

Bioneer

Healthier Future for
Humanity with
Genomic Technology

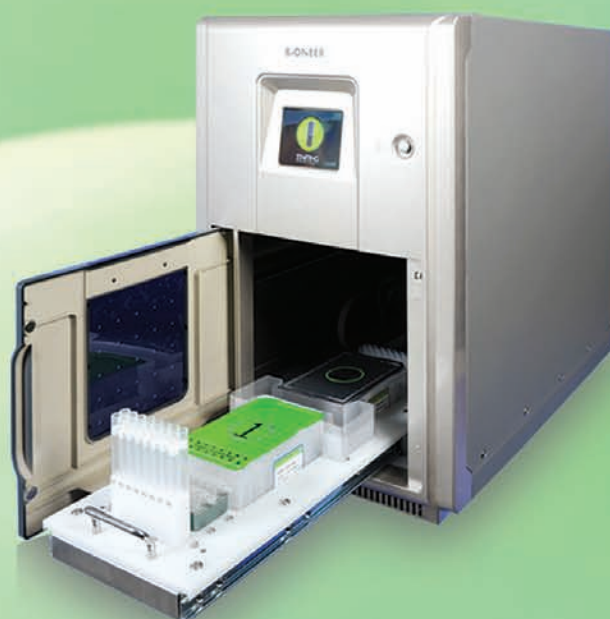
ExiProgen™ Guide Book

The world's first fully automated protein synthesis
and nucleic acid extraction system

Automatic
Protein
Synthesizer

Automatic
Nucleic acid
Extractor

Automatic
Protein Purifier



20140403
Ver.2

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

BIONEER CORPORATION

Preface

본 책자는 포스트게놈시대의 생명공학 연구실의 필수적인 연구장비인 *ExiProgen™*에 관한 설명서입니다. *ExiProgen™*은 무세포 transcription, translation 반응과 magnetic affinity purification을 이용하여 DNA로부터 다양한 단백질들을 전자동으로 합성하고 고순도로 정제할 수 있어 생명공학의 획기적인 발전을 가져올 수 있는 신개념의 장비입니다.

지난 30년간은 유전자혁명의 시대였습니다. 1985년 automatic DNA sequencer가 발명된 이후 30년간 sequencing 장비들이 눈부시게 발전하여 10년 걸렸던 인간 게놈 해독이 이제는 하루 안에 가능하게 되었습니다. 그리하여 GeneBank에는 3억 개 이상의 단백질을 만들 수 있는 유전정보가 축적되어 있고, NGS장비의 보급에 따라, 매년 2배씩 유전정보의 양이 늘어날 것으로 예상하고 있습니다. 또한, 유전자 합성 기술도 빠르게 발전하고 있어 1 kb 의 gene을 200달러 대에 만들 수 있는 시대가 되었습니다. 이제 이러한 기술을 기반으로 하여 모든 생명체들의 유전정보로부터 유용단백질을 대량으로 발굴하고 이를 활용하는 합성생물학 시대가 빠르게 열리고 있습니다. 구조생물학의 발전에 따라서 새로운 서열을 갖는 유전자를 설계하고 대량 합성할 수 있어 생명체 유래의 단백질보다 우수한 성능을 갖는 신규 단백질이 빠른 속도로 개발되어 생명공학의 제 2의 전성기를 맞이하게 될 것입니다. 그러나 단백질을 제조하는 데는 여전히 많은 시간이 걸리고 전문가들만이 할 수 있어, 엄청난 DNA정보들을 활용하는 후속 연구가 쫓아가지 못하고 있습니다.

시험관에서 DNA를 합성할 수 있는 PCR이 1988년 개발되어 보급되기 전에는, 원하는 DNA를 얻기 위한 방법이 세포를 이용한 유전자재조합 방법 밖에 없었기 때문에 많은 시간이 소모되고 전문가들만이 실험을 수행 할수 있었습니다. 시험관에서 짧은 시간 안에 DNA를 합성하는 PCR이 발명되고 이를 자동화한 thermal cycler가 개발되어 1990년 초부터 널리 보급됨에 따라 생명공학이 눈부신 속도로 발전해 왔습니다.

세포추출액을 사용하여 시험관 내에서 단백질을 만드는 방법이 개발된 지 50여 년이 넘었지만 현재까지 이 원리를 이용한 효율적인 자동화장비가 개발되지 않아서 지금까지도 단백질을 만들기 위해서는 세포를 이용하는 방법이 주로 사용되고 있습니다. 그래서 유용단백질을 발견하는 데 있어서 가장 시간과 비용이 많이 들어가는 것은 유전자로부터 순수한 단백질을 만들어내는 과정입니다.

본 장비는 포스트게놈시대의 생명공학의 새로운 도약을 위해, 누구나 쉽게 많은 단백질들을 만드는 것이 가능하며, 엄청난 유전정보로부터 단백질을 고속으로 만들어 활용할 수 있게 하는 장비입니다. *ExiProgen™*에 template DNA와 단백질합성 kit를 장착하여 가동시키면, 전자동으로 무세포 단백질합성과 affinity purification을 통해 고순도의 단백질을 제조할 수 있습니다. *ExiProgen™*은 원하는 단백질들을 전자동으로 만들어 낼 수 있을 뿐만 아니라, 생체시료로부터 DNA나 RNA를 전자동으로 추출할 수 있는 기능도 가지고 있어, 유전자를 다루는 실험실의 생산성을 획기적으로 높일 수 있는 장비입니다. *ExiProgen™*은 각각의 목적에 최적화된 protocol을 내장하고 있어서, 각각의 protocol에 사용되는 다양한 kit들을 이용하여 고순도, 고수율로 단백질과 핵산을 전자동으로 얻을 수 있습니다.

당사는 *ExiProgen™*을 한국과 미국의 주요 바이오 회사들과 공공연구기관들에 공급하기 시작하여, 이들 기관의 연구원들로부터 놀라운 찬사를 받고 있습니다. 현재 전세계의 생명공학 연구실부터 분자진단 실험실까지 전자동 단백질합성과 다양한 생체시료로부터 DNA, RNA를 전자동으로 추출하는 데 광범위하게 사용되고 있습니다. 본 기기를 사용하시는 순간부터 수많은 유전자들로부터 유용단백질을 찾아 나가는 데 있어 포스트게놈시대의 선도자가 되실 것입니다. Bioneer는 전세계 생명공학 연구실에 *ExiProgen™*을 지속적으로 보급하고 있습니다. 본 장비가 PCR 장비처럼 생명공학의 새로운 지평을 열어나가는 차세대 실험실의 필수장비로 사용될 것입니다. 그럼으로써 포스트 게놈 시대의

수많은 유전자정보를 최대한 활용하여 고속으로 유용한 단백질들을 만들 수 있게 되어 생명공학의 제 2의 르네상스를 가속화하는 데 크게 기여할 수 있을 것으로 기대됩니다.

당사는 지속적인 연구개발투자로 세계 수준의 oligonucleotide 대량합성 기술을 개발하고, 이를 이용한 고속 gene 합성기술을 개발하여 다양한 서비스들을 제공해 오고 있습니다 (http://www.bioneer.co.kr/order/GeneSynthesisOrder_main.aspx). 이제 경제적 가치와 직결되는 단백질을 전자동으로 합성할 수 있는 기술을 개발함으로써 유전자로부터 고부가가치 단백질을 개발하는 전과정을 고객들께 제공할 수 있게 되어 고객들께서 더욱 값진 연구결과들을 얻는데 큰 도움이 될 수 있을 것입니다.

(주)바이오니아 (KOSDAQ 64550)는 1992년에 설립된 한국 바이오 벤처 1호 기업으로써, 설립 이래 20여 년간 끊임없는 연구개발투자로 독창적인 400여 개의 특허들을 발명하여, 포스트 게놈 시대의 생명공학 연구에 핵심적인 수만 여종의 첨단시약들과 장비들을 개발, 상용화하여 생명공학의 핵심인 유전자 기술을 보급하는데 기여해 왔습니다. 그동안 축적된 성공과 실패의 소중한 경험을 기반으로, 창의적인 아이디어로 과감하게 한계에 도전하는 포스트 게놈 시대의 Pioneer가 되고자 합니다. 혁신적인 생명공학 연구와 유전자 기반의 분자진단 siRNA신약의 원천 기술들을 개발하여 유전자기술을 통해 인류의 건강한 삶과 지속 가능한 사회를 만들어 나가는데 기여해 나갈 것입니다.

본 Guide Book을 통해서 *ExiProgen™*에 대한 새로운 정보를 얻으시고 가까운 시일 내에 *ExiProgen™* 사용자로서 신약개발, 종자개발, 식품, 화학, 소재산업 등에서 무한한 가능성에 도전하는 단백질 Discovery의 Pioneer가 되시길 기원합니다.

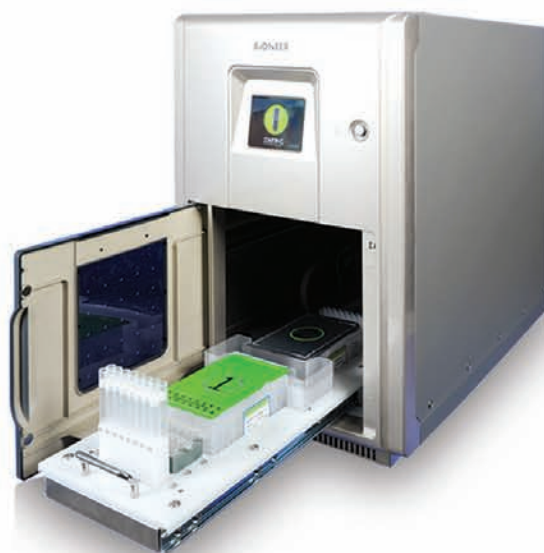
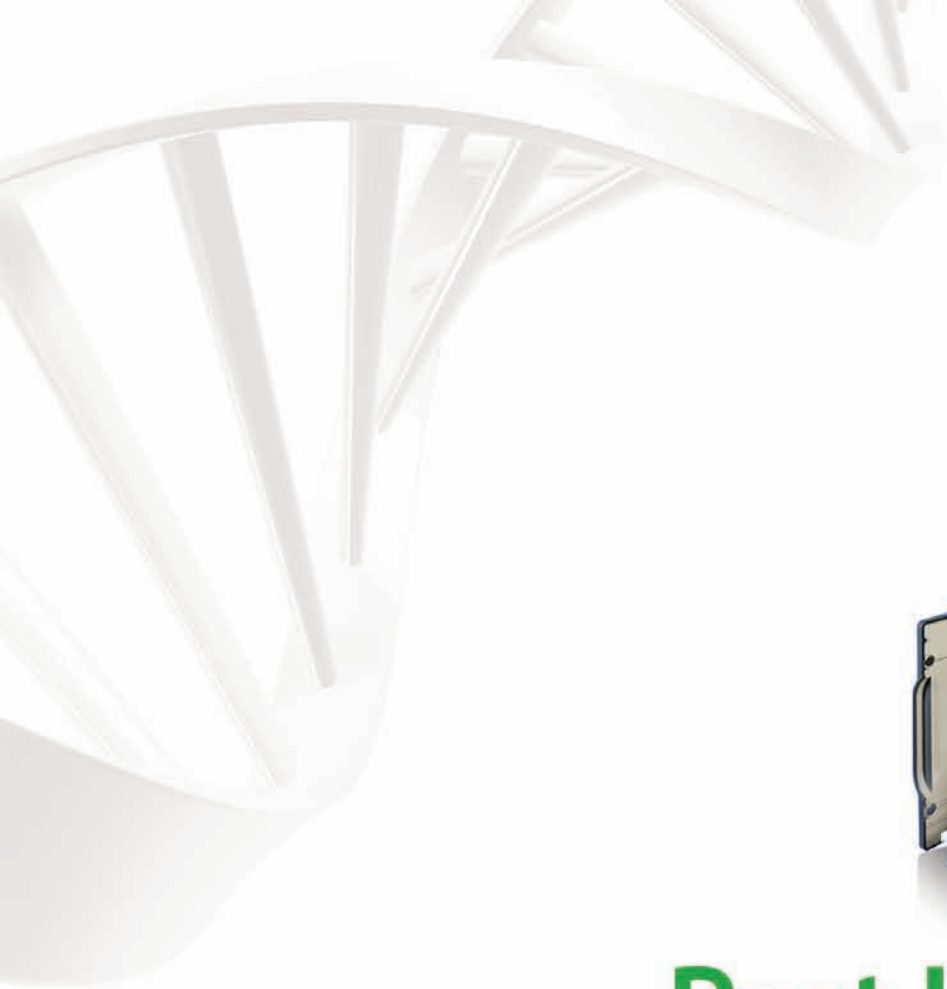
2014년 3월
대표이사 박 한오

Contents

Preface	3
Part I - ExiProgen™	7
Part II - Protein Synthesis & Purification	11
Template Preparation & Protein Product Selection Guide	12
1. Introduction	13
2. Protein Synthesis (Expression & Purification)	14
2.1. Principle of cell-free protein expression	14
2.2. Principle of affinity purification with magnetic beads	15
3. ExiProgen™ 단백질 합성을 위한 template DNA 준비	16
3.1. ExiProgen™ 단백질 합성을 위한 template DNA 준비 가이드	17
3.1.1. 단백질의 유전자 sequence 정보만 알고 있는 경우	17
3.1.2. cDNA, clone 또는 PCR product 형태로 단백질 유전자를 갖고 있는 경우	18
3.1.3. 단백질의 유전자 clone을 T7 발현 벡터 (pET, pK7, pIVEX 등)로 갖고 있는 경우	19
3.2. ExiProgen™ 단백질 발현용 template DNA 구조	20
3.2.1. Fast and parallel template preparation with PCR	21
ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit	21
3.2.2. Cloning in pBIVT vectors	25
3.3. Template DNA를 이용한 단백질 발현 확인	24
AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit	25
3.4. Template DNA 농도 최적화	25
AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit	28
3.5. Effect of template DNA purity on protein synthesis	31
4. Protein Expression & Purification	33
4.1. ExiProgen™ kits for protein synthesis(Expression & Purification)	34
4.1.1. 한번에 다종의 단백질들의 합성여부를 보려고 할 때	34
ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit	
4.1.2. 1mg이상의 단백질을 손쉽게 얻고 싶을 때	38
ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit	
4.1.3. Histidine tag이 제거된 단백질을 얻고자 할 때	40
ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit	
4.1.4. Disulfide bond가 있는 목적 단백질을 얻고자 할 때	43
ExiProgen™ EC-Disulfide Protein Synthesis Kit	
4.2. AccuRapid™ kits for protein expression	
4.2.1. The easy method for protein synthesis !!	46
AccuRapid™ Protein Synthesis Kit	
4.2.2. Screening for protein expression	48
AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit	
4.2.3. Protein synthesis with manual kit	49
AccuRapid™ Midi Protein Expression Kit	
AccuRapid™ Maxi Protein Expression Kit	
4.3. ExiProgen™ kits for protein purification	50
4.3.1. Cell-free protein의 purification	51
ExiProgen™ His-Tagged Protein Purification Kit	

Contents

4.3.2. Modified protein의 purification	53
<i>ExiProgen™</i> Cell Based Protein Purification Kit	
4.4. Level up of protein expression	55
4.4.1. Codon optimization for the maximal expression of the protein	55
4.4.2. Batch expression vs Continuous expression	56
4.4.3. Effect of reaction temperature on protein synthesis	58
5. Application	60
5.1. <i>ExiProgen™</i> kit를 이용한 독성 단백질 합성	60
5.2. <i>ExiProgen™</i> kit를 이용한 막단백질 합성	63
5.3. <i>ExiProgen™</i> kit를 이용한 상업용 단백질 합성	65
6. Troubleshooting guide	67
7. Ordering Information	69
8. Service Information	71
9. References	72
Part III - Nucleic Acid Extraction	75
1. Introduction	76
2. Principle and Selection Guide	77
2.1. Principle of nucleic acid extraction	77
2.2. Selection guide	78
3. Product Information	79
3.1. <i>ExiProgen™</i> Blood Genomic DNA Kit	79
3.2. <i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit	81
3.3. <i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit	85
3.4. <i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit	88
3.5. <i>ExiProgen™</i> Nano-Plus Plasmid DNA Kit	91
3.6. <i>ExiProgen™</i> Gel Extraction Kit	94
3.7. <i>ExiProgen™</i> PCR Purification Kit	97
3.8. <i>ExiProgen™</i> Tissue Total RNA Kit	99
3.9. <i>ExiProgen™</i> Plant Total RNA Kit	103
3.10. <i>ExiProgen™</i> Viral DNA/RNA Kit	107
4. Application	110
4.1. <i>ExiProgen™</i> 을 이용한 소고기 조직의 genomic DNA 추출	110
4.2. <i>ExiProgen™</i> 을 이용한 쌀 종자 genomic DNA 추출	113
4.3. <i>ExiProgen™</i> 을 이용한 paraffin embedding sample에서의 genomic DNA 추출	116
5. Troubleshooting Guide	118
6. Ordering Information	122



Part I

ExiProgen™

Bioneer

Healthier Future for
Humanity with
Genomic Technology

ExiProgen™

ExiProgen™은 cell-free protein synthesis 기능과 affinity expression 기능을 병합하여 전자동화시켜, template DNA와 kit를 넣고 가동시키면, 하루 만에 다양한 단백질을 전자동으로 제조할 수 있는 장비입니다. 뿐만 아니라, 1시간 내외에 세포나 조직 등 다양한 시료로부터 전자동으로 핵산을 추출하는 기능도 가지고 있어 생명공학 연구실의 혁신을 주도할 신개념의 장비입니다.

ExiProgen™에 사용되는 당사의 다양한 단백질 합성 kit를 이용하여 다양한 단백질들을 각각의 목적에 적합하게 고순도로 얻을 수 있습니다. 제조하려는 단백질의 특성에 따라 단백질을 coding 하고 있는 template DNA를 각 kit와 함께 장착한 후 각 kit에 해당하는 protocol을 실행하면 전자동으로 작동되어 고순도의 단백질을 얻을 수 있습니다.

ExiProgen™을 이용한 단백질 합성은 *E. coli* 단백질 발현 시스템에 적합한 template DNA를 단백질 합성 kit에 첨가한 후, ExiProgen™에 장착해 가동시키면 전자동으로 단백질을 발현시키고, 발현된 단백질을 affinity tag를 이용하여 정제한 후, 최종적으로 목적 단백질을 제공해 주는 방법입니다. 1회 반응으로 최대 16종의 각기 다른 단백질을 만들 수 있으며, 이 단백질들은 고순도를 갖습니다. 또한, ExiProgen™은 affinity protein purification 과정만 별도로 수행할 수 있으며 세포에서 발현된 affinity tag를 가지는 단백질을 고순도로 정제할 수도 있습니다.

ExiProgen™은 다양한 시료로부터 각 시료에 최적화된 핵산추출 kit를 이용하여 DNA, RNA를 전자동으로 획득할 수 있습니다. 배양 세포, 조직, 등으로부터 고품질의 RNA (RNA Quality Score >9.0)를 추출할 수 있고 또, 다양한 조직으로부터 genomic DNA를 고순도로 정제할 수 있는 기능을 가지고 있습니다.

ExiProgen™의 특징은 다음과 같습니다.

각각의 목적에 맞게 최적화된 protocol이 내장되어 있음

ExiProgen™에는 최적화된 단백질합성/정제 및 핵산추출용 protocol이 내장되어 있으며, ExiProgen™이 지원하는 모든 protocol을 이용하여 누구나 쉽게 재현성 있는 실험들을 수행할 수 있습니다. 또한, 추가적으로 개발되는 단백질합성/정제 및 핵산 추출에 해당하는 protocol들은 당사의 홈페이지에서 무상으로 다운받은 후 네트워크(TCP/IP) 연결을 통해 손쉽게 장비에 설치할 수 있도록 되어 있습니다.



Temperature Controlled Block이 장착되어 있음

ExiProgen™은 특별히 제작한 Temperature Controlled Block을 장착하고 있어 온도를 4~90°C범위에서 변경할 수 있으며, 이는 원하는 온도에서 단백질 합성을 수행하거나, 단백질 합성/정제와 핵산 추출실험을 거쳐 얻은 최종 산물을 낮은 온도에서 안정하게 보관할 수 있게 해줍니다.

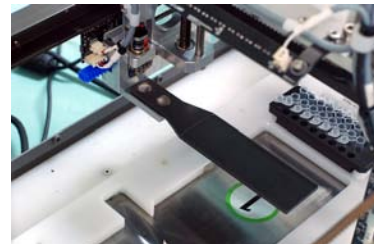


Magnet & Heating Block

ExiProgen™은 단백질합성/정제 또는 핵산을 추출할 때 사용할 수 있도록 자석을 포함하는 Magnet & Heating block 이 장착되어 있습니다. Heating block 위에 배치된 자석은 단백질 정제 또는 핵산 추출에 사용되는 자성입자들을 각 well의 벽면에 균등하고 빠르게 부착시켜 고순도, 고효율로 단백질 정제 및 핵산 추출을 수행할 수 있도록 해줍니다. 또한, Heating block은 30~90℃ 범위에서 일정한 온도 유지를 위한 제어가 가능하며, 단백질 합성 시 온도를 유지하거나, 핵산 추출 시 가온 반응을 통해 ethanol을 완전히 증발시켜 고순도의 핵산을 얻을 수 있도록 해줍니다. (한국등록특허 10-1025135).

오염방지장치 (Contamination Shield)

ExiProgen™에 장착된 오염방지장치는 핵산 추출 과정 중에 피펫을 사용하여 빈 번히 용액들을 이동시키는데 이때 피펫으로부터 용액이 낙하되어 다른 well로 떨어져 발생될 수 있는 교차 오염을 완전히 차단하도록 고안된 장치입니다. 오염방지장치는 장비 가동 중 피펫 팁 하단에 위치하며 용액이 떨어지는 것을 방지합니다.



터치 스크린을 이용한 편리한 사용

3.5인치 터치 스크린을 이용하여 실험 protocol 및 elution volume 등을 선택하여 실행할 수 있습니다. 또한, 실험 진행률을 실시간으로 확인할 수 있어 보다 편리한 사용이 가능합니다.



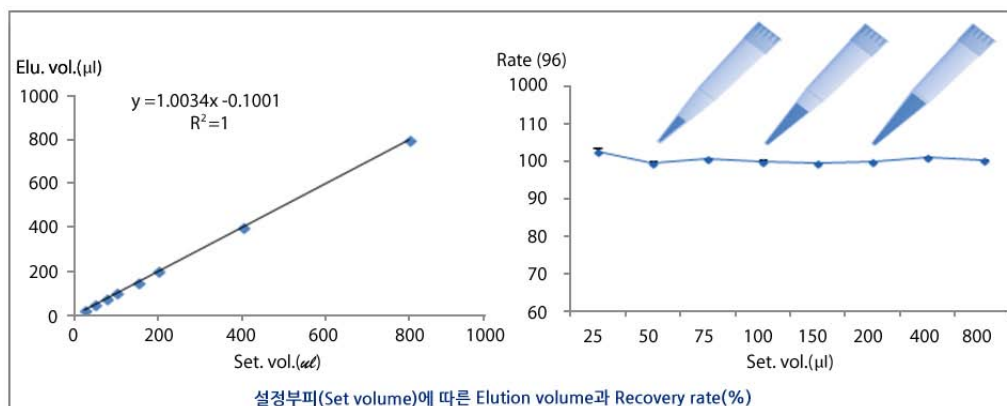
자동 UV 살균 lamp

ExiProgen™은 강력한 살균 램프를 장착하고 있어 단백질을 합성/정제하거나 핵산을 추출하기 전후 장비 내부를 살균할 수 있습니다. 이것은 각 실험에 따른 오염을 막아 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있는 환경을 제공합니다.



정확한 Pipette Volume

ExiProgen™은 0.1 mm까지 조정 가능한 syringe motor를 장착하여 자동 분주 과정에서 발생할 수 있는 오차범위를 최소화 하였으며, 용액을 25 µl~1000 µl 부피 범위에서 분주할 수 있도록 하여 다양한 실험에 적용할 수 있습니다.



