components used in the experiment, and choose a desired button.

* **Note:** If you want to quit and press the 'ok' button, the UV lamp will be turned on automatically.

Analysis of Sample

After protein synthesis with *ExiProgen*™, the final target proteins of about 180-190 µl is collected from Dialysis tube located at the **row B** of the Reaction block (Figure 6). Final protein samples may contain Ni-NTA magnetic beads, but this can be removed by centrifugation before use.

If necessary, reaction samples from protein expression and purification can be recovered from the rows K1, K2, and L2 of Cartridges ② as shown in Figure 6.

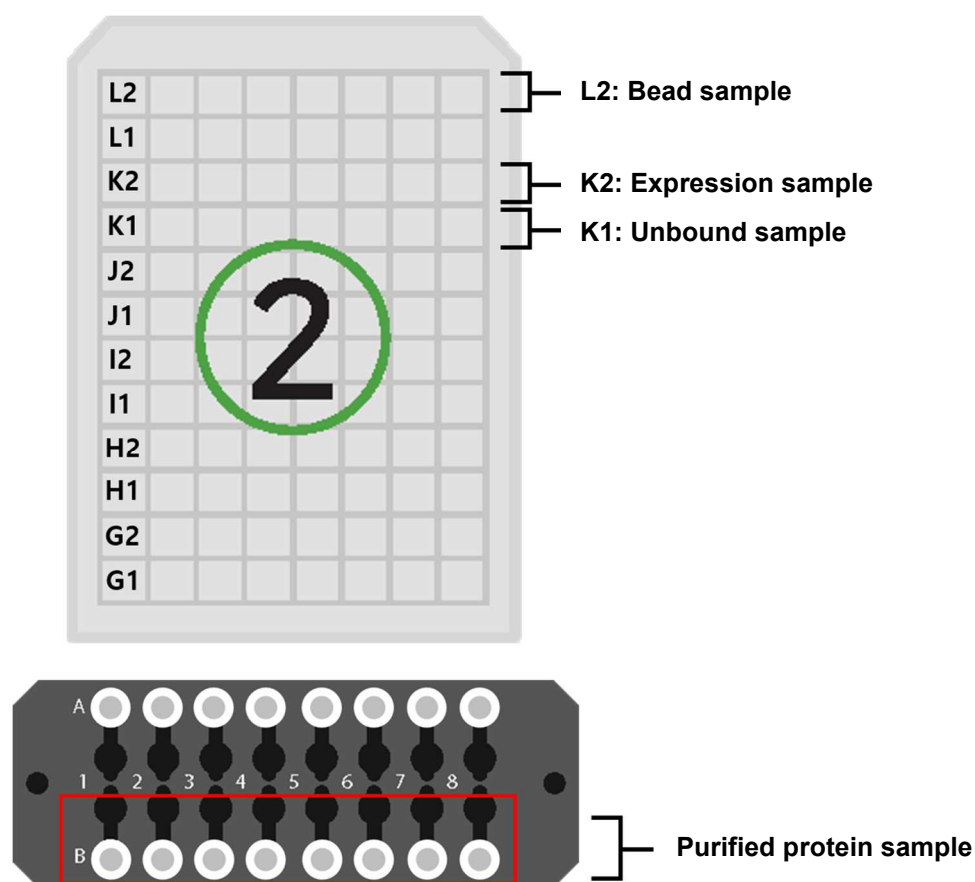


Figure 6. Samples for each row of Cartridge ②.

- Expression sample: Samples after expression, but without purification.
- Unbound sample: Samples not bound to Ni-NTA magnetic bead.
- Bead sample: Used bead samples for purification.

Each sample can be checked through SDS-PAGE whether target protein is synthesized as desired.

1. Prepare the loading mixture as shown in the table.

Components	Expression/ Unbound sample	Purified protein sample	Bead sample*
Sample	5 µl	5 µl	15 µl
4X loading dye	5 µl	5 µl	5 µl
Sterile distilled water	10 µl	10 µl	-
Total volume	20 µl	20 µl	20 µl

* **Note:** Add 360-400 µl of sterile distilled water to the well containing the beads for suspension and proceed with the sampling afterwards.

2. Incubate the prepared loading mixture at 95°C for 5-10 min.

3. Load the following amounts of each sample to the wells of 10% or 12% SDS-PAGE gel [10 x 8 (cm), 10-well] and run the SDS-PAGE.

- Expression/Unbound samples: 5 µl/well
- Purified protein/Bead sample: 10 µl/well

4. Confirm whether the target protein is synthesized through staining with Coomassie blue and de-staining procedures (Figure 7, 8).

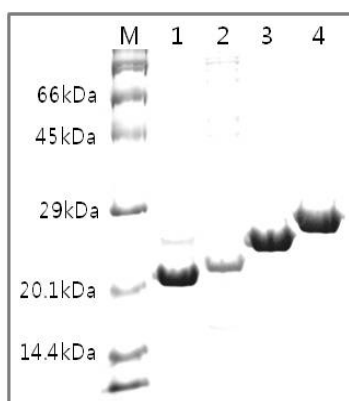


Figure 7. Confirmation of SDS-PAGE results for protein synthesis using ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit. M, Protein Size Marker; Lane 1, Dual specificity protein phosphatase 3 (22 kDa); Lane 2, Human growth hormone (23 kDa); Lane 3, CAT (24 kDa); Lane 4, AcGFP (28 kDa).

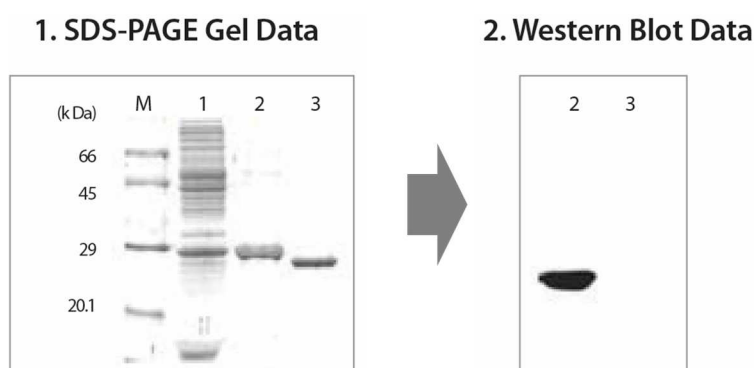


Figure 8. SDS-PAGE data to confirm removal of 6x histidine tag and Western Blot result using His-tag antibody from proteins synthesized through *ExiProgen*[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit. M, Protein Size Marker; Lane 1, Expression sample of pBIVT-TEV-AcGFP; Lane 2, Histidine tag-TEV-AcGFP (histidine tagged sample); Lane 3, AcGFP (histidine tag-free sample).

Maintenance

After protein synthesis, Cartridges and other accessories should be washed and stored as follows.

1. Reaction block

Rinse all the used wells of the Reaction block with sterile distilled water and store it in 70% ethanol at a room temperature. Before use, wash with sterile distilled water and dry.

2. Waste Tray and Disposable Tip Rack

Discard all the solution in the Waste Tray, wash it in running water and clean it with 20% ethanol. Also, if there are any impurities on the Disposable Tip Rack, clean it with 20% ethanol.

3. Cartridge ①, ②

After the reaction is completed, keep the remaining Cartridges with the lid covered, and store Cartridge ① at 4°C and Cartridge ② at -20°C at the appropriate temperature, respectively.

Troubleshooting

If there is a problem with protein synthesis, please refer to the following information (However, keep in mind that the following suggests solutions for general problems regarding protein synthesis, and may not correspond to solutions for all protein synthesis problems).

1. No protein synthesis, including positive control protein.

Cause	Solution
Nuclease (DNase, RNase) contamination	When performing the experiment, wear gloves and use DNase- and RNase-free pipette tips.
No addition of DNA or missed components	Make sure to add the correct amount of Positive control DNA and ensure that all components are installed correctly.
Storage condition of reagent	Store all reagents and components in the kit at the recommended temperatures. In particular, avoid repeated freeze-thaw cycles of <i>E. coli</i> extract.

2. Positive control protein is synthesized, but the target protein is not synthesized.

Cause	Solution
Sequences of template DNA	If there is a mutation in the ORF (Open Reading Frame) of the template DNA, translation may be interrupted, so please check the ORF sequence.
Structures of template DNA	Confirm that the structures of the T7 promoter, T7 terminator, and histidine tag are correctly positioned in the template DNA.
Contamination of template DNA	If DNA is degraded by nuclease contamination in the process of preparing template DNA, protein cannot be synthesized. It is recommended to use template DNA obtained using nuclease-free elution buffer.
Low expression efficiency	<i>ExiProgen</i> [™] Protein Expression Optimization Kit can be applied to increase protein expression efficiency.

3. Low synthesis amount of target protein.

Cause	Solution
Purity of template DNA	If the purity of template DNA is low, the protein may not be synthesized. It is recommended to use DNA as follows: $A_{260/280}$: 1.7-2.0, $A_{260/230} > 1.5$.
Amount of template DNA	There may be differences in the amount of protein synthesis depending on the amount of template DNA added. To increase the amount of protein synthesis, optimize the DNA concentration through expression level screening test prior to the experiment (See Appendix B).
Unoptimized template DNA for <i>E. coli</i> codons	If the sequences of the template DNA are not optimized for <i>E. coli</i> codons, protein synthesis may not occur or the amount of synthesis may be low. It is recommended to use codon-optimized DNA.
Position of histidine tag	Depending on the location of the histidine tag, the target protein expression may be inhibited. Or, it might not affect protein expression, but it may affect purification when the tag is not exposed to the outside during the formation of the tertiary structure. In this case, change the position of the tag.

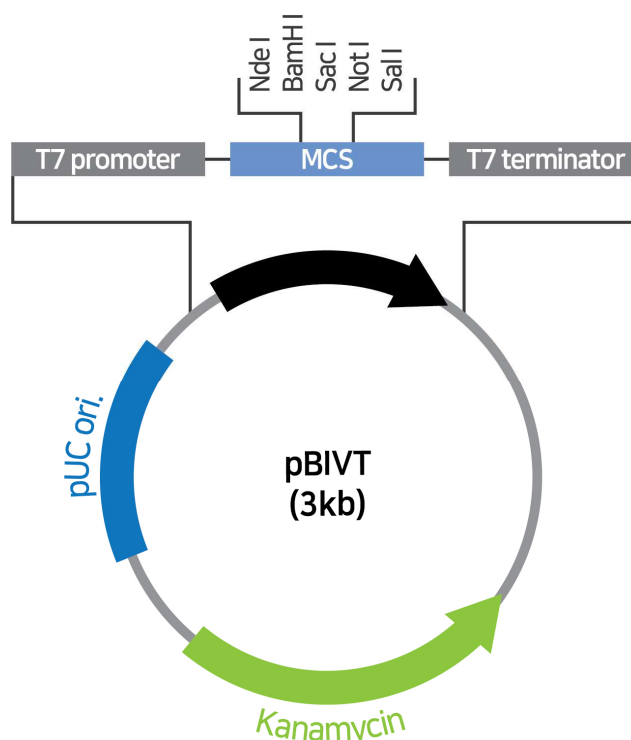
4. The activity or solubility of the target protein is low.

