

ExiProgen[™] **His-tagged Protein Purification Kit**

Cat. No. K-7220
K-7221



***ExiProgen*[™] His-tagged Protein Purification Kit**

User Guide

K-7220



K-7221



Version No.: 2 (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[™] His-tagged Protein Purification 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, and PCT/KR2012/006715.

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.....	1
Precautions	1
Introduction	2
Cell-free Protein Synthesis System	2
The <i>ExiProgen</i> ™ Protein Synthesis System	4
Product Description	6
Experimental Procedures	7
Components Details	7
Experiments Preparation	9
Protocols	10
Analysis of Sample	16
Maintenance	19
Troubleshooting	20
References	22
Ordering Information	24
Related Products	24
Explanation of Symbols	25

Product Information

Components

<i>ExiProgen</i>[™] His-tagged Protein Purification Kit			
Components	K-7220 (16 rxn)	K-7221 (32 rxn)	Storage
Cartridge ①	96-well x 1 ea	96-well x 2 ea	4°C
Cartridge ②	96-well x 1 ea	96-well x 2 ea	
Disposable filter tip	2 pack (8 ea/pack)	1 pack (33 ea/pack)	-
Elution tubes and caps	8-tube strips x 2 ea	8-tube strips x 4 ea	-

Storage

The Cartridge ① and ② included in *ExiProgen*[™] His-tagged Protein Purification Kit contain magnetic Ni-NTA magnetic nanoparticles and buffers used for protein purification, so they should be stored at 4°C.

Specifications

<i>ExiProgen</i>[™] His-tagged Protein Purification Kit		
	K-7220 (16 rxn)	K-7221 (32 rxn)
Number of reactions (Up to 16 rxn/ 1 times)	16 rxn	32 rxn
Operating time	2 hours	
Sample	Cell lysate, Cell-free protein expression sample (<i>in vitro</i>)	
Binding capacity	3 mg of protein/ml of beads	

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).

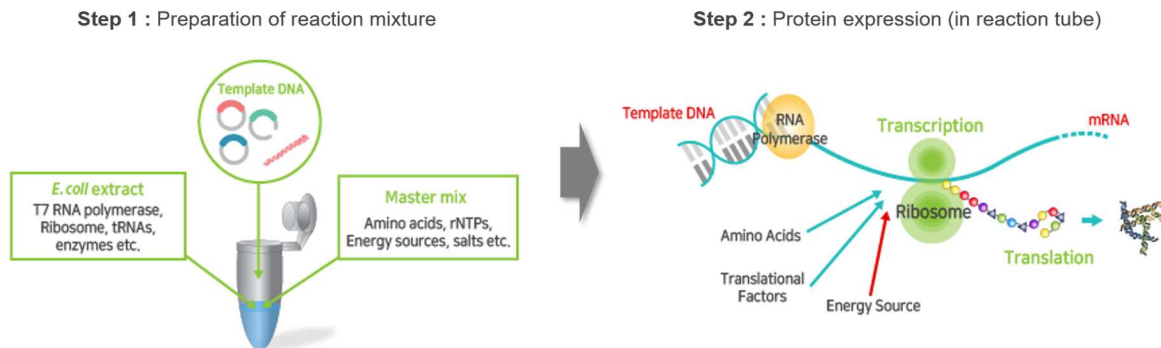


Figure 1. Principles of cell-free protein synthesis system.

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 DNA 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.

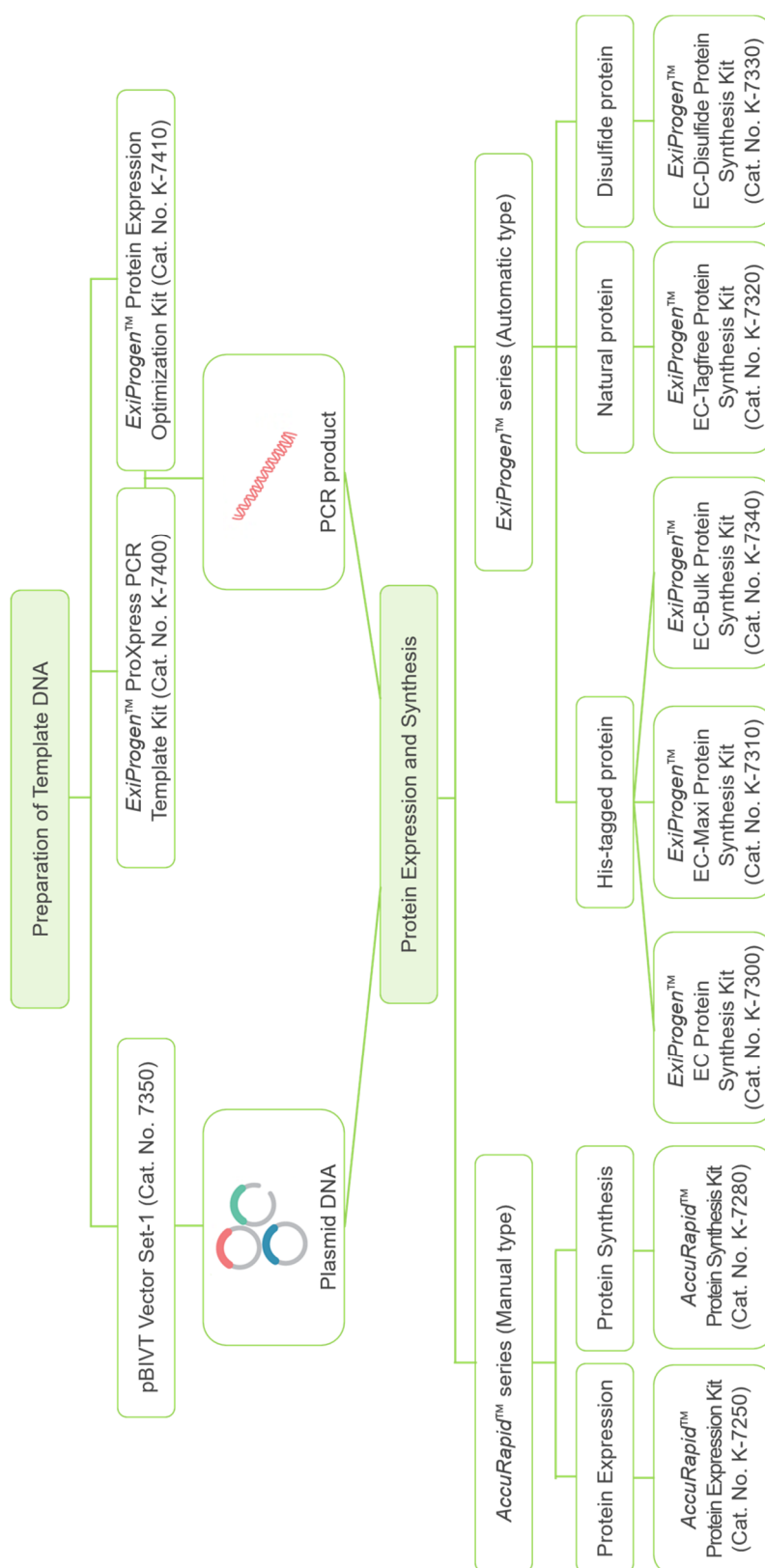


Figure 2. Product information related to protein expression and synthesis.

Product Description

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit can be applied to *ExiProgen™*, a fully automated protein synthesis and nucleic acid extraction system developed by BIONEER, and target proteins can be obtained from protein expression samples with high purity.

This product purifies proteins by affinity method using Ni-NTA beads and Histidine-tag from cell lysate or cell-free protein expression samples. The target protein is captured to the surface of the Ni-NTA magnetic bead equilibrated with Equilibrium buffer and washed with washing buffer. After that, the target protein is eluted from the beads by treating the elution buffer including high concentration of imidazole.

A series of protein purification processes can save a lot of time and labor since users do not have to perform the entire process except for sample addition by applying an automated system (Figure 3). In addition, it can have high reproducibility, unlike manual type experiments that can obtain different results for each user.