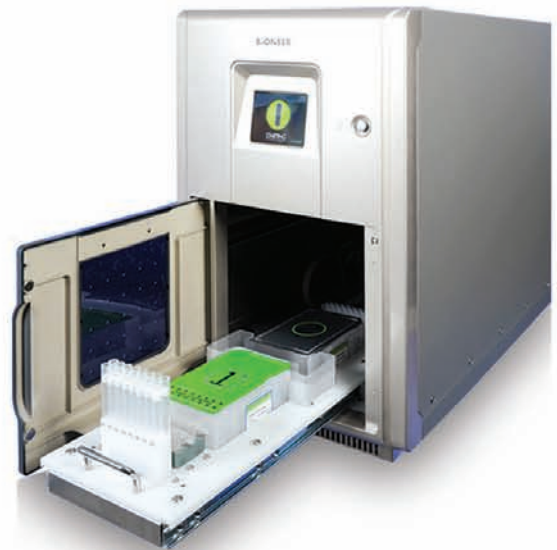
Protocol no.

Protein Synthesis & Purification

Kit (Cat. no.)	Protocol no./Name
<i>ExiProgen™</i> His-Tagged Protein Purification Kit (K-7200)	901, Protein : Purification
<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit (K-7300,7301,7302)	902, Protein : Synthesis
<i>ExiProgen™</i> EC-Maxi Protein Synthesis Kit (K-7310)	903, Protein : Synthesis_Maxi
<i>ExiProgen™</i> EC-Tagfree Protein Synthesis Kit (K-7320)	904, Protein : Synthesis_TF
<i>ExiProgen™</i> EC-Disulfide Protein Synthesis Kit (K-7330)	905, Protein : Synthesis_DS
<i>ExiProgen™</i> Cell-Based Protein Purification Kit (K-7230)	906, Protein:Purification_Cell

Nucleic Acid Preparation

Kit (Cat. no.)	Protocol no./Name
<i>ExiProgen™</i> Blood Genomic DNA Kit (K-4311)	101, Genomic DNA : Whole Blood
<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit (K-4312)	102, Genomic DNA : Animal tissue 103, Genomic DNA : FFPE tissue
<i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit (K-4314)	108, Genomic DNA : Gram (+) bacteria 109, Genomic DNA : Gram (-) bacteria
<i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit (K-4315)	104, Genomic DNA : Plant tissue 105, Genomic DNA : Plant seed
<i>ExiProgen™</i> Tissue Total RNA Kit (K-4342)	202, Total RNA : Animal tissue
<i>ExiProgen™</i> Plant Total RNA Kit (K-4344)	204, Total RNA : Plant tissue 205, Total RNA : Plant seed
<i>ExiProgen™</i> Viral DNA/ RNA Kit (K-4371)	412, Viral DNA : Plasma 413, Viral DNA : Serum
<i>ExiProgen™</i> Nano-Plus Plasmid DNA Kit (K-4381)	703, Fragment DNA : Plasmid DNA
<i>ExiProgen™</i> Gel Extraction Kit (K-4391)	803, Fragment DNA : Gel slice
<i>ExiProgen™</i> PCR Purification Kit (K-4392)	804, Fragment DNA : PCR product



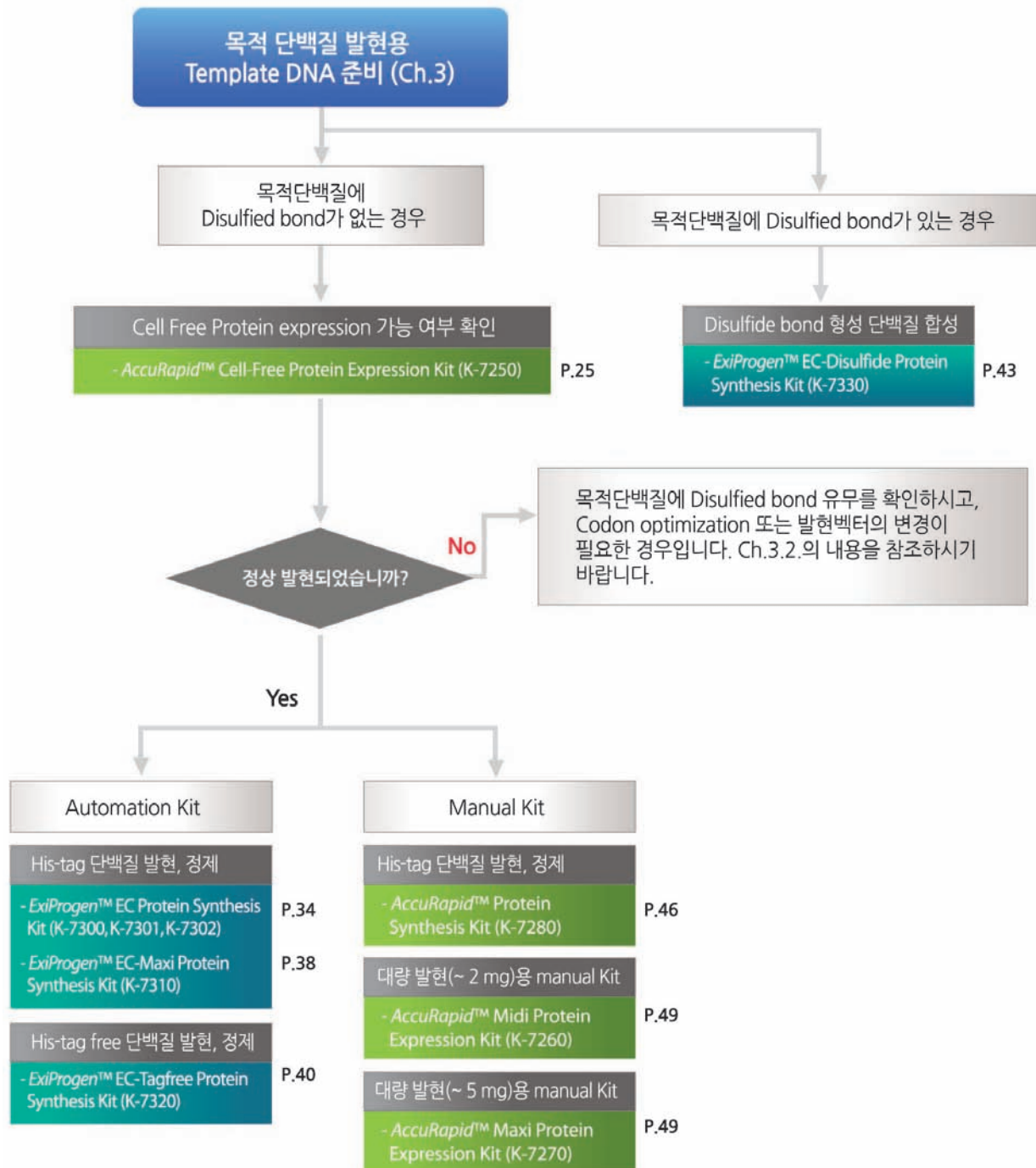
Part II

Protein Synthesis & Purification

Bioneer

Healthier Future for
Humanity with
Genomic Technology

Template Preparation & Protein Product Selection Guide



1. Introduction

단백질은 효소, 호르몬, 구조단백질, 조절단백질 등의 다양한 기능으로 생체를 구성하는 물질 중에 가장 다양하고 복잡한 기능을 하는 중요한 물질입니다. 포스트 게놈 시대에 이러한 단백질들을 만드는 수많은 유전자들의 염기서열들이 알려졌기 때문에, 이러한 유전자들이 만들어 내는 단백질들의 기능 및 구조 등에 대한 연구 수요가 급격하게 늘어나고 있습니다.

특정 단백질의 기능과 특성의 연구는 단백질 발현 정제부터 시작됩니다. 단백질을 제조하는 방법은 대장균, 효모, 동물세포 등 다양한 세포주를 이용할 수 있으며, 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터를 세포 내로 주입하여 형질전환 시키고 세포주를 배양하고 재조합 단백질을 발현시킨 후, 이 세포를 파쇄하여 발현된 단백질을 정제하는 방법들이 일반적으로 사용되고 있습니다. 이 방법은 재조합벡터를 만들어서 단백질을 안정하게 발현시키는 균주 선발과정과 최적의 발현조건을 찾는 과정이 필요하며, 이후 세포배양, 세포파쇄, 그리고 단백질 정제의 일련의 과정을 거쳐야 하므로 많은 시간과 노동력이 필요합니다. 뿐만 아니라 세포주에 독성을 나타내는 단백질인 경우에는 단백질을 발현시키는 것이 어려워 특수한 발현조건들을 시도해야만 합니다. 또 세포 내에서 발현된 단백질이 inclusion body로 형성되면 이것을 soluble protein으로 만들기 위해 많은 노력이 필요하여 하나의 순수한 단백질을 제조하기 까지 최소 일주일에서 길게는 수개월의 시간이 소요됩니다. 이러한 문제점을 극복하고자 세포를 이용하지 않고 짧은 시간 내에 반응용기 내에서 단백질을 합성하는 무세포 단백질 발현법이 개발되어 사용되고 있습니다. 이 방법은 반응용기에 단백질을 발현할 수 있는 template DNA (expression vector 또는 PCR product)와 세포 추출액, 그리고 아미노산과 핵산 그리고 에너지물질이 들어 있는 단백질 발현용액을 첨가한 후, 적정온도에서 반응을 시켜 목표 단백질을 발현시키는 방법으로, 세포를 사용하여 단백질을 발현시키는 방법에 비해서 소요시간을 획기적으로 줄일 수 있을 뿐만 아니라 세포 내에서 독성을 가지는 단백질도 발현을 시킬 수 있다는 장점을 가지고 있습니다.

(주)바이오니아에서는 무세포 단백질 발현 방법을 ExiProgen™에 적용시킨 다양한 kit들을 개발하여 판매하고 있습니다. 단백질 내에 이황화결합이 없는 일반적인 단백질을 ~ 100 µg 정도의 양을 얻을 수 있는 kit, 대량으로 500 µg 내외의 단백질을 얻을 수 있는 kit, 이황화결합이 2개 이상인 단백질을 합성하는 kit, His-tag이 없는 고순도의 단백질을 제조할 수 있는 kit들을 제공하고 있습니다. 또한 무세포 발현용 벡터와 PCR을 이용하여 무세포 발현용 template DNA 제작할 수 있는 kit 등을 개발하여 공급하고 있습니다. 이러한 kit들은 E. coli 세포 추출액으로 만들어져 있고 T7 promoter를 이용하여 발현시키는 시스템으로서 T7 발현 염기서열을 포함하는 template DNA (Expression vector 또는 PCR product)만 가지고 있으면 곧바로 단백질 합성이 가능합니다.

또한 그 밖에도 당사는 ExiProgen™을 이용하여 기존의 세포배양 방식을 이용하여 발현시킨 재조합 단백질을 전자동으로 손쉽게 정제할 수 있는 단백질 정제kit도 판매하고 있습니다. 이 kit는 최대 16종의 시료를 동시에 정제할 수 있는 kit로, 동일 단백질에 대한 최적화된 발현 조건을 확인하는 실험 등에 활용될 수 있습니다.

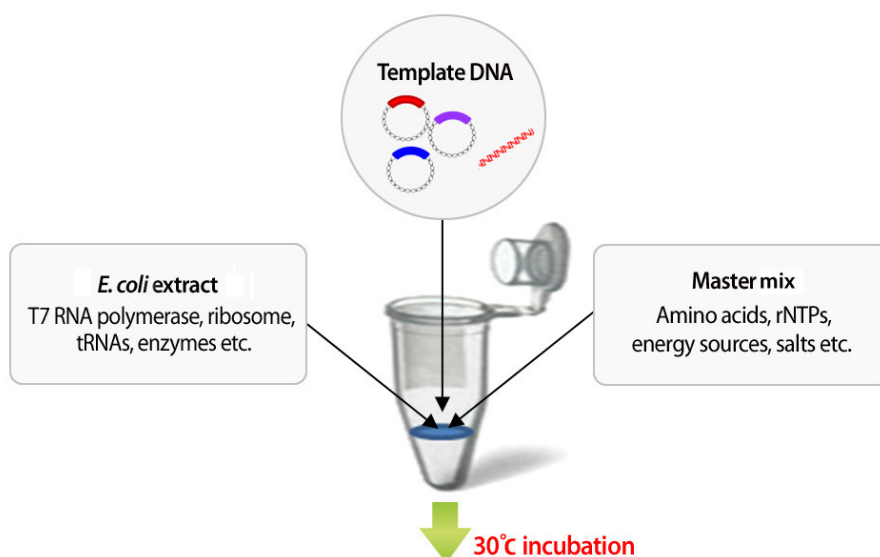
2. Protein synthesis (Expression & Purification)

2.1. Principle of cell-free protein expression

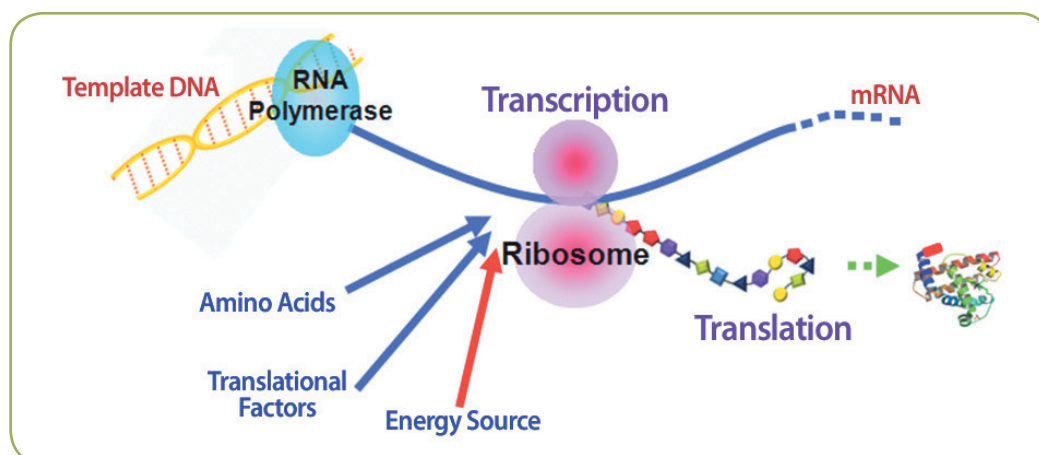
무세포 단백질 발현이 이루어지기 위해서는, rNTP와 T7 RNA polymerase, ribosome과 tRNA (transfer RNA)등이 필요합니다. 당사의 모든 kit에는 T7 RNA polymerase, ribosome, tRNA 등을 공급해 주는 *E. coli* extract와 rNTP, 아미노산 및 에너지를 공급해주는 Master mix가 포함되어 있습니다.

무세포 단백질 발현법의 조작과정과 원리는 아래와 같습니다. *E. coli* extract와 Master mix가 들어 있는 시험관튜브에 단백질을 암호화하는 template DNA를 첨가한 후 잘 섞어서, 30℃의 온도를 일정시간 동안 유지시켜주면, 아래와 같이 튜브 내에서 단백질 발현이 이루어지게 됩니다. 당사의 단백질 발현/합성 kit는 아래의 그림과 같이 첨가해준 DNA를 template으로 하여 시험관내에서 rNTP를 이용하여 전사 (transcription)가 일어나고 이어서 가해준 아미노산과 에너지를 이용하여 번역 (translation)이 진행되어 원하는 단백질이 만들어지는 원리를 기반으로 하고 있습니다.

Step I: Prepare of Reaction Mixture



Step II: Protein Expression (in reaction tube)

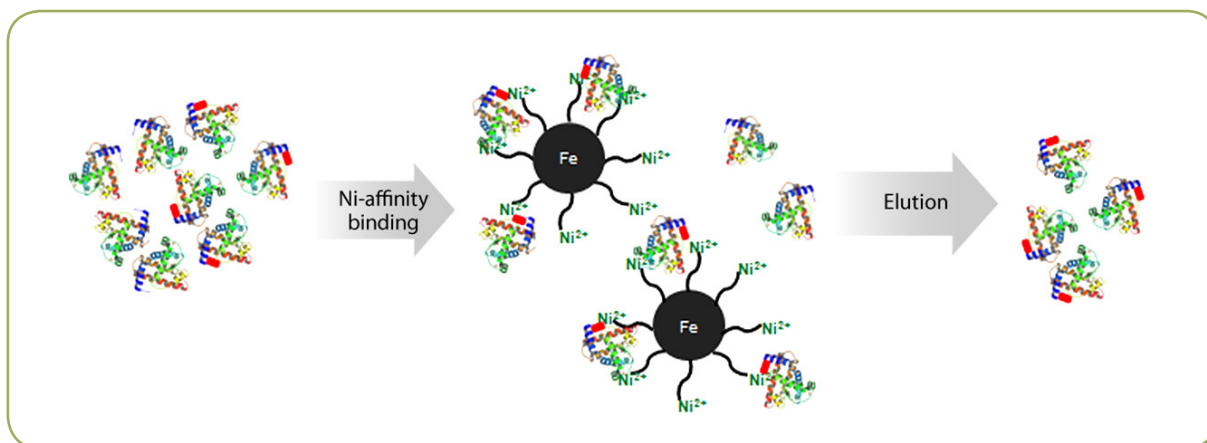


2.2. Principle of affinity purification with magnetic beads

자성입자는 핵산, 단백질, 항체의약품과 같은 biomolecule들의 정제에 다양하게 이용되고 있으며, 정제과정을 자동화 시키는데 적합합니다. 자성입자 표면에 코팅된 잔기들에 의하여 biomolecule들이 결합하고, 그 후, 세척과정과 추출과정을 거치게 됩니다.

ExiProgen™ 단백질 합성 및 정제 kit류는 당사의 독자적인 기술력으로 개발된 실리카 나노자성입자를 사용하고 있으며, 이 자성입자의 표면에는 Ni-NTA로 코팅되어 있어서 His-tag을 가지고 있는 목적 단백질을 정제할 수 있습니다.

자성입자를 이용하여 목적단백질을 정제하는 원리는 다음과 같습니다.



3. ExiProgen™ 단백질 합성을 위한 template DNA 준비

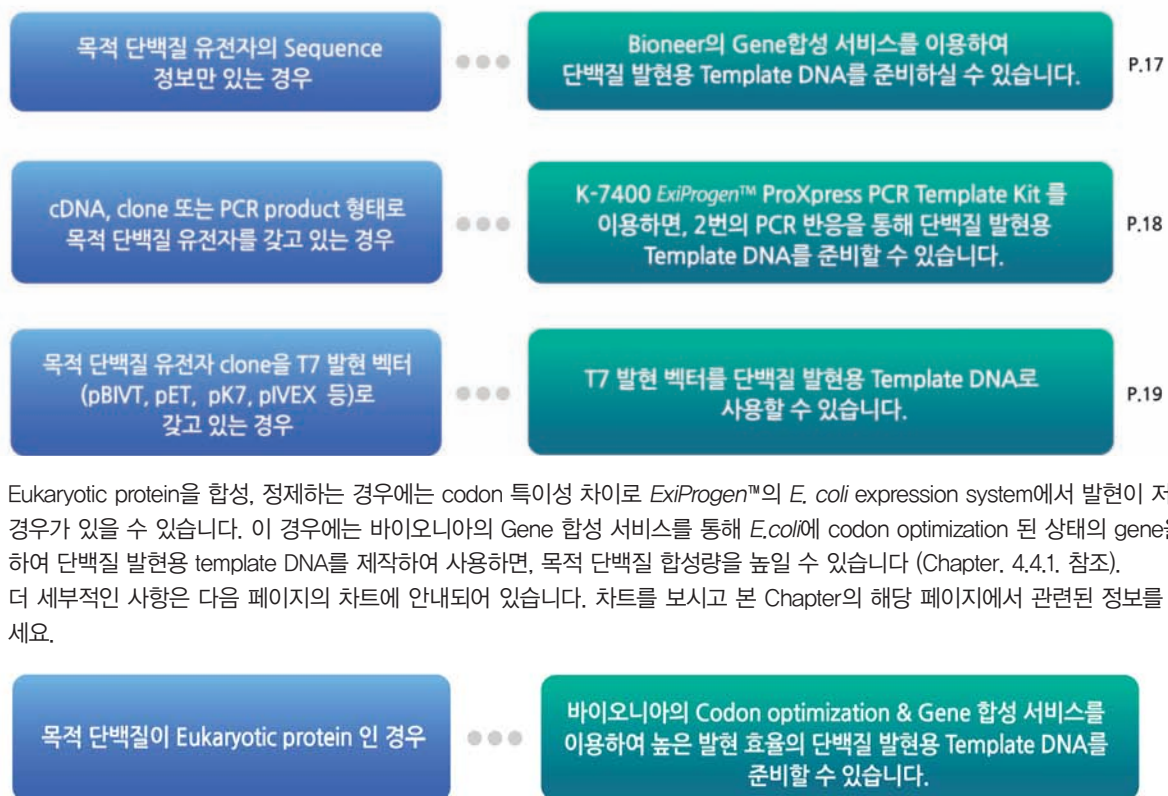
ExiProgen™ 장비와 kit 그리고 단백질 발현용 template DNA를 가지고 원하는 목적 단백질을 합성 정제할 수 있습니다. ExiProgen™ system에서 목적 단백질을 발현하기 위해서는 무세포 단백질 발현용 template DNA를 먼저 준비해야 합니다.

단백질 발현용 Template DNA를 준비하실 때 유의하실 사항은 다음과 같습니다.

*. ExiProgen™의 단백질 정제는 His-tag과 Ni-NTA bead를 이용하므로, 목적 단백질의 template DNA에 쓰일 유전자 sequence에는 6x His tag sequence가 반드시 포함되어 있어야 합니다 (Chapter. 3.2 참조).

*. 목적 단백질에 Post-translational modification이 필요한 경우, *E. coli* expression system을 이용하는 ExiProgen™ 단백질 합성 kit 에서 post-translational modification이 이뤄지지 않으므로, Eukaryotic protein expression system을 이용하여 단백질 발현을 수행한 후, ExiProgen™에서 단백질을 정제할 수 있습니다.

위의 사항을 유념하시고, 아래와 같이 Template DNA를 준비하실 수 있습니다.



Eukaryotic protein을 합성, 정제하는 경우에는 codon 특이성 차이로 ExiProgen™의 *E. coli* expression system에서 발현이 저하되는 경우가 있을 수 있습니다. 이 경우에는 바이오니아의 Gene 합성 서비스를 통해 *E.coli*에 codon optimization 된 상태의 gene을 확보하여 단백질 발현용 template DNA를 제작하여 사용하면, 목적 단백질 합성량을 높일 수 있습니다 (Chapter. 4.4.1. 참조).

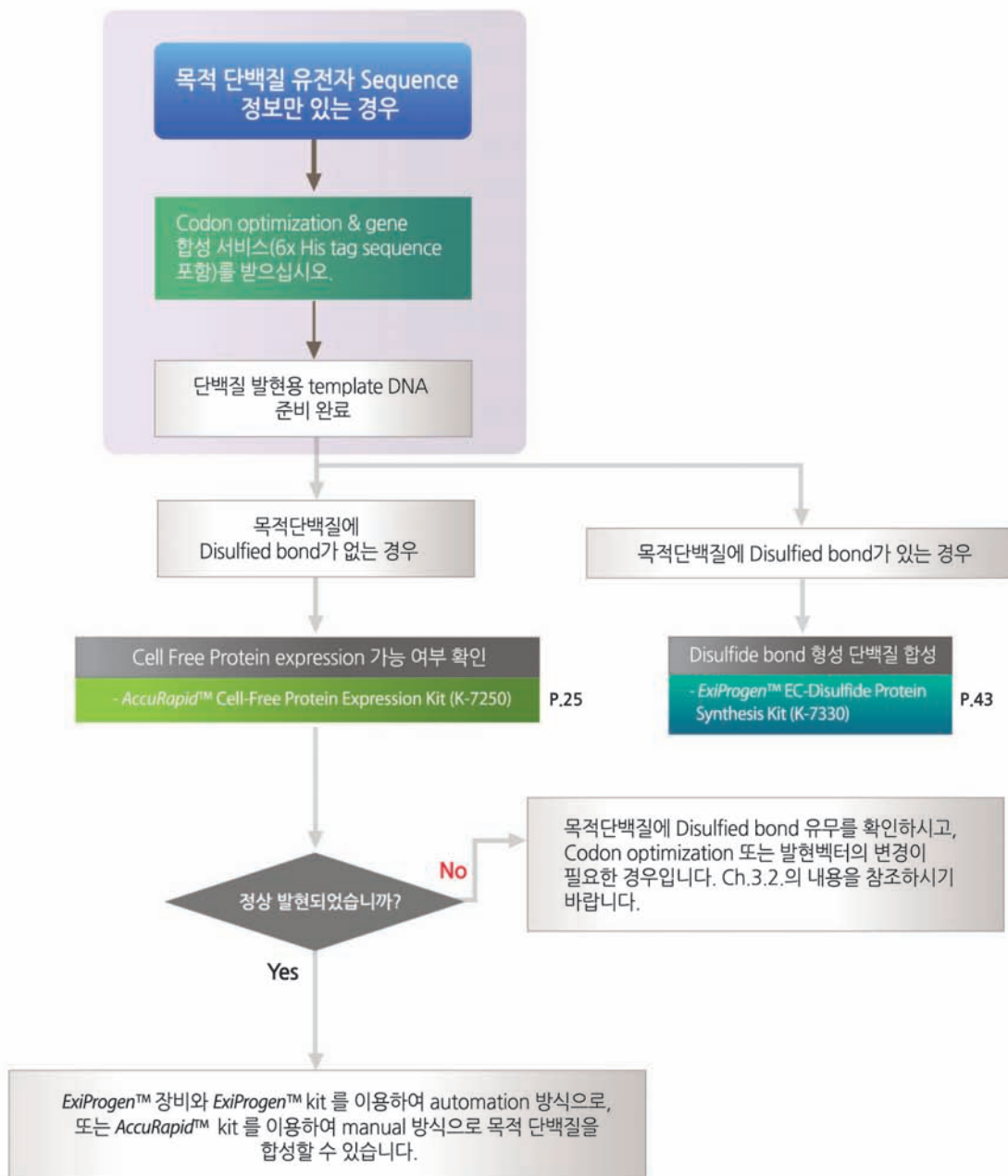
더 세부적인 사항은 다음 페이지의 차트에 안내되어 있습니다. 차트를 보시고 본 Chapter의 해당 페이지에서 관련된 정보를 확인하세요.