Cause	Solution
Proteins that require post-translational modification	In the cell-free protein synthesis system using <i>E. coli</i> extract, it is impossible to synthesize proteins that require post-translational modifications such as glycosylation and phosphorylation.
When specific elements are required for protein activity	If the synthesized protein requires specific elements to exhibit activity, the activity should be confirmed after adding the elements to the final purified protein solution.
Aggregation due to low solubility of proteins	If the protein synthesis temperature is lowered or the chaperone protein is added to help fold the protein, the solubility may be improved (Frydman, J., 2001).

Appendix A: pBIVT Vectors

BIONEER's cell-free protein synthesis vector, pBIVT Vector Set-1, is compatible with all kits of *ExiProgen™* protein synthesis system. This vector set contains two types of plasmids, so 6x histidine tagging is possible at either the N-terminus or C-terminus. The structure of the vector is as shown below.

- pBIVT Vector Map



- pBIVT-1's MCS (Multiple Cloning Site) sequences

ATG	CATATG	CACCACCACCACCACCAC	GGATCC	GAGCTC	AAGCTT	GCGGCCGC	A	TAG	GTCGAC
Start	NdeI	6X His-tag	BamHI	SacI		NotI		Stop	SalI
codon								codon	

- pBIVT-2's MCS (Multiple Cloning Site) sequences

ATG	CATATG	GGATCC	GAGCTC	AAGCTT	GCGGCCGC	A	CACCACCACCACCACCAC	TAG	GTCGAC
Start	NdeI	BamHI	SacI		NotI		6X His-tag	Stop	SalI
codon								codon	

Appendix B: Screening of Template DNA Concentration

When synthesizing proteins using the *ExiProgen*™ protein synthesis system, there may be differences in the amount of protein synthesis depending on the amount of template DNA. Optimal protein synthesis results can be obtained by first performing expression screening according to the concentration of template DNA as shown below and then synthesizing the protein using *ExiProgen*™.

1. AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit (Cat. No. K-7250)

1) Prepare by measuring the concentration of template DNA.

Example) 100 ng/μl

2) Prepare the reaction mixture as follows.

DNA concentration screening						
Components	Volume	120 ng	240 ng	360 ng	480 ng	600 ng
<i>E. coli</i> extract	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl
Master Mix	21 μl	21 μl	21 μl	21 μl	21 μl	21 μl
Template DNA	X μl	1.2 μl	2.4 μl	3.6 μl	4.8 μl	6 μl
DEPC DW	12-X μl	10.8 μl	9.6 μl	8.4 μl	7.2 μl	6 μl
Total volume	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl

3) Incubate the reaction mixtures at 30°C for 3 hrs.

4) Confirm the optimal expression concentration through SDS-PAGE.

2. ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit (Cat. No. K-7320)

1) Confirm the DNA concentration equivalent to **10 times** the optimal DNA concentration identified in the previous experiment, add protein expression solution each Dialysis tube in the **row A** of the Reaction block.

Example) EC-Tagfree Kit expression volume (450 μl) ÷ screening expression volume (45 μl) ≈ 10

Optimal DNA concentration through screening (600 ng) x 10 ≈ 6 μg

Optimal DNA concentration through screening (120 ng) x 10 ≈ 1.2 μg

Reference

- Ahn, J. H., Kang, T. J., & Kim, D. M. (2008). Tuning the expression level of recombinant proteins by modulating mRNA stability in a cell-free protein synthesis system. *Biotechnology and bioengineering*, 101(2), 422-427.
- Forster, A. C., Cornish, V. W., & Blacklow, S. C. (2004). Pure translation display. *Analytical biochemistry*, 333(2), 358-364.
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 603-647.
- Gualerzi, C. O., Giuliodori, A. M., & Pon, C. L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *Journal of molecular biology*, 331(3), 527-539.
- Hino, M., Kataoka, M., Kajimoto, K., Yamamoto, T., Kido, J. I., Shinohara, Y., & Baba, Y. (2008). Efficiency of cell-free protein synthesis based on a crude cell extract from Escherichia coli, wheat germ, and rabbit reticulocytes. *Journal of biotechnology*, 133(2), 183-189.
- Josephson, K., Hartman, M. C., & Szostak, J. W. (2005). Ribosomal synthesis of unnatural peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 127(33), 11727-11735.
- Keum, J. W., Ahn, J. H., Choi, C. Y., Lee, K. H., Kwon, Y. C., & Kim, D. M. (2006). The presence of a common downstream box enables the simultaneous expression of multiple proteins in an E. coli extract. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(3), 562-567.
- Keum, J. W., Ahn, J. H., Kang, T. J., & Kim, D. M. (2009). Combinatorial, selective and reversible control of gene expression using oligodeoxynucleotides in a cell-free protein synthesis system. *Biotechnology and bioengineering*, 102(2), 577-582.
- Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., ... & Yokoyama, S. (2002). Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *Journal of structural and functional genomics*, 2(1), 29-35.
- Kim, D. M., & Choi, C. Y. (1996). A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnology progress*, 12(5), 645-649.

Kim, T. W., Oh, I. S., Keum, J. W., Kwon, Y. C., Byun, J. Y., Lee, K. H., ... & Kim, D. M. (2007). Prolonged cell-free protein synthesis using dual energy sources: Combined use of creatine phosphate and glucose for the efficient supply of ATP and retarded accumulation of phosphate. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6), 1510-1515.

Kim, H. C., Kim, T. W., & Kim, D. M. (2011). Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochemistry*, 46(6), 1366-1369.

Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, 587(8), 1155-1163.

Lim, H. J., & Kim, D. M. (2019). Cell-free metabolic engineering: recent developments and future prospects. *Methods and Protocols*, 2(2), 33.

Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B. W., & Ueda, T. (2007). Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(1), 270-276.

Park, S., & Hamad-Schifferli, K. (2010). Enhancement of in vitro translation by gold nanoparticle– DNA conjugates. *ACS nano*, 4(5), 2555-2560.

Rungpragayphan, S., Nakano, H., & Yamane, T. (2003). PCR-linked in vitro expression: a novel system for high-throughput construction and screening of protein libraries. *FEBS letters*, 540(1-3), 147-150.

Trotta, E. (2011). The 3-base periodicity and codon usage of coding sequences are correlated with gene expression at the level of transcription elongation. *PloS one*, 6(6), e21590.

Villemagne, D., Jackson, R., & Douthwaite, J. A. (2006). Highly efficient ribosome display selection by use of purified components for in vitro translation. *Journal of immunological methods*, 313(1-2), 140-148.

Ordering Information

Description		Cat. No
<i>ExiProgen</i> TM EC-Tagfree Protein Synthesis Kit	8 rxn	K-7320

Related Products

Description		Cat. No
<i>AccuRapid</i> TM Cell-Free Protein Expression Kit		K-7250
<i>AccuRapid</i> TM Midi Protein Expression Kit		K-7260
<i>AccuRapid</i> TM Maxi Protein Expression Kit		K-7270
<i>AccuRapid</i> TM Protein Synthesis Kit		K-7280
<i>ExiProgen</i> TM ProXpress PCR Template Kit		K-7400
First primer F/R sets (N terminus 6x His tag) (each 5 nmole)		N-8229
First primer F/R sets (C terminus 6x His tag) (each 5 nmole)		N-8230
<i>ExiProgen</i> TM Protein Expression Optimization Kit		K-7410
pBIVT Vector Set-1		K-7350
<i>ExiProgen</i> TM EC-Maxi Protein Synthesis Kit		K-7310
<i>ExiProgen</i> TM EC Protein Synthesis Kit		K-7300
<i>ExiProgen</i> TM EC-Disulfide Protein Synthesis Kit		K-7330
<i>ExiProgen</i> TM EC-Bulk Protein Synthesis Kit		K-7340
<i>ExiProgen</i> TM His-tagged Protein Purification Kit		K-7220
<i>ExiProgen</i> TM Dialysis Kit		K-7240
<i>ExiProgen</i> TM Consumable SET		KA-3001
Gene Synthesis Service		S-2041
Protein Synthesis Service		S-2500
<i>ExiProgen</i> TM		A-5041

Explanation of Symbols

 Batch Code	 Biological Risks	 Catalog Number	 Caution
 Consult Instructions For Use	 Contains Sufficient for <n> tests	 Do not Re-use	 Manufacturer
 Research Use Only	 Temperature Limitation	 Use-by date	

ExiProgen[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit

사 용 설 명 서

K-7320



Version No.: 3 (2022-06-23)

사용 전, 사용설명서에 있는 모든 내용을 정독하시길 바랍니다.



(주)바이오니아

대전광역시 유성구 테크노2로 71

바이오니아 글로벌 센터

Tel: 1588-9788

Email: sales@bioneer.co.kr

www.bioneer.com

사용 목적

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit는 연구용 제품으로 연구 목적으로만 사용할 수 있습니다. 사용자는 국가 및 사용 용도에 따라 권한 취득이 필요할 수 있습니다.

안전경고 및 주의사항

자극적이거나 유해한 물질을 다루는 경우 적절한 보호장비를 착용하시기 바랍니다. 실험복, 보호장갑, 보호안경 등의 사용을 적극 권장합니다. 자세한 정보는 물질안전보건자료 (MSDS)를 확인하시기 바랍니다.

보증 및 책임

모든 바이오니아 제품은 엄격한 품질 관리 공정 아래에서 완제품 시험 과정을 거칩니다. 바이오니아는 보증 기간 (제품표시) 동안 제품의 품질을 보증합니다. 바이오니아는 본 사용설명서에 제시된 사용법과 다른 방법을 사용하여 발생한 문제에 대해서는 책임을 지지 않습니다. 효율적인 시장보고 및 처리를 위하여 고객은 발생한 문제점을 30일 이내에 바이오니아에 상세하게 전달하여야 합니다.

ISO 9001 품질경영시스템 인증

바이오니아에서 생산되는 모든 제품은 제품 개발, 생산에서 품질 보증 및 공급업체 자격에 이르기까지 ISO 9001 규정에 의거하여 엄격한 품질관리 및 검사를 통과한 후 출하된 제품입니다.

특허

ExiProgen™과 키트는 특허 KR10-2011-0085824, PCT/KR2012/006715, KR10-2012-0138335, KR10-2013-0022324에 의해 보호됩니다.

상표

ExiProgen™은 바이오니아의 상표입니다.

저작권

Copyright 2022. 바이오니아. 무단전재 및 복제 금지

고지

제품, 서비스, 사양, 설명 등 제공된 모든 정보는 사전 예고 없이 절차에 따라 변경될 수 있습니다.