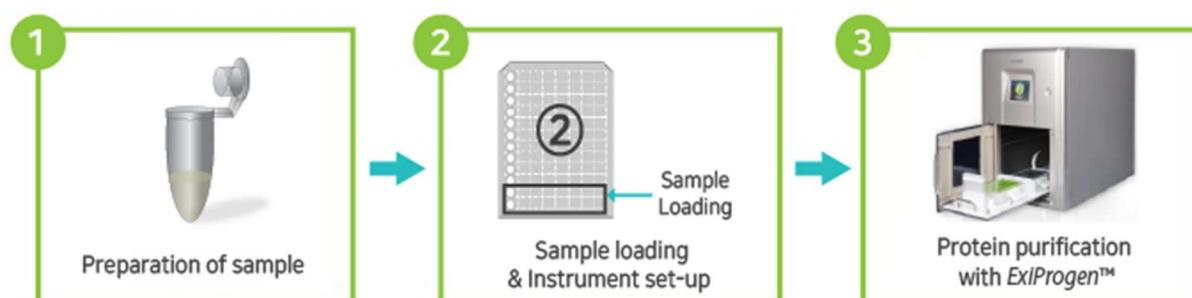
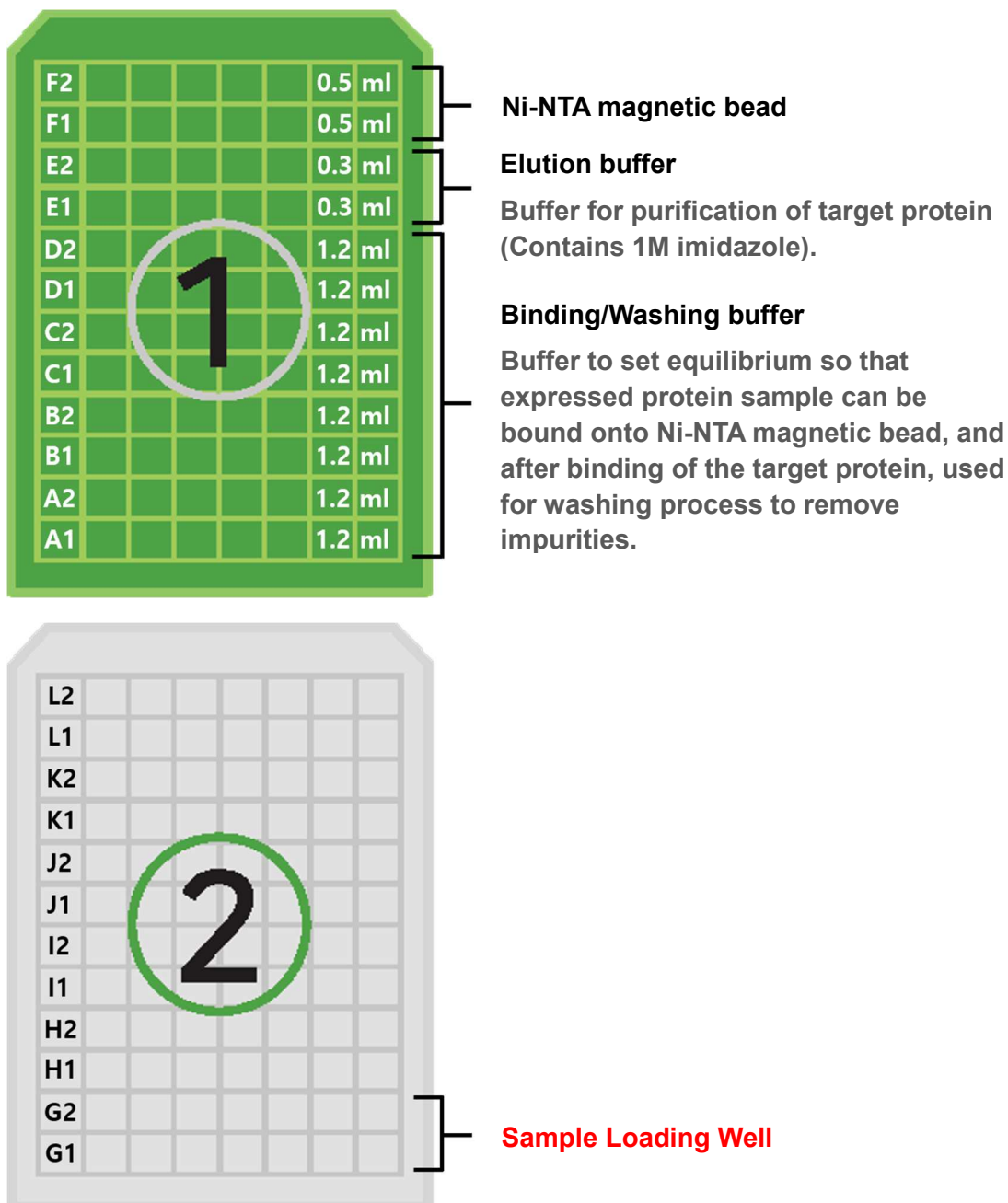


Figure 3. Principles of *ExiProgen™* His-tagged Protein Purification Kit.

Experimental Procedures

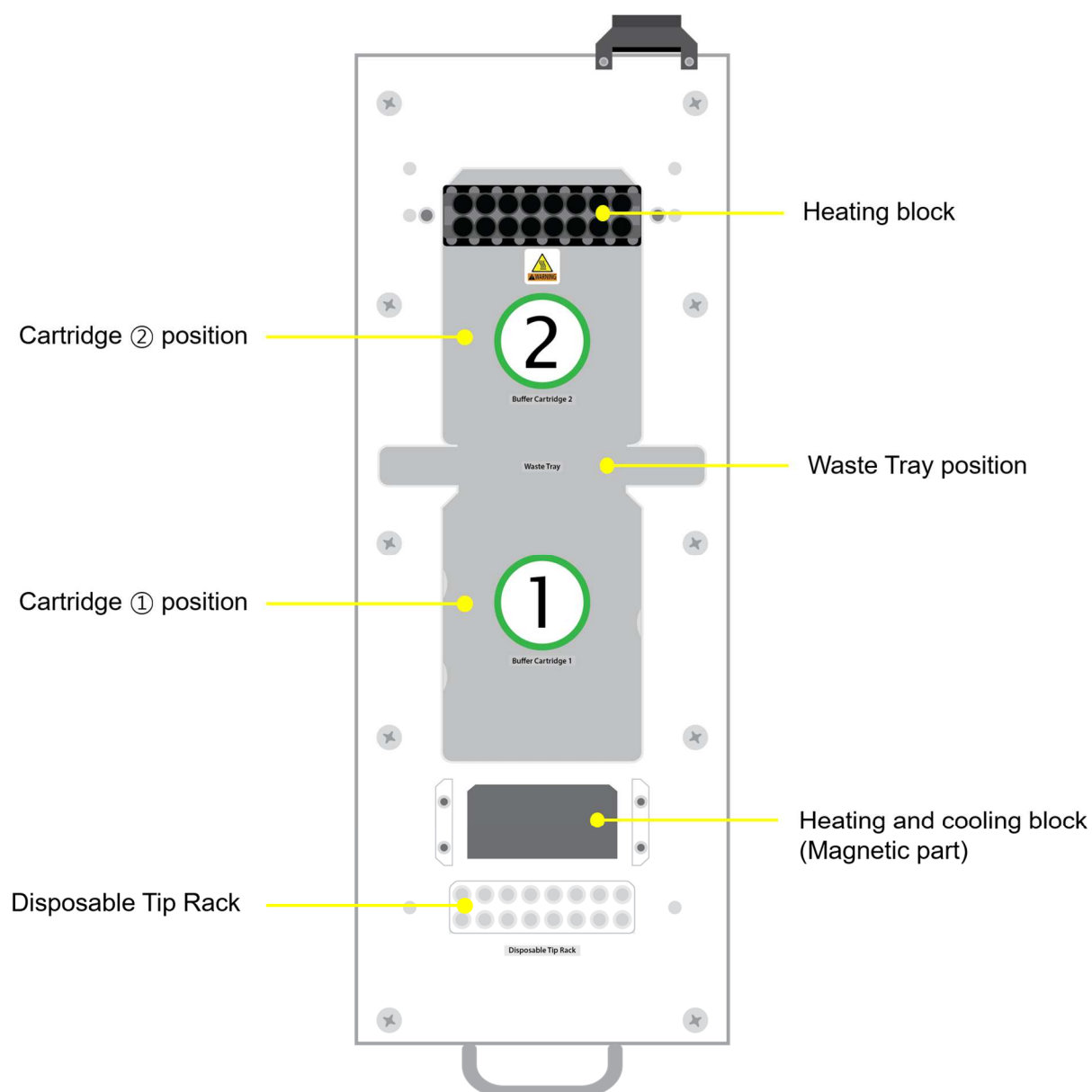
Components Details

1. Cartridges



2. Note

Structure of ExiProgen™ Baseplate



Experiments Preparation

Preparation of Sample

Prepare the cell lysate or cell-free protein expression sample to be applied to *ExiProgen™* His-tagged Protein Purification Kit.

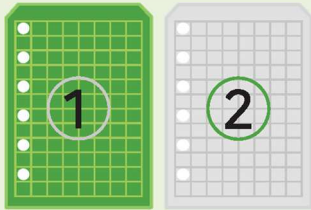
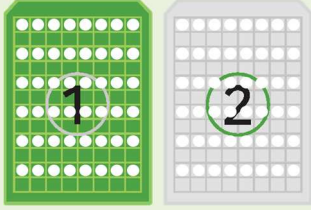
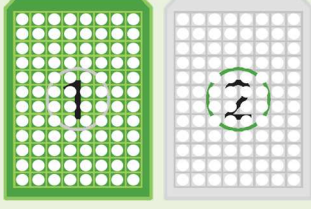
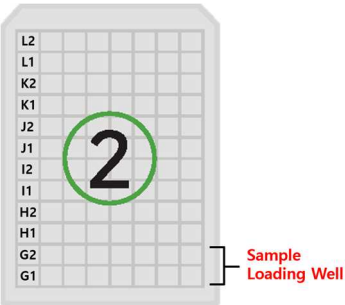

1. Cell lysate (e.g., *E. coli* cell lysate)

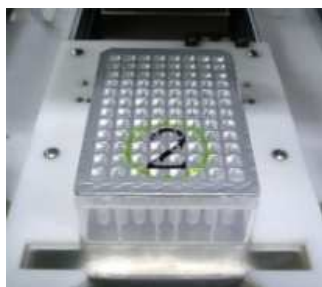
- 1) Harvest cells of target protein that is overexpressed by centrifuging at 3,000 rpm for 10 min.
- 2) Add an appropriate amount of lysis buffer* (not provided) to the cell pellet and resuspend the cells completely.
* **Example of lysis buffer:** 20 mM Tris-HCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.6
- 3) Lyse the cells on ice with a sonicator.
(Microtip, On/10 sec, Off/20 sec, Total time/5 min)
- 4) Transfer the cell lysate to the 1.5 ml tube and centrifuge at 13,000 rpm for 1 min to separate supernatant from pellet.
- 5) Confirm whether the target protein in the supernatant is expressed or not with SDS-PAGE.