3.1 ExiProgen™ 단백질 합성을 위한 template DNA 준비 가이드

3.1.1 단백질의 유전자 sequence 정보만 알고 있는 경우

합성하려는 단백질의 유전자 sequence 정보 (NCBI access number 등)만 알고 있는 경우, (주)바이오니아의 Codon optimization & Gene 합성 서비스를 이용하여 간편하게 6x His-tag sequence가 포함된 단백질 발현용 template DNA를 준비할 수 있습니다. mg 단위의 발현량을 필요로 하는 경우에는 cloning 서비스를 이용하여 T7 *E.coli* expression vector로 template DNA를 준비하는 것을 권장합니다.

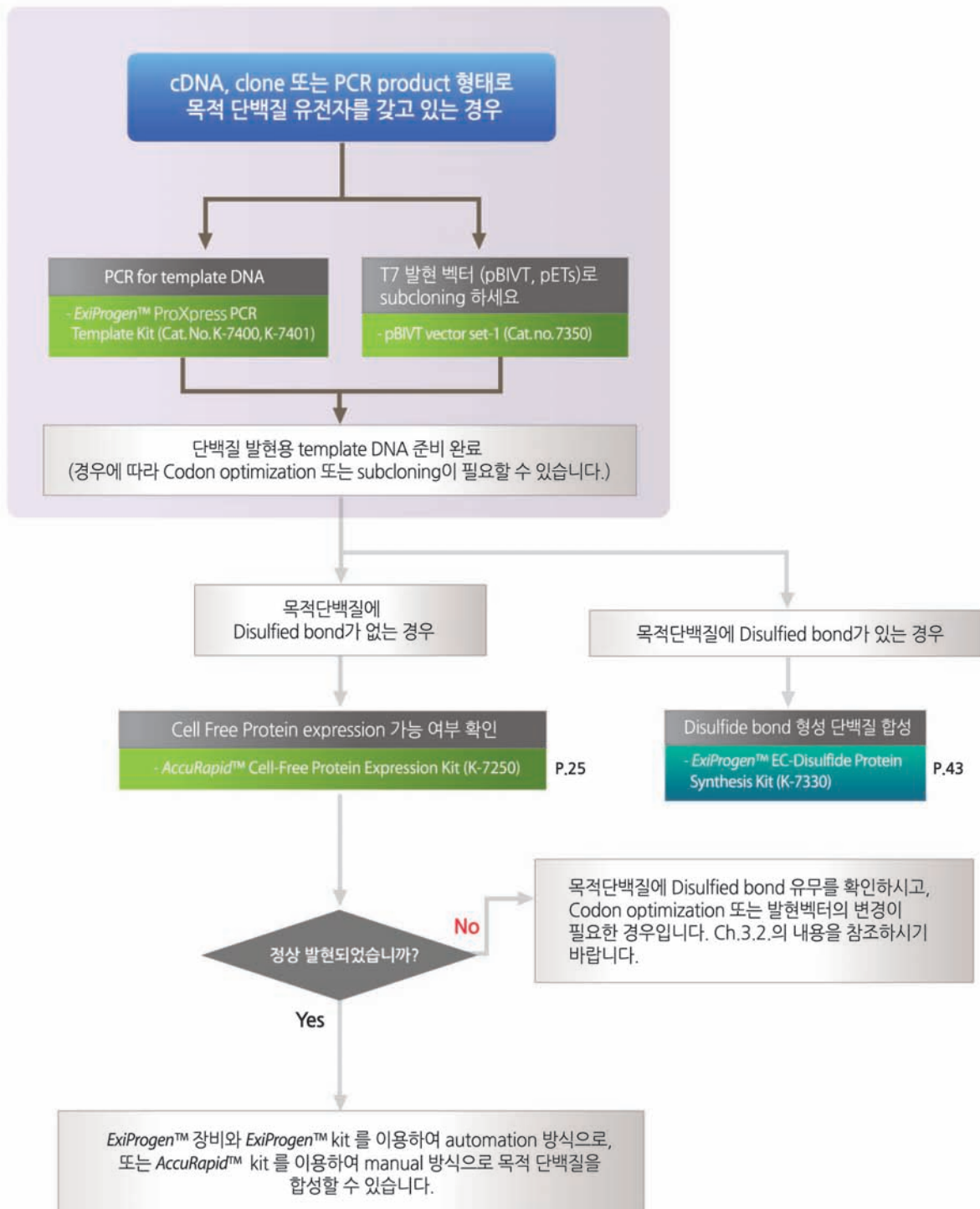
아래의 차트표의 해당 페이지에서 자세한 내용을 확인할 수 있습니다.



3.1.2 cDNA, clone 또는 PCR product 형태로 단백질 유전자를 갖고 있는 경우

단백질 유전자의 cDNA, clone 또는 PCR product (6x His-tag sequence 포함)로부터 단백질을 합성을 하고자 하는 경우, (주) 바이오니아의 ExiProgen™ ProXpress PCR Template kit (Cat. no. K-7400, K-7401)을 이용하시면, 2번의 PCR 반응을 통해 간편하게 단백질 발현용 template DNA를 준비할 수 있습니다. mg 단위의 발현량을 필요로 하는 경우에는 Cloning 서비스를 이용하여 T7 E.coli Expression vector로 template DNA를 준비하는 것을 권장합니다.

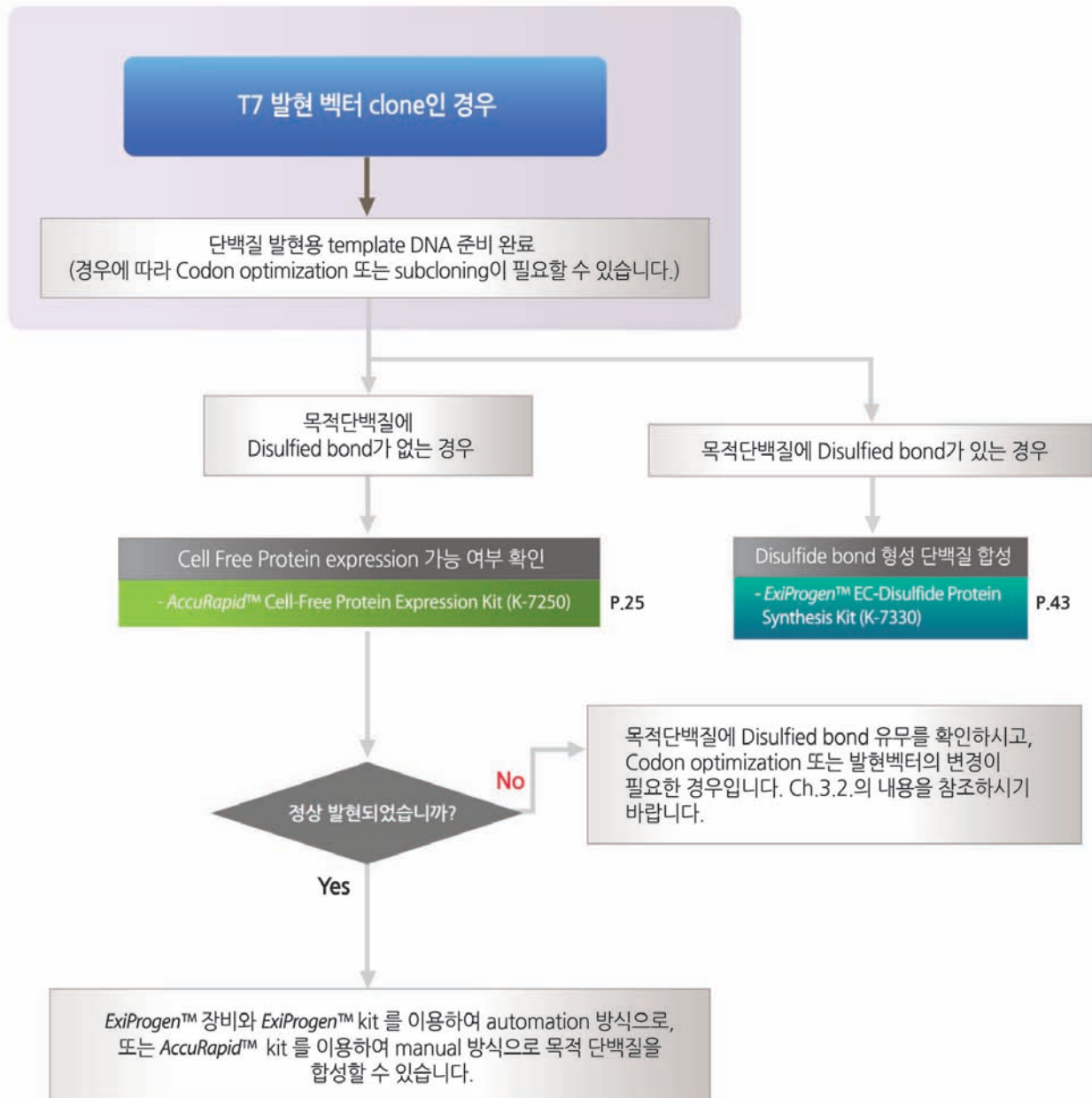
아래의 차트표의 해당 페이지에서 자세한 내용을 확인할 수 있습니다.



3.1.3 단백질의 유전자 clone을 T7 발현 벡터 (pBMT, pET, pK7, pIVEX 등)로 갖고 있는 경우

단백질 유전자를 T7 *E.coli* 발현 벡터 (pET, pK7, pIVEX 등)에 삽입된 clone (6x His-tag sequence 포함)으로 갖고 있는 경우, ExiProgen™ 단백질 발현용 template DNA로 바로 이용할 수 있습니다.

아래의 차트표의 해당 페이지에서 자세한 내용을 확인할 수 있습니다.



3.2. ExiProgen™ 단백질 발현용 template DNA 구조

무세포 단백질 발현용 template DNA 로는 발현벡터 또는 PCR product를 사용할 수 있습니다. template DNA 는 “T7 promoter – Ribosome binding site (RBS) – Target gene (6x His-tag sequence포함) – T7 terminator” 의 구조를 가지고 있어야 하며, 그 구조는 아래의 그림과 같습니다. 또한 target gene은 start codon과 stop codon을 가지고 있어야 하며, 정제를 위하여 5' 말단 또는 3' 말단에 6x His-tag을 가지고 있어야 합니다.

1) NH constructs (5' end 6x His-tagged template)



2) CH constructs (3' end 6x His-tagged template)



발현 벡터는 (주)바이오니아에서 판매하는 *In vitro* translation 전용 벡터인 pBIVT벡터 (Cat. No. K-7350)에 클로닝하여 사용할 수 있고, 그 밖에도 pK7, pIVEX, pET 벡터 등을 사용할 수 있습니다. 발현 벡터의 경우, 각각의 template DNA 마다 최대의 단백질 합성율을 보이는 최적의 DNA 농도가 다릅니다. 따라서 DNA 농도별 스크리닝을 하여 각 Kit에 맞는 최적의 DNA양을 선정하시기 바랍니다.

PCR product로부터 cloning을 하지 않고 바로 template DNA를 제작하기 위해서는 당사의 ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit (Cat. No. K-7400,7401)를 이용하여 제작할 수 있습니다. 많은 종류의 단백질을 빠르게 소량으로 만들어서 성능을 평가해 볼 때 매우 유용한 Kit로서 Genomic DNA, cDNA 또는 T-vector 등에서 간편하게 1일 내로 단백질을 만들 수 있는 장점이 있습니다.

ExiProgen™으로 발현된 단백질을 정제하기 위해 6x His-tag이 필요합니다. His-tag은 목적 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 위치할 수 있습니다. (단, Tag free 실험을 위해서는 His-tag은 N-말단에 위치해야 합니다.)

일반적으로 His-tag의 존재는 단백질의 구조 변화에 영향을 주지는 않습니다 (Carson M et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007 Mar;63(Pt 3):295–301). 그러나 단백질 3차 구조 형성 시 안쪽으로 말려 들어가서 Ni column에 결합하지 못할 수 있습니다. 이러한 경우에는 단백질 정제가 불가능할 수 있어, 이 경우는 His-tag의 위치를 변경해야 합니다.

또한 효소의 활성과 단백질의 구조 분석측면에 있어서도 affinity tag의 위치가 영향을 미친다고 알려져 있으며, 한 예로 *Solanum dulcamara*, *Solanaceae*의 종의 효소를 tag의 위치를 달리하여 성능을 비교한 실험에서는 두 가지의 효소 중 C-말단에 tag가 있는 효소는 활성을 나타내지 못한 결과를 얻을 수 있었습니다 (Freydank et al, *Proteins*, 2008 Jul;72(1):173–83).

단백질을 최대한 많이 합성하기 위해서는 template DNA의 순도가 높아야 합니다. DNA의 순도는 $A_{260/280} > 1.8$, $A_{260/230} > 1.5$ 일수록 좋으며, 만약 준비하신 template DNA의 순도가 낮은 경우에는 당사의 AccuPrep® PCR purification Kit (Cat. No. K-3034)를 이용하여 재정제한 후, 사용하시면 됩니다.

또한 DNA의 서열상의 *E.coli* codon usage가 단백질 합성량에 영향을 미치며, 만약 코돈 최적화 (codon optimization)가 되어 있지 않은 경우 당사의 codon optimization & AccuGeneBlock synthesis service를 통해서 최적의 template DNA 를 경제적으로 합성하실 수 있습니다. 또한, 당사의 *In vitro* translation vector에 클로닝된 상태로 제공 받으실 수 있는 gene synthesis Service도 제공하고 있습니다. 자세한 내용은 홈페이지를 참조하시기 바랍니다.

3.2.1. Fast and parallel template preparation with PCR

ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit (Cat. no. 7400, 7401)



본 kit는 cloning 과정 없이 PCR 반응을 이용하여 cell-free protein expression용 template DNA를 제작할 수 있는 kit로서, 표적 유전자 증폭용 1차 primer set를 제외한 template DNA 제조 반응에 필요한 모든 구성품 (2차 primer set, PCR premix 등)이 kit에 포함되어 있습니다. 본 kit로 제작된 단백질 발현용 template DNA는 *AccuRapid™* Protein Expression Kit류 (매뉴얼 방식) 및 *ExiProgen™* Protein Synthesis Kit류에 사용가능합니다.

■ 특징 및 장점

Rapid & Easy Preparation of Linear Template DNA (for Protein Expression):

목적 단백질의 유전자를 포함하는 cDNA, genomic DNA 등으로부터 두 단계의 PCR 반응을 통해 단백질 합성용 template DNA를 제조할 수 있으며, *ExiProgen™* kit와 연계하여 하루만에 목적 단백질 합성을 완료할 수 있습니다.

Accurate Protein Template by High fidelity PCR:

본 kit는 당사의 대표적인 Long & high fidelity PCR PreMix인 *AccuPower® ProFi Taq* PCR PreMix를 사용하여, PCR 반응 시 생길 수 있는 error rate를 줄여주기 때문에 정확한 sequence를 가진 단백질 발현용 template DNA를 제작할 수 있습니다.

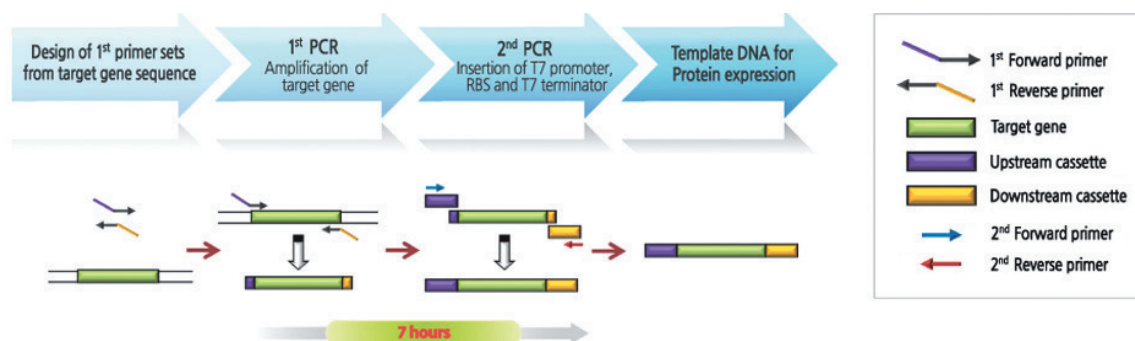
High Efficiency:

본 kit를 이용하여 제조한 단백질 발현용 template는 *ExiProgen™*에 최적화되어 소량의 DNA 만으로도 100 µg이내의 단백질을 합성할 수 있습니다.

(ex: template DNA 길이에 따른 최대 단백질 합성을 위한 권장 DNA 사용량: 1 kb 이하- 500 ng, 1~2 kb - 1 µg)

■ 실험 방법

본 kit를 사용하여 cloning 없이 PCR 반응만으로 단백질 합성에 바로 사용할 수 있는 template DNA를 얻는 과정은 두 단계로 진행되며 그 과정은 아래 그림과 같습니다.



1) 1차 PCR: 합성하려고 하는 단백질의 structural gene의 DNA (cDNA, genomic DNA, plasmid DNA)로부터 합성하려고 하는 start codon과 termination codon을 포함하는 coding region을 PCR로 증폭

(1차 extended primer 사용: (주)바이오니아 홈페이지에서 주문하실 수 있습니다. Ordering Information 참조)

2) 2차 Overlapping PCR: 1차 PCR에서 확보된 target gene(coding region)을 모든 primer 들이 포함되어 있는 PCR kit에 가하여 2차 PCR을 수행하여 5' 쪽 말단에 T7 promoter 및 RBS 서열을 연결하고 3' 쪽 말단에 T7 terminator 서열을 연결하는 overlapping PCR을 거쳐서 얻은 최종 template DNA를 gel purification 하여 얻을 수 있습니다.

■ 실험 결과

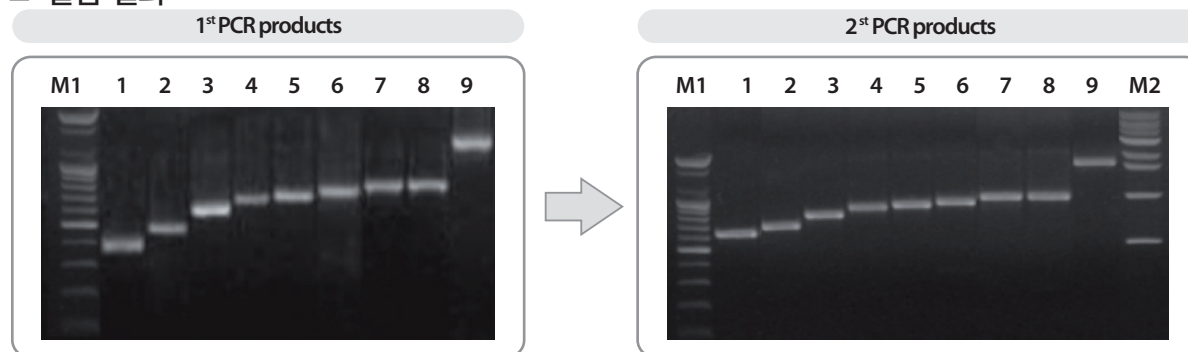


Figure 1. PCR agarose gel data

M: 100 bp DNA Ladder (D-1030, Bioneer), M2: 1 kb DNA Ladder (D-1040, Bioneer)

1: SAV (Template – pT), 2: RNase H (Template – BL21 (DE3) gDNA), 3: hGH (Template – pT)

4: CAT (Template – pBIVT), 5: UDG (Template – BL21 (DE3) gDNA), 6: AcGFP (Template – pBIVT)

7: EVO (Template – pT), 8: RFP (Template – pIVEX), 9: Poly A polymerase (Template – pET15b)

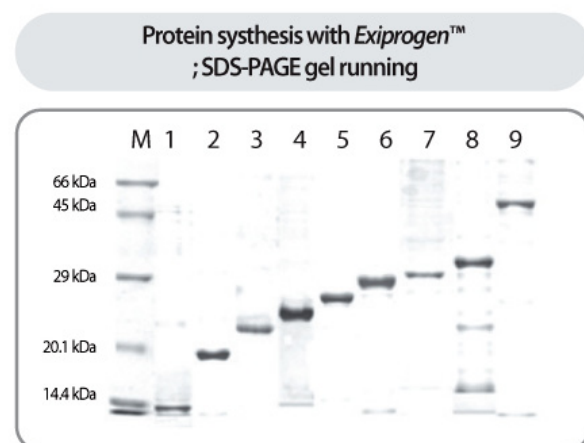


Figure 2. SDS-PAGE gel data of synthesized proteins.

Each linear template DNA generated by *ExiProgen™ ProXpress* PCR Template Kit and those are used as template for protein synthesis with *ExiProgen™* EC Protein Synthesis Kit.

M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low)(Bioneer, D-2020),

1; SAV (13 kDa), 2; RNase H (20 kDa), 3; hGH (23 kDa), 4; CAT (26.5 kDa), 5; UDG (28 kDa), 6; AcGFP (28 kDa), 7; EVO (30 kDa), 8; RFP (31 kDa), 9; Poly A polymerase (54 kDa)

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7400	ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1쌍 primer F/R sets (N terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1쌍 primer F/R sets (C terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/ µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
A-2030-4	MyGenie™ 32 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

● AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix

3'-A overhang이 가능한 High fidelity PCR

AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix 는 Bioneer 에서 독자적으로 개발한 ProFi Taq DNA polymerase와 PCR반응혼합물이 동결 건조된 제품으로 template DNA 와 primers의 첨가만으로 정확하고 깨끗한 PCR산물을 얻을 수 있는 제품입니다.