목차

제품 정보	36
제품 구성	36
보관법	36
제품 사양	37
주의사항	37
개요	38
무세포 단백질 합성 시스템	38
<i>ExiProgen</i> [™] 단백질 합성 시스템	40
제품 개요	42
실험 방법	44
구성품 상세	44
실험 준비	47
실험 방법	51
Sample 분석	56
유지 보수	59
문제 해결	60
부록 A: pBIVT Vectors	62
부록 B: Template DNA 농도 Screening	63
참고 문헌	64
주문 정보	66
관련 제품	66
기호 설명	67

제품 정보

제품 구성

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit ①

구성품	K-7320 (8 rxn)	Storage
Cartridge ①	96-well x 1 ea	4°C
Dialysis tube	1 pack (16 ea/pack)	
Disposable filter tip	1 pack (8 ea/pack)	-
Protection Cover	1 ea	-

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit ②

구성품	K-7320 (8 rxn)	Storage
Cartridge ②	96-well x 1 ea	-20°C (E. coli extract는 -70°C 이하 권장)
E. coli extract	8-tube strip (Yellow) x 1 ea	
Master mix	8-tube strip (Violet) x 1 ea	
DEPC DW	8-tube strip (White) x 1 ea	
Storage buffer	35 ml x 2 bottle	
TEV protease	1.5 ml tube x 1 ea	
Positive control DNA	1.5 ml tube x 1 ea	

보관법

Kit ①에 포함된 Cartridge ①과 Dialysis tube 는 4°C 에서 보관해야 합니다. Kit ②에 포함된 Cartridge ②, Master mix, DEPC DW, Storage buffer, TEV protease, Positive control DNA 는 -20°C 에서 보관해야 합니다. 특히, E. coli extract 는 T7 RNA polymerase 와 ribosome 등이 포함되어 수령 즉시 -70°C 이하 온도에서 보관을 권장하며, 반복적으로 얼리고 녹일 경우 효율이 저하될 수 있습니다.

제품 사양

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit	
	K-7320 (8 rxn)
반응 수 (최대 8 rxn/1회)	8 rxn
반응 시간	26시간
필요한 Sample DNA 양	1-6 µg [Plasmid DNA: 0.6 µg/kb (Vector)]
수율	최대 200 µg*

* 참고: 목적 단백질에 따라 수율은 크게 달라질 수 있습니다.

주의사항

본 kit 의 Cartridge ①, ②는 교차 오염, 증발, 용액의 누출을 막기 위해 sealing film 으로 밀봉 포장되어 있고, 키트의 모든 플라스틱 제품이나 버퍼 류는 DNase-free, RNase-free 상태로 제공되므로 보관 및 사용 중 Nuclease 또는 Protease 에 의해 오염되지 않도록 주의하시기 바랍니다.

개요

무세포 단백질 합성 시스템

단백질은 효소, 호르몬, 구조 단백질 등의 다양한 기능을 수행하며 생체 반응에 있어 필수적인 요소이기 때문에, 포스트게놈시대에 단백질의 역할 및 구조에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있습니다. 이러한 연구는 특정 단백질을 만들어내는 것으로부터 시작됩니다.

단백질 연구를 위한 재조합 단백질의 합성은 대장균, 효모, 동물세포, 식물 등을 기반으로 한 여러 종류의 발현 시스템이 이용됩니다. 이러한 시스템을 기반으로 단백질을 발현하기 위해서는 타겟 유전자가 삽입되어 있는 vector를 세포 형질전환 시키고 해당 세포주를 배양해 단백질을 다량 발현시킵니다. 이후 세포를 파쇄하고, 단백질을 정제하는 공정을 일반적으로 사용합니다. 하지만, 이 방법은 재조합 단백질을 안정적으로 발현하는 균주 및 세포주의 선별 과정과 세포 배양, 세포 파쇄, 단백질 정제 등 일련의 과정을 거쳐야 하므로 많은 시간과 노동력이 필요합니다. 또한, 타겟 단백질이 균주 및 세포주에 독성을 나타내면 단백질 발현이 어려워 다양한 발현 조건을 시도해야 하기에 하나의 단백질을 성공적으로 합성하기까지 짧게는 몇 주, 길게는 수개월의 시간이 소요됩니다.

이러한 문제점을 극복하고자 무세포 단백질 합성 시스템과 관련 제품이 개발되어 왔습니다(Keum et al., 2009; Kim et al., 2007; Kim et al., 2011; Park & Hamad-Schifferli, 2010). 무세포 단백질 합성 시스템은 cell extract를 기반으로 *in vitro*에서 유전자를 전사, 번역하여 단백질을 합성하는 기술입니다. T7 RNA polymerase, 리보솜, tRNA, 효소 등이 포함된 cell extract와 아미노산, rNTP, 에너지 물질 등 전사 및 번역을 수행하는 물질과 기질이 포함된 단백질 발현 용액을 준비합니다. 이후 타겟 단백질을 암호화하는 유전자를 첨가하고, 적정 온도에서 일정 시간 반응을 진행하면 재조합 단백질이 발현됩니다(그림1). 무세포 단백질 합성 시스템은 반응 시간이 최소 1~3시간이므로 단백질 발현 시간을 획기적으로 절감할 수 있습니다. 또한, 살아있는 세포가 아닌 cell extract를 기반으로 단백질을 발현하기 때문에 세포 내 독성을 나타내는 단백질 발현에 용이하며, open system이므로 단백질 발현을 위한 조건을 간편하게 조절할 수 있습니다(Hino et al., 2008).

무세포 단백질 합성 시스템은 효소 공학, 단백질 labeling, 단백질-단백질 상호작용 기작 연구, 단백질 활성 부위에 대한 연구 등에 폭넓게 활용되고 있습니다(Forster et al., 2004; Josephson et al., 2005; Keum et al., 2006; Kigawa et al., 2002; Ohashi et al., 2007; Villemagne et al., 2006).

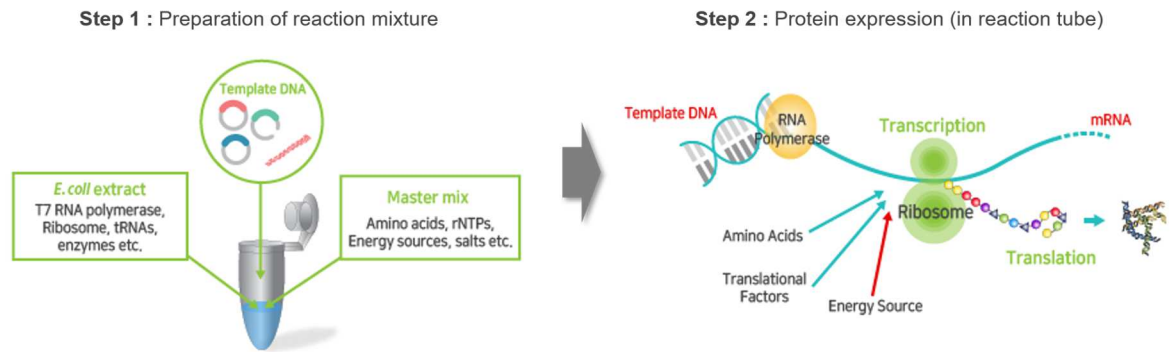


그림 1. 무세포 단백질 합성 시스템의 원리.

ExiProgen™ 단백질 합성 시스템

바이오니아에서는 전자동 단백질 합성 장비인 ExiProgen™을 개발했습니다. ExiProgen™은 무세포 단백질 합성 기술과 나노 자성입자를 이용한 친화성 정제 기술을 적용한 장비입니다. 따라서 당사의 다양한 단백질 발현 및 정제 키트를 함께 사용하여 고순도의 단백질을 신속하게 전자동으로 획득할 수 있습니다. 한편, 본 장비는 핵산 추출 키트를 이용하여 다양한 시료로부터 필요한 DNA, RNA를 전자동으로 추출할 수 있어 활용도가 높습니다.

당사의 단백질 발현 및 정제 키트는 *E. coli*의 T7 발현 시스템을 이용하며, Template DNA(발현 vector 또는 PCR product)만 있으면 바로 이용할 수 있습니다 (Ahn et al., 2008; Rungpragayphan et al., 2003). ExiProgen™ 장비를 이용한 단백질 합성은 Template DNA를 첨가하면 단백질 발현과 정제 등 일련의 과정을 전자동으로 수행하여 최종적으로 목적 단백질이 포함된 시료를 얻을 수 있습니다.

당사의 단백질 발현 및 정제 키트는 세 가지 제품 군(그림 2)으로 분류됩니다. 1) 무세포 단백질 발현에 사용되는 Template DNA를 제조하는 제품군, 2) Manual 방식으로 손쉽게 재조합 단백질을 발현 혹은 합성할 수 있는 AccuRapid™ 제품군, 3) ExiProgen™ 장비를 이용하여 전자동으로 단백질을 발현하고 정제할 수 있는 ExiProgen™ 제품군으로 나누어 집니다. 단백질 발현 및 정제 키트는 제품마다 최소 µg 단위부터 최대 mg 단위까지 단백질을 발현 및 합성할 수 있습니다.

이 외에도 단백질 발현 성능을 향상시키기 위한 키트, 단백질 정제 혹은 버퍼를 교환하기 위한 키트 등 실험 목적에 따라 선택 가능한 기타 제품군이 있습니다.

각 키트에 대한 자세한 설명은 바이오니아 홈페이지 (www.bioneer.co.kr)을 참고하시기 바랍니다.

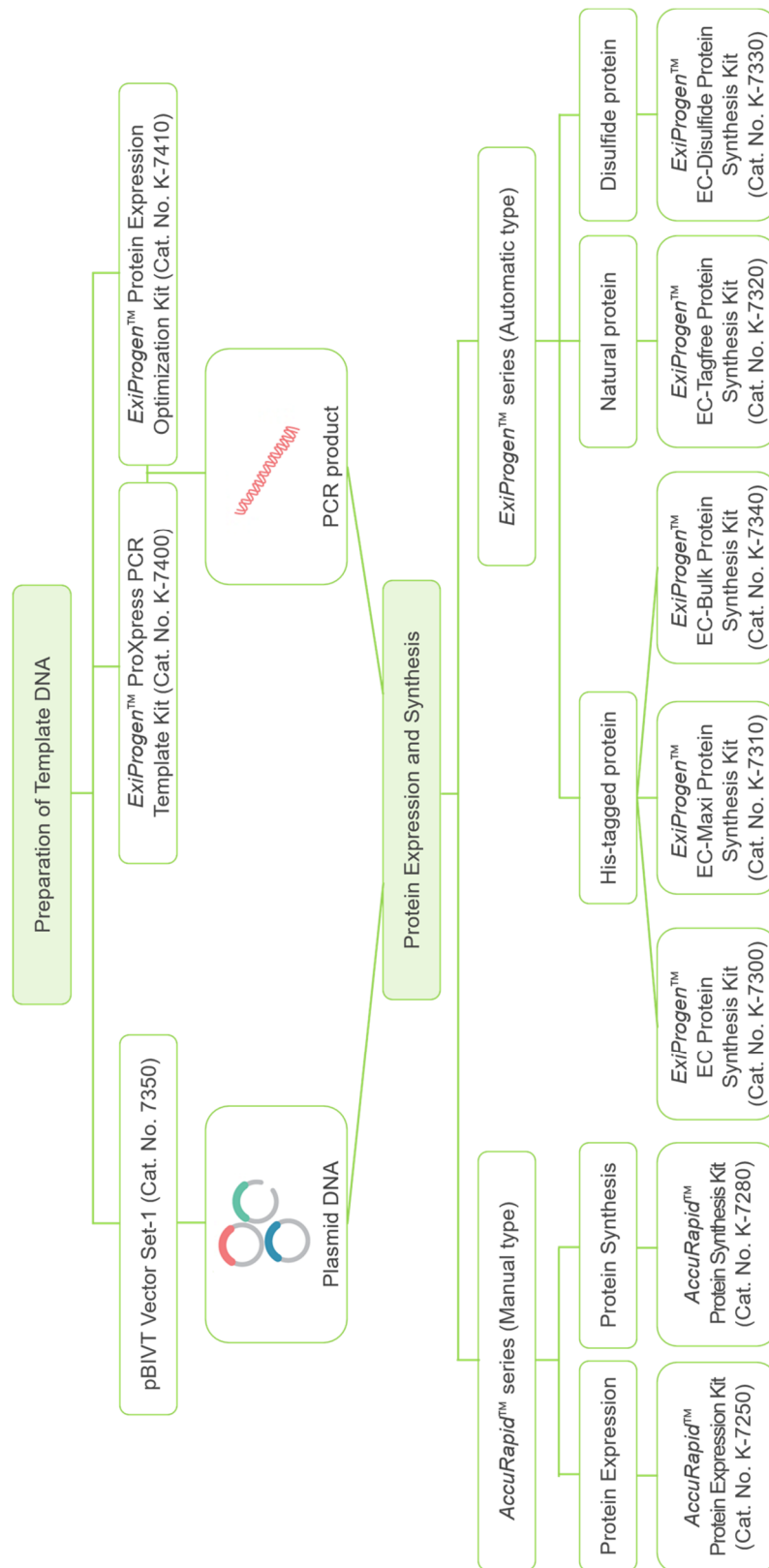


그림 2. 단백질 발현 및 합성 관련 제품 정보.