2. Cell-free protein expression sample (*In vitro*)

- 1) Prepare the protein expression solution with a final volume of 750 µl in a 1.5 ml tube using the *AccuRapid™* Midi Protein Expression Kit (Cat. No. K-7260).
- 2) Place the prepared protein expression solution in an incubator and incubate at 30°C for 3 hrs.
- 3) Confirm whether the target protein in the supernatant is expressed or not with SDS-PAGE.

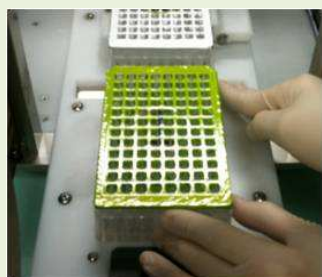
Protocols

Steps	Procedure Details
<p>Example 1) For 1 sample</p>  <p>Example 2) For 8 samples</p>  <p>Example 3) For 16 samples</p> 	<p>1. Punch holes in the sealing films of Cartridge ① and ② using 6 Hole Punch (<i>ExiProgen™</i> accessory) according to the number of samples.</p> <p>* Note: Refer to the left pictures and punch holes depending on the required number of samples.</p>
	<p>2. Add 700-750 µl of cell lysate or protein expression sample prepared on page 9 to each column in rows G of Cartridge ②.</p>
	<p>3. Open the door of <i>ExiProgen™</i> and pull out the baseplate completely.</p>



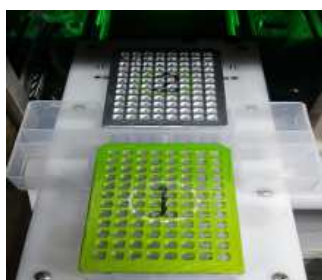
4. Load Cartridge ② in the position of ② on the baseplate.

*** 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.

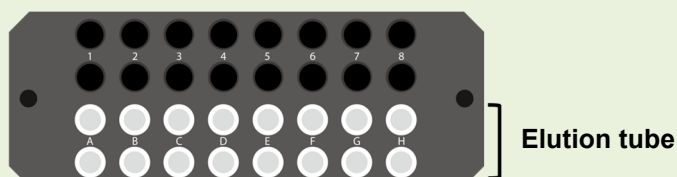
*** Note:** Follow the exact installation order of Cartridge ② → Cartridge ① → Waste Tray. Ensure that Cartridges and Waste Tray are firmly installed, without showing any movement.

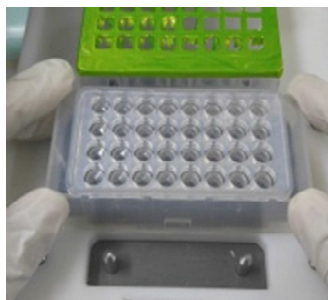


7. Load Elution Tube Rack (*ExiProgen™* accessory) with Elution tube on the Heating and cooling block (Magnetic part) of the baseplate.

*** Note:** Elution tube should be installed on the Elution Tube Rack in an open state.

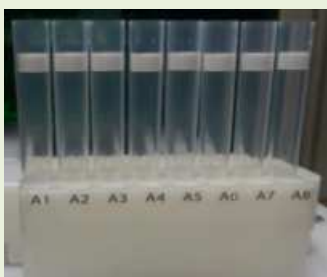
*** Note:** Please refer to the illustration below when placing Elution tube to Elution Tube Rack and install it in the correct position in the rows in alphabet. Elution tube can be used according to the number of samples and they must be placed on the same row as punched cartridges.





8. Place the Protection Cover as shown in the picture on the left.

*** Note:** Press down Protection Cover firmly so that it covers Elution Tube Rack all the way down to the baseplate.



9. Place Disposable filter tips in 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.

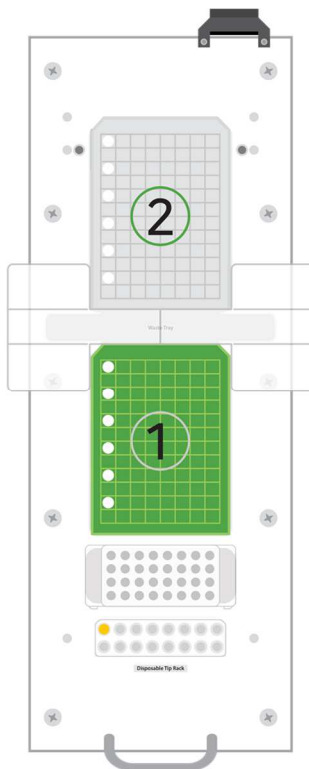


10. Finally, confirm holes in the cartridges and position of samples and tips (Refer to the pictures on page 13).

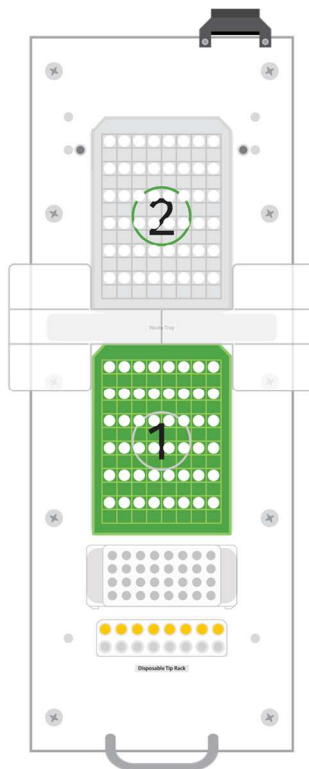
Push the baseplate completely until you hear the click sound, then close the door.

*** Note**

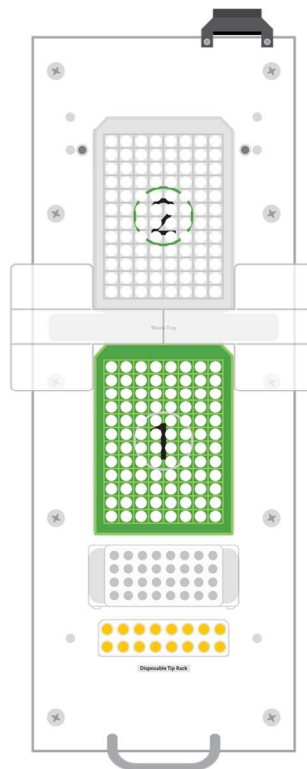
Example 1) For 1 Sample



Example 2) For 8 Samples



Example 3) For 16 Samples



11. 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.



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



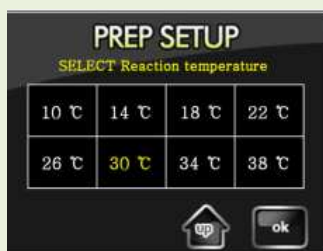
13. The PREP SETUP screen appears as shown in the left, and a screen to select the protocol number for each kit appears. Press '901' to confirm that the following information is displayed on the screen, and then press the 'Enter' button.

Prep Type: Protein

Sample SRC: Protein_Purification



14. 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.



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



16. 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.



17. 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 **2 hours** to finish run.

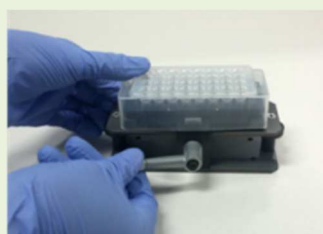
Prep Type: Protein

Sample SRC: Protein_Purification



18. '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.



19. After taking out the sample rack, Protection Cover can be removed by using Protection Cover Separation Tool (*ExiProgen*TM's accessory).

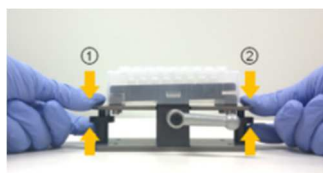
Take out Elution Tube Rack from *ExiProgen*TM, place it on top of the Protection Cover Separation Tool.

*** Note:** When placing Elution Tube Rack on Protection Cover Separation Tool, the lever must be facing left-hand side.



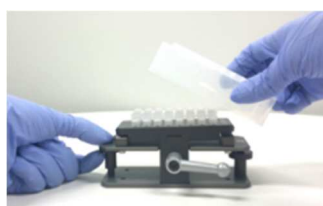
20. Fix the Protection Cover and Separation Tool so that it does not move with one hand, and turn the lever clockwise by 180° with the other hand.

*** Note:** Rotate the lever until Elution Tube Rack is firmly fixed to Protection Cover Separation Tool.



21. After fixing the Elution Tube Rack, press down both sides of Separation Tool. When the lever is pulled, the Protection Cover rises upwards and gets separated from the Elution Tube Rack for easy detachment.

*** Note:** When rotating lever, while holding the Protection Cover with one hand, pull the lever sequentially to prevent the solution from splashing in the tube.



Analysis of Sample

After protein purification with *ExiProgen*™, the final target proteins of about 250 µl is collected from Elution tube. Final protein samples may contain Ni-NTA magnetic beads, but this can be removed by centrifugation before use.

If necessary, reaction samples from protein purification can be recovered from the rows L, K, J of Cartridges ② as shown in Figure 4.