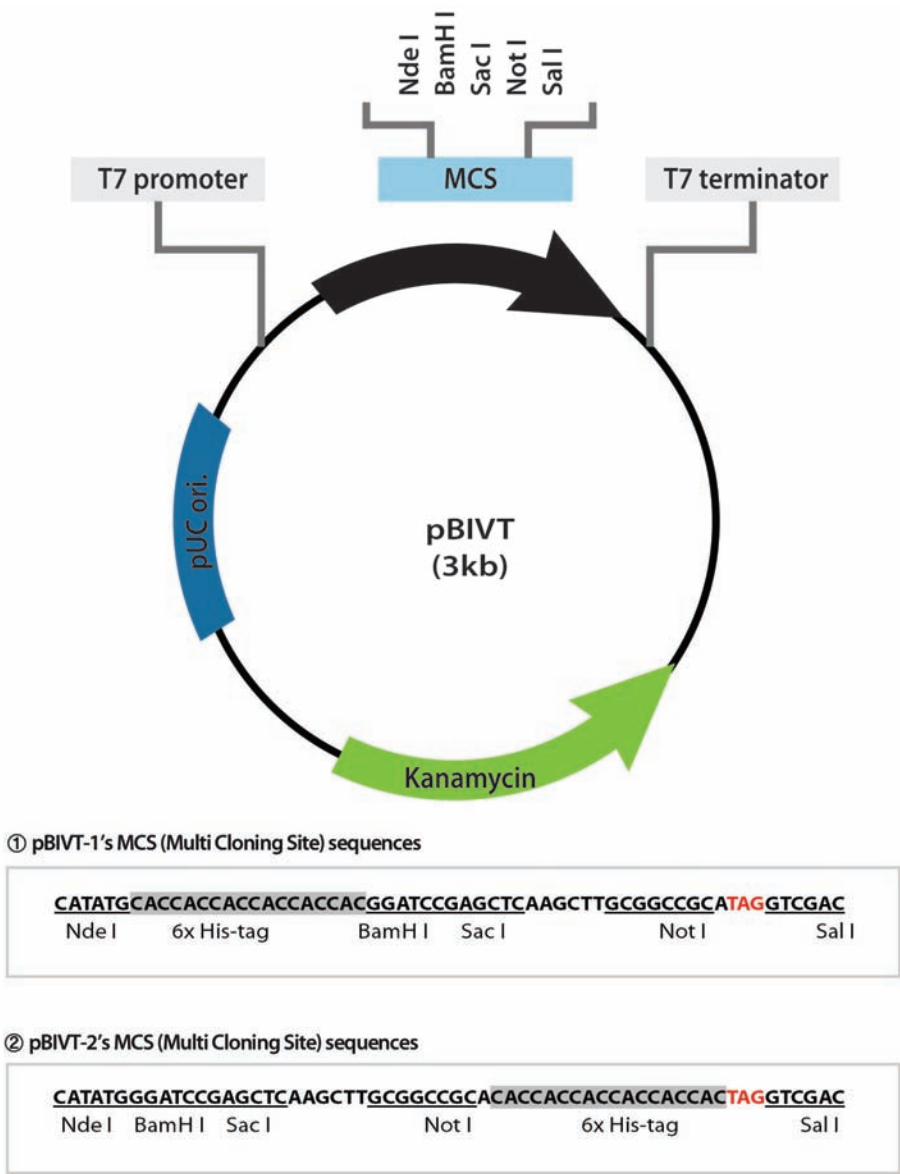
본 제품에 사용되는 ProFi Taq DNA polymerase는 높은 정확성과 뛰어난 증폭효율을 나타내며, Human genomic DNA의 경우 21 kb의 DNA fragment 증폭이 가능하며 Lambda DNA 의 경우 30 kb의 DNA fragment 증폭이 가능합니다. AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix는 high efficiency 및 long-range PCR에 매우 적합한 제품이며 그 외에도 다양한 PCR 증폭 반응에 사용하실 수 있습니다.



¹ Oligo synthesis service 문의

3.2.2. Cloning in pBIVT vectors

당사의 무세포 단백질 합성 전용 벡터인 pBIVT 벡터 세트 (pBIVT-1, pBIVT-2)는 ExiProgen™ 단백질 합성시스템의 모든 kit에 적용 가능합니다. 본 벡터 세트는 N-terminal (pBIVT-1) 또는 C-terminal (pBIVT-2)에 6x His-tagging이 가능하며, 구조는 아래와 같습니다.



■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7350	pBIVT vector set-1
E-1211	BamH I, 5,000 U
E-1981	Sal I, 1,000 U
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
E-3061	T4 DNA Ligase, 20,000 U

3.3. Template DNA를 이용한 단백질 발현 확인

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



본 kit는 반응튜브 내에서 template DNA를 이용하여 3시간 만에 원하는 단백질을 20 µg 내외로 발현할 수 있는 kit로서 AccuRapid™ E. coli extract와 AccuRapid™ Master mix를 포함하고 있습니다. 이 중 AccuRapid™ E. coli extract는 T7 RNA polymerase를 포함하고 있으며, AccuRapid™ Master mix는 아미노산, NTPs, 에너지를 비롯하여 RNA 합성 및 단백질 생산에 필요한 모든 성분을 포함하고 있어 손쉽게 사용이 가능합니다.

■ 특징 및 장점

High Speed

3시간 만에 DNA로부터 단백질을 발현할 수 있습니다.

Flexibility

T7 promoter/terminator site와 RBS(Ribosomal Binding Site)를 포함하고 있는 다양한 DNA로부터 원하는 단백질의 합성이 가능합니다.

High Performance

Host 세포에 독성을 나타내어 기존의 cloning 방법으로 발현이 불가능했던 단백질의 발현이 가능합니다.

Compatibility

본 kit는 ExiProgen™ 단백질 합성 kit 류와 데이터가 호환됩니다.

■ 실험 방법

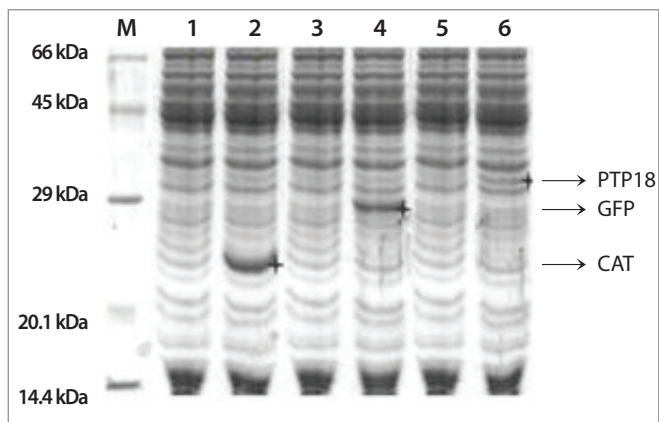
본 kit를 이용한 실험방법은 다음과 같습니다. 미리 준비한 발현벡터 또는 PCR product를 키트에서 제공되는 E. coli extract와 Master



mix와 혼합한 후, 이 반응물을 PCR machine에 넣고, 30℃, 3시간 동안 유지시켜주면 단백질 발현이 이루어지게 됩니다.

발현이 끝난 시료는 일반적으로 SDS-PAGE gel에서 확인할 수 있으며, 만약 확인이 어려운 경우에는 western blot이나 형광 값 측정방법 등을 이용하여 확인하시면 됩니다.

■ 실험 결과



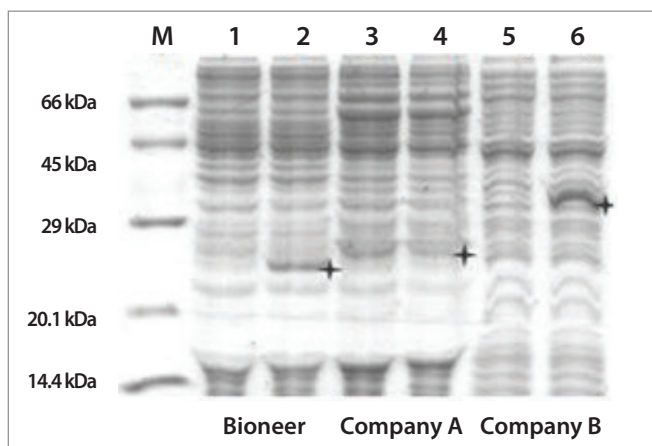
1. *AccuRapid™* Cell-Free Protein Expression Kit를 이용한 단백질 발현

Figure 1. Protein expression data of *AccuRapid™* Cell-Free Protein Expression Kit.

Lane M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),

Lane 1,3,5; Negative control (No-DNA), Lane 2; CAT (Chloramphenicol acetyl transferase),

Lane 4; GFP (Green fluorescence protein), Lane 6; PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B)



2. 타사 kit와의 성능비교

Figure 2. Comparison of protein expression between *AccuRapid™* Cell-Free Protein Expression Kit and protein expression kits from other companies.

Lane M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low), Lane 1,3,5 ; Negative control (No-DNA),

Lane 2; Bioneer's kit and control DNA, Lane 4; Company A's kit and control DNA,

Lane 6; Company B's kit and control DNA

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7400	ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1차 primer F/R sets (N terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1차 primer F/R sets (C terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
k-7250	AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-2030-4	MyGenie™ 32 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

● ExiSpin™

Voltex와 Spin down을 한번에

ExiSpin™은 실험 과정 중 반복되는 vortex 와 spin-down 과정을 결합한 자동화 장비로서 Centrifuge와 vortex 기능을 사용자가 기기 자체의 program을 이용하여 자동으로 반복 수행할 수 있는 장비입니다. ExiSpin™을 통해 PCR을 비롯한 분자 생물학 연구에 있어서 실험시간을 획기적으로 단축할 수 있습니다. 특히 8-tube strip 4 개를 동시에 처리할 수 있어 AccuPower® Kit 사용 시 신속하며 재현성이 있게 반응물을 혼합할 수 있습니다. 임상 분자 진단 검사분야, 생화학, 분자생물학 등 microtube를 사용하는 모든 분야의 연구에서 필수적인 장비입니다.



¹ Oligo synthesis service 문의

3.4. Template DNA 농도 최적화

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



ExiProgen™ EC series를 이용하여 단백질을 합성할 때, template DNA의 양에 따라서 단백질 합성량에 차이가 있을 수 있습니다. 먼저 AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit를 사용하여 template DNA 농도에 따른 단백질의 최대 발현조건을 스크리닝합니다. 이 결과를 바탕으로 선정된 template DNA 농도를 반영하여 ExiProgen™ EC series로 단백질을 합성하면, 최대한 많은 양의 단백질을 얻을 수 있습니다.

■ 실험 방법

Step I ; AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit를 이용한 template DNA 농도 스크리닝

1. Template DNA를 각 농도별로 준비 – 25, 50, 100, 200, 300, 400 (ng/μl)
2. kit의 사용설명서에 따라서 단백질 발현 실험 진행
 - ① Reaction mixture 준비
 - Reaction volume; 45 μl
 - Sample DNA; 1번에서 준비한 DNA를 각 2 μl씩 첨가
→ Final DNA의 양: 50, 100, 200, 400, 600, 800 ng
 - ② 반응물을 30℃에서 3시간 반응 (PCR machine 이용) 후, SDS-PAGE gel을 통해서 최적 발현 농도 확인

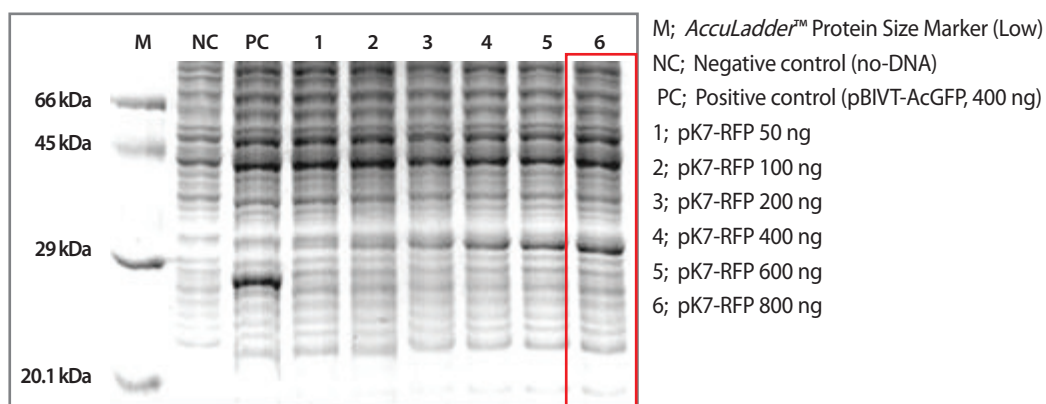
Step II; ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit series를 이용한 단백질 합성

K-7300, K-7301, K-7302 <i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit – 발현시료 부피; 750 μl – DNA 사용량; Step I에서 확인된 최적 발현량을 보이는 template DNA 농도의 16.7배 사용 – kit 사용설명서에 따라서 셋팅한 후, <i>ExiProgen™</i> 902번 프로토콜로 단백질 합성	K-7310 <i>ExiProgen™</i> EC-Maxi Protein Synthesis Kit – 발현시료 부피 ; 450 μl – DNA 사용량 ; Step I에서 확인된 최적 발현량을 보이는 template DNA 농도의 10배 사용 – kit 사용설명서에 따라서 셋팅한 후, <i>ExiProgen™</i> 903번 프로토콜로 단백질 합성	K-7320 <i>ExiProgen™</i> EC-Tagfree Protein Synthesis Kit – 발현시료 부피 ; 450 μl – DNA 사용량 ; Step I에서 확인된 최적 발현량을 보이는 template DNA 농도의 10배 사용 – kit 사용설명서에 따라서 셋팅한 후, <i>ExiProgen™</i> 904번 프로토콜로 단백질 합성
---	--	---

■ 실험 결과

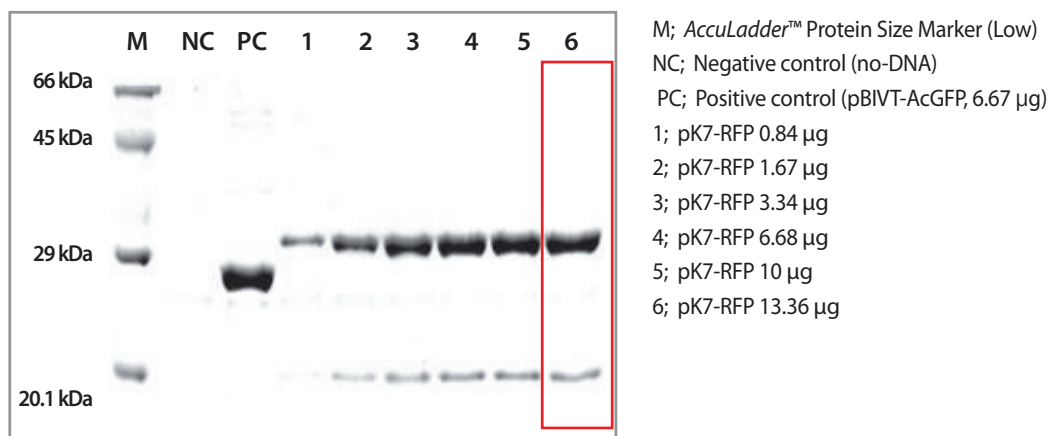
1. *AccuRapid™* Cell-Free Protein Expression Kit를 이용한 DNA 농도 스크리닝

- sample; pK7-RFP
- Reaction volume; 45 μ l
- Reaction condition; 30°C, 3 hr
- Sampling; 총 20 μ l (시료 5 μ l + D.W. 10 μ l + 4x loading dye 5 μ l) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 5 μ l/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)
- 결과



2. *ExiProgen™* EC Protein Synthesis Kit를 이용한 단백질 합성

- sample; pK7-RFP
- Reaction volume; 750 μ l 정제 후 최종 250 μ l 회수
- Sampling; 총 20 μ l (시료 15 μ l + 4x loading dye 5 μ l) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 μ l/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)
- 결과



■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7400	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1× primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1× primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	<i>AccuPower® ProFi Taq</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	<i>AccuPrep®</i> PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	<i>AccuPrep®</i> Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	<i>AccuPrep®</i> Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
k-7250	<i>AccuRapid™</i> Cell-Free Protein Expression Kit
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-2030-4	<i>MyGenie™</i> 32 Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i> , Instrument
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

¹ Oligo synthesis service 문의

3.5. Effect of template DNA purity on protein synthesis

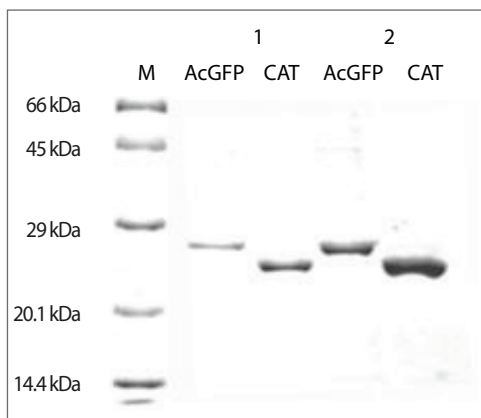
무세포 단백질 발현 방법을 이용하여 단백질을 합성할 때, template DNA의 순도에 따라서 합성량에 차이가 있을 수 있습니다. 따라서 DNA를 준비하실 때, 높은 순도($A_{260}/280$ 값이 1.8 이상, $A_{260}/230$ 값이 1.5 이상)로 준비하는 것을 권장합니다.

■ 실험 결과

Template DNA는 *ExiProgen™ ProXpress* PCR Template Kit 를 이용하여 제작하였으며, 제작한 시료를 *ExiProgen™ EC* Protein Synthesis Kit 로 단백질을 합성한 결과, 최종 시료의 순도에 따라 단백질 합성량에 차이가 있는 것을 확인할 수 있습니다.

	Sample 이름	$A_{260}/280$	$A_{260}/230$
1	AcGFP	1.82	0.28
	CAT	1.76	0.95
2	AcGFP	1.87	1.62
	CAT	1.87	1.51

- Template DNA; Each PCR product 500 ng
- kit; *ExiProgen™ EC* Protein Synthesis Kit (Cat. no. K-7300)
- Protocol no.; 902
- Sampling; 총 20 μ l (시료 15 μ l + 4x loading dye 5 μ l) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 μ l/well 로딩 (10 x 8 (cm²), 10 wells)
- 결과



M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low)
1; Sample group 1
2; Sample group 2

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7400	ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1차 primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1차 primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	ExiProgen™, Instrument
A-2030-4	MyGenie™ 32 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

● AccuLadder™ Protein Size Marker (Low)

Protein Size Marker의 표준

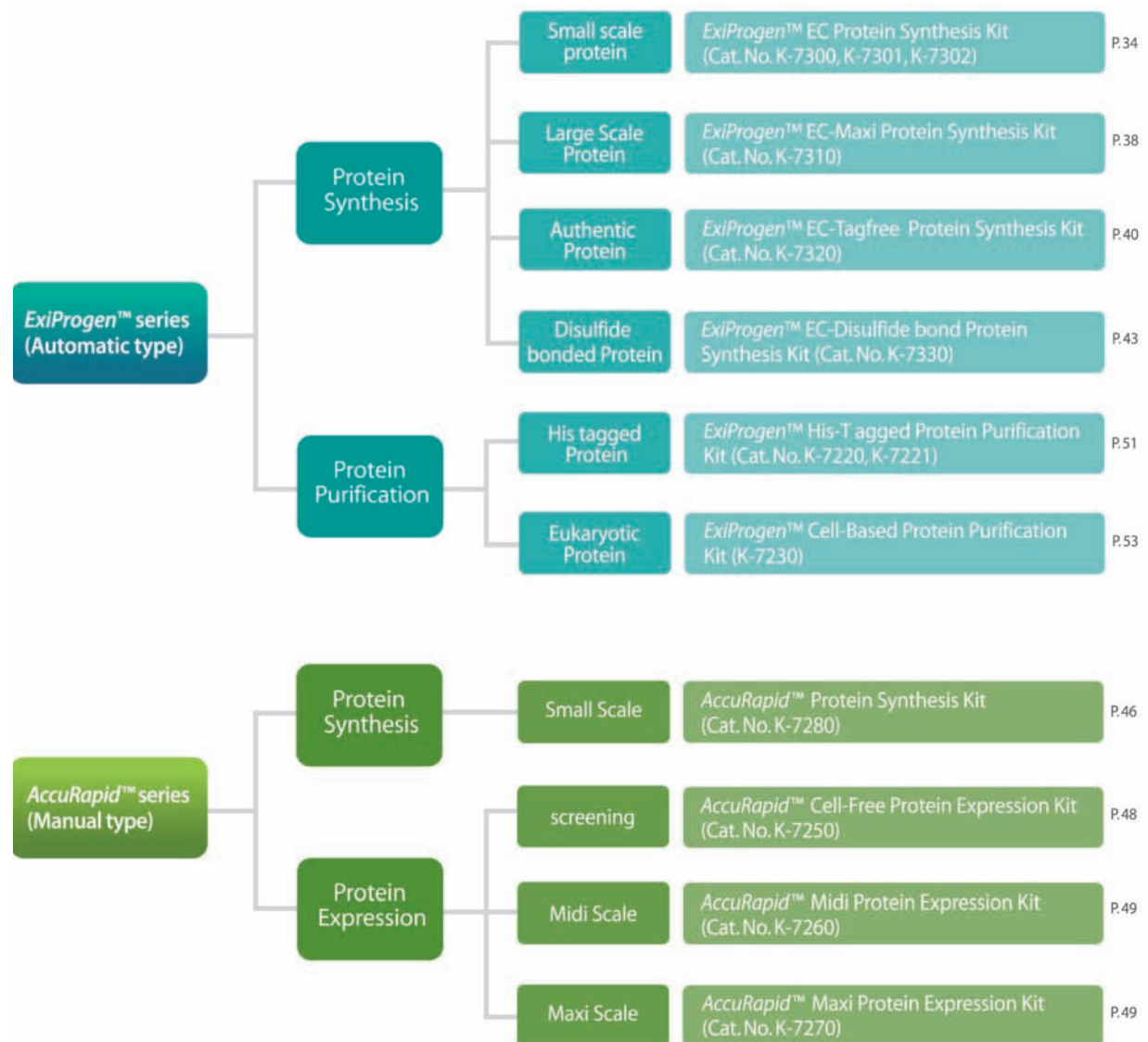
AccuLadder™ Protein Size Marker (Low)는 고순도의 6가지 단백질로 구성되어 있어서 Coomassie Blue staining 뿐만 아니라, Silver staining도 적용 가능 합니다. AccuLadder™ Protein Size Marker (Low)에는 loading buffer가 pre-mix 되어 있어 샘플과 같이 boiling 후 곧바로 사용 가능합니다.

Protein	MW (kDa)	Source
Albumin	66	Bovine serum
Ovalbumin	45	Chicken egg white
Carbonic anhydrase	29	Bovine erythrocytes
Trypsin inhibitor	20.1	Soybean
Lysozyme	14.4	Chicken egg white
Aprotinin	6.5	Bovine lung

¹ Oligo synthesis service 문의

4. Protein Expression & Purification

당사의 단백질 발현 및 합성 키트는 2가지 제품 군으로 나누어집니다. Manual 방식으로 손쉽게 재조합 단백질 발현 및 정제할 수 있는 *AccuRapid™* series 및 *ExiProgen™* 을 이용하여 전자동으로 단백질을 발현하고 정제할 수 있는 *ExiProgen™* series 로 나누어집니다. 해당 kit를 이용하여 최소 µg단위부터 최대 mg단위까지 단백질의 합성이 가능하며, 제품 군은 아래와 같이 분류됩니다(Template DNA 제조와 관련된 내용은 P.16 에서 확인할 수 있습니다).



4.1. ExiProgen™ kits for protein synthesis (expression & purification)

4.1.1. 한번에 다종의 단백질들의 합성여부를 보려고 할 때

ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit (Cat.no.K-7300~02)



본 kit는 ExiProgen™ 장비에서 단백질을 합성할 수 있는 kit입니다. template DNA를 첨가한 kit를 ExiProgen™에 장착한 후, Protocol no. 902 (약 6시간)를 가동시키면 전자동으로 단백질을 발현하고 발현된 목적단백질을 His-tag를 이용하여 정제합니다. 1회 반응으로 최대 16종의 서로 다른 단백질을 고순도로 얻을 수 있으며, 실험 환경에 따라서 상이한 결과를 얻을 가능성이 있는 Manual 방법과는 달리 재현성 높은 결과를 얻을 수 있습니다.

■ 특징 및 장점

Fully Automatic: DNA-in-Protein-out

1~10 µg DNA를 kit와 함께 ExiProgen™에 장착한 후 가동시키면 전자동으로 약 6시간 이내에 고순도의 단백질을 얻을 수 있습니다.

High Performance

본 kit는 기존의 cloning으로 생산이 불가능한 세포 독성을 갖는 단백질의 합성도 가능합니다.

High Purity and High Yield

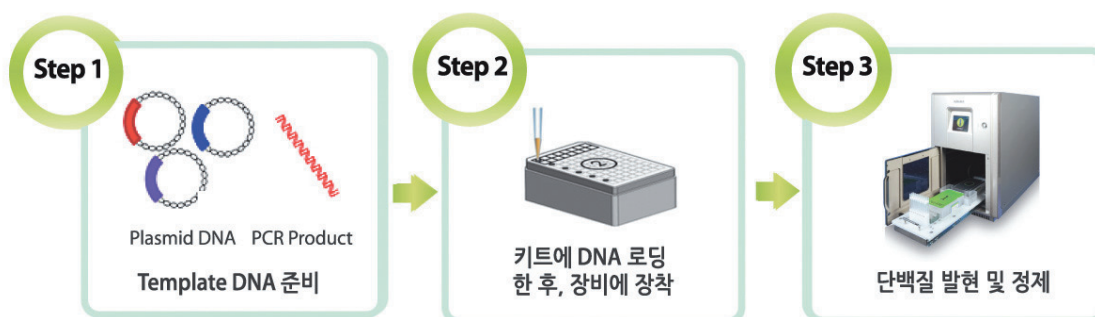
각각의 반응 well 당 순도 90% 이상의 단백질을 100 µg 내외로 얻을 수 있습니다.