제품 개요

ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit는 자사의 전자동 단백질 합성 및 핵산 추출 장비인 ExiProgen™에 적용할 수 있는 키트로, 1회 반응 당 Histidine tag이 제거된 8종류의 순수한 단백질을 최대 200 µg까지 합성할 수 있습니다.

본 제품은 Stepwise Exchange Cell-Free (SECF) 단백질 합성 기술을 적용해 최적의 단백질 발현 환경을 조성합니다. 이 기술은 membrane을 이용한 투석을 통해 단백질 발현 시 발생하는 부산물이 제거되며, 동시에 단백질 발현에 소모되는 에너지원과 아미노산이 추가로 공급됩니다(그림 3) (Kim & Choi, 1996; Lim & Kim, 2019). 최적의 단백질 발현 환경은 높은 단백질 합성 수율로 이어집니다.

발현된 단백질은 Histidine tag을 이용한 Affinity 방법으로 정제됩니다. 그리고 목적 단백질과 Histidine tag을 연결하는 TEV cleavage site에 TEV protease가 작용해 절단되어 최종적으로 Histidine tag이 제거된 순수한 단백질을 얻을 수 있습니다(그림 4) (Li et al., 2013).

단백질 발현/정제 및 투석을 통한 Buffer change까지 모든 반응은 전자동으로 진행됩니다. 따라서 사용자가 타겟 유전자만 첨가하면, 간편하게 8종류의 순수한 단백질을 Storage buffer에 용해된 상태로 회수할 수 있습니다.

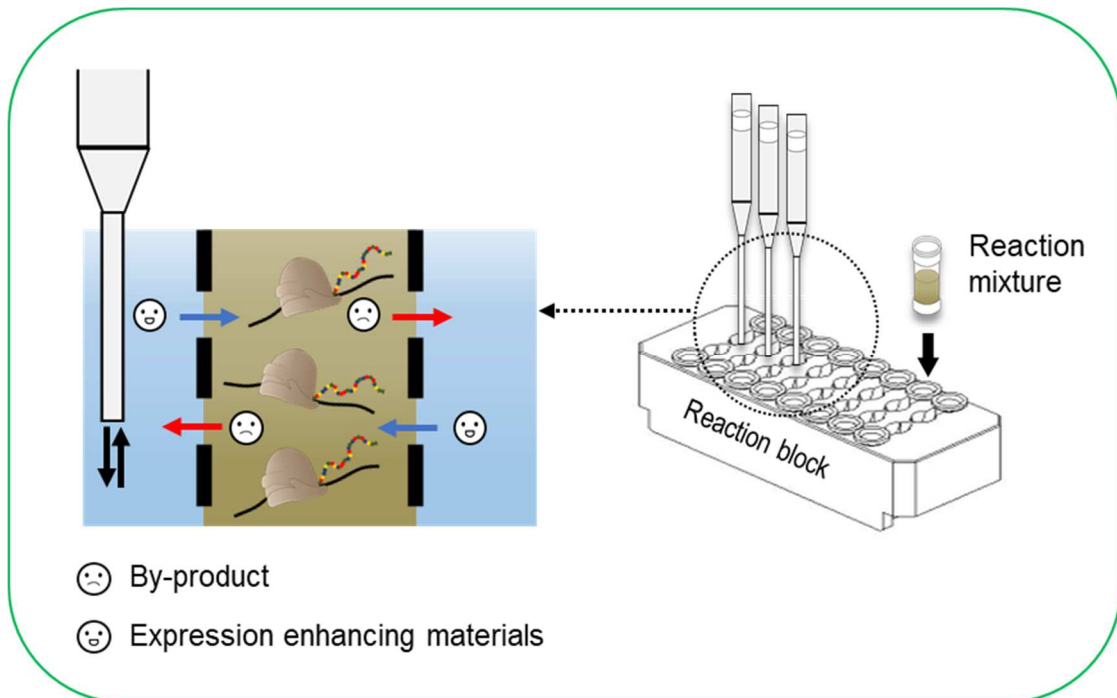


그림 3. ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit의 SECF 원리.

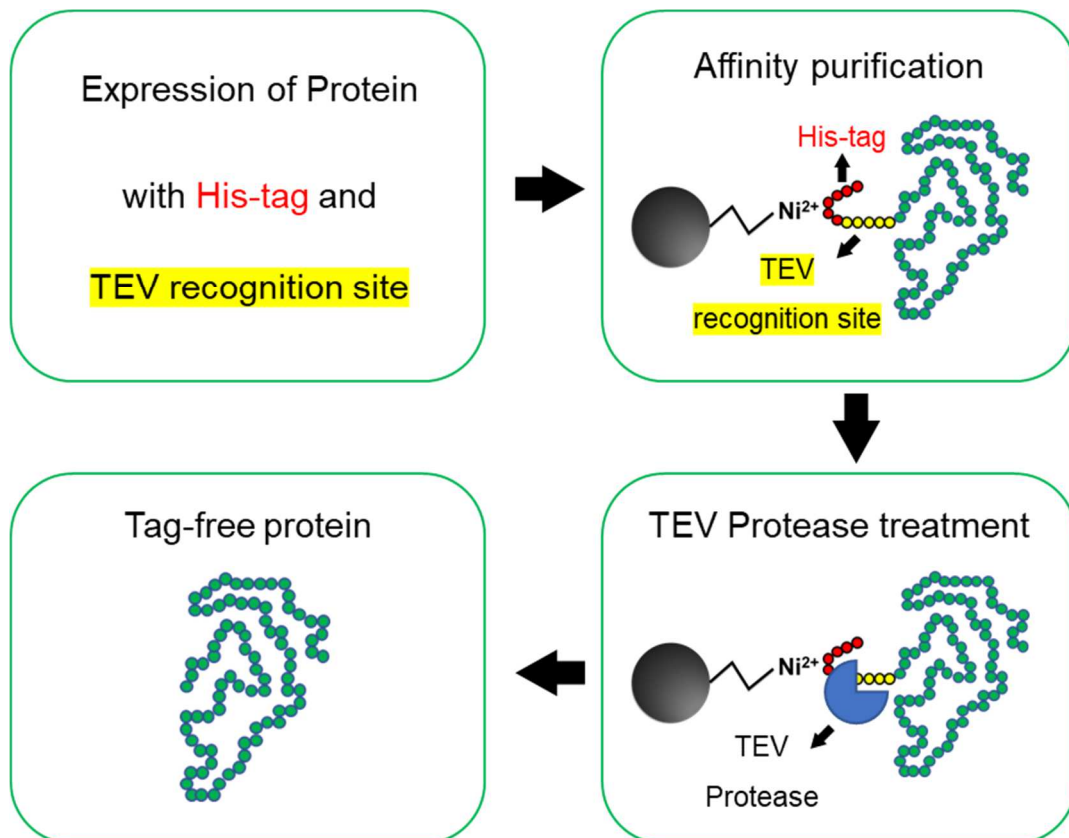


그림 4. ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit의 원리.

실험 방법

구성품 상세

1. Cartridges

F2					0.9 ml
F1					0.3 ml
E2					0.9 ml
E1					0.9 ml
D2					0.9 ml
D1					0.9 ml
C2					0.9 ml
C1					0.9 ml
B2					0.9 ml
B1					0.9 ml
A2					0.25 ml
A1					1 ml

Ni-NTA magnetic bead

Binding/Washing buffer

Ni-NTA magnetic bead에 단백질 발현물이 결합할 수 있게 평형화 해주며, 목적 단백질 결합 후, 세척과정 (불순물 제거)에 사용

멸균 증류수

Elution 전, tip 세척에 사용.

L2					1.2 ml
L1					1 ml
K2					1 ml
K1					1 ml
J2					1 ml
J1					1 ml
I2					1 ml
I1					1 ml
H2					1 ml
H1					1 ml
G2					1 ml
G1					0.3 ml

Feeding buffer

순차적 단백질 발현 반응 시, 첨가해 주는 단백질 발현용액으로 NTP, 아미노산, 에너지원 등을 포함하고 있음.

Storage buffer

단백질 정제 후, 최종 목적 단백질을 보관해주는 완충용액.

TEV protease and reaction buffer

(TEV protease 100 μ l 추가 시, final volume)

6x histidine-tag의 제거에 사용.

2. *E. coli* extract

Kit ②의 구성품인 *E. coli* extract는 세포 파쇄액으로, 단백질 발현에 필요한 T7 RNA polymerase, 리보솜, tRNA 등을 공급해 주며, 8-tube strips로 공급되며, 각 tube당 **130 µl**씩 분주 되어 있습니다.

3. Master mix

Kit ②의 구성품인 Master mix는 단백질 발현에 필요한 NTPs, 아미노산 및 에너지원과 salt를 포함하고 있으며, 8-tube strip으로 공급되며, 각 tube당 **220 µl**씩 분주 되어 있습니다.

4. DEPC DW

단백질 발현용액의 최종 부피를 맞추어 주는 용도로 사용되며, 8-tube strip으로 공급되며, 각 tube당 **130 µl**씩 분주 되어 있습니다.

5. Dialysis tube

Dialysis tube는 당사에서 제작한 특수한 membrane tube로, feeding buffer 내의 에너지를 단백질 발현용액으로 공급해 주고, 목적 단백질 정제 후 정제 버퍼를 storage buffer로 교체할 때 사용되며, 20% 에탄올에 보관되어 있습니다. 또한, 각 tube는 개별 포장되어 있으므로, 사용시 필요한 개수만큼 꺼내어 사용하시면 됩니다. 사용하기 전 20% 에탄올을 제거하고 멸균 증류수로 한번 세척한 후 사용하시기 바랍니다.

6. Storage buffer

키트에서 제공하는 storage buffer의 조성은 다음과 같습니다.