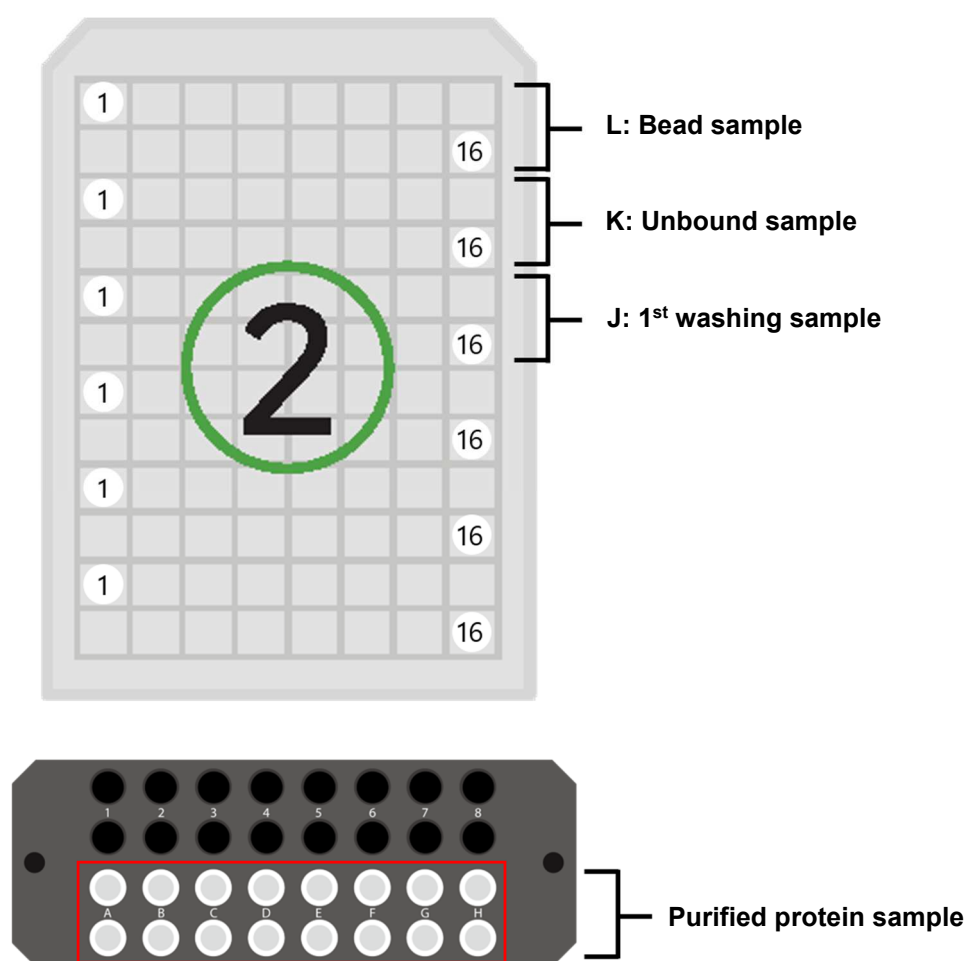


Figure 4. Samples for each row of Cartridge ②.

- Unbound sample: Samples not bound to Ni-NTA magnetic bead.
- 1st washing sample: Samples after 1st washing step in purification process.
- Bead sample: Used bead samples for purification.

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

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

Components	Unbound/1 st washing sample	Purified protein/Bead sample*
Sample	5 µl	15 µl
4X loading dye	5 µl	5 µl
Sterile distilled water	10 µl	-
Total volume	20 µl	20 µl

* **Note:** Add 200 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.

- Unbound/ 1st washing samples: 5 µl/well
- Purified protein/Bead sample: 10 µl/well

4. Confirm whether the target protein is synthesized and purified through staining with Coomassie blue and de-staining procedures (Figure 5, 6).

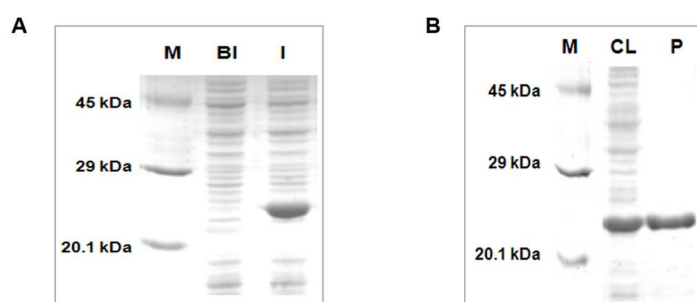


Figure 5. Purification of target protein using *E. coli* cell lysate. (A) *E. coli* cell lysate overexpressed DUSP3. M, Protein Size Marker; BI, Pre-induction sample; I, Post-induction sample. **(B)** Purification of target protein using *ExiProgen*TM. M, Protein Size Marker; CL, Recombinant cell lysate; P, Purification sample.

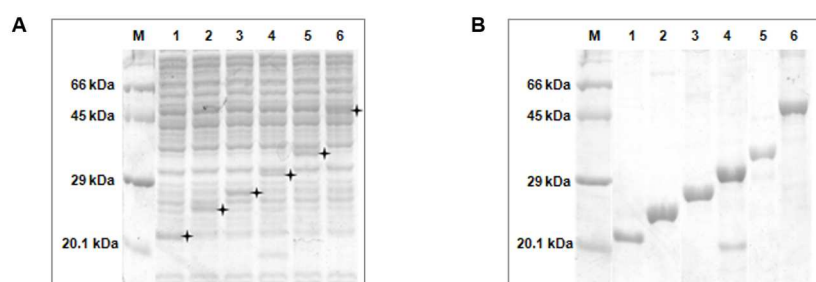


Figure 6. Purification of the target protein using cell-free protein expression sample. (A) Protein expression sample. **(B)** Purification of target protein using *ExiProgen™*. M, Protein Size Marker; 1, DUSP3 (22 kDa); 2, CAT (24 kDa); 3, AcGFP (28 kDa); 4, ERFP (31 kDa); 5, EF-Ts (34 kDa); 6, VF (45 kDa).

Maintenance

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

1. 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.

2. Cartridge ①, ②

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

Troubleshooting

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

1. No protein purification or low amount of purified target protein.

Cause	Solution
Low amount of expression of target protein	<p>1. When using cell lysate sample. Optimize the protein expression level by changing the incubation temperature, inoculation concentration, time, etc.</p> <p>2. When using cell-free protein expression sample. 2-1) Optimize codons according to the cell line of cell extract with sequences of template DNA used for protein expression. 2-2) Use the manual <i>AccuRapid™</i> kit to increase the yield by screening for the optimal expression conditions, through template concentration optimization process on a small scale.</p>
Formation of inclusion body	If the expressed target protein forms an aggregate, it may not bind to the Ni-NTA magnetic bead. Optimize the expression process to minimize protein aggregation.
Low amount of loading sample	Reduce the amount of lysis buffer when preparing cell lysate. Then, high concentration samples can be prepared for protein purification.

No histidine tag	Check if the Histidine tag is attached to the N-terminus or C-terminus, and if not, prepare the tagged sample again.
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.
Degradation of target DNA	Add protease inhibitor during cell lysis.

2. When the target protein is identified in Unbound or 1st washing sample.

Cause	Solution
In case of overloading	This corresponds to the case where an amount of sample exceeding the binding capacity of the Ni-NTA magnetic bead is loaded. In this case, dilute the sample before use.
Protein precipitation	Solubilization reagent (e.g., 0.1% Triton X-100 or Tween 20) can be added to the buffer.

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.
- 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.
- Kim, T. W., Oh, I. S., Keum, J. W., Kwon, Y. C., Byun, J. Y., Lee, K. H., Choi, C. Y., & 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.
- Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2002). Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *Journal of structural and functional genomics*, 2(1), 29-35.

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.

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> His-tagged Protein Purification Kit	16 rxn	K-7220
	32 rxn	K-7221

Related Products

Description		Cat. No
<i>AccuRapid™</i> Cell-Free Protein Expression Kit		K-7250
<i>AccuRapid™</i> Midi Protein Expression Kit		K-7260
<i>AccuRapid™</i> Maxi Protein Expression Kit		K-7270
<i>AccuRapid™</i> Protein Synthesis Kit		K-7280
<i>ExiProgen™</i> 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> Protein Expression Optimization Kit		K-7410
pBIVT Vector Set-1		K-7350
<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit		K-7300
<i>ExiProgen™</i> EC-Maxi Protein Synthesis Kit		K-7310
<i>ExiProgen™</i> EC-Tagfree Protein Synthesis Kit		K-7320
<i>ExiProgen™</i> EC-Disulfide Protein Synthesis Kit		K-7330
<i>ExiProgen™</i> EC-Bulk Protein Synthesis Kit		K-7340
<i>ExiProgen™</i> Dialysis Kit		K-7240
<i>ExiProgen™</i> Consumable SET		KA-3001
Gene Synthesis Service		S-2041
Protein Synthesis Service		S-2500
<i>ExiProgen™</i>		A-5041

Explanation of Symbols

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

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit

사 용 설 명 서

K-7220



K-7221



Version No.: 2 (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™ His-tagged Protein Purification 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/KR2012/006715에 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	29
제품 구성	29
보관법	29
제품 사양	29
주의사항	29
개요	30
무세포 단백질 합성 시스템	30
ExiProgen™ 단백질 합성 시스템	32
제품 개요	34
실험 방법	35
구성품 상세	35
실험 준비	37
실험 방법	38
Sample 분석	44
유지 보수	46
문제 해결	47
참고 문헌	49
주문 정보	51
관련 제품	51
기호 설명	52

제품 정보

제품 구성

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit			
구성품	K-7220 (16 rxn)	K-7221 (32 rxn)	Storage
Cartridge ①	96-well x 1 ea	96-well x 2 ea	4°C
Cartridge ②	96-well x 1 ea	96-well x 2 ea	
Disposable filter tip	2 pack (8 ea/pack)	1 pack (33 ea/pack)	-
Elution tubes and caps	8-tube strips x 2 ea	8-tube strips x 4 ea	-

보관법

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit 에 포함된 Cartridge ①과 ②에는 단백질 정제에 사용되는 Ni-NTA 자성 입자와 buffer 류를 포함하고 있어, 4°C 에서 보관해야 합니다.