Reproducibility

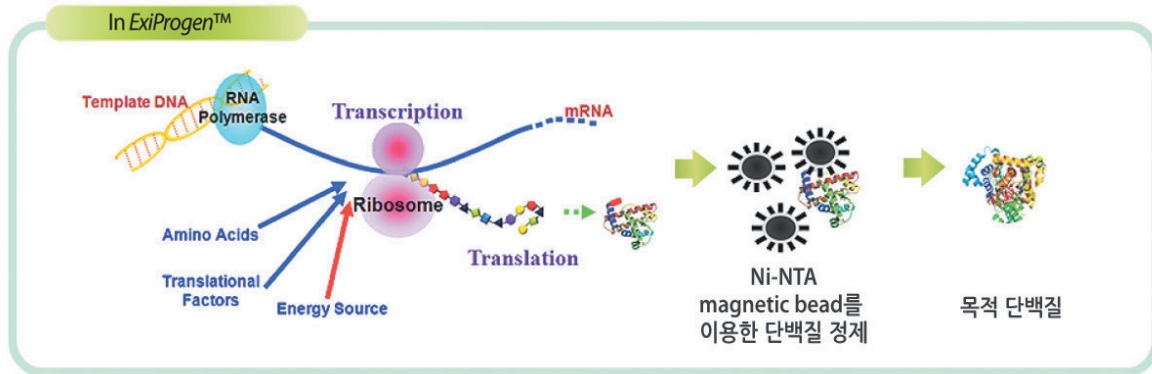
Template DNA만 첨가하면 원하는 단백질을 손쉽게 얻을 수 있어 재현성이 높습니다.

■ 실험 방법 및 원리

본 kit를 이용한 실험방법은 다음과 같습니다. 미리 준비한 발현벡터 또는 PCR product를 kit의 Cartridge ②에 첨가하고, ExiProgen™ 장비에 장착한 후, 장비를 가동시킵니다.



ExiProgen™은 전자동으로 30℃, 3시간 동안 단백질을 발현시킨 후, Ni-affinity를 이용하여 목적 단백질을 정제하며, 그 원리는 아래의 그림과 같습니다.



모든 반응이 끝난 후, 목적단백질은 최종적으로 정제버퍼에 용해된 상태로 회수할 수 있으며, 반응이 끝난 시료는 SDS-PAGE gel에서 확인할 수 있습니다.

■ 실험 결과

- 본 kit는 형광단백질을 발현할 수 있는 DNA를 control로 제공하며, kit로 합성된 형광 단백질은 아래와 같이 육안으로 확인이 가능합니다.

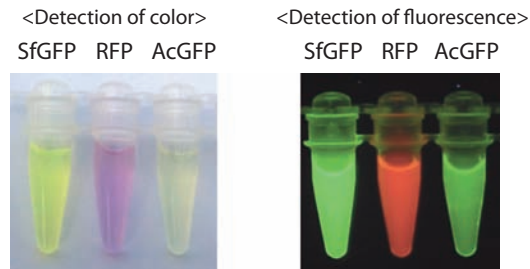


Figure1. Detection of fluorescence emitted from fluorescent proteins synthesized with ExiProgen™.

This result indicates that these synthesized SfGFP, RFP, and AcGFP are functionally active.

Left panel: Color of each protein elution samples detected with naked eyes

Right panel: Fluorescence from protein elution samples detected with UV illuminator

- 동시에 16개의 반응을 진행할 수 있으며, 반응 well 사이의 편차가 없습니다.

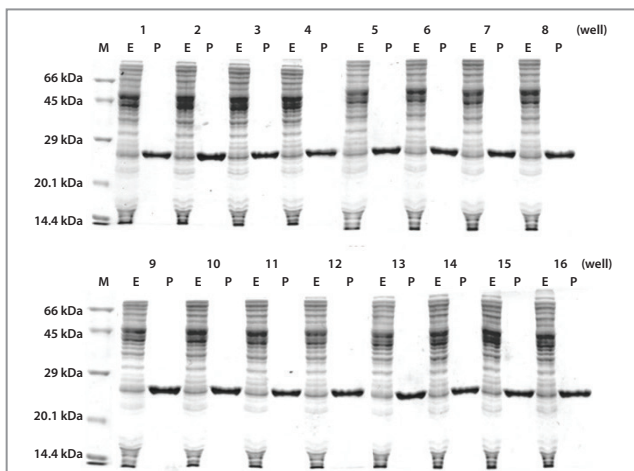


Figure2. Expression and purification of the CAT enzyme. Reproducibility is seen in all 16 wells with no detectable variation between wells.

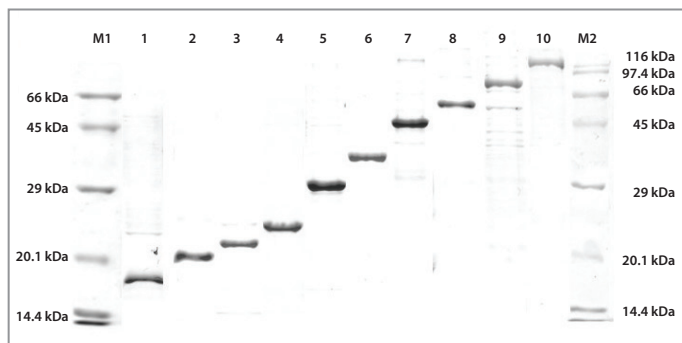
Lane 1~16: Number of the well, M: **AccuLadder™ Protein Size Marker (Low)**,

E: Expression sample, P: Purification sample

3. 다양한 크기의 단백질을 동시에 합성 할 수 있습니다.

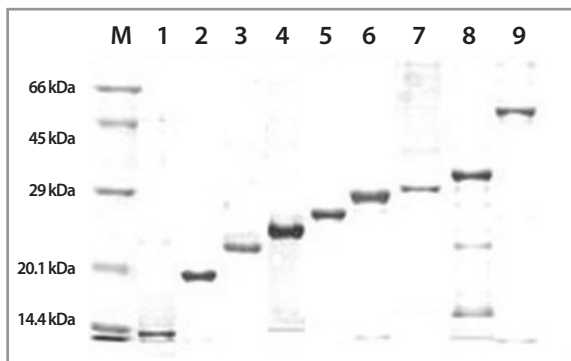
(Plasmid DNA - 10~120 kDa, PCR product - 10~60 kDa 합성 가능)

< Template DNA; plasmid DNA >



M1; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low)
1; CalmL3 (17.5 kDa), 2; RNase H (20 kDa), 3; DUSP 3 (22 kDa), 4; CAT (24 kDa), 5; AcGFP (29 kDa), 6; EF-Ts (34 kDa), 7; VF (45 kDa), 8; Poly A polymerase (50 kDa), 9; MMLV RTase (75 kDa), 10; BM3 (117 kDa)
M2; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Broad)

< Template DNA; PCR product >



M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),
1; SAV (13 kDa), 2; RNase H (20 kDa), 3; hGH (23 kDa),
4; CAT (26.5 kDa), 5; UDG (28 kDa), 6; AcGFP (28 kDa),
7; EVO (30 kDa), 8; RFP (31 kDa), 9; Poly A polymerase (54 kDa)

Figure 3. SDS-PAGE data of various proteins synthesized from various templates (Plasmid & PCR products).

Up to 16 types of proteins can be expressed and purified simultaneously with an average of over 90% purity.

Amount of loading sample is 1/35 of total sample.

4. 본 kit로 합성한 단백질들은 활성을 나타냅니다.

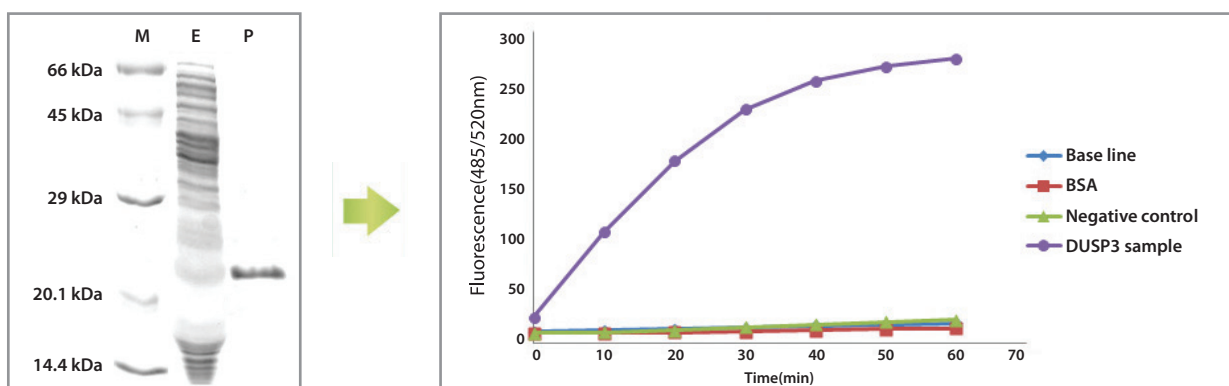


Figure 4. SDS-PAGE & enzyme activity data of DUSP3

Left panel: Expression and purification of DUSP3 (protein tyrosine phosphatase).

M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low), E: Expression sample, P: Purification sample

Right panel: DUSP3 synthesized with *ExiProgen™* has an enzyme activity.

DUSP3 phosphatase activity was measured by incubating with 500 μ M 3-O-methylfluorescein phosphate (OMFP).

(Reaction buffer: 100 mM Tris-HCl (pH8.2), 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 20% Glycerol)

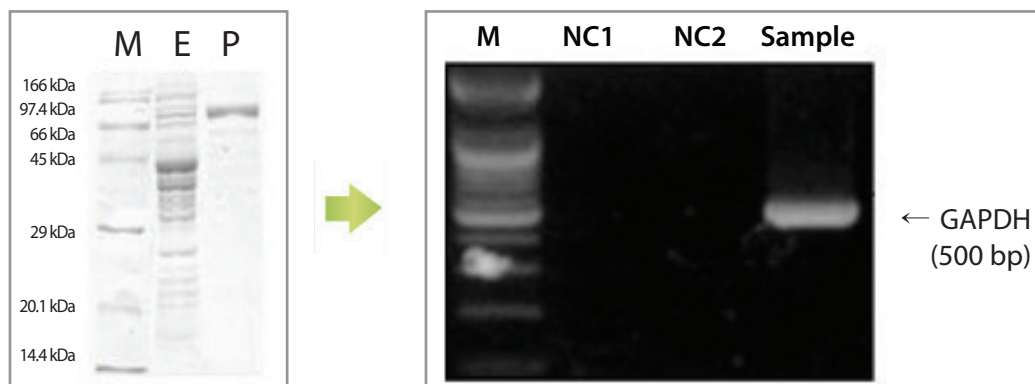


Figure 5. SDS-PAGE & enzyme activity data of MMLV RTase.

Left panel: Expression and purification of MMLV RTase.

M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Broad), E: Expression sample, P: Purification sample

Light panel: Amplification of GAPDH of Human total RNA with MMLV RTase was synthesized with *ExiProgen™*.

Lane M: 100 bp DNA Ladder, Lane NC1: Negative control 1 (No-RNA),

Lane NC2: Negative control 2 (No-enzyme), Lane Sample: 10 ng Human total RNA from HeLa cell

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7400	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1 $\times$ primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1 $\times$ primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	<i>AccuPower® ProFi Taq</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 μ l reaction/tube
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 μ l (135 ng/ μ l)
K-3034-1	<i>AccuPrep®</i> PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	<i>AccuPrep®</i> Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
k-7300	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 μ l
A-5041	<i>ExiProgen™</i> , Instrument
A-2030-4	<i>MyGenie™</i> 32 Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i> , Instrument
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

¹ Oligo synthesis service 문의

4.1.2. 1mg이상의 단백질을 손쉽게 얻고 싶을 때

ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit (Cat. no. K-7310)



본 kit는 당사의 특허기술인 ExiProgen™ 장비의 SECF(Stepwise Exchange Cell-Free) 단백질 합성법을 이용하여 전자동으로 많은 양의 단백질을 합성할 수 있는 kit입니다. template DNA 를 첨가한 kit를 ExiProgen™ 에 장착한 후, Protocol No. 903(약 25시간) 을 가동시키면 하루 만에 순도 90% 이상의 단백질을 최대 500 µg 합성할 수 있습니다. 또한 단백질 발현/정제 및 투석까지 모든 반응이 전자동으로 이루어지며, 최종 목적 단백질은 원하는 storage buffer에 용해된 상태로 회수할 수 있습니다.

■ 특징 및 장점

Fully Automatic: DNA-in-Protein (in storage buffer)-out

1~6 µg DNA를 kit와 함께 ExiProgen™ 에 장착한 후 가동시키면 전자동으로 단백질을 합성하고, 목적 단백질 정제 용액을 투석버퍼로 치환한 상태로 회수할 수 있습니다.

Parallel Processing

본 kit는 1~8종의 단백질을 동시에 합성할 수 있습니다.

High Purity and High Yield

각각의 반응 well 당 순도 90% 이상의 단백질을 최대 500 µg까지 얻을 수 있습니다.

■ 실험 방법 및 원리

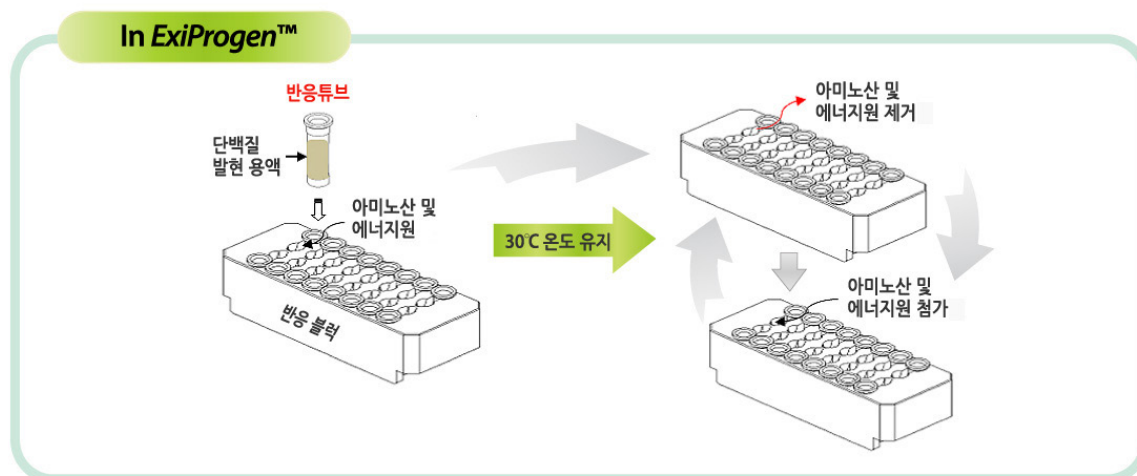
본 kit는 당사의 SECF 단백질 발현법을 이용하여 단백질을 발현하고, 발현된 단백질을 Ni-NTA magnetic bead를 이용하여 정제하는 kit입니다. SECF 단백질 발현법은 단백질 발현에 필요한 에너지원 등을 단계적으로 공급해주어 단백질 발현효율을 극대화 시킨 kit이며, 실험개요는 아래와 같습니다



상기와 같이 Template DNA를 kit에서 제공하는 E. coli extract와 Master mix와 함께 섞은 후, 이 반응용액을 반응튜브에 첨가하시기 바랍니다. 그 후 반응튜브를 ExiProgen™ 의 반응블록에 삽입한 후, 나머지 kit를 장착하고 장비를 가동시키면 됩니다.

그 후, ExiProgen™ 은 아래와 같은 방식으로 단백질 발현에 필요한 아미노산과 에너지를 단계적으로 공급하면서 단백질을 발현시키고, ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit의 정제방법과 동일한 방식으로 Ni-affinity를 이용하여 목적단백질을 정제하게 됩니다.

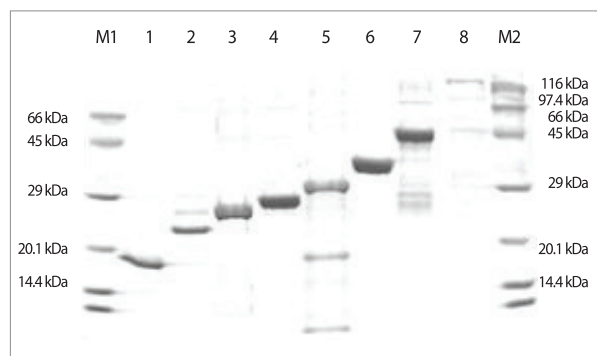
Note) Template DNA로 ExiProgen™ ProXpress PCR template Kit를 이용하여 제작한 PCR product를 사용하는 경우, ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit에 비해 합성량이 크게 증가되지 않기 때문에, 본 kit를 사용하실 때에는 T7 expression vector plasmid (pBIVT, pK7, pIVEX, pET 등)에 목적 단백질 유전자를 삽입한 plasmid DNA를 template DNA로 사용하실 것을 권장합니다.



Note) Template DNA로 ExiProgen™ ProXpress PCR template Kit를 이용하여 제작한 PCR product를 사용하는 경우, ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit에 비해 합성량이 크게 증가되지 않기 때문에, 본 kit를 사용하실 때에는 T7 expression vector plasmid (pBIVT, pK7, pIVEX, pET 등)에 목적 단백질 유전자를 삽입한 plasmid DNA를 template DNA로 사용하실 것을 권장합니다.

■ 실험 결과

1. 다양한 크기의 단백질을 동시에 합성 할 수 있으며, 각 단백질 당 최대 500 µg까지 합성이 가능합니다.



M1; AccuLadder™ Protein Size Marker (Low)

1; CalmL3 (17.5 kDa), 2; DUSP 3 (22 kDa),
3; CAT (24 kDa), 4; AcGFP (29 kDa),
5; RFP(30 kDa), 6; EF-Ts (34 kDa),
7; VF (45 kDa), 8; BM3 (117 kDa)

M2; AccuLadder™ Protein Size Marker (Broad)

Figure 1. Expression and purification of various proteins.

Proteins can be expressed and purified simultaneously with an average of over 90% purity. Amount of loading sample is 1/80 of total sample.

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7310	ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
K-7250	AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	ExiProgen™, Instrument

4.1.3. Histidine Tag이 제거된 단백질을 얻고자 할 때

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



본 kit는 당사의 ExiProgen™ 장비를 이용하여 원형 그대로의 단백질을 전자동으로 합성할 수 있는 kit입니다. 목적단백질을 His-tag이 있는 상태로 발현시킨 후, 이를 제거하여 고순도의 단백질을 얻을 수 있는 kit입니다. Template DNA를 첨가한 kit를 ExiProgen™에 장착한 후, Protocol no. 904 (약 25시간)를 가동시키면 하루 만에 순도 95% 이상의 목적 단백질을 얻을 수 있으며, 최종 목적 단백질은 storage buffer에 용해된 상태로 회수할 수 있습니다.

■ 특징 및 장점

Protein Synthesis without His-tag

Template DNA를 kit와 함께 ExiProgen™에 장착한 후 가동시키면 전자동으로 단백질을 발현되고, 발현된 목적단백질은Protease의 처리에 의해서 His-tag이 제거된 상태로 회수됩니다.

Fully Automatic: DNA-in-Protein (in storage buffer)-out

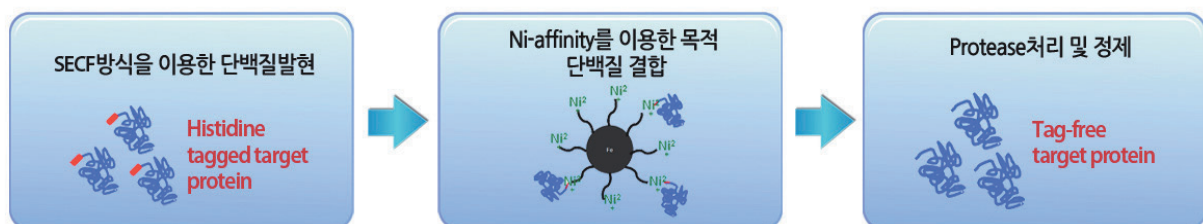
목적 단백질은 투석버퍼에 용해된 상태로 회수됩니다.

Parallel Processing and High Purity

본 kit는 1~8종의 단백질을 동시에 합성할 수 있으며, 순도 95% 이상의 단백질을 얻을 수 있습니다.

■ 실험 방법 및 원리

본 kit는 당사의 ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit와 같이 SECF 법으로 단백질을 발현시키고, 발현된 단백질을 Ni-NTA magnetic bead와 결합시킨 후, kit에 포함되어 있는 특정 아미노산 서열을 인식하여 자르는 TEV (Tobacco Etch Virus) protease를 처리하여 순수한 목적 단백질을 정제할 수 있는 kit로, 실험방법과 원리는 아래와 같습니다.



■ Template DNA 구조

본 kit로 단백질을 발현하기 위해서 template DNA는 아래와 같은 구조로 되어 있어야 합니다.



즉, 5 – 말단에 6x His-tag과 TEV site의 서열을 서열을 가지고 있어야 하며, 이 때, TEV site의 아미노산 서열은 다음과 같습니다.



↑
TEV에 의해서 잘리는 위치

이 서열을 기반으로 합성된 단백질은 정제과정을 마친 후, 최종적으로 목적 단백질 앞에 Glycine (또는 Serine) 아미노산 한 개만을 추가로 가지게 됩니다. X의 위치에는 20개의 아미노산 중 어느 것이나 사용가능하며, Positive control로 제공되는 DNA의 서열은 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly를 암호화 하고 있습니다.

Note) 단, 목적단백질의 N-terminal에 다른 아미노산이 있을 때 발현이 저해되거나, 용해도가 낮아지는 단백질에는 사용이 불가능할 수도 있습니다. 따라서 본 kit를 사용하기 전에 *AccuRapid™* Cell-Free Protein Expression Kit (26 page 참조)를 이용하여 template DNA의 발현 여부를 확인 하시기를 권장합니다.

■ 실험 결과

1. 다양한 크기의 단백질을 동시에 합성 할 수 있으며, 각 단백질 당 200 µg 내외로 합성이 가능합니다.

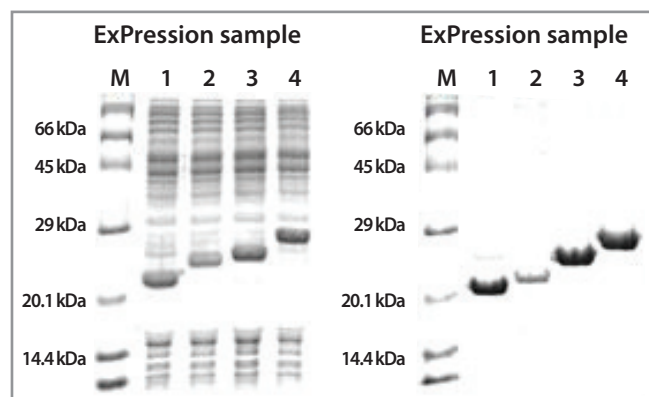


Figure 1. Expression and purification of various proteins.

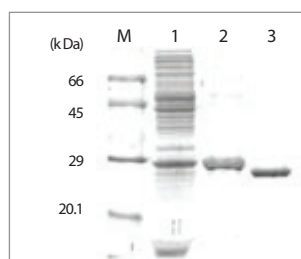
M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low) (Bioneer, D-2020),

1; DUSP3 (22 kDa), 2; hGH (23 kDa), 3; AcGFP (28 kDa),

Note) DUSP3: Dual specificity protein phosphatase 3, hGH: Human growth hormone

2. 본 kit로 발현, 정제된 단백질의 최종 형태는 His-tag이 없는 목적 단백질 입니다.