- Buffer 조성: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.05% (v/v) NaN₃, 50% (v/v) glycerol, pH 7.6

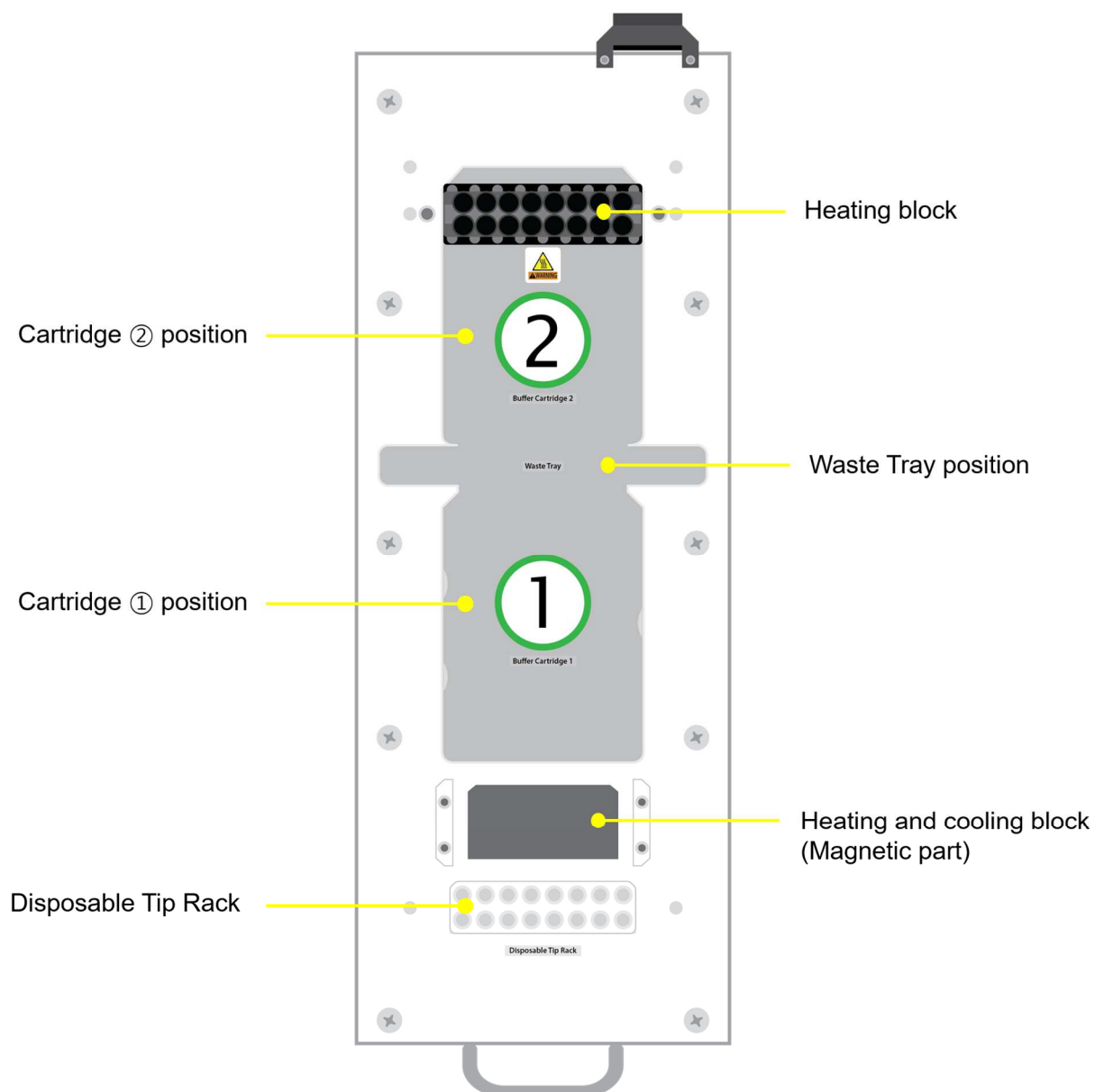
Storage buffer는 bottle에 제공되며, 사용 직전에 Cartridge ②의 G2~J1 행에 1 ml씩 분주하여 사용하시면 됩니다. 만일 다른 조성의 buffer를 사용하시고자 하는 경우, 조성에 맞게 직접 제조하여 사용하시면 됩니다. 단, buffer에 glycerol을 10% 이상 첨가해 주셔야 합니다. 그렇지 않을 시, 용액 사이의 농도차에 의하여 storage buffer가 Dialysis tube 내로 다량 유입되어 정제된 단백질을 포함한 용액이 Reaction block 밖으로 넘쳐 흐를 수 있습니다.

7. TEV protease

6x histidine-tag을 제거하는데 사용되며, **사용 직전에 Cartridge ②의 G1 행에 100 µl씩 분주하여 사용하시면 됩니다.**

3. 참고

ExiProgen™ Baseplate 구조



실험 준비

Template DNA 준비

*ExiProgen*TM EC-Tagfree Protein Synthesis Kit 에 적용하기 위한 template DNA 는 “T7 promoter - Ribosome binding site (RBS) – 6x histidine tag – **TEV cleavage site** - Target gene - T7 terminator”의 구조를 가지고 있어야 합니다(그림 5). 이 서열을 기반으로 합성된 단백질은 정제과정을 마친 후, 최종적으로 목적 단백질 앞에 하나의 아미노산[Glycine(또는 Serine)]만을 추가로 가지게 됩니다. X 의 위치에는 20 개의 아미노산 중 어느 것이나 사용 가능하며, Positive control 로 제공되는 DNA 의 서열은 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly 을 암호화하고 있습니다.

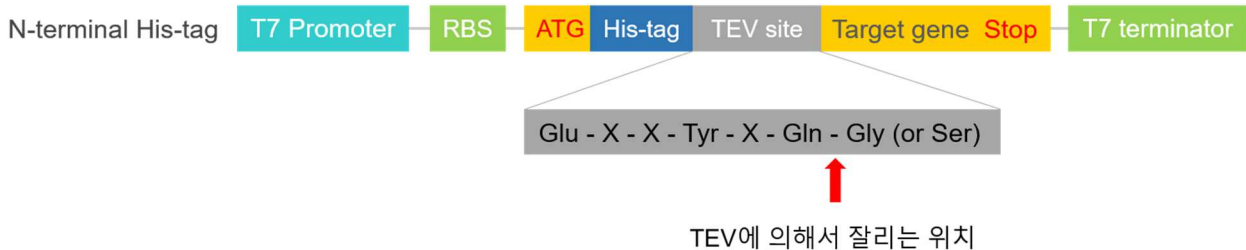


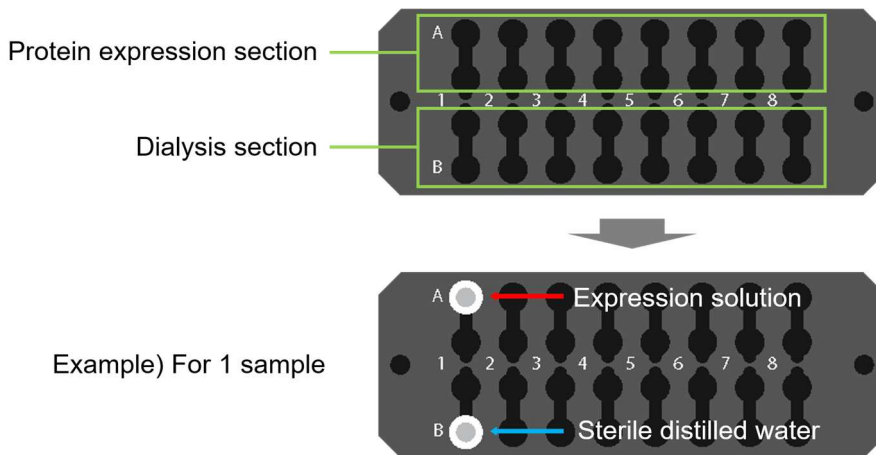
그림 5. *ExiProgen*TM EC-Tagfree Protein Synthesis Kit 에 적용을 위한 template DNA 의 구조 및 TEV site 서열.

발현 vector 는 당사에서 판매하는 *in vitro* translation 전용 vector 인 pBIVT Vector Set-1 (Cat. No. K-7350, 부록 A. 참조) 에 cloning 하여 사용 가능 하며, 그 밖에도 pK7, pIVEX, pET vector 등을 사용하실 수 있습니다.

단백질 합성을 최대화하기 위해서는 DNA 의 서열이 *E. coli* 코돈에 최적화되어 있어야 하며, 만약 코돈 최적화가 안되어 있는 경우 당사의 Gene Synthesis Service 를 통해서 합성하실 수 있습니다. (Trotta, E., 2011). 또한, 당사의 *in vitro* translation 전용 vector 인 pBT7-N-His vector, pBT7-C-His vector 에 cloning 된 상태로 제공받으실 수 있어, 쉽고 빠르게 적용 가능합니다. 자세한 내용은 홈페이지(www.bioneer.co.kr)를 참조하시기 바랍니다.

실험 시작 전 준비사항

1. Kit ② 박스에서 Cartridge ②를 꺼내어 상온에서 미리 녹입니다.
2. Kit ② 박스에서 *E. coli* extract, Master mix, DEPC DW 를 반응 sample 수에 맞게 꺼내어 ice 에서 천천히 녹입니다. 필요한 경우, Positive control DNA tube 를 함께 꺼내어 녹입니다.
* 참고: 용액이 녹는 데, 약 2 시간이 소요됩니다. 사용 전, 모든 용액이 완전히 녹은 것을 확인하고 사용하시기 바랍니다.
* 참고: Positive control 은 pBIVT-(TEV site)-AcGFP 가 제공되며, 약 3.8 kb (28 kDa)입니다.
3. Reaction block (*ExiProgen*[™] 장비 액세서리)을 준비합니다.
4. Kit ① 박스에서 Dialysis tube를 반응 sample 수의 2배 개수로 준비합니다. 핀셋으로 Dialysis tube를 꺼낸 후, pipette을 이용하거나 상하로 흔들어 내부의 에탄올을 제거합니다. 그 후, 멸균 증류수가 들어있는 squeeze bottle을 이용하여 tube 내/외부를 세척합니다.
* 참고: 멸균 증류수는 따로 제공되지 않으니 준비해주시기 바랍니다.
5. Pipette 을 이용하여 Dialysis tube 내부의 물기를 완전히 제거하고, Reaction block 에 아래 그림과 같이 장착합니다. **B** 행의 tube 에는 **멸균 증류수 500 μ l** 를 채워 놓습니다.



6. Kit ① 박스에서 Cartridge ①과 Disposable filter tip, Protection Cover 를 꺼내어 준비합니다.

7. 단백질 발현 용액 준비

ExiProgen™으로 단백질 합성을 하기에 앞서, 발현시키고자 하는 DNA 가 첨가된 발현 용액을 준비해야 합니다.

- 1) 미리 녹인 *E. coli* extract, Master mix, DEPC DW 를 이용하여 아래와 같이 단백질 발현 용액을 제조합니다. 각 tube 를 spin down 한 후, tube 내의 용액을 pipette 으로 섞어준 뒤, 사용하시기 바랍니다.