제품 사양

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit		
	K-7220 (16 rxn)	K-7221 (32 rxn)
반응 수 (최대 16 rxn/1회)	16 rxn	32 rxn
반응 시간	2시간	
Sample	세포 파쇄액, 무세포 단백질 발현 sample (<i>in vitro</i>)	
Binding capacity	3 mg of protein/ml of beads	

주의사항

본 제품의 Cartridge ①, ②는 교차 오염, 증발, 용액의 누출을 막기 위해 sealing film 으로 밀봉 포장되어 있고, 키트의 모든 플라스틱 제품이나 buffer 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

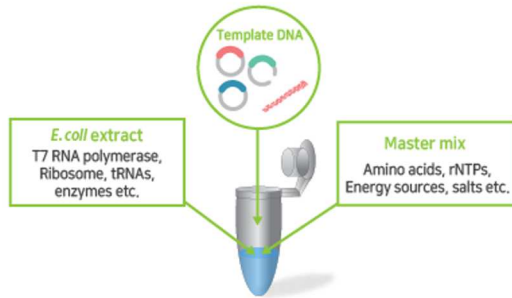
단백질은 효소, 호르몬, 구조 단백질 등의 다양한 기능을 수행하며 생체 반응에 있어 필수적인 요소이기 때문에, 포스트게놈시대에 단백질의 역할 및 구조에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있습니다. 이러한 연구는 특정 단백질을 만들어내는 것으로부터 시작됩니다.

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).

Step 1 : Preparation of reaction mixture



Step 2 : Protein expression (in reaction tube)

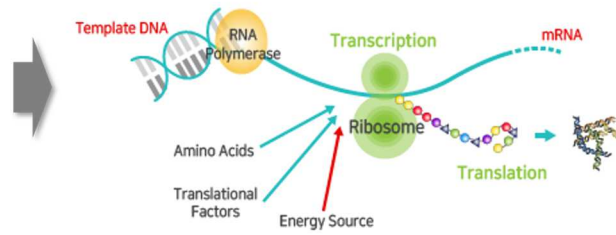


그림 1. 무세포 단백질 합성 시스템의 원리.

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.

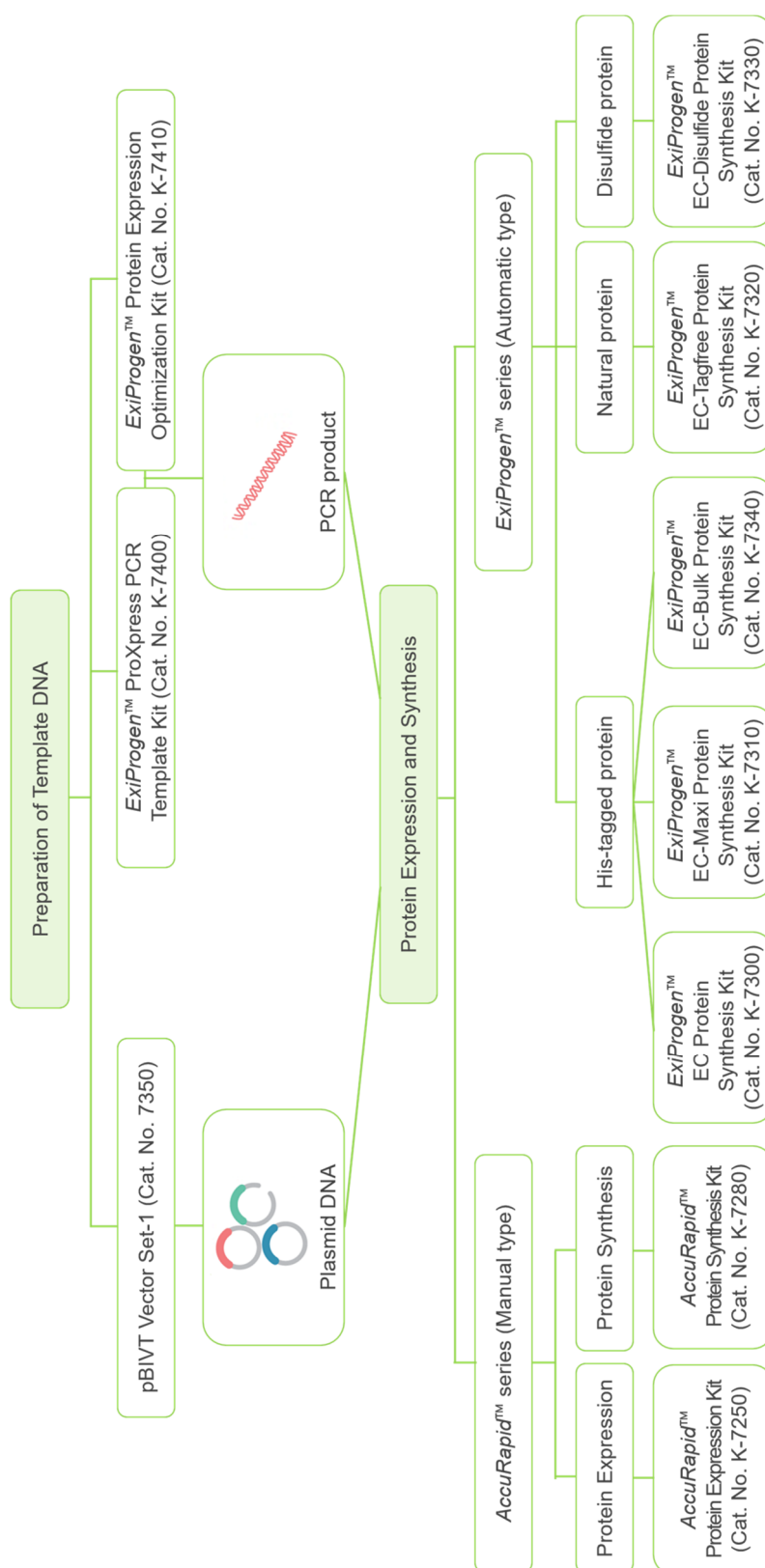


그림 2. 단백질 발현 및 합성 관련 제품 정보.

제품 개요

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit는 자사의 전자동 단백질 합성 및 핵산 추출 장비인 ExiProgen™에 적용할 수 있으며, 단백질이 발현된 시료로부터 목적 단백질을 고순도로 간편하게 정제할 수 있습니다.

본 제품은 세포 파쇄액 (Cell lysate) 또는 무세포 단백질 발현 샘플을 Ni-NTA bead와 Histidine-tag을 이용한 Affinity 방법으로 단백질을 정제합니다. Equilibrium buffer로 평형화 된 Ni-NTA magnetic bead의 표면에 목적 단백질을 결합하고, washing buffer로 세척합니다. 이후 고농도의 Imidazole이 포함된 elution buffer를 처리해 bead로부터 목적 단백질을 분리합니다.

일련의 단백질 정제 과정은 자동화 시스템을 적용해 시료를 첨가하는 단계를 제외한 전체 공정을 실험자가 수행하지 않아도 되기에 많은 시간과 노동력을 절약할 수 있습니다(그림 3). 또한, 실험자마다 상이한 결과를 얻을 수 있는 Manual type의 실험과 달리, 높은 재현성을 나타냅니다.

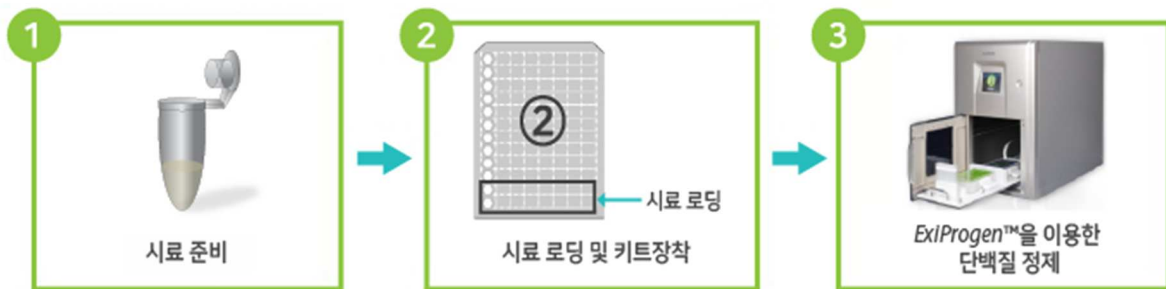
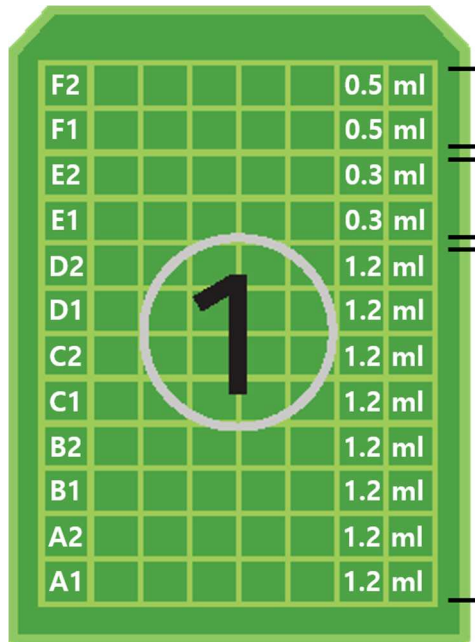


그림 3. ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit의 원리.