1. SDS-PAGE Gel Data



2. Western Blot Data



Figure 2. Data of SDS-PAGE and Western blot with His-tag antibody

M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),

1: Expression sample of pBIVT-TEV-AcGFP

2: His-tag-TEV-AcGFP (His tagged sample), 3: AcGFP (His tag-free sample)

■ Application

본 kit는 목적단백질을 His-tag이 없는 상태로 고순도로 합성할 수 있으므로, 단백질의 구조분석이나, 단백질 의약품개발, 항원단백질 합성에 응용될 수 있습니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7320	ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7400	ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1쌍 primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1쌍 primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	ExiProgen™, Instrument
A-2030-4	MyGenie™ 32 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

¹ Oligo synthesis service 문의

4.1.4 Disulfide bond가 있는 목적 단백질을 얻고자 할 때

ExiProgen™ EC-Disulfide Protein Synthesis Kit (Cat.no.K-7330)



본 kit는 당사의 ExiProgen™ 장비를 이용하여 이황화결합(disulfide bond) 을 가지고 있는 목적단백질을 전자동으로 합성할 수 있는 kit입니다. Template DNA를 첨가한 kit를 ExiProgen™에 장착한 후, Protocol no. 905 (약 36시간)를 가동시키면 단백질 발현/정제 및 투석까지 모든 반응이 하루 만에 전자동으로 이루어지며, 최종 목적 단백질은 storage buffer에 용해된 상태로 회수할 수 있습니다

■ 특징 및 장점

Protein Synthesis with Disulfide Bond

본 kit는 이황화결합 (1~9개)을 가지고 있는 단백질을 합성하는 데 사용되며, 합성된 단백질은 고유의 활성을 나타냅니다.

Fully Automatic: DNA-in-Protein (in storage buffer)-out

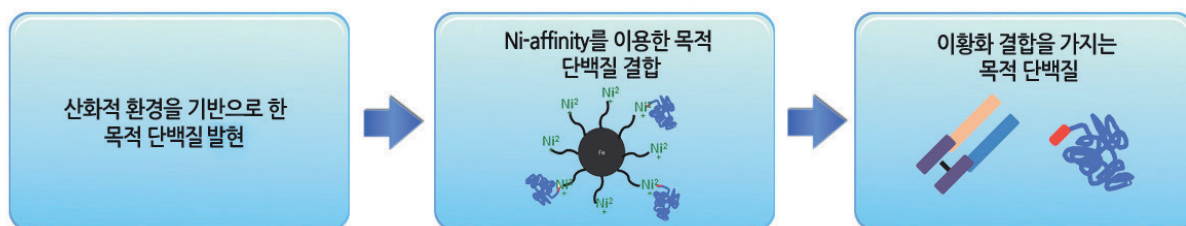
목적 단백질은 투석버퍼에 용해된 상태로 회수됩니다.

Parallel Processing System

본 kit는 1~8종의 단백질을 동시에 합성할 수 있습니다.

■ 실험 방법 및 원리

본 kit는 단백질 발현시 에너지원 등을 지속적으로 공급해 주는 SECF(Stepwise Exchange Cell-Free) 방법을 사용하여 단백질을 발현 시키며, 발현된 단백질을 Ni-NTA magnetic bead를 이용하여 정제하는 kit입니다. 또한 본 kit는 단백질 발현시 최적의 단백질 folding을 돕기 위한 샤페론 단백질이 첨가되어 있고 이황화결합을 갖는 단백질을 합성할 수 있도록 최적의 조성으로 구성되어 있습니다.



■ 실험 결과

1. 본 kit로 이황화결합을 갖는 단백질을 합성할 수 있으며, 합성된 단백질은 고유의 활성을 나타냅니다.

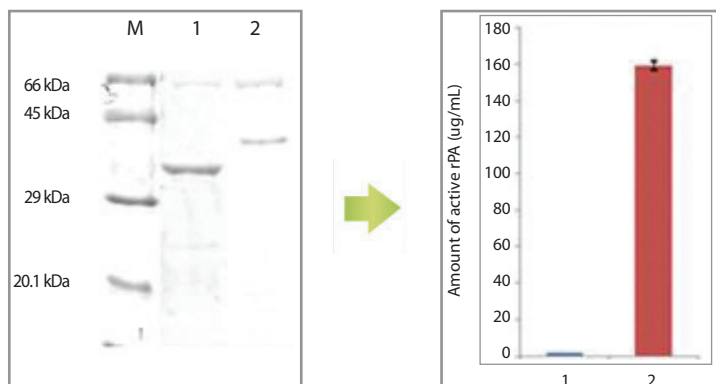


Figure 1. SDS-PAGE & enzyme activity data

Left Pannel: Expression and purification of ScFV and rPA.

M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low), 1: ScFV (it has 2 disulfide bonds.), 2: rPA (it has 9 disulfide bonds)

* Amount of purification sample is 1/40 of total sample

Right panel: rPA synthesized has an enzyme activity.

1: Synthesis sample using *ExiProgen™* EC-Maxi Protein Synthesis Kit

2: Synthesis sample using *ExiProgen™* EC-Disulfide Protein Synthesis Kit

* rPA activity was measured by incubating with chromogenic substrate S-2288

■ Application

본 kit는 pharmaceutical protein, ScFv 합성 및 항체 스크리닝에 응용될 수 있습니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7330	<i>ExiProgen™</i> EC-Disulfide Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7400	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1× primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1× primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	<i>AccuPower® ProFi Taq</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	<i>AccuPrep®</i> PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	<i>AccuPrep®</i> Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	<i>AccuPrep®</i> Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	<i>ExiProgen™</i> , Instrument
A-2030-4	<i>MyGenie™</i> 32 Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i> , Instrument
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

¹ Oligo synthesis service 문의

4.2. AccuRapid™ kits for protein expression

4.2.1. The easy method for protein synthesis !!

AccuRapid™ Protein Synthesis Kit (Cat.no. K-7280)



AccuRapid™ Protein Synthesis Kit는 매뉴얼 방식으로 원하는 단백질의 발현 및 정제여부를 확인할 수 있는 kit입니다. 본 kit는 *E. coli* 무세포 발현 및 Ni-affinity 정제 실험에 사용되는 모든 구성품을 포함하고 있으며, 반응당 정제된 목적 단백질을 100 µg 내외로 회수할 수 있습니다.

■ 특징 및 장점

High Simplicity and High Performance

세포를 이용하지 않고 시험관 튜브 내에서 손쉽게 단백질을 합성 할 수 있으며, 기존의 세포배양 방법으로 발현이 불가능했던 단백질도 합성이 가능합니다.

Flexibility

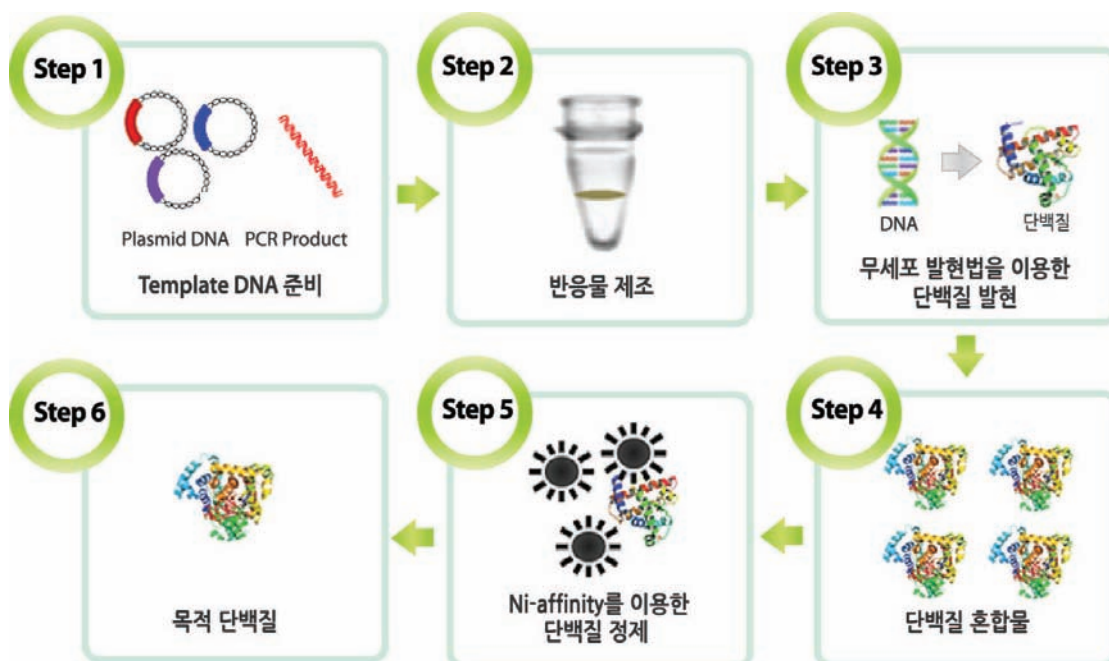
T7 시스템에서 발현이 가능한 다양한 DNA로부터 원하는 단백질의 발현 및 정제 여부를 손쉽게 확인할 수 있습니다.

Compatibility

ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit와 호환이 가능합니다.

■ 실험 방법

본 kit를 이용한 실험방법은 다음과 같습니다. 미리 준비한 발현벡터 또는 PCR product를 키트에서 제공되는 *E. coli* extract와 Master mix와 혼합한 후, 이 반응물을 water bath에 넣고, 30℃에서 단백질을 발현시킵니다. 그 후, 발현이 끝난 시료를 kit에서 제공하는 Ni-NTA magnetic bead와 buffer를 이용하여 목적 단백질을 정제합니다.



일반적으로 SDS-PAGE gel에서 확인할 수 있으며, 만약 확인이 어려운 경우에는 Western blot이나 형광값 측정방법 등을 이용하여 확인하면 됩니다.

■ 실험 결과

AccuRapid™ Protein Synthesis Kit를 이용한 단백질 합성

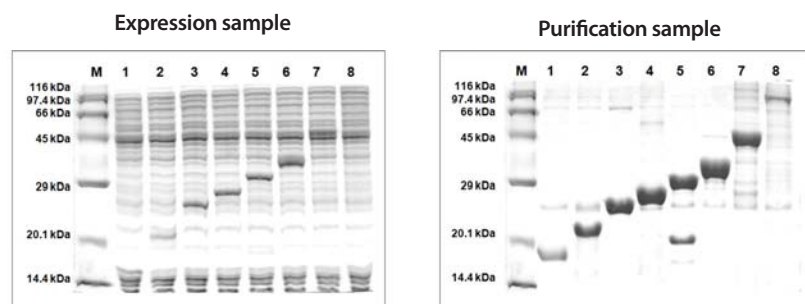


Figure 1. SDS-PAGE data of various proteins synthesized from various templates

M; *AccuLadder™* Protein Size Marker (Broad)

1; CalmL3 (17.5 kDa), 2; DUSP 3 (22 kDa), 3; CAT (24 kDa), 4; AcGFP (29 kDa),

5; ERFP (31 kDa), 6; EF-Ts (34 kDa), 7; VF (45 kDa), 8; BM3 (117 kDa)

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7280	<i>AccuRapid™</i> Protein Synthesis Kit, 5 reactions
K-7400	<i>ExiProgen™</i> ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1차 primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1차 primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	<i>AccuPower®</i> ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 ul reaction/tube
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	<i>AccuPrep®</i> PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	<i>AccuPrep®</i> Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	<i>AccuPrep®</i> Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2010	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Broad), 500 µl
A-2030-4	<i>MyGenie™</i> 32 Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i> , Instrument
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

4.2.1. Screening for protein expression

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



본 kit는 반응튜브 내에서 template DNA를 이용하여 3시간 만에 원하는 단백질의 발현을 확인할 수 있는 kit로서 *E. coli* extract와 Master mix를 포함하고 있습니다. 이 중 *E. coli* extract에는 T7 RNA polymerase, ribosome 등이 포함되어 있고, Master mix는 아미노산, NTPs, 에너지원 등이 포함되어 template DNA만 있으면, 손쉽게 목적 단백질의 발현을 확인할 수 있습니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7250	AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit, 45 µl x 24 reactions
K-7400	ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1차 primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1차 primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-2030-4	MyGenie™ 32 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

¹ Oligo synthesis service 문의

4.2.2. Protein expression with manual kit

AccuRapid™ Midi Protein Expression Kit (Cat. no. K-7260)



본 kit는 당사의 무세포 발현시스템을 이용하여 단백질을 발현할 수 있는 매뉴얼 타입의 kit로, kit에는 무세포 단백질 발현에 필요한 *E. coli* extract와 Master mix가 포함되어 있습니다.

각각의 용액은 총 1 ml x 5 reactions의 단백질 발현용액을 만들 수 있도록 제공되고 있으며, 실험에 따라서 원하시는 반응 용량 (ex) 500 µl 발현 또는 750 µl 발현에 맞게 비율을 조절하여 사용 가능합니다.

Template DNA를 첨가한 반응액을 제조한, 1.5 ml 튜브에 넣어 밀폐하여 30℃ 항온조에서 3시간 동안 유지시켜 주면 단백질이 발현됩니다. 본 kit를 이용하면 300 µl/ml 내외의 단백질이 발현 가능합니다. 만약 단백질의 용해도를 높이하고자 한다면 온도를 낮추어 반응을 진행합니다.

AccuRapid™ Maxi Protein Expression Kit (Cat. no. K-7260)



본 kit는 당사의 무세포 발현시스템을 이용하여 단백질을 발현할 수 있는 매뉴얼 타입의 kit로, kit에는 무세포 단백질 발현에 필요한 *E. coli* extract와 Master mix가 포함되어 있습니다.

각각의 용액은 총 10 ml x 1 reactions의 단백질 발현용액을 만들 수 있도록 제공되고 있으며, 실험에 따라서 원하시는 반응 용량에 맞게 조절하여 사용 가능합니다.

Template DNA를 첨가한 반응액을 제조한 후, 15~50 ml 튜브에 넣어 밀폐하여 30℃ 항온조에서 3시간 동안 유지시켜 주면 단백질이 발현됩니다.

또한 본 kit는 무세포 발현시스템의 CECF(Continuous Exchange Cell-Free) 단백질 합성의 원리를 이용하여 고효율로 단백질을 대량으로 발현할 수 있으며, 이 때에는

추가로 K-7270-1 AccuRapid™ Protein Expression Kit_Feeding buffer를 구매하신 후, 사용하실 수 있습니다.

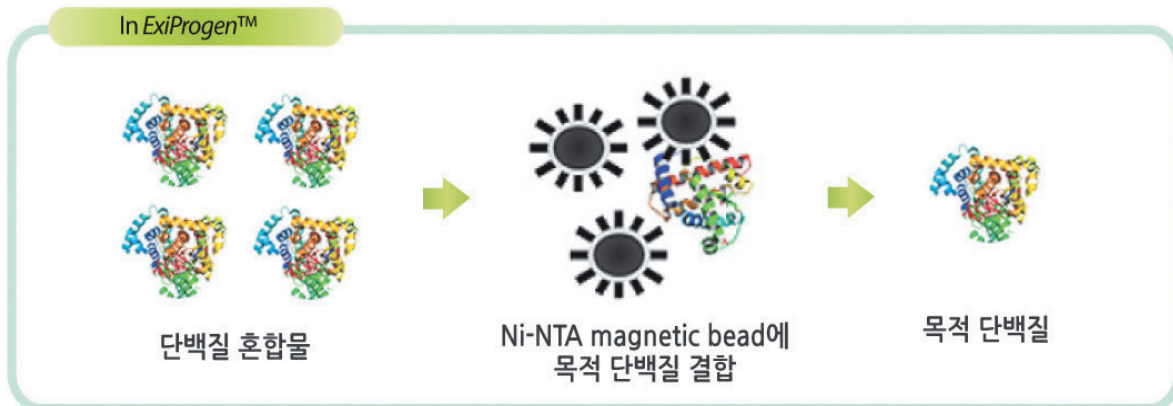
Template DNA를 첨가한 반응액을 투석용 멤브레인에 넣고 반응액이 들어있는 멤브레인을 밀봉하여, 적절한 반응용기에 넣습니다. 그 후, 멤브레인이 잠길 정도로 반응용기를 채운 후, 30℃ 항온 장비 (shaking 가능)에서 16시간 이상 동안 유지시켜 주면 고효율로 목적 단백질이 발현됩니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7260	AccuRapid™ Midi Protein Expression Kit, 1 ml x 5 reactions
K-7270	AccuRapid™ Maxi Protein Expression Kit, 10 ml x 1 reaction
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl

4.3. ExiProgen™ kit for protein purification

ExiProgen™을 이용하여 재조합 단백질이 발현된 *E. coli* 세포 또는 무세포 발현 시료로부터 단백질을 정제할 수 있으며, 그 원리는 아래의 그림과 같습니다. N말단 또는 C말단에 6x His-tag을 가지고 있는 단백질을 발현시킨 시료를 전 처리하여 kit에 넣은 후 장비를 가동시키면, Ni-affinity를 이용하여 전자동으로 목적 단백질을 정제할 수 있습니다.



Equilibrium buffer로 평형화된 자성입자에 세포 파쇄액 또는 무세포 발현시료가 첨가되면, 목적단백질의 His-tag이 자성입자 표면의 니켈 이온과 결합하게 됩니다. 그 후, washing buffer를 이용하여 자성입자와 반응용기내의 불순물을 세척하고, imidazole이 포함된 elution buffer를 이용하여 자성입자로부터 목적단백질을 분리합니다.

4.3.1. Cell-free protein의 purification

ExiProgen™ His-Tagged Protein Purification Kit (Cat. no. K-7220, 21)



본 kit는 ExiProgen™을 사용 (protocol no. 901)하여 재조합 단백질이 발현된 *E. coli* 파쇄액 또는 무세포 단백질 발현 시료로부터 His-tag을 가지고 있는 목적 단백질을 고순도로 정제할 수 있는 kit입니다. 본 kit는 ExiProgen™을 사용(protocol no. 901)하여 재조합 단백질이 발현된 *E. coli* 파쇄액 또는 무세포 단백질 발현 시료로부터 His-tag을 가지고 있는 목적 단백질을 고순도로 정제할 수 있는 kit입니다. kit 내에는 Ni-NTA magnetic bead와 정제에 필요한 버퍼가 pre-filled 되어 있는 cartridge가 포함되어 있습니다. Ni-NTA magnetic bead는 당사가 개발한 자성 실리카 입자로 외부에 노출된 니켈 이온이 단백질의 His-tag과 결합할 수 있어, his-tag을 가지고 있는 목적 단백질을 고순도로 정제할 수 있습니다.

■ 특징 및 장점

Availability of Various Sample

본 kit는 *In vivo* (*E. coli* 발현) 또는 *In vitro* (무세포 발현)로 발현된 재조합 단백질의 정제가 가능합니다.

Pre-filled Buffer Cartridge System

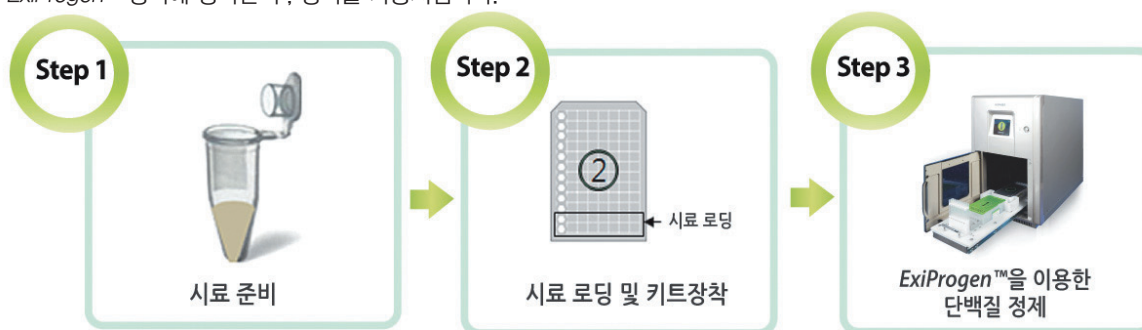
단백질 정제에 필요한 모든 버퍼가 들어있는 pre-filled cartridge가 제공되므로, 세포 파쇄액 또는 무세포 단백질 발현 시료만 준비하면 즉시 사용이 가능합니다.

Parallel Processing and High Purity

본 kit는 1~16종의 단백질을 동시에 정제할 수 있으며, 순도 90% 이상의 단백질을 얻을 수 있습니다.

■ 실험 방법

본 kit를 이용한 실험방법은 다음과 같습니다. 미리 준비한 세포 파쇄액 또는 무세포 발현시료를 kit의 Cartridge ②에 첨가하고, ExiProgen™ 장비에 장착한 후, 장비를 가동시킵니다.



모든 반응이 끝난 후, 목적단백질은 최종적으로 정제버퍼에 용해된 상태로 회수할 수 있으며, 반응이 끝난 시료는 SDS-PAGE gel에서 확인할 수 있습니다.

■ 실험 결과

1. 목적 단백질 발현 세포 준비

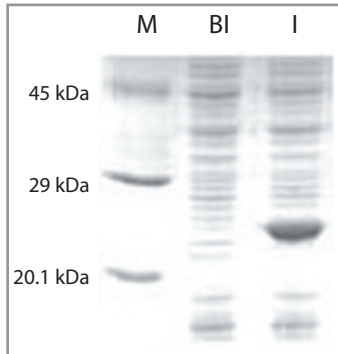


Figure 1. Recombinant *E. coli* cell with expressed of DUSP3.

M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),
BI; Pre-induction sample
I; Post-Induction sample

2. *ExiProgen™* 을 이용한 단백질 정제

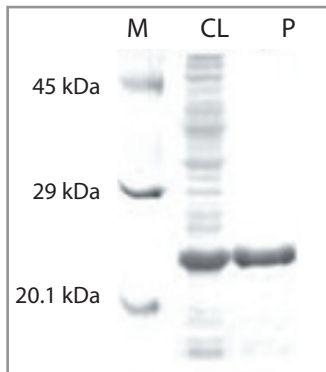


Figure 2. Purification of DUSP3 with *ExiProgen™*.

M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),
CL; Sample of recombinant cell lysate
P; Sample of purification

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7220	<i>ExiProgen™</i> His-Tagged Protein Purification Kit, 16 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 μ l
A-5041	<i>ExiProgen™</i> , Instrument

4.3.2. Modified Protein의 purification

ExiProgen™ Cell-Based Protein Purification Kit (Cat.no.K-7230)



ExiProgen™ Cell-Based Protein Purification Kit 는 ExiProgen™을 사용 (protocol no. 906, 약 7시간)하여 eukaryotic cell에서 발현된 목적 단백질을 고순도로 정제할 수 있는 kit입니다. 본 kit에는 Cell lysis buffer, Ni-NTA magnetic bead, 정제 및 투석 버퍼 등이 포함되어 있어, 목적 단백질이 포함된 세포 추출물 또는 세포 배양액을 첨가하면 전자동으로 목적 단백질을 고순도로 정제한 후, 단백질 보관용 완충용액에 투석한 상태로 회수할 수 있습니다.

■ 특징 및 장점

Fully Automatic: Cell-in-Protein (in storage buffer)-out

재조합 단백질(his-tagged protein) 발현 시료를 kit에 넣은 후 ExiProgen™에 장착한 후 가동시키면, 투석 버퍼에 용해된 목적 단백질을 회수할 수 있습니다.

Pre-filled Buffer Cartridge System

세포파쇄, 단백질 정제 및 투석에 필요한 모든 버퍼가 들어있는 pre-filled cartridge가 제공되므로, 시료만 준비하면 즉시 사용이 가능합니다.

Parallel Processing and High Purity

본 kit는 1~8종의 단백질을 동시에 정제할 수 있으며, 고순도의 단백질을 얻을 수 있습니다.

■ 실험 방법

본 kit를 이용한 실험방법은 다음과 같습니다. 미리 준비한 세포 파쇄액 또는 세포 배양액을 kit의 Cartridge ②에 첨가하고, ExiProgen™ 장비에 장착한 후, 장비를 가동시키면 됩니다.



모든 반응이 끝난 후, 목적단백질은 최종적으로 투석버퍼에 용해된 상태로 회수할 수 있으며, 반응이 끝난 시료는 SDS-PAGE gel running 또는 Western blot으로 확인할 수 있습니다.

■ 실험 결과

1. 목적 단백질 발현 세포 준비

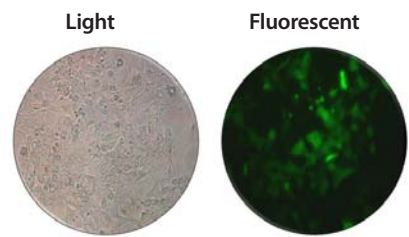


Figure 1. Light and fluorescent microscope images of HEK293 cells.
HEK293 cells were transfected with 2 µg of AcGFP expression plasmid mixed with Lipofectamine 2000 in a 6-well plate. AcGFP expression was assessed under fluorescent microscope 48 hours after later.