조성	Sample	Positive control DNA
Template DNA	X μ l	6 μ l
<i>E. coli</i> extract	120 μ l	120 μ l
Master mix	210 μ l	210 μ l
DEPC DW	(120-X) μ l	114 μ l
Total volume	450 μ l	450 μ l

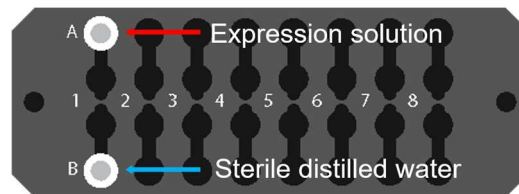
* 참고: Sample DNA 의 양 – Plasmid DNA: 0.6 μ g/kb (Vector)

예시) Insert DNA 포함 plasmid DNA 크기가 5 kb, 농도가 100 ng/ μ l 인 DNA 용액을 사용하는 경우
→ 30 μ l (= 3 μ g) 사용

* 참고: 최적의 단백질 합성을 원하시는 경우, 부록 B. 를 참조하여 DNA 농도 screening 실험을 진행하시기 바랍니다.

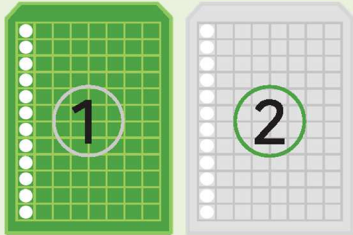
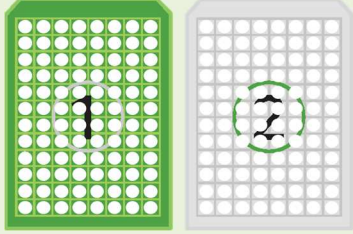
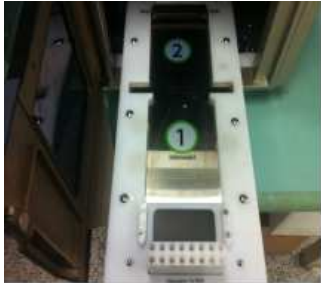
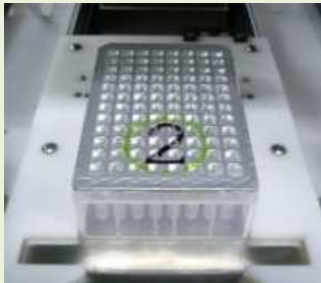
- 2) 위에서 제조한 각 단백질 발현 용액을 Reaction block 의 **A 행의 tube** 에 넣습니다.

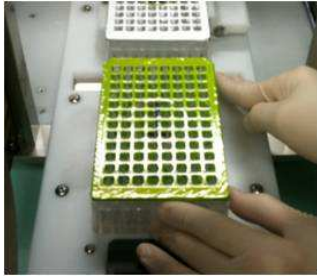
Example) For 1 sample



- 3) Reaction block 위에 Protection Cover 를 장착하여 실험 준비를 마칩니다.

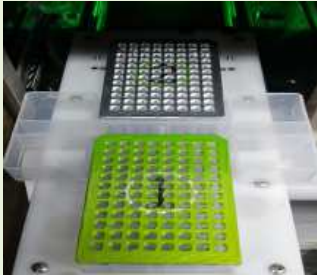
실험 방법

단계	세부절차
예시 1) Sample 1개  예시 2) Sample 8개 	1. 6 Hole Punch (<i>ExiProgen</i>TM 장비 액세서리)를 이용하여 sample 수에 맞게 Cartridge ①과 ②의 sealing film 에 구멍을 뚫어 주시기 바랍니다. * 참고: 왼쪽 그림을 참고하여 Sample 수에 맞게 sealing film 에 구멍을 뚫어 주시기 바랍니다. 2. Cartridge ②의 G1 행에는 TEV protease 100 µl 씩, G2~J1 행에는 storage buffer 1 ml 씩 분주해주시기 바랍니다. * 참고: 다른 조성의 storage buffer 를 사용하는 경우, 조성에 맞게 직접 제조하여 사용하시면 됩니다. 단, buffer 에 glycerol 을 10% 이상 첨가해 주셔야 합니다. 그렇지 않을 시, 농도 차에 의하여 storage buffer 가 Dialysis tube 내로 다량 유입되어 용액이 Reaction block 밖으로 넘쳐 흐를 수 있습니다.
	3. <i>ExiProgen</i>TM 장비의 문을 열고, baseplate 를 앞으로 완전히 잡아당깁니다.
	4. 숫자 ②가 쓰여진 위치에 Cartridge ②를 장착하시기 바랍니다. * 참고: Cartridge ②의 L 행을 먼저 Heating block 방향으로 끼워 넣어 장착하신 후, 잘 고정이 되었는지 확인하시기 바랍니다.



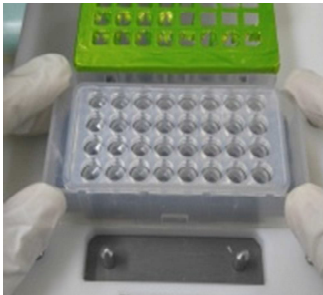
5. 숫자 ①이 쓰여진 위치에 Cartridge ①을 장착하시기 바랍니다.

* 참고: Cartridge ① 장착 위치에는 Cartridge 고정을 위한 실리콘 링이 양쪽에 있습니다. 따라서 Cartridge의 왼쪽 면부터 맞춘 후, 오른쪽 면을 눌러서 끼우고, Cartridge가 흔들리지 않는지 확인하시기 바랍니다.



6. Cartridge ②와 ①을 모두 장착한 후, 사이에 Waste Tray를 장착하시기 바랍니다.

* 참고: Cartridge ② → Cartridge ① → Waste Tray 순서를 지켜서 장착하신 후, 흔들리지 않고 제대로 고정이 되었는지, 확인하시기 바랍니다.



7. pp. 49~50에서 준비한 Reaction block을 장비 내 base plate의 Heating and cooling block (Magnetic part)에 장착하시기 바랍니다.

* 참고: Reaction block을 장착할 시에는 A행은 장비 안쪽, B행은 Disposable Tip Rack 방향으로 향하게 장착되었는지 확인하시기 바랍니다.



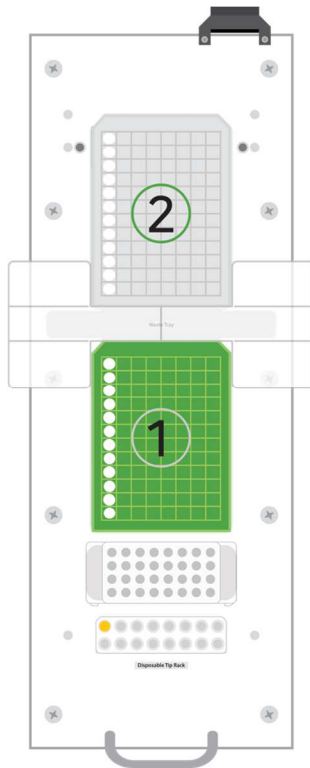
8. Disposable Tip Rack의 **B행**에 sample의 개수에 맞게 Tip을 꽂으시기 바랍니다.

* 참고: 단, Cartridge의 뚫린 '열'과 같은 '열'에 tip을 꽂으셔야 합니다. 또한, Cartridge의 뚫지 않은 열에 상응하는 위치에는 tip을 꽂지 마시기 바랍니다.

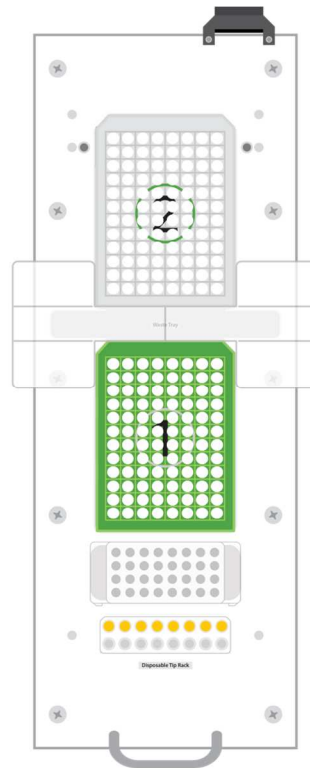
9. 최종적으로 Cartridge, sample, tip의 위치를 확인하시기 바랍니다(53페이지 참고). Baseplate를 밀어 넣고 문을 닫습니다. 단, 이때에 baseplate는 소리가 날 때까지 밀어 넣으시기 바랍니다.

* 참고

예시 1) Sample 1 개



예시 2) Sample 8 개



10. ExiProgen™ 장비의 전원을 켜고, 'Press to start' 버튼을 눌러 주시기 바랍니다. 'start' 버튼을 누르면, 좌측 하단과 같이 ExiProgen™ 화면이 뜨고, 스크롤 바가 움직인 후, 다음 화면으로 넘어 갑니다.

* 참고: 이 과정은 장비의 X, Y, Z 축 값을 초기화 하는 과정입니다. 만약 정상적으로 다음화면으로 넘어가지 않는 경우에는 장비의 전원을 끄고, A/S 센터로 연락하시기 바랍니다.



11. MENU 화면에서 'Start' 버튼을 누르면, 프로토콜을 선택할 수 있는 다음 화면으로 넘어 갑니다.

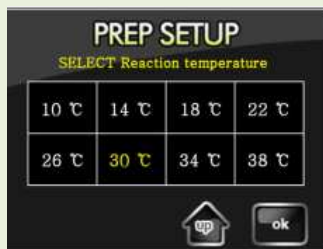


12. 좌측 화면과 같이 PREP SETUP 화면이 나타나고, 각 키트에 해당하는 프로토콜 번호를 선택할 수 있는 화면이 나타납니다. 여기에서 '904'를 눌러 화면에서 아래의 내용이 나타나는지 확인 후, 'Enter' 버튼을 눌러 주시기 바랍니다.

Prep Type: Protein
Sample SRC: Synthesis_TF



13. 프로토콜 선택 후, Elution volume 을 선택할 수 있는 화면이 나타납니다. 이는 핵산 추출 시 사용되는 것으로, 본 키트 사용시에는 곧바로 'ok'버튼을 눌러 다음 단계로 이동하시기 바랍니다.



14. Elution volume 선택 화면 후, 단백질 합성 시 온도를 선택할 수 있는 화면이 나타납니다. 본 키트 사용시에는 **30°C**를 선택하신 후, 'ok'버튼을 눌러 주시기 바랍니다.



15. 'CHECK LIST' 화면이 뜨면, Cartridge 를 비롯한 부속품이 각 위치에 맞게 셋팅 되어 있는지 다시 한번 확인하신 후 'ok' 버튼을 눌러 주시기 바랍니다.



16. 좌측과 같이 'Running Mode' 화면이 뜨면, 최종적으로 아래의 내용을 확인하신 후, 'RUN' 버튼을 눌러 주시기 바랍니다. 이 후, 장비 가동이 시작되고 **약 26 시간** 소요됩니다.

Prep Type: Protein

Sample SRC: Synthesis_TF



17. 프로토콜 실행이 완료되면 'Work Completion' 화면이 나타납니다. 실험에 사용한 모든 부속품을 제거하신 후, 원하시는 버튼을 눌러 주시기 바랍니다.

* 참고: 단, 종료를 원하시어 'ok'버튼을 누르시면, UV lamp 가 가동됩니다.