실험 방법

구성품 상세

1. Cartridges



Ni-NTA magnetic bead

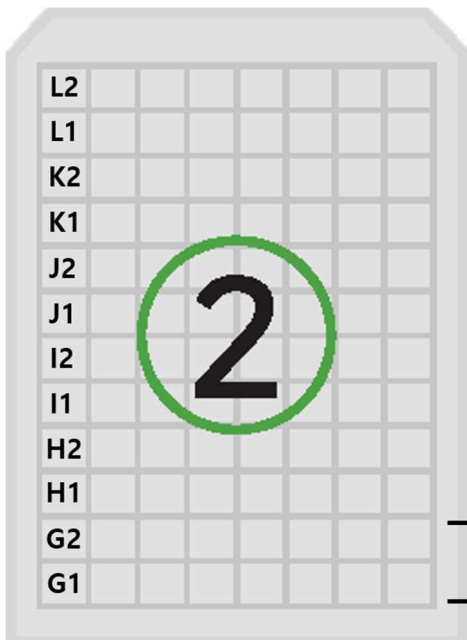
Elution buffer

목적 단백질 정제용 buffer

(1 M imidazole을 포함하고 있음).

Binding/Washing buffer

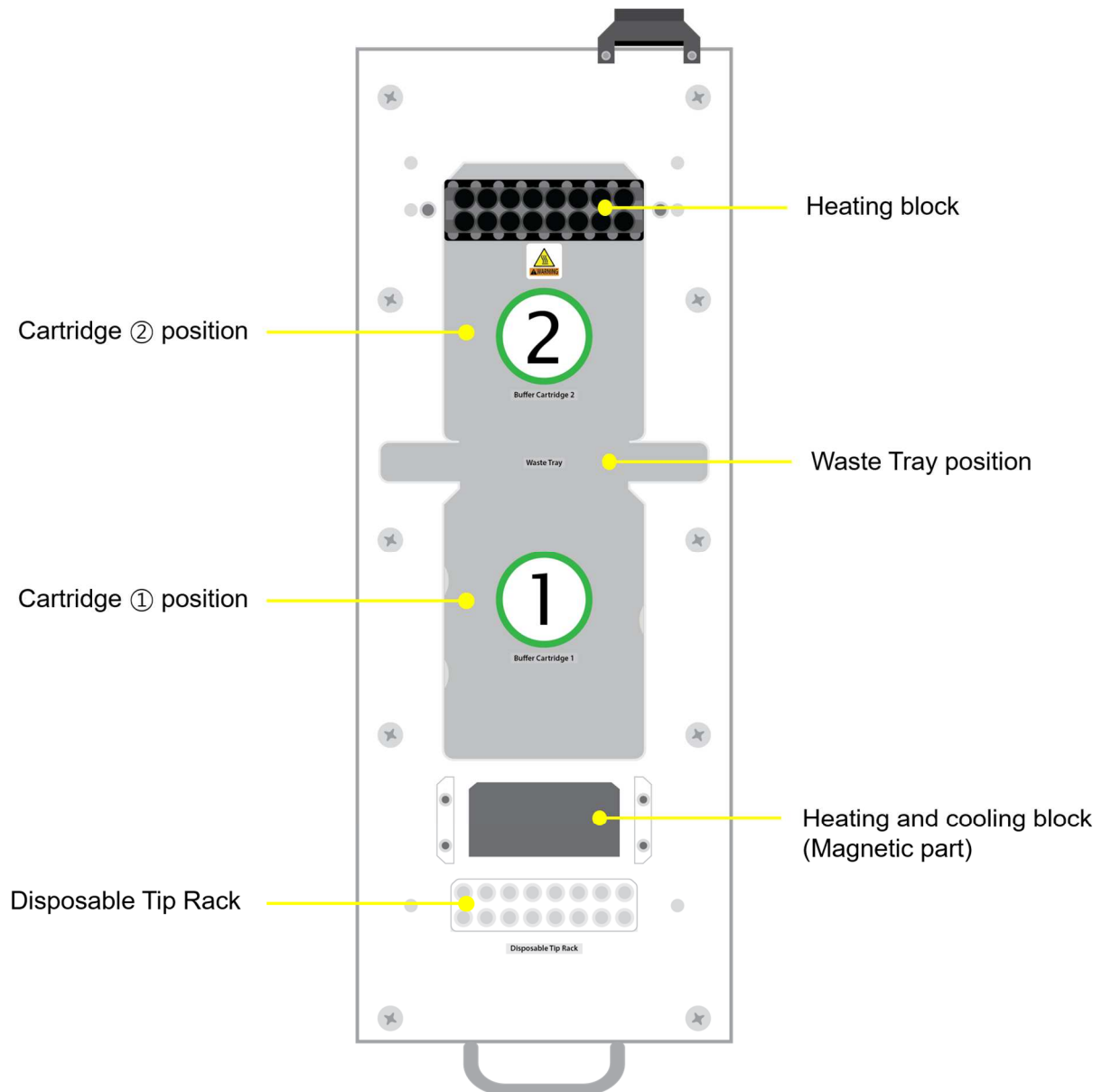
Ni-NTA magnetic bead에 단백질 발현물이 결합할 수 있게 평형화 해주며, 목적 단백질 결합 후, 세척과정 (불순물 제거)에 사용.



Sample Loading Well

2. 참고

ExiProgen™ Baseplate 구조



실험 준비

Sample 준비

ExiProgen™ His-tagged Protein Purification Kit 에 적용하기 위한 sample 은 cell lysate 또는 무세포 단백질 발현 sample 로 준비하시기 바랍니다.

1. Cell lysate (e.g. *E. coli* cell lysate)

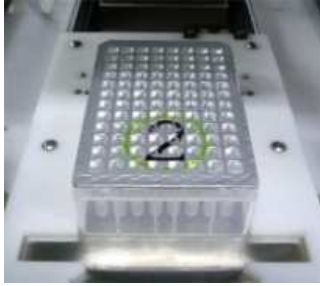
- 1) 목적 단백질을 과발현시킨 cell 을 3,000 rpm 에서 10 분간 원심 분리하여 회수합니다.
- 2) Cell pellet 에 적정량의 Lysis buffer* (미제공)를 넣고, pellet 을 완전히 풀어줍니다.
* Lysis buffer 예시: 20 mM Tris-HCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.6
- 3) Sample 을 ice 에 둔 채, sonicator 를 이용하여 cell 을 파쇄합니다.
(Microtip, On/10 sec, Off/20 sec, Total time/5 min)
- 4) Cell lysate 를 1.5 ml tube 에 옮겨 담은 후, 13,000 rpm 으로 1 분 동안 원심 분리하여 상층액과 pellet 을 분리합니다.
- 5) SDS-PAGE 를 통하여 상층액에 목적 단백질의 발현 여부를 확인합니다.

2. 무세포 단백질 발현 sample (*In vitro*)

- 1) AccuRapid™ Midi Protein Expression Kit (Cat. No. K-7260) 를 이용하여 1.5 ml tube 에 최종 부피 750 µl 만큼 단백질 발현용액을 준비합니다.
- 2) 준비한 단백질 발현용액을 incubator 에 넣고, 30°C 에서 3 시간 동안 반응시켜줍니다.
- 3) SDS-PAGE 를 통하여 발현 용액에 목적 단백질의 발현 여부를 확인합니다.

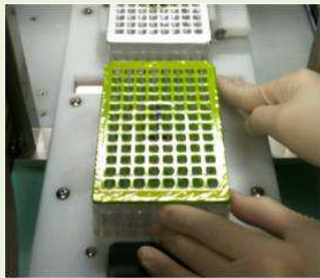
실험 방법

단계	세부절차
<p>예시 1) Sample 1개</p>  <p>예시 2) Sample 8개</p>  <p>예시 3) Sample 16개</p> 	<p>1. 6 Hole Punch (ExiProgen™ 장비 액세서리)를 이용하여 sample 수에 맞게 Cartridge ①과 ②의 sealing film 에 구멍을 뚫어 주시기 바랍니다.</p> <p>* 참고: 왼쪽 그림을 참고하여 Sample 수에 맞게 sealing film 에 구멍을 뚫어 주시기 바랍니다.</p>
	<p>2. p.37 에서 준비한 cell lysate 또는 단백질 발현 sample 700~750 µl 을 Cartridge ②의 G 행에 첨가하시기 바랍니다.</p>
	<p>3. ExiProgen™ 장비의 문을 열고, baseplate 를 앞으로 완전히 잡아당깁니다.</p>



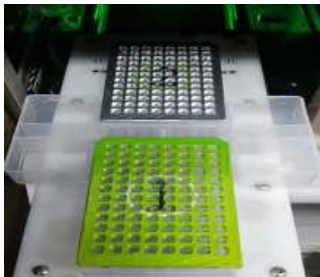
4. 숫자 ②가 쓰여진 위치에 Cartridge ②를 장착하시기 바랍니다.