2. ExiProgen™ 을 이용한 단백질 정제

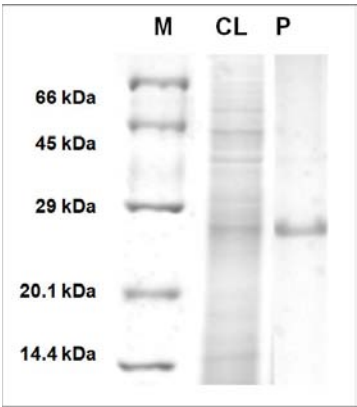


Figure 2. Purification of AcGFP with ExiProgen™.
M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),
CL; Sample of recombinant cell lysate
P; Sample of purification

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7230	<i>ExiProgen™</i> Cell-Based Protein Purification Kit, 16 reactions
C-9027	10% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	<i>ExiProgen™</i> , Instrument

4.4. Level up of protein expression

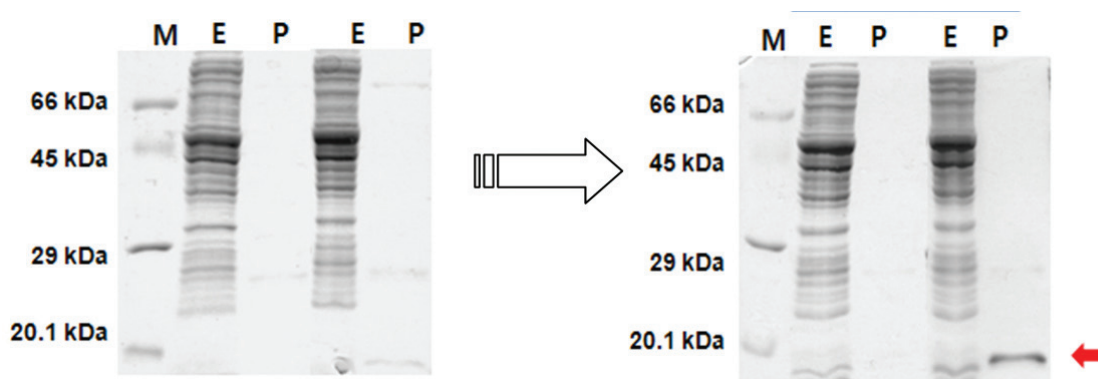
4.4.1. Codon optimization for the maximal expression of the protein

Eukaryotic gene을 무세포 단백질 발현 방법을 이용하여 단백질을 합성할 때에는 서열 특이성 때문에 *E. coli* 에서 발현이 잘 되지 않는 경우가 많습니다. 이러한 경우에는 동일한 유전자에 대해서 *E. coli* codon optimization을 하여 gene 합성한 후, 사용하면 단백질 합성량을 높일 수 있습니다.

■ 실험 결과

Eukaryotic gene 중 하나인 FGF2 (Fibroblast Growth Factor-2) 유전자를 가지고 단백질을 합성한 결과, *E. coli* codon optimized DNA를 사용한 경우 단백질 합성량이 크게 증가하는 것이 확인할 수 있습니다.

- Template DNA; pBIVT-FGF2, pBIVT-FGF2_opti.
- kit; ExiProgen™ EC Protein Synthesis kit (Cat. no. K-7300)
- Protocol No.; 902
- Sampling; 총 20 μ l (시료 15 μ l + 4x loading dye 5 μ l) 제조 후, 95°C, 5min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 μ l/well 로딩 (10 x 8 (cm²), 10 wells)
- 결과



M; AccuLadder™ Protein Size Marker (Low)

Negative; Negative control (No-DNA), FGF2; pBIVT-FGF2 (Original sequences)

FGF2_opti.; pBIVT-FGF2_opti. (*E. coli* codon optimized sequences)

E; Expression sample, P; Purification sample

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7300	ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
K-7310	ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7320	ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7330	ExiProgen™ EC-Disulfide Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7350	pBIVT vectors set-1 ¹
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 μ l

¹ Gene synthesis service 문의

4.4.2. Batch expression vs Continuous expression

무세포 단백질 발현시, 에너지원이 한정되어 있는 경우에는 단백질 발현량이 제한적일 수 있습니다. 따라서 투석막을 이용하여 에너지원을 지속적으로 공급하는 경우에는 단백질 발현량이 증가될 수 있습니다.

■ 실험 결과

본 실험에서 세포배양 방법으로 합성이 어려운 Poly A polymerase를 에너지원이 한정되어 있는 batch 방식의 무세포 발현법과 에너지원을 지속적으로 공급하는 Continuous 방식의 무세포 발현법으로 합성을 하였으며, Continuous 방식으로 발현 시 최종 합성량이 증가될 수 있음을 확인하였습니다.

1. Template DNA

; pET15b(+)-Poly A polymerase (6 µg)

2. Protein Expression Condition

- kit; *AccuRapid*™ Midi Protein Expression Kit

① Batch type

- Reaction mixture; volume - 750 µl
- Reaction condition; temperature 26°C, time - 3 hrs
- Equipment; water bath

② Continuous type

- Reaction mixture; volume 750 µl
- *AccuRapid*™ Protein Expression Kit Feeding buffer; 100 ml
- Cut off size of dialysis membrane; 6-8 kDa
- Reaction condition; temperature 26°C, time 22 hrs
- Equipment; Hybridization incubator

3. Protein Purification Condition

- Bead; Ni-NTA magnetic bead 50 mg
- Final sample; 0.25 ml

4. Result

- Sampling

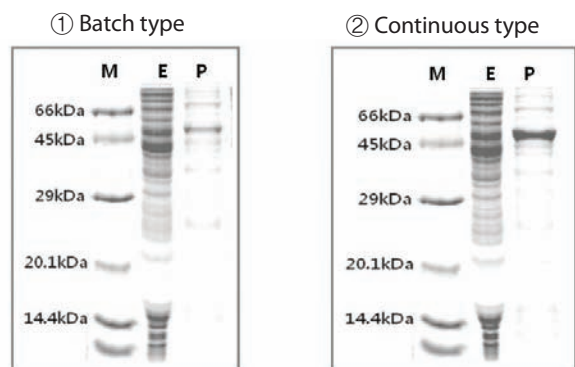
Expression; 시료 5 µl + 4x loading dye 5 µl + D.W. 10 µl 로 제조 후, 95°C, 5 min 열처리

Purification; 시료 15 µl + 4x loading dye 5 µl 로 제조 후, 95°C, 5 min 열처리

- SDS-PAGE gel running

Expression; 5 µl/well

Purification; 10 µl/well



M: *AccuLadder*™ Protein Size Marker (Low),
E; Expression,
P; Purification

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7270	AccuRapid™ Maxi Protein Expression Kit, 10 ml x 1 reaction
K-7270-1	AccuRapid™ Protein Expression Kit_Feeding buffer
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	ExiProgen™ , Instrument

● Bioneer magnetic bead

직경 400nm 의 silica coated magnetic bead

Silica coated magnetic bead 는 DNA 및 단백질 정제에서부터 질병의 관찰을 위한 소재로까지 많은 바이오 분야에서 사용되고 있습니다. 바이오니아의 Magnetic Beads는 표면에 적절한 기능기(functional group)로 코팅하고, 이 기능기를 가진 Magnetic Beads가 DNA, RNA, 단백질, 특정세포(specific cell)와 결합하게 한 후에 외부 자기장(Magnetic field)을 이용하여 Magnetic Beads를 원하는 위치로 이동하거나 부착하여 정제(purification)를 하게 하는 제품입니다.



4.4.3. Effect of reaction temperature on protein synthesis

ExiProgen™을 이용한 무세포 단백질 합성시, 단백질 발현 온도는 최종 단백질 합성량에 영향을 줄 수 있으며, 단백질에 따라서 최적의 합성 온도가 다를 수 있습니다.

■ 실험 결과

본 실험에서 AcGFP (Aequorea victoria green fluorescence protein), CAT (Chloramphenicol acetyl transferase), FGF2 (Fibroblast growth factor 2), hGH (Human growth hormone), Poly A polymerase 및 이황화결합을 가진 단백질 ScFV (Single chain antibody), rPA (Recombinant plasminogen activator)의 단백질 합성시 반응 온도의 영향에 대해 확인하였습니다.

1. Template DNA

; pBIVT-AcGFP (6 µg), pBIVT-CAT (6 µg), pBIVT-FGF2 (1.2 µg), pBIVT-hGH (1.2 µg),
pET15b(+)-Poly A polymerase (6 µg), ScFV (1 µg), rPA (2 µg)

2. 각 키트를 이용한 단백질 합성

① Normal Proteins

- Sample; AcGFP, CAT, FGF2, hGH, Poly A polymerase
- kit; ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit
- Reaction temperature; 26, 30, 34°C
- Protocol No.; 903

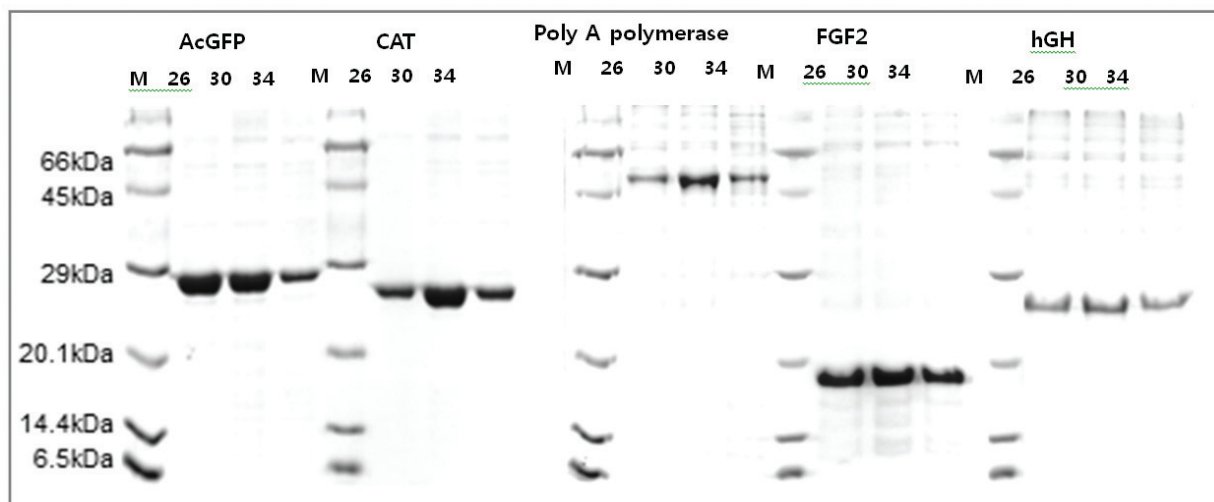
② Disulfide bonded proteins

- Sample; ScFV, rPA
- kit; ExiProgen™ EC-Disulfide Protein Synthesis Kit
- Reaction temperature; 18, 26, 34°C
- Protocol No.; 905

3. Result

① Normal Proteins

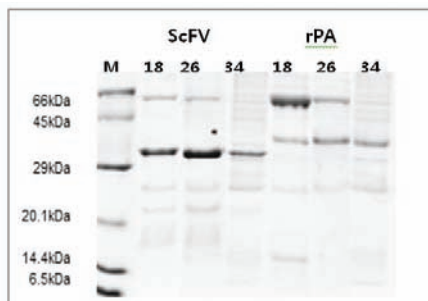
- Sampling; 총 20 µl (시료 5 µl + 4x loading dye 5 µl + ADW 5 µl) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 µl/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)



M : AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 26; 26 °C setting, 30; 30 °C setting, 34; 34 °C setting

② Disulfide bonded proteins

- Sampling; 총 20 µl (시료 15 µl + 4x loading dye 5 µl) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 µl/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)



M : AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 18; 18°C setting, 26; 26°C setting, 34; 34°C setting

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7310	ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7320	ExiProgen™ EC-Tagfree Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7330	ExiProgen™ EC-Disulfide Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7400	ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1× primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1× primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	ExiProgen™, Instrument
A-2030-4	MyGenie™ 32 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

¹ Oligo synthesis service 문의

5. Application

5.1. ExiProgen™ kit를 이용한 독성 단백질 합성

일반적으로 세포에 독성을 나타내는 유전자는 세포 배양 방법으로 단백질을 합성하기 어려울 뿐만 아니라 이 유전자가 클로닝 된 발현벡터를 증량도 어려울 수 있습니다. 따라서 이러한 독성유전자를 발현시키기 위해서 무세포 단백질 발현 방법으로 단백질을 발현하는 당사의 ExiProgen™ 시스템이 활용될 수 있습니다.

■ 실험 결과

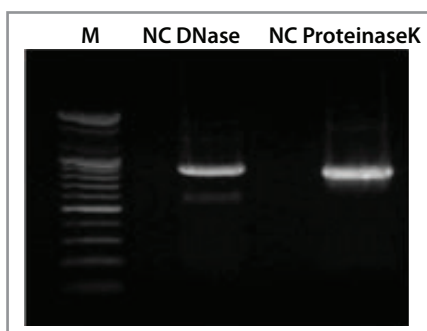
당사는 독성 유전자 중 DNase I 과 Proteinase K의 유전자를 합성하여 ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit로 단백질 발현용 template를 제작하였으며, 이 DNA를 이용하여 ExiProgen™ 으로 단백질을 합성하였습니다

1. Gene synthesis

- (주)바이오니아 Gene synthesis service를 이용한 유전자 합성 및 T vector 클로닝

2. Template DNA 제작

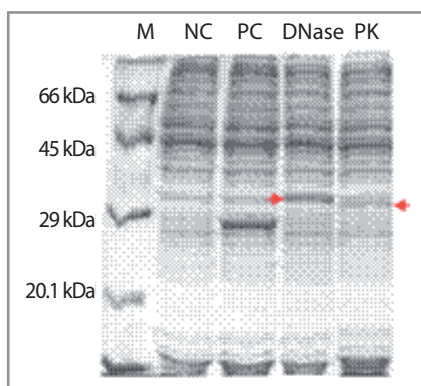
- Template DNA; pT-DNase I, pT-Proteinase K
- kit; ExiProgen™ ProXpress PCR Template Kit (Cat no. K-7400)



M; 100 bp DNA Ladder (Bioneer, D-1030),
NC; Negative control (No-template)
1; Dnase (Template – pT),
2; Proteinase K (Template – pT)

3. 단백질 발현 확인

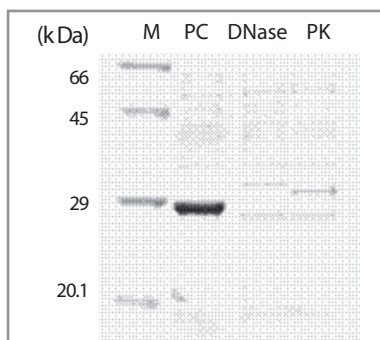
- Template DNA; DNase I, Proteinase K PCR products – each 10 ng
- kit; AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression kit (Cat. No. K-7250)
- 반응 조건; MyGenie™ 96으로 30°C, 3시간 반응
- Sampling; 총 20 µl (시료 5 µl + DW 10 µl + 4x loading dye 5 µl) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 5 µl/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)
- 결과



M: AccuLadder™ Protein Size Marker (Low),
NC; Negative control (No-DNA),
PC; Positive control (AcGFP),
DNase; DNase I,
PK; Proteinase K

4. 단백질 합성

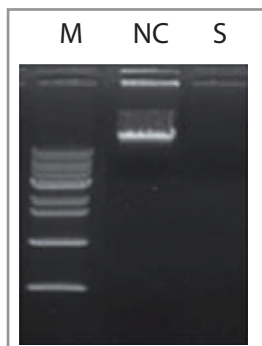
- Template DNA; DNase I, Proteinase K PCR products – each 500 ng
- kit; *ExiProgen™* EC Protein Synthesis Kit (Cat. no. K-7300)
- Protocol No.; 902
- Sampling; 총 20 μ l (시료 15 μ l + 4x loading dye 5 μ l) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 μ l/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)
- 결과



M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low),
NC: Negative control (No-DNA),
PC; Positive control (AcGFP),
DNase; DNase I,
PK; Proteinase K

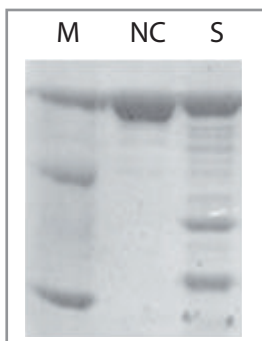
5. 단백질 활성 확인

(A) DNase I



Lambda DNA was degraded by DNase I synthesized with *ExiProgen™*.
(All sample were incubated at 37°C for 3 hours.)
M: 1 kb DNA Ladder (D-1040, Bioneer),
NC: Negative control (No DNase I treated)
S: DNase I treated sample

(B) Proteinase K



BSA protein was degraded by Proteinase K synthesized with *ExiProgen™*.
(All sample were incubated at 37°C for 16 hours.)
M: *AccuLadder™* Protein Size Marker (Low) (D-2020, Bioneer),
NC: Negative control (No Proteinase K treated),
S: Proteinase K treated sample

■ Related Products

Cat. no.	Products
k-7300	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
K-7400	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 16 reactions
N-8229	1× primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole
N-8230	1× primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	<i>AccuPower® ProFi Taq</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
K-3034-1	<i>AccuPrep®</i> PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	<i>AccuPrep®</i> Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	<i>AccuPrep®</i> Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	<i>ExiProgen™</i> , Instrument
A-2030-4	<i>MyGenie™</i> 32 Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i> , Instrument
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

¹ Oligo synthesis service 문의

5.2. ExiProgen™ kit를 이용한 막단백질 합성

일반적으로 막단백질은 일반적인 *E. coli* 발현 환경(*in vivo* 또는 *in vitro*)에서는 발현되기 어려우며, detergent를 첨가해 주어야 합성이 가능합니다. 당사의 ExiProgen™ 단백질 합성 kit를 이용하면 detergent 첨가만으로도 손쉽게 막단백질을 합성할 수 있습니다.

■ 실험 결과

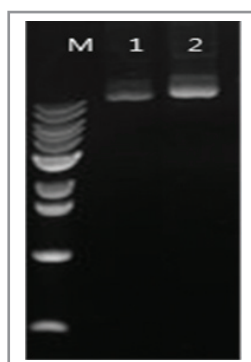
본 실험에서는 막단백질 중 FLAP (5-lipoxygenase activating protein, 4개의 transmembrane domain을 가짐)와 bR (bacteriorhodopsin, 7개의 transmembrane domain을 가짐)의 유전자를 합성하여 pET32a (+)에 클로닝하여 단백질 발현용 벡터를 제작하였으며, 이 발현벡터를 template로 하여 ExiProgen™으로 단백질을 합성하였습니다.

1. Gene synthesis

- (주)바이오니아 Gene synthesis service를 이용한 *E. coli* codon optimized 유전자 합성

2. Cloning 방법을 이용한 Template DNA 제작

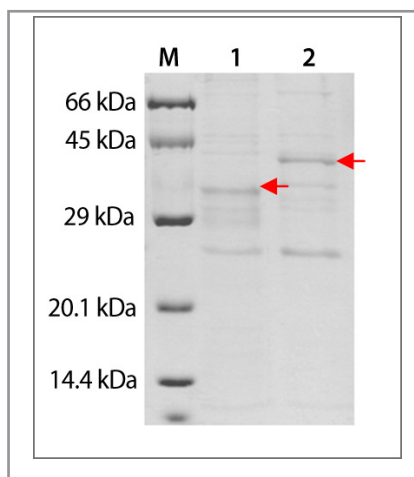
- Vector DNA; pET32a(+)
- Insert DNA; pT-FLAP, pT-bR
- Competent cell; DH-5a



M; 100bp DNA Ladder (Bioneer, D-1030),
1; pET32a(+)-FLAP,
2; pET32a(+)-bR

3. 단백질 합성

- Template DNA; pET32a(+)-FLAP (3 µl), ; pET32a(+)-bR (6 µg)
- kit; ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit (Cat. no. K-7300)
Detergent 첨가 - 발현용액과 정제버퍼에 final 0.5% Brij35 첨가
- Protocol no. ; 902
- Sampling; 총 20 µl (시료 5 µl + 4x loading dye 5 µl) 제조 후, 95°C, 5 min 열처리
- SDS-PAGE gel running; 시료 10 µl/well 로딩 (10 x 8(cm²), 10 wells)
- 결과



M: AccuLadder™ Protein Size Marker (Low),
1; FLAP (35 kDa), 2 ; bR (43 kDa)

■ Related Products

Cat. no.	Products
K-7300	ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
C-9100	Agarose, 100 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
A-5041	ExiProgen™, Instrument
A-7020	Agaro-Power™ System

● AgaroPower™

96개 샘플을 한번에

Agaro-Power™은 loading adapter가 부착된 agarose gel electrophoresis kit로서 미숙련자도 최대 96개의 sample (size marker 포함하지 않고)을 2~3분 내로 빠르고 loading 할 수 있도록 개발된 제품입니다. 본 제품은 내구성이 강한 폴리카보네이트 사출물로서 제작하여 아크릴류의 전기영동장치들에 비해 내구성을 뛰어넘습니다. 이 제품은 power supply가 포함되어 있어 별도의 전원장치가 필요 없고 간편하게 gel 을 casting 할 수 있는 gel casting tray 도 포함되어 있습니다.



¹ Oligo synthesis service 문의

5.3. ExiProgen™ kit를 이용한 상업용 단백질 합성

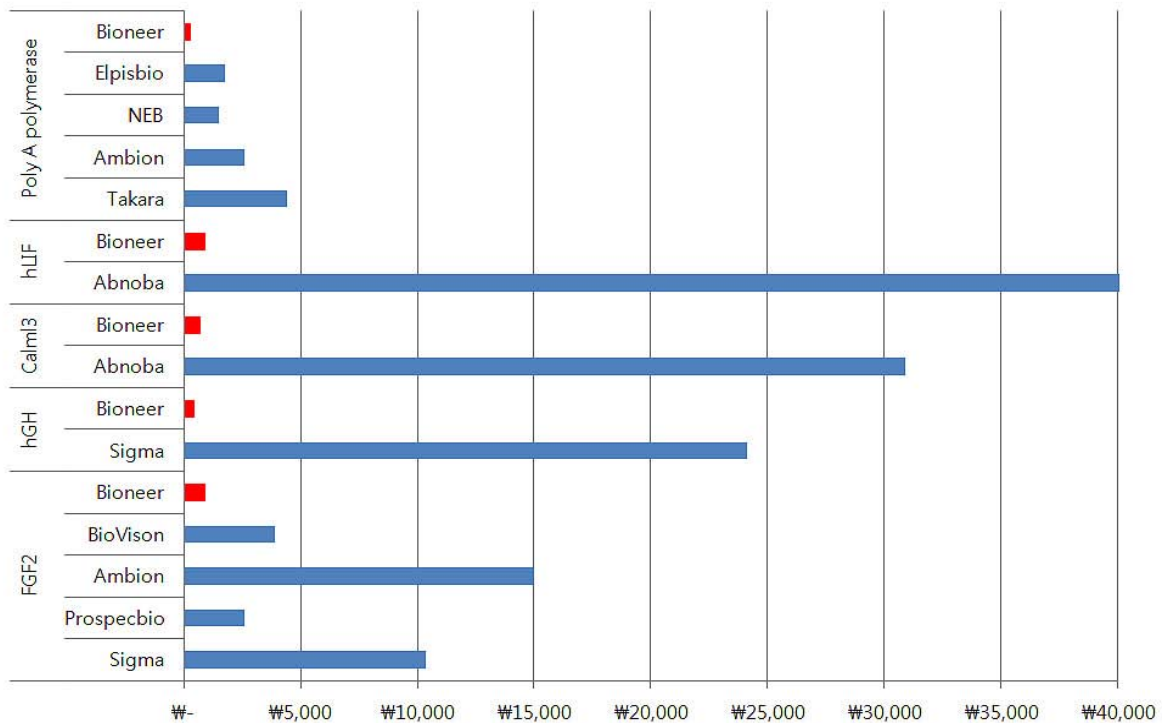
Potential Value of ExiProgen™ !

ExiProgen™ 은 template DNA만 가지고 있다면, 누구나 손쉽게 단백질을 만들 수 있는 장비입니다. 따라서 실험실에서 사용하는 단백질 중 상업적으로 판매되고 있는 고가의 단백질도 ExiProgen™ 으로 손쉽게 만들어 사용할 수 있습니다.