Sample 분석

ExiProgen™ 장비를 이용한 단백질 합성이 끝난 후, 최종 목적 단백질은 Reaction block의 **B행의 tube**에서 회수하실 수 있으며, 단백질 용액은 약 180~190 µl 정도가 회수됩니다(그림 6). 단, 최종 단백질 용액에는 Ni-NTA magnetic bead가 포함되어 있을 수 있으나, 이는 원심 분리하여 제거한 후 사용하시면 됩니다.

필요 시, 단백질 발현 및 정제 과정 중의 일부 sample은 그림 6와 같이 Cartridge ②의 K1, K2, L2 행에서 회수하실 수 있습니다.

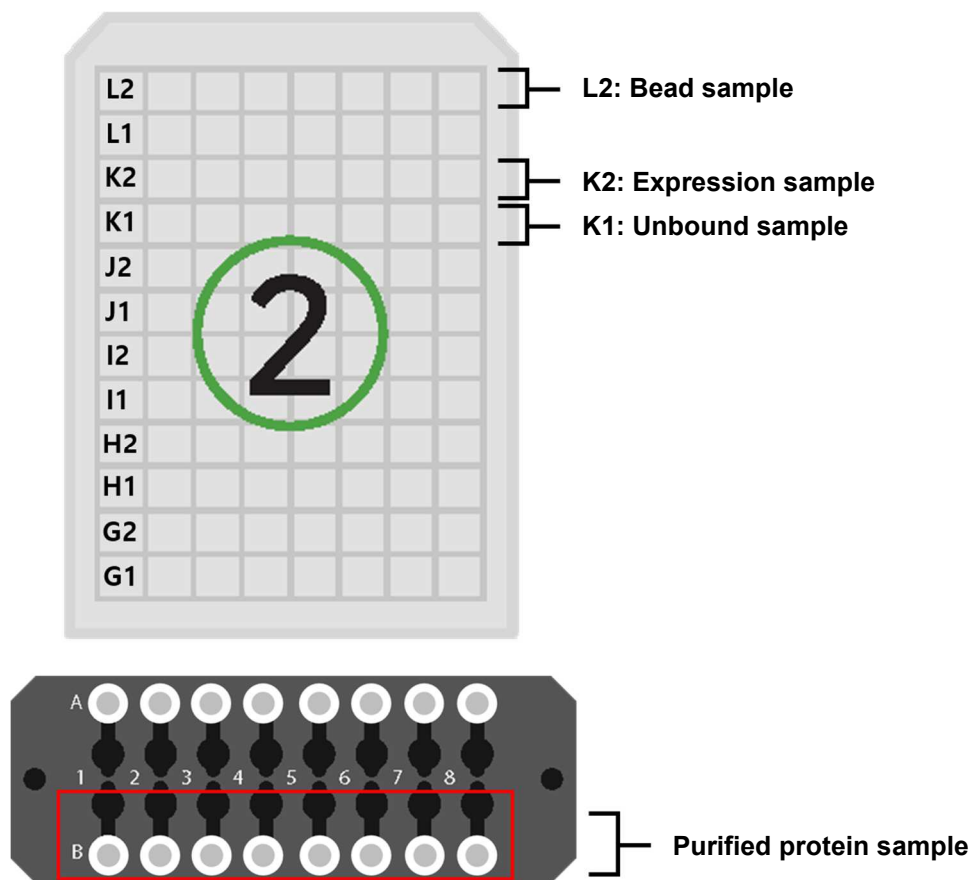


그림 6. Cartridge ②의 각 행별 sample.

- Expression sample: 단백질 발현 sample.
- Unbound sample: 발현 sample을 Ni-NTA bead에 결합시킨 후의 상등액(bead에 결합하지 않은 단백질을 포함하는 용액).
- Bead sample: 단백질 정제 시, 사용된 bead sample (Elution 되지 않은 단백질을 포함하는 용액).

각 sample들은 SDS-PAGE를 통해 원하는 단백질의 합성이 제대로 이루어졌는지 확인할 수 있습니다.

1. Loading mixture를 아래와 같이 준비하시기 바랍니다.

조성	Expression/ Unbound sample	최종 단백질 sample	Bead sample
Sample	5 μ l	5 μ l	15 μ l
4X loading dye	5 μ l	5 μ l	5 μ l
멸균 증류수	10 μ l	10 μ l	-
Total volume	20 μ l	20 μ l	20 μ l

* 참고: 360-400 μ l의 멸균증류수를 카트리지 내 Bead sample이 포함되어 있는 well에 첨가하고 pipette을 이용해 충분히 혼합한 후 sampling하시기 바랍니다.

2. 준비한 loading mixture를 95°C에서 5~10분간 열처리를 하시기 바랍니다.

3. 10% 또는 12% SDS-PAGE gel [10 x 8 (cm), 10-well]에 각 sample들을 하기와 같은 양을 loading하신 후, running 하시기 바랍니다.

- Expression/Unbound samples: 5 μ l/well
- 최종 단백질, Bead sample: 10 μ l/well

4. Coomassie blue 용액으로 염색 및 탈색하여 목적 단백질의 합성 여부를 확인합니다(그림 7, 8).

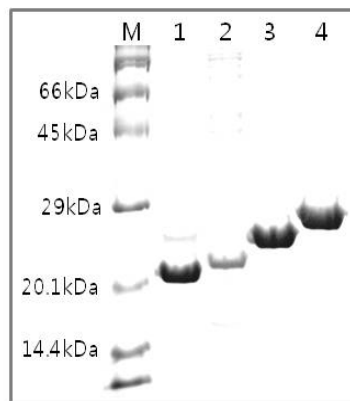


그림 7. *ExiProgen*[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit를 통한 단백질 합성 확인을 위한 SDS-PAGE

결과. M, Protein Size Marker; Lane 1, Dual specificity protein phosphatase 3 (22 kDa); Lane 2, Human growth hormone (23 kDa); Lane 3, CAT (24 kDa); Lane 4, AcGFP (28 kDa).

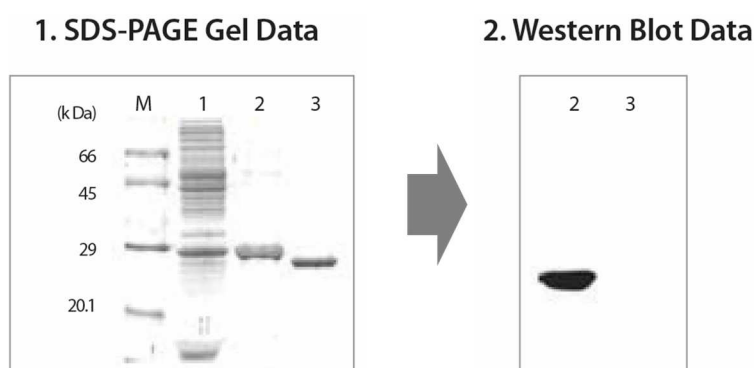


그림 8. *ExiProgen*™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit 를 통해 합성된 단백질의 6x histidine tag 제거 확인을 위한 SDS-PAGE 및 His-tag antibody 를 통한 Western blot 결과. M, Protein Size Marker; Lane 1, Expression sample of pBIVT-TEV-AcGFP; Lane 2, Histidine tag-TEV-AcGFP (histidine tagged sample); Lane 3, AcGFP (histidine tag-free sample).

유지 보수

단백질 합성이 끝난 후, Cartridge 및 기타 장비 액세서리는 다음과 같이 세척 후 보관하시면 됩니다.

1. Reaction block

단백질 합성이 끝난 후, Reaction block은 사용한 모든 well을 멸균 증류수로 세척한 후, 70% 에탄올 용액에 담근 상태로 상온에서 보관하시면 됩니다. 사용 전, 멸균 증류수로 세척하여 말린 후 사용하시면 됩니다.

2. Waste Tray 및 Disposable Tip Rack

Waste Tray는 tray 안의 용액을 버리고 흐르는 물에 씻은 후 20% 에탄올을 뿌려서 닦은 후, 보관하면 됩니다. 또한, Disposable Tip Rack은 불순물이 묻어 있지 않은 경우에는 그대로 보관하시고, 만약 불순물이 묻은 경우에는 20% 에탄올을 뿌려서 닦은 후, 보관하면 됩니다.

3. Cartridge ①, ②

반응이 끝나고 남은 Cartridge들은 뚜껑을 덮은 상태로 Cartridge ①은 4°C, Cartridge ②는 -20°C에 각각의 온도에 맞게 보관하시기 바랍니다.

문제 해결

단백질 합성에 문제가 있는 경우, 아래의 내용을 참조하여 해결하시기 바랍니다.(단, 아래의 내용은 일반적인 단백질의 합성에 대한 해결방법을 제시해 줄 수 있으나, 모든 단백질의 합성 문제의 해결 방법에 해당되지 않을 수 있다는 점을 유의하시기 바랍니다.)

1. Positive control을 포함한 목적단백질의 합성이 되지 않는 경우.

원인	해결 방법
Nuclease (DNase, RNase)의 오염	실험을 하실 때에는 장갑을 끼고, DNase-, RNase-free한 pipette tips을 이용하시기 바랍니다.
DNA 미첨가 또는 구성품 미장착	정확한 양의 Positive control DNA를 첨가하고 모든 구성품을 올바르게 장착하였는지 확인하시기 바랍니다.
시약의 보관 상태	키트 내의 모든 시약 및 구성품은 권장하는 온도에서 보관하시기 바라며, 특히 <i>E. coli</i> extract는 반복적으로 얼리고 녹이지 않도록 주의하시기 바랍니다.

2. Positive control 단백질은 합성되나, 목적단백질이 합성되지 않는 경우.

원인	해결 방법
Template DNA의 염기서열	Template DNA의 ORF (Open Reading Frame)에 mutation이 생기는 경우 translation이 중단될 수 있으니, ORF 서열을 확인하시기 바랍니다.
Template DNA의 구조	Template DNA에 T7 promoter, T7 terminator, Histidine tag의 구조가 올바르게 위치하는 것을 확인하시기 바랍니다.
Template DNA의 오염	Template DNA를 준비하는 과정에서 nuclease의 오염에 의해서 DNA가 분해된 경우에는 단백질 합성이 되지 않습니다. 따라서, nuclease-free elution buffer를 이용하여 얻은 template DNA 사용을 권해드립니다.
낮은 발현 효율	ExiProgen™ Protein Expression Optimization Kit로 제작한 template DNA를 사용하여 단백질 발현 효율을 증가시킬 수 있습니다.

3. 목적 단백질의 합성량이 낮은 경우.

원인	해결 방법
Template DNA의 순도	DNA의 순도가 낮은 경우에는 단백질의 합성이 되지 않을 수 있습니다. $A_{260/280}$ 값이 1.7~2.0이고, $A_{260/230}$ 값이 1.5 이상인 DNA를 사용하시는 것을 권장해 드립니다.
Template DNA의 첨가량	Template DNA의 첨가량에 따라서 단백질의 합성량에 차이가 있을 수 있습니다. 단백질 합성량의 증대를 위해서는 실험에 앞서, 발현 screening을 통해 최적의 DNA 농도를 결정한 후, 단백질 합성을 하시기 바랍니다(부록 B. 참조).
Template DNA의 <i>E. coli</i> 코돈 최적화 여부	Template DNA의 염기 서열이 <i>E. coli</i> 코돈 최적화가 이루어지지 않은 경우, 단백질 합성이 되지 않거나, 합성량이 낮을 수 있습니다. 코돈 최적화된 유전자를 사용하시는 것을 권장해 드립니다.
Histidine tag의 위치	Histidine tag의 위치에 따라 목적 단백질의 발현이 저해될 수 있습니다. 혹은 단백질 발현에는 영향을 주지 않으나, 3차 구조 형성 시 외부로 노출되지 않아서 정제가 되지 않는 경우가 생길 수 있습니다. 이러한 경우, tag의 위치를 변경하시기 바랍니다.