* 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 Cartridge 의 왼쪽 면부터 맞춘 후, 오른쪽 면을 눌러서 끼우고, Cartridge 가 흔들리지 않는지 확인하시기 바랍니다.



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

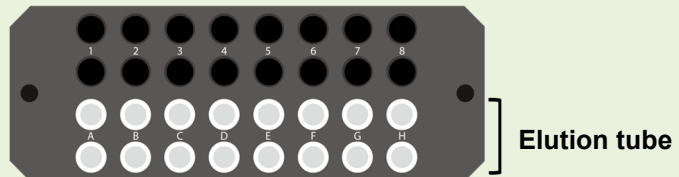
* 참고: Cartridge ② → Cartridge ① → Waste Tray 순서를 지켜서 장착하신 후, 흔들리지 않고 제대로 고정이 되었는지, 확인하시기 바랍니다.



7. Elution tube 를 장착한 Elution Tube Rack (ExiProgen™ 장비 액세서리)을 장비 내 baseplate 의 Heating and cooling block (Magnetic part)에 장착하시기 바랍니다.

* 참고: Elution tube 는 열린 상태로 rack 에 장착하시기 바랍니다.

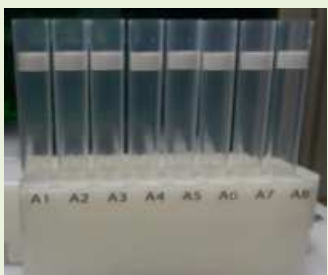
* 참고: Elution Tube Rack에 Elution tube를 장착할 시에는 아래의 그림을 참고하여 '영문열'의 정확한 위치에 꽂아 주시기 바랍니다. Elution tube는 sample의 개수에 맞추어 사용하시면 되며, 놓는 위치는 Cartridge의 뚫린 '열'과 같은 '열'에 장착하시면 됩니다.





8. 왼쪽 그림과 같이 Protection Cover 를 장착합니다.

* 참고: Protection Cover 는 baseplate 위에서 Elution Tube Rack 을 덮을 수 있도록 끝까지 밀어서 장착합니다.



9. Disposable Tip Rack 에 sample 의 개수에 맞게 Tip 을 꽂으시기 바랍니다.

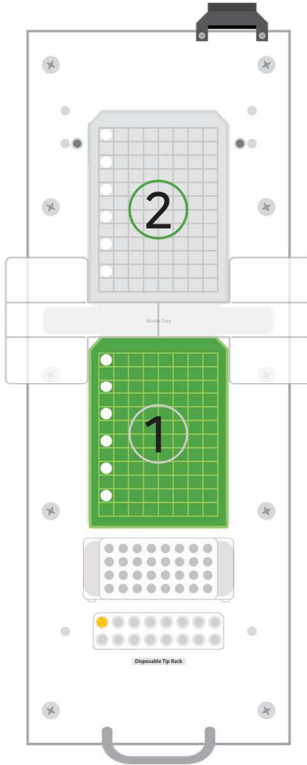
* 참고: 단, Cartridge 의 뚫린 ‘열’과 같은 ‘열’에 tip 을 꽂으셔야 합니다. 또한, Cartridge 의 뚫지 않은 열에 상응하는 위치에는 tip 을 꽂지 마시기 바랍니다.



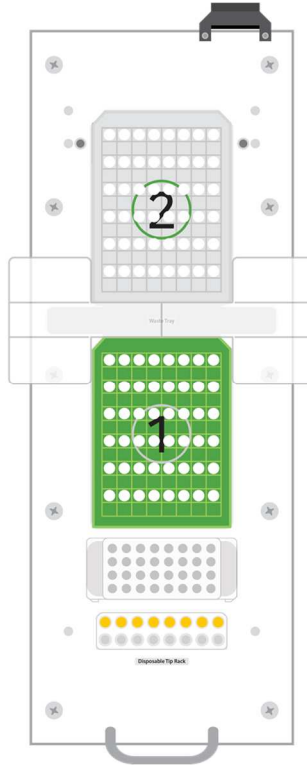
10. 최종적으로 Cartridge, 시료 및 Tip 의 위치가 일치하는 지 확인합니다(41 페이지의 그림을 참고하시기 바랍니다). 위치가 일치하면 baseplate 를 밀어 넣고 문을 닫습니다. 단, baseplate 는 소리가 날 때까지 밀어 넣으시기 바랍니다.

* 참고

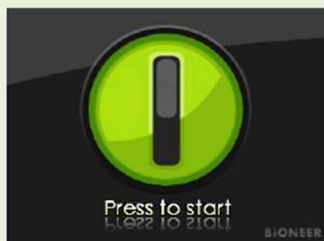
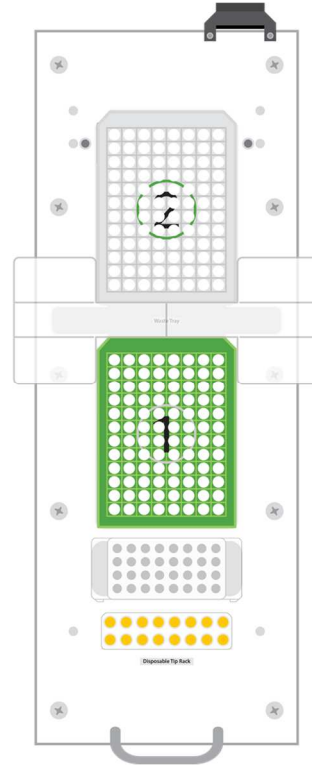
예시 1) Sample 1 개



예시 2) Sample 8 개



예시 3) Sample 16 개



11. 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.



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

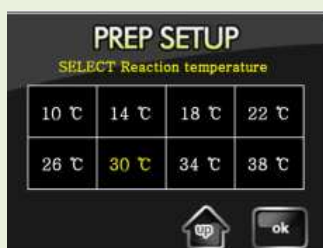


13. 좌측 화면과 같이 PREP SETUP 화면이 나타나고, 각 키트에 해당하는 프로토콜 번호를 선택할 수 있는 화면이 나타납니다. 여기에서 '901'을 눌러 화면에서 아래의 내용이 나타나는지 확인 후, 'Enter' 버튼을 눌러 주시기 바랍니다.

Prep Type: Protein
Sample SRC: Protein_Purification



14. 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.



15. Elution volume 선택 화면 후, 단백질 정제 시 온도를 선택할 수 있는 화면이 나타납니다. 본 키트 사용시에는 곧바로 'ok'버튼을 눌러 다음 단계로 이동하시기 바랍니다.



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



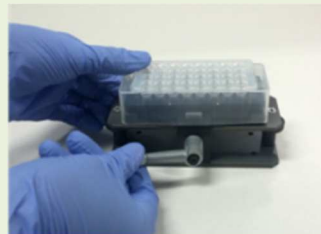
17. 좌측과 같이 'Running Mode' 화면이 뜨면, 최종적으로 아래의 내용을 확인하신 후, 'RUN' 버튼을 눌러 주시기 바랍니다. 이 후, 장비 가동이 시작되고 약 2 시간 소요됩니다.

Prep Type: Protein
Sample SRC: Protein_Purification



18. 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.



19. Sample rack 을 꺼내신 후, 다음의 Protection Cover Separation Tool (*ExiProgen™* 장비 액세서리) 사용 방법에 따라 Protection Cover 를 제거할 수 있습니다.

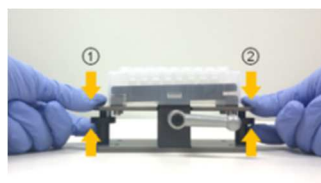
*ExiProgen™*에서 Elution Tube Rack 을 꺼내어 Protection Cover Separation Tool 에 장착합니다.

* 참고: Rack 장착 시 Separation Tool 의 레버 위치가 왼쪽에 있어야 합니다.



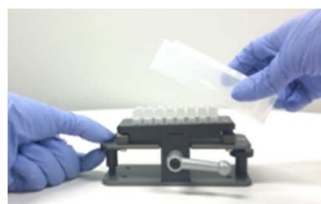
20. 한 손으로 Protection Cover 와 Separation Tool 이 움직이지 않도록 고정하고, 다른 한 손으로 레버를 시계방향으로 180° 돌려줍니다.

* 참고: Elution Tube Rack 이 고정될 때까지 레버를 시계방향으로 충분히 돌려야 합니다.



21. Elution Tube Rack 고정이 완료되면, Separation Tool 의 양쪽 측면에 있는 레버를 당겨줍니다. 레버를 당기면 Protection Cover 가 위쪽으로 올라오며 Rack 과 분리되어 쉽게 제거할 수 있습니다.

* 참고: 레버 작동 시 한 손으로 Protection Cover 를 잡은 상태에서 왼쪽, 오른쪽의 레버를 순차적으로 당겨주면 tube 내 용액이 튜브 현상을 방지할 수 있습니다.



Sample 분석

ExiProgen™ 장비를 이용한 단백질 정제가 끝난 후, 최종 목적 단백질은 Elution tube에서 회수하실 수 있으며, 단백질 용액은 약 250 µl 정도가 회수됩니다. 단, 최종 단백질 용액에는 Ni-NTA magnetic bead가 포함되어 있을 수 있으나, 이는 원심 분리하여 제거한 후 사용하시면 됩니다.