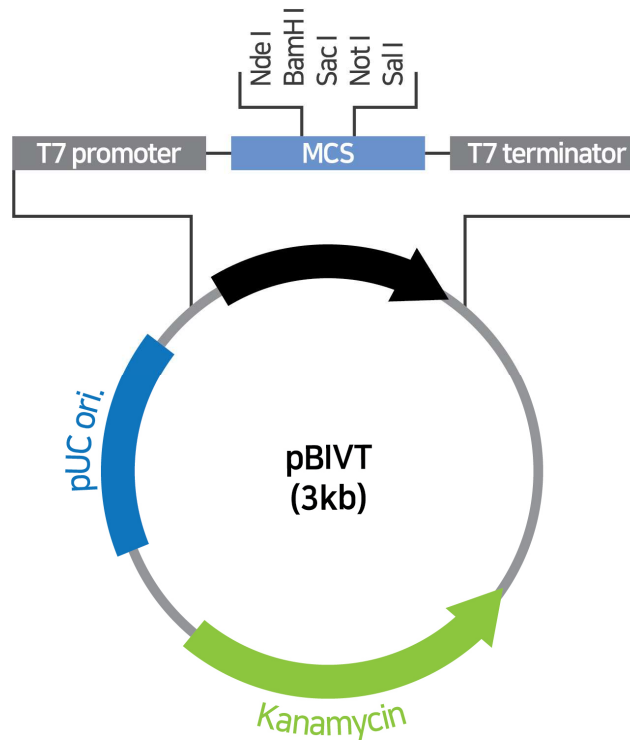
4. 목적 단백질의 활성 또는 solubility가 낮은 경우.

원인	해결 방법
Posttranslational modification을 필요로 하는 단백질인 경우	<i>E. coli</i> extract를 이용한 무세포 단백질 합성시스템에서는 glycosylation, phosphorylation 등과 같은 posttranslational modification이 필요한 단백질 합성이 불가능합니다.
단백질 활성화에 특정 요소를 필요로 하는 경우	합성된 단백질이 활성을 나타내기 위해서 특정 요소들을 필요로 하는 경우에는 최종적으로 정제된 단백질 용액에 이러한 요소들을 첨가해준 후 활성을 확인하셔야 합니다.
단백질의 solubility가 낮아서 aggregation이 되는 경우	단백질 합성 온도를 낮춰주거나, 단백질의 folding을 도와주는 chaperone 단백질을 첨가한 후 합성을 하면, solubility가 향상될 가능성이 있습니다(Frydman et al., 2001; Gualerzi et al., 2003).

부록 A: pBIVT Vectors

당사의 무세포 단백질 합성 전용 vector인 pBIVT Vector Set-1은 ExiProgen™ 단백질 합성시스템의 모든 키트에 적용 가능합니다. 본 vector 세트에는 두 종류의 plasmid가 포함되어 있어, N-말단 또는 C-말단에 모두 6x histidine tagging이 가능하며, 구조는 아래와 같습니다.

- pBIVT Vector Map



- pBIVT-1의 MCS (Multiple Cloning Site) 서열

ATG	CATATG	CACCACCACCACCACCAC	GGATCC	GAGCTC	AAGCTT	GCGGCCGC	A	TAG	GTCGAC
Start codon	NdeI	6X His-tag	BamHI	SacI		NotI		Stop codon	SalI

- pBIVT-2의 MCS (Multiple Cloning Site) 서열

ATG	CATATG	GGATCC	GAGCTC	AAGCTT	GCGGCCGC	A	CACCACCACCACCACCAC	TAG	GTCGAC
Start codon	NdeI	BamHI	SacI		NotI		6X His-tag	Stop codon	SalI

부록 B: Template DNA 농도 Screening

ExiProgen[™] 단백질 합성시스템을 이용하여 단백질을 합성하실 때, template DNA 의 양에 따라서 단백질 합성량에 차이가 있을 수 있습니다. Template DNA 는 하기와 같이 농도에 따른 발현 screening 을 먼저 선행하신 후, *ExiProgen*[™]을 이용한 단백질 합성을 하시면 최적의 단백질 합성 결과를 얻으실 수 있습니다.

1. *AccuRapid*[™] Cell-Free Protein Expression Kit (Cat. No. K-7250)

1) Template DNA 의 농도를 측정하여 준비합니다.

예시: 100 ng/μl

2) 아래와 같이 반응용액을 준비합니다.

DNA 농도 screening						
조성	Volume	120 ng	240 ng	360 ng	480 ng	600 ng
<i>E. coli</i> extract	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl
Master Mix	21 μl	21 μl	21 μl	21 μl	21 μl	21 μl
Template DNA	X μl	1.2 μl	2.4 μl	3.6 μl	4.8 μl	6 μl
DEPC DW	12-X μl	10.8 μl	9.6 μl	8.4 μl	7.2 μl	6 μl
Total volume	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl

3) 반응용액들을 30°C 에서 3 시간 동안 반응시킵니다.

4) SDS-PAGE 를 통해서 최적의 발현 농도를 확인합니다.

2. *ExiProgen*[™] EC-Tagfree Protein Synthesis Kit (Cat. No. K-7320)

1) 이전 실험을 통해 확인한 최적 DNA 농도의 **10 배수**에 해당하는 DNA 농도를 확인하여 단백질 발현 용액 만든 후, Reaction block 의 **A 행의 각 tube**에 넣습니다.

예시: EC-Tagfree Kit 발현 볼륨 (450 μl) ÷ screening 발현 볼륨 (45 μl) ≈ 10

Screening 을 통한 최적의 DNA 농도 (600 ng) x 10 ≈ 6 μg

Screening 을 통한 최적의 DNA 농도 (120 ng) x 10 ≈ 1.2 μg

참고 문헌

- Ahn, J. H., Kang, T. J., & Kim, D. M. (2008). Tuning the expression level of recombinant proteins by modulating mRNA stability in a cell-free protein synthesis system. *Biotechnology and bioengineering*, 101(2), 422-427.
- Forster, A. C., Cornish, V. W., & Blacklow, S. C. (2004). Pure translation display. *Analytical biochemistry*, 333(2), 358-364.
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 603-647.
- Gualerzi, C. O., Giuliodori, A. M., & Pon, C. L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *Journal of molecular biology*, 331(3), 527-539.
- Hino, M., Kataoka, M., Kajimoto, K., Yamamoto, T., Kido, J. I., Shinohara, Y., & Baba, Y. (2008). Efficiency of cell-free protein synthesis based on a crude cell extract from Escherichia coli, wheat germ, and rabbit reticulocytes. *Journal of biotechnology*, 133(2), 183-189.
- Josephson, K., Hartman, M. C., & Szostak, J. W. (2005). Ribosomal synthesis of unnatural peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 127(33), 11727-11735.
- Keum, J. W., Ahn, J. H., Choi, C. Y., Lee, K. H., Kwon, Y. C., & Kim, D. M. (2006). The presence of a common downstream box enables the simultaneous expression of multiple proteins in an E. coli extract. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(3), 562-567.
- Keum, J. W., Ahn, J. H., Kang, T. J., & Kim, D. M. (2009). Combinatorial, selective and reversible control of gene expression using oligodeoxynucleotides in a cell-free protein synthesis system. *Biotechnology and bioengineering*, 102(2), 577-582.
- Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., ... & Yokoyama, S. (2002). Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *Journal of structural and functional genomics*, 2(1), 29-35.
- Kim, D. M., & Choi, C. Y. (1996). A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnology progress*, 12(5), 645-649.

Kim, T. W., Oh, I. S., Keum, J. W., Kwon, Y. C., Byun, J. Y., Lee, K. H., ... & Kim, D. M. (2007). Prolonged cell-free protein synthesis using dual energy sources: Combined use of creatine phosphate and glucose for the efficient supply of ATP and retarded accumulation of phosphate. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6), 1510-1515.

Kim, H. C., Kim, T. W., & Kim, D. M. (2011). Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochemistry*, 46(6), 1366-1369.

Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, 587(8), 1155-1163.

Lim, H. J., & Kim, D. M. (2019). Cell-free metabolic engineering: recent developments and future prospects. *Methods and Protocols*, 2(2), 33.

Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B. W., & Ueda, T. (2007). Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(1), 270-276.

Park, S., & Hamad-Schifferli, K. (2010). Enhancement of in vitro translation by gold nanoparticle– DNA conjugates. *ACS nano*, 4(5), 2555-2560.

Rungpragayphan, S., Nakano, H., & Yamane, T. (2003). PCR-linked in vitro expression: a novel system for high-throughput construction and screening of protein libraries. *FEBS letters*, 540(1-3), 147-150.

Trotta, E. (2011). The 3-base periodicity and codon usage of coding sequences are correlated with gene expression at the level of transcription elongation. *PloS one*, 6(6), e21590.

Villemagne, D., Jackson, R., & Douthwaite, J. A. (2006). Highly efficient ribosome display selection by use of purified components for in vitro translation. *Journal of immunological methods*, 313(1-2), 140-148.

주문정보

제품명		Cat. No
ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit	8 rxn	K-7320

관련 제품

제품명		Cat. No
AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit		K-7250
AccuRapid™ Midi Protein Expression Kit		K-7260
AccuRapid™ Maxi Protein Expression Kit		K-7270
AccuRapid™ Protein Synthesis Kit		K-7280
ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit		K-7400
First primer F/R sets (N terminus 6x His tag) (each 5 nmole)		N-8229
First primer F/R sets (C terminus 6x His tag) (each 5 nmole)		N-8230
ExiProgen™ Protein Expression Optimization Kit		K-7410
pBIVT Vector Set-1		K-7350
ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit		K-7310
ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit		K-7300
ExiProgen™ EC-Disulfide Protein Synthesis Kit		K-7330
ExiProgen™ EC-Bulk Protein Synthesis Kit		K-7340
ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit		K-7220
ExiProgen™ Dialysis Kit		K-7240
ExiProgen™ Consumable SET		KA-3001
Gene Synthesis Service		S-2041
Protein Synthesis Service		S-2500
ExiProgen™		A-5041

기호설명

 Batch Code	 Biological Risks	 Catalog Number	 Caution
 Consult Instructions For Use	 Contains Sufficient for <n> tests	 Do not Re-use	 Manufacturer
 Research Use Only	 Temperature Limitation	 Use-by date	

BIONEER Corporation - HQ

Address 8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon, 34302, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER Global Center

Address 71, Techno 2-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34013, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER R&D Center

Address Korea Bio Park BLDG #B-702, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER Inc. - USA Branch

Address 155 Filbert St. Suite 216 Oakland, CA 94607, USA
E-mail order.usa@bioneer.com
Web us.bioneer.com

BIONEER Corp. - European Branch

Address Ludwig-Erhard-Strasse 30-34, 65760 Eschborn, Germany
E-mail euinfo@bioneer.com
Web www.bioneer.com