필요 시, 단백질 정제 과정 중의 일부 sample은 그림 4와 같이 Cartridge ②의 L, K, J 행에서 회수하실 수 있습니다.

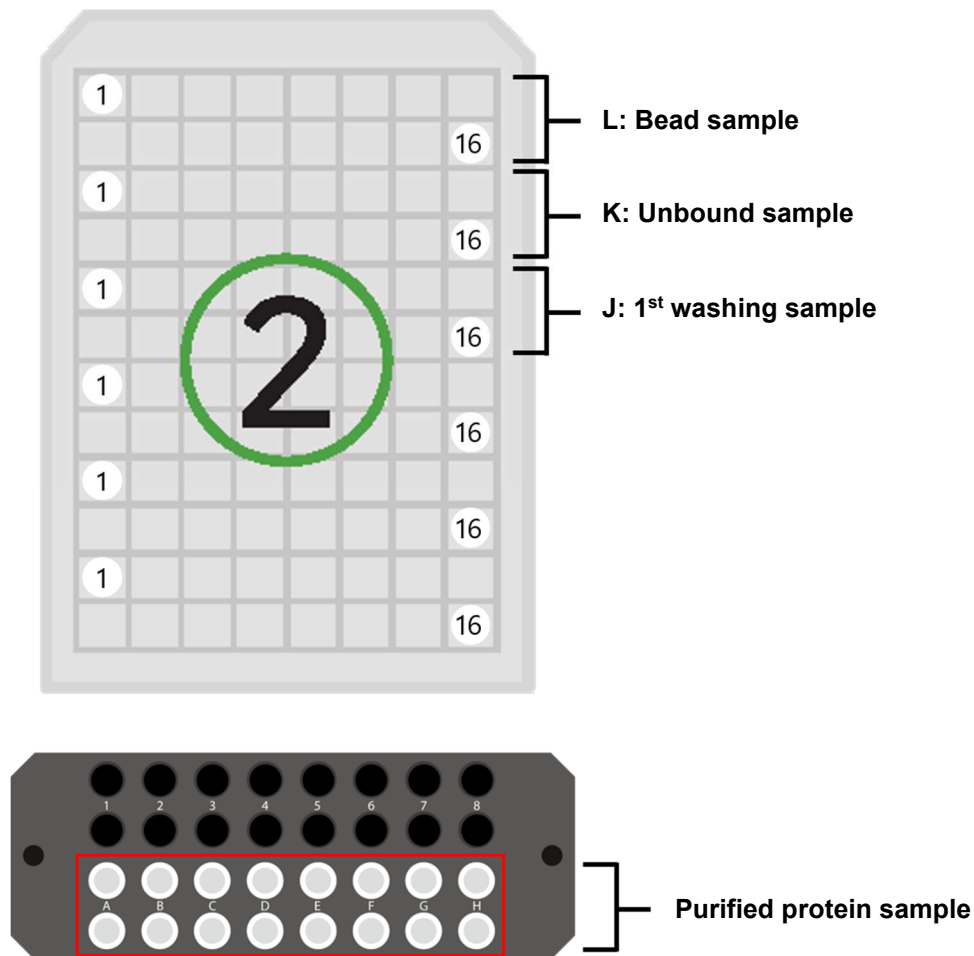


그림 4. Cartridge ②의 각 행별 sample.

- Unbound sample: 발현 sample을 Ni-NTA bead에 결합시킨 후의 상등액(bead에 결합하지 않은 단백질을 포함하는 용액).
- 1st washing sample: 단백질 정제 시, 1차 washing 후, 상등액.
- Bead sample: 단백질 정제 시, 사용된 bead sample.

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

1. Loading mixture를 아래와 같이 준비하시기 바랍니다.

조성	Unbound/1 st washing samples	최종 단백질/Bead sample*
Sample	5 μ l	15 μ l
4X loading dye	5 μ l	5 μ l
멸균 증류수	10 μ l	-
Total volume	20 μ l	20 μ l

* 참고: 200 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.

- Unbound/1st washing samples: 5 μ l/well
- 최종 단백질/Bead samples: 10 μ l/well

4. Coomassie blue 용액으로 염색 및 탈색하여 목적 단백질의 합성 및 정제 여부를 확인합니다(그림 5, 6).

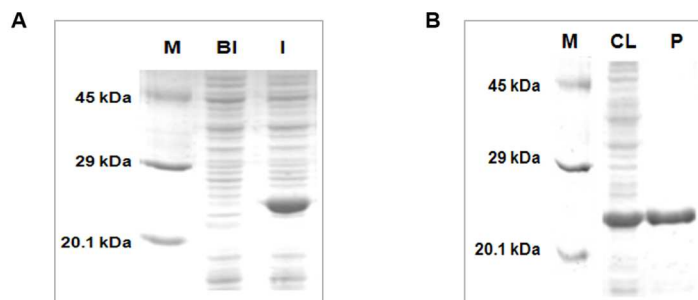


그림 5. *E. coli* cell lysate를 이용한 목적 단백질의 정제. (A) DUSP3가 과발현된 *E. coli* cell lysate. M, Protein Size Marker; BI, Pre-induction sample; I, Post-induction sample. **(B) ExiProgen™을 이용한 목적 단백질의 정제.** M, Protein Size Marker; CL, Recombinant cell lysate; P, Purification sample.

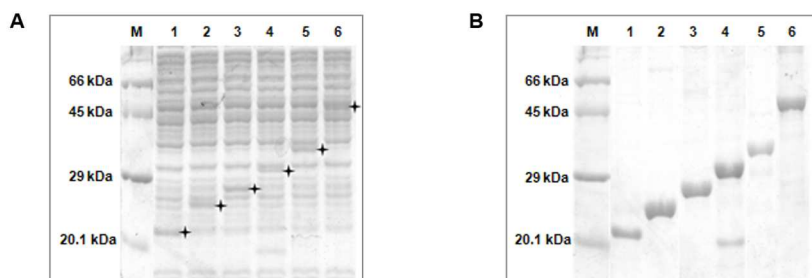


그림 6. 무세포 단백질 발현법으로 발현된 sample을 이용한 목적 단백질의 정제. (A) 발현시료. (B) ExiProgen™을 이용한 목적 단백질의 정제. ExiProgen™을 이용한 목적 단백질의 정제. M, Protein Size Marker; 1, DUSP3 (22 kDa); 2, CAT (24 kDa); 3, AcGFP (28 kDa); 4, ERFP (31 kDa); 5, EF-Ts (34 kDa); 6, VF (45 kDa).

유지 보수

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

1. 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.

2. Cartridge ①, ②

반응이 끝나고 남은 Cartridge ①, ②는 뚜껑을 덮은 상태로 4°C에 보관하시기 바랍니다.

문제 해결

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

1. 목적 단백질의 정제량이 적거나, 정제되지 않는 경우.

원인	해결 방법
목적 단백질의 발현양이 적은 경우	<p>1. 정제 시료가 Cell lysate인 경우. 배양 온도 및 단백질 발현 유도체의 접종 농도, 시간 등의 변경을 통해 단백질 발현 수준을 최적화하십시오.</p> <p>2. 정제 시료가 무세포 단백질 발현 시료인 경우. 2-1) 단백질 발현 시 사용하는 Template DNA의 염기 서열을 Cell extract의 cell line에 맞춰 코돈 최적화를 합니다.</p> <p>2-2) Manual 키트인 <i>AccuRapid™</i> 키트를 사용하여 적은 스케일로 template 농도 최적화 과정을 통해 최적의 발현조건을 찾으면 수율을 높일 수 있습니다.</p>
응집체(Inclusion body)를 형성하는 경우	발현된 목적 단백질이 응집체를 형성한다면, Ni-NTA magnetic bead에 결합하지 않을 수 있습니다. 단백질 응집을 최소화하기 위해 발현 과정을 최적화하십시오.
Loading sample의 양이 적은 경우	Cell lysate를 준비할 때 사용하는 lysis buffer의 양을 줄이십시오. 단백질 정제를 위한 고농도의 시료를 제조할 수 있습니다.
Histidine tag이 없는 경우	N-termius 혹은 C-terminus에 Histidine tag이 부착되어있는지 확인하고 없는 경우 부착한 시료를 재 준비합니다.

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.
목적 단백질의 분해	Cell lysis를 하는 동안, protease inhibitor를 첨가하시기 바랍니다.

2. 목적 단백질이 Unbound 또는 1st washing sample에서 확인되는 경우.

원인	해결 방법
Overloading 되는 경우	Ni-NTA magnetic bead의 binding capacity를 넘어선 양의 sample이 loading된 경우에 해당하며, sample을 희석하여 사용하시기 바랍니다.
단백질이 침전되는 경우	Solubilization reagent (ex. 0.1% Triton X-100 또는 Tween 20) 등을 buffer에 첨가하여 사용할 수 있습니다.

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.

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.

Kim, T. W., Oh, I. S., Keum, J. W., Kwon, Y. C., Byun, J. Y., Lee, K. H., Choi, C. Y., & 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.

Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2002). Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *Journal of structural and functional genomics*, 2(1), 29-35.

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.

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
<i>ExiProgen</i> TM His-tagged Protein Purification Kit	16 rxn	K-7220
	32 rxn	K-7221

관련 제품

제품명	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 Protein Synthesis Kit	K-7300
<i>ExiProgen</i> TM EC-Maxi Protein Synthesis Kit	K-7310
<i>ExiProgen</i> TM EC-Tagfree Protein Synthesis Kit	K-7320
<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 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

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