1. 제조사별 단위 가격 비교표

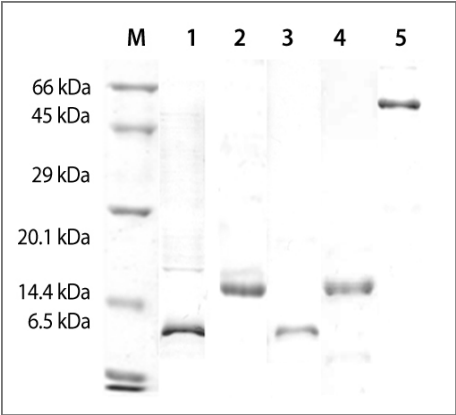
단백질 이름	회사	제품 구성	가격 (원)	단가 (원/μg)
FGF2	Bioneer	30 μg	27,000	900
	Sigma	25 μg	259,000	10,360
	Prospecbio	50 μg	130,000	2,600
	Ambion	10 μg	150,000	15,000
	BioVision	50 μg	195,000	3,900
hGH	Bioneer	66 μg	27,000	409
	Sigma	10 μg	241,000	24,100
Calml3	Bioneer	40 μg	27,000	675
	Abnoba	10 μg	309,000	30,900
hLIF	Bioneer	30 μg	27,000	900
	Abnoba	2 μg	259,000	129,500
단백질 이름	회사	제품 구성	가격 (원)	가격 (원/ Unit)
Poly A polymerase	Bioneer	100 units	27,000	270
	TAKARA	100 units	441,000	4,410
	Ambion	80 units	207,000	2,587
	NEB	100 units	150,000	1,500
	Elpisbio	50 unit	88,000	1,760

제조사별 기능성 단백질 가격 비교 (원/μg)



2. ExiProgen™ 합성 결과

- Protein 종류
; FGF2 (Fibroblast growth factor 2), hGH(Human Growth Hormone), Calml3(Calmoduline like protein), hLIF (Leukemia inhibitory factor), Poly A polymerase
- kit; ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit (Cat. no. K-7300)



M: AccuLadder™ Protein Size Marker (Low),
1; Calml3
2; hGH
3; FGF2
4; hLIF
5; Poly A polymerase

■ Related Products

Cat. no.	Products
k-7300	ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
K-7310	ExiProgen™ EC-Maxi Protein Synthesis Kit, 8 reactions

6. Troubleshooting Guide

당사의 ExiProgen™ 단백질 합성 kit를 이용하여 목적단백질의 합성이 잘 되지 않는 경우, 아래의 troubleshooting guide를 참조하시어 해결하시기 바랍니다. 단, 아래의 내용은 일반적인 단백질의 합성에 대한 해결방법을 제시해 줄 수 있으나, 모든 단백질의 합성 문제의 해결 방안이 해당되지는 않을 수 있다는 점을 유의하시기 바랍니다.

1. Positive control 단백질의 합성이 되지 않는 경우

원인	해결방안
핵산분해효소 (DNase, RNase)의 오염	실험을 하실 때에는 항상 장갑을 끼고, DNase-, RNase-free한 pipette tips을 이용하시기 바랍니다.
Pipetting error 또는 시약 미첨가	실험을 하기 전 pipettes을 체크하시고, 정확한 양의 DNA 또는 시약을 첨가하시기 바랍니다. 또한 protocol에 따라서 모든 시약이 빠짐없이 혼합되었는지 확인하시기 바랍니다.
시약의 보관상태	kit내의 모든 시약 및 구성품은 권장하는 온도에서 보관하시기 바라며, 특히 <i>E. coli</i> extract는 freezing/thawing을 반복하지 않도록 주의하시기 바랍니다.

2. Positive control 단백질은 합성되나, 목적단백질이 합성되지 않는 경우

원인	해결방안
Template DNA의 염기서열	Target gene을 포함하는 codon의 프레임 (ATG (start) ~ TAA, TGA, TAG (Stop))이 올바른지 확인하시기 바랍니다. Template DNA의 ORF (Open Reading Frame)에 mutation이 생기는 경우 translation 중간에 합성이 끝날 수 있으니, 반드시 ORF의 서열을 확인하시기 바랍니다.
발현벡터의 구조	목적단백질을 발현할 수 있는 유전자는 T7 Promoter와 terminator가 있는 벡터 (ex) pBIVT, pK7, pIVEX, pET 일부)에 클로닝하여 사용하여야 하며, endogenous lac repressor가 생성될 수 있는 벡터의 경우에는 IPTG를 첨가하여 합성을 하셔야 합니다.
Template DNA의 오염	Template DNA를 준비하는 과정에서 핵산분해효소의 오염에 의해서 DNA가 분해된 경우에는 단백질 합성이 되지 않습니다.

3. 목적 단백질의 합성량이 낮은 경우

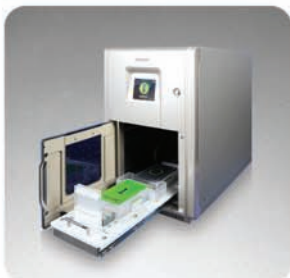
원인	해결방안
Template DNA의 순도	최적화된 단백질 합성을 하기 위해서는 template DNA의 순도가 높아야 합니다. $A_{260}/_{280}$ 값이 1.8~2.0, $A_{260}/_{230}$ 값이 1.5 이상일수록 합성 효율이 높아집니다. 만약 DNA의 순도가 낮은 경우에는 단백질의 합성이 되지 않을 수도 있습니다.
Template DNA의 농도	Template DNA의 농도에 따라서 단백질의 합성량에 차이가 있을 수 있습니다. 단백질 합성량의 최대화하기 위해서는 실험에 앞서 발현 스크리닝을 통해서 최적 DNA 농도를 결정 후, 단백질 합성을 하시기 바랍니다.
Template DNA의 <i>E. coli</i> codon 최적화 여부	Template DNA의 염기 서열이 <i>E. coli</i> codon 최적화가 이루어지지 않은 경우에는 단백질의 합성이 되지 않거나, 합성량이 낮을 수 있습니다.
His-tag의 위치	His-tag의 위치에 따라서 목적단백질의 발현을 저해시킬 수 있으며, 단백질의 발현에는 영향을 주지는 않으나, 3차 구조 형성시 외부로 노출되지 않아서 정제가 되지 않는 경우가 생길 수 있습니다. 이러한 경우에는 tag의 위치를 변경하시기를 권장합니다.

4. 목적 단백질의 활성 또는 solubility가 낮은 경우

원인	해결방안
Post-translational modification을 필요로 하는 단백질인 경우	<i>E. coli</i> 를 이용한 무세포 단백질 합성시스템에서는 glycosylation, phosphorylation 등과 같은 post translational modification이 필요한 단백질은 합성이 불가능합니다.
단백질 활성화에 특정 요소를 필요로 하는 경우	합성된 단백질이 활성을 나타내기 위해서 특정 요소 등을 필요로 하는 경우에는 최종적으로 정제된 단백질 용액에 이러한 요소들을 첨가해준 후 활성을 확인하여야 합니다.
단백질의 solubility가 낮아서 aggregation이 되는 경우	단백질 합성 온도를 낮춰주거나, 단백질의 folding을 도와주는 chaperone protein을 첨가한 후 합성을 하면, solubility가 향상될 가능성이 있습니다.

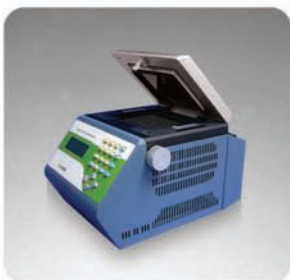
7. Ordering Information

Instruments



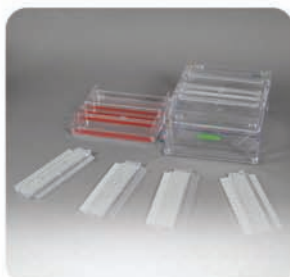
- **ExiProgen™**
(Cat. no. A-5041)

세계최초 전자동 단백질 합성 및 핵산추출 장비



- **MyGenie™ 96/384 Gradient Thermal**
(Cat. no. A-2040-1)

1분만에 384 well, 1536 well 등의 다른 block으로 쉽게 교체하여 사용할 수 있는 혁신적인 PCR Machine



- **Agaro-Power™**
(Cat. no. A-7020)

loading adapter가 부착된 agarose gel electrophoresis kit 미숙련자도 최대 96개의 sample을 2~3분 내로 빠르게 loading 할 수 있도록 개발된 제품



- **ExiSpin™**
(Cat. no. A-7040)

실험 과정 중 반복되는 vortex와 spin-down 과정을 결합한 자동화 장비로서 Centrifuge와 vortex 기능을 사용자가 기기 자체의 program을 이용하여 자동으로 반복 수행할 수 있음



- **LabChip GX®**
(122000)

단백질 분석 및 정량을 위한 완벽한 솔루션, Perkin Elmer 사의 장비

Protein Synthesis & Purification kits

Cat. no.	Products
K-7400	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 16 reactions
K-7401	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 32 reactions
K-7250	<i>AccuRapid™</i> Cell-Free Protein Expression Kit, 45 µl x 24 reactions
K-7260	<i>AccuRapid™</i> Midi Protein Expression Kit, 1 ml x 5 reactions
K-7270	<i>AccuRapid™</i> Maxi Protein Expression Kit, 10 ml x 1 reaction
K-7280	<i>AccuRapid™</i> Protein Synthesis Kit, 5 reactions
k-7300	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
K-7301	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 32 reactions
K-7302	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 96 reactions
K-7310	<i>ExiProgen™</i> EC-Maxi Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7320	<i>ExiProgen™</i> EC-Tagfree Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7330	<i>ExiProgen™</i> EC-Disulfide Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7220	<i>ExiProgen™</i> His-Tagged Protein Purification Kit, 16 reactions
K-7221	<i>ExiProgen™</i> His-Tagged Protein Purification Kit, 32 reactions
K-7230	<i>ExiProgen™</i> Cell-Based Protein Purification Kit, 16 reactions

Related Products

Cat. no.	Products
N-8229	1× primer F/R sets (N terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1× primer F/R sets (C terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	AccuLadder™ 1 Kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-3034-1	AccuPrep® PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	AccuPrep® Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9100-1	Agarose, 500 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3112	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 50 reactions
K-3122	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3132	AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 10 reactions
K-3030	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 200 reactions
K-3030-1	AccuPrep® Plasmid Extraction Kit 50 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	AccuLadder™ Protein Size Marker (Low), 500 µl
D-2010	AccuLadder™ Protein Size Marker (Broad), 500 µl

8. Service Information

● Cell Free Protein Synthesis/Expression Service

(주)바이오니아 단백질연구팀

Tel : 1588-9788/042-930-8647, E-mail : Proteinsupport@bioneer.co.kr

● Gene Synthesis Service

(주)바이오니아 Gene합성 팀

Tel : 1588-9788/042-930-8515, E-mail : Genesynthesis-support@bioneer.co.kr

● Sequencing Service

(주)바이오니아 Sequencing 팀

Tel : 1588-9788/042-930-8700, E-mail : Sequencing-support@bioneer.co.kr

● Oligo (Primer) Service

(주)바이오니아 DNA 팀

Tel : 1588-9788/042-930-8700, E-mail : Oligo-support@bioneer.co.kr

¹ Oligo synthesis service 문의

9. References

- Kim HC, Kim TW, Kim DM (2011)** Prolonged production of proteins in a cell free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochemistry* 46: 1366–1369.
- Chursov A, Walter MC, Schmidt T, Mironov A, Shneider A, et al. (2011)** Sequence-structure relationships in yeast mRNAs. *Nucleic Acids Res* In press.
- 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: e21590.
- Park S, Hamad-Schifferli K (2010)** Enhancement of in vitro translation by gold nanoparticle–DNA conjugates. *ACS Nano* 4: 2555–2560.
- Keum JW, Ahn JH, Kang TJ, Kim DM (2009)** Combinatorial, selective and reversible control of gene expression using oligodeoxynucleotides in a cell-free protein synthesis system. *Biotechnol Bioeng* 102: 577–582.
- Ahn JH, Kang TJ, Kim DM (2008)** Tuning the expression level of recombinant proteins by modulating mRNA stability in a cell-free protein synthesis system. *Biotechnol Bioeng* 101: 422–427.
- Ahn JH, Keum JW, Kim DM (2008)** High-throughput, combinatorial engineering of initial codons for tunable expression of recombinant proteins. *J Proteome Res* 7: 2107–2113.
- Hino M, Kataoka M, Kajimoto K, Yamamoto T, Kido J, 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. *J Biotechnol*, 133(2):183–189.
- Kim TW, Oh IS, Keum JW, Kwon YC, Byun JY, et al. (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. *Biotechnol Bioeng* 97: 1510–1515.
- Ohashi H, Shimizu Y, Ying BW, Ueda T (2007)** Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. *Biochem Biophys Res Commun*, 352(1):270–276.
- Keum JW, Ahn JH, Choi CY, Lee KH, Kwon YC, et al. (2006)** The presence of a common downstream box enables the simultaneous expression of multiple proteins in an *E. coli* extract. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 562–567.
- Kim TW, Keum JW, Oh IS, Choi CY, Park CG, et al. (2006)** Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* 126: 554–561.
- Swartz J (2006)** Developing cell-free biology for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33(7):476–485.
- Villemagne D, Jackson R, Douthwaite JA (2006)** Highly efficient ribosome display selection by use of purified components for in vitro translation. *J Immunol Methods*, 313(1–2):140–148.
- Katzen F, Chang G, Kudlicki W (2005)** The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, 23(3):150–156.
- Josephson K, Hartman MC, Szostak JW (2005)** Ribosomal synthesis of unnatural peptides. *J Am Chem Soc*, 127(33):11727–11735.
- Shimizu Y, Kanamori T, Ueda T (2005)** Protein synthesis by pure translation systems. *Methods*, 36(3):299–304.
- Underwood KA, Swartz JR, Puglisi JD (2005)** Quantitative polysome analysis identifies limitations in bacterial cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 91(4):425–435.
- Forster AC, Cornish VW, Blacklow SC (2004)** Pure translation display. *Anal Biochem* 2004, 333(2):358–364.

- Torizawa T, Shimizu M, Taoka M, Miyano H, Kainosho M (2004)** Efficient production of isotopically labeled proteins by cell-free synthesis: a practical protocol. *J Biomol NMR* 30: 311–325.
- Ying BW, Taguchi H, Ueda H, Ueda T (2004)** Chaperone-assisted folding of a single-chain antibody in a reconstituted translation system. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 320(4):1359-1364.
- Gualerzi CO, Giuliadori AM, Pon CL (2003)** Transcriptional and posttranscriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol*, 331(3):527-539.
- 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 Lett* 540: 147–150.
- Kigawa T, Yamaguchi-Nunokawa E, Kodama K, Matsuda T, Yabuki T, et al. (2002)** Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *J Struct Funct Genomics* 2: 29–35.
- Frydman J (2001)** Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 70:603-647.
- Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T (2001)** Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*, 19(8):751-755.
- Ramachandiran V, Kramer G, Hardesty B (2000)** Expression of different coding sequences in cell-free bacterial and eukaryotic systems indicates translational pausing on *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett*, 482(3): 185-188.
- Jermutus L, Ryabova LA, Pluckthun A (1998)** Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr Opin Biotechnol*, 9(5): 534-548.
- Netzer WJ, Hartl FU (1997)** Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature*, 388(6640):343-349.
- Roberts RW, Szostak JW (1997)** RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(23):12297-12302.
- Frydman J, Hartl FU (1996)** Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between *in vitro* and *in vivo* mechanisms. *Science*, 272(5267):1497-1502.
- Kuriki Y (1986)** Stimulation in vitro of expression of the amp gene of pBR322 by soluble protein fractions isolated from *E. coli*. *Biochem Int*, 12(4):593-602.
- Zubay G (1973)** *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*, 7:267-287.

ACCURATE
PREMIX
FORMAT

Empower YOUR PCR with **AccuPower® Taq Series**

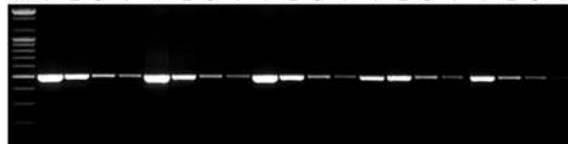
AccuPower® Taq PCR PreMix

Convenient, versatile PCR mastermix containing *Taq* DNA polymerase.

Great for routine PCR, SYBR-Green or dual-labeled probe based qPCR, primer extension, TA cloning, and more.

• 5' to 3' exonuclease activity • 3' A overhang • Amplify ~ 8 kb from human gDNA and 10 kb from Lambda DNA

BIONEER I Company S Company Q Company T Company
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4



Target Gene: Human myc
Lane M: 100 bp DNA Ladder
Lane 1: 10 ng of human total cDNA
Lane 2: 1 ng of human total cDNA
Lane 3: 100 pg of human total cDNA
Lane 4: 10 pg of human total cDNA

Comparison of PCR amplification efficiency between *AccuPower® Taq* PCR PreMix from Bioneer and other suppliers' PCR master mixes.

AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix

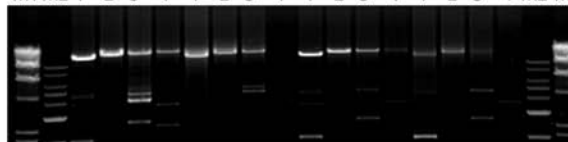
Accurate cloning & expression

Ready-to-use mastermix featuring higher processivity than *Pfu* and higher fidelity than native *Taq*.

Great for long-range gDNA amplification and PCR using difficult templates or low-copy targets.

• 5' to 3' exonuclease activity • 3' A overhang • Amplify ~ 8 kb from human gDNA and 10 kb from Lambda DNA

BIONEER I Company S Company T Company
M1 M2 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 M2 M1



Lane M1: Lambda/*Hind* III marker
Lane M2: 1 kb DNA Ladder
Lane 1: 15 kb fragment
Lane 2: 20 kb fragment
Lane 3: 25 kb fragment
Lane 4: 30 kb fragment

Comparison of PCR amplification of long targets between *AccuPower® ProFi Taq* PCR PreMix from Bioneer and other suppliers' PCR master mixes.

AccuPower® PyroHotStart Taq PCR PreMix

Low copy amplification

Mastermix providing maximized specificity, improved sensitivity, and versatility.

Great for multiplex PCR, *HotStart* PCR, and SYBR-Green or dual-labeled probe based qPCR.

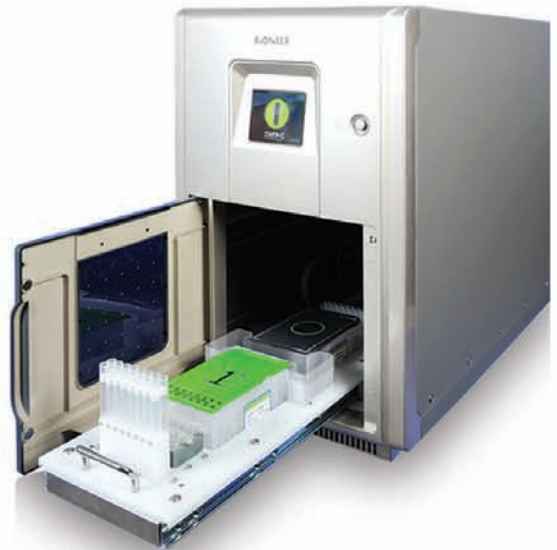
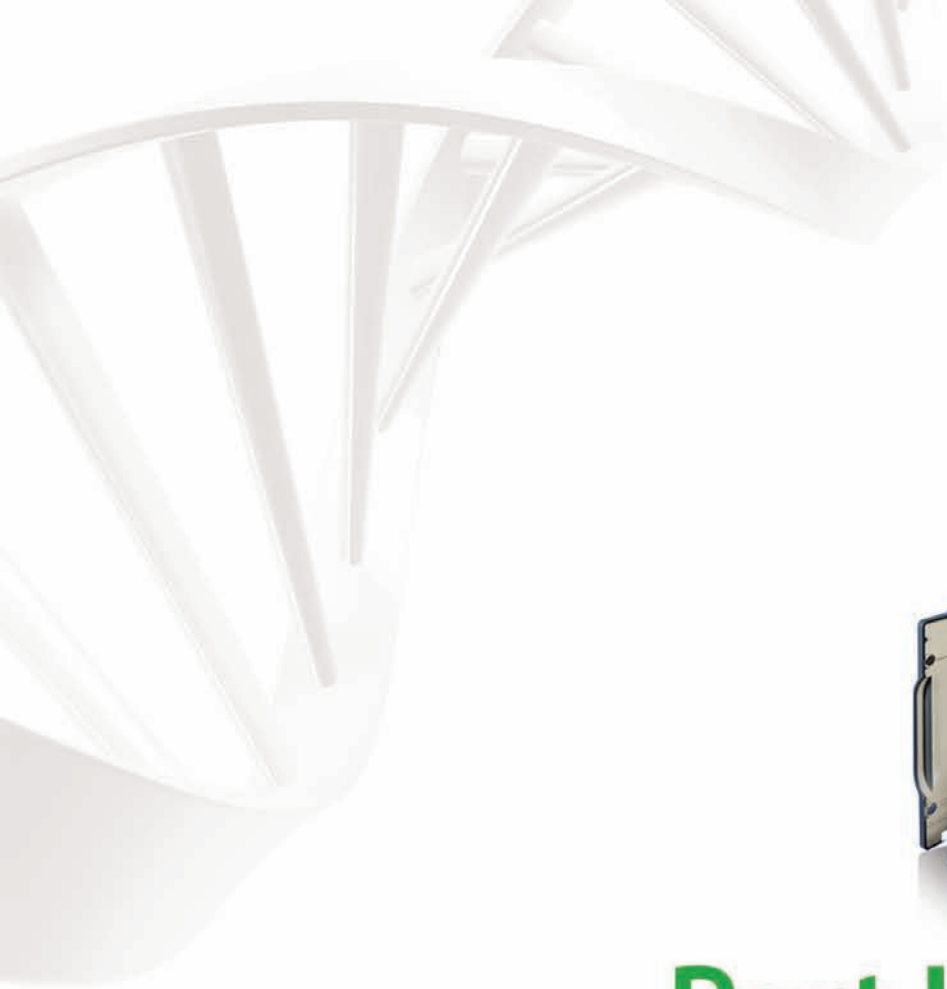
• 5' to 3' exonuclease activity • 3' A overhang • Amplify ~ 8 kb from human gDNA and 10 kb from Lambda DNA

BIONEER I Company S Company T Company Q Company
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4



Lane M: 100 bp DNA Ladder
Lane 1: 100 ng DNA, PrP primer set (500 bp)
Lane 2: 10 ng DNA, PrP primer set (500 bp)
Lane 3: 100 ng DNA, PrP primer set (705 bp)
Lane 4: 10 ng DNA, PrP primer set (705 bp)

Comparison of PCR amplification specificity between *AccuPower® PyroHotStart Taq* PCR PreMix from Bioneer and other suppliers' Hot start PCR master mixes.



Part III

Nucleic Acid Extraction

Bioneer

Healthier Future for
Humanity with
Genomic Technology

1. Introduction

핵산 추출은 유전공학 분야에서 가장 널리 사용되는 보편적인 기술입니다. 생명체에 대한 유전 정보를 담고 있는 핵산은 세포나 조직, 바이러스나 박테리아에서 추출되어 다양한 실험에서 사용되고 있으며 추출 이후 다음 단계의 성공적인 실험을 위해서는 고순도의 핵산을 얻는 것이 매우 중요한 일입니다

이러한 핵산 분리 방법으로는 유전자재조합 기술이 발전하면서 여러 가지 방법이 개발 되어 왔습니다. 초기에 사용하였던 페놀을 이용하여 핵산을 분리 정제하는 방법은 고순도로 핵산을 추출할 수 있지만 페놀 유기용매의 위험성으로 인해 지금은 많이 사용되지 않고 있습니다. 이후 실리카 resin이나 filter가 들어있는 column을 사용한 형태의 추출 방식이 주목 받게 되고 안정성 및 그 성능을 인정받아 대부분의 핵산정제 kit에서 일반적으로 사용되고 있습니다. 한편 유전공학 분야의 발달과 함께 다양한 시료에서의 핵산 추출과 한번에 여러 개의 시료에서 동시에 핵산을 추출해야 하는 필요성이 증대되면서 사용자의 편의성 및 핵산 추출 효율을 높이기 위해 자동화의 필요성이 대두되어 silica magnetic bead를 사용하여 DNA를 추출하는 방법이 실리카 막을 사용하는 방식에 비해 막힘 현상이 없어 자동핵산 추출에 널리 사용되고 있습니다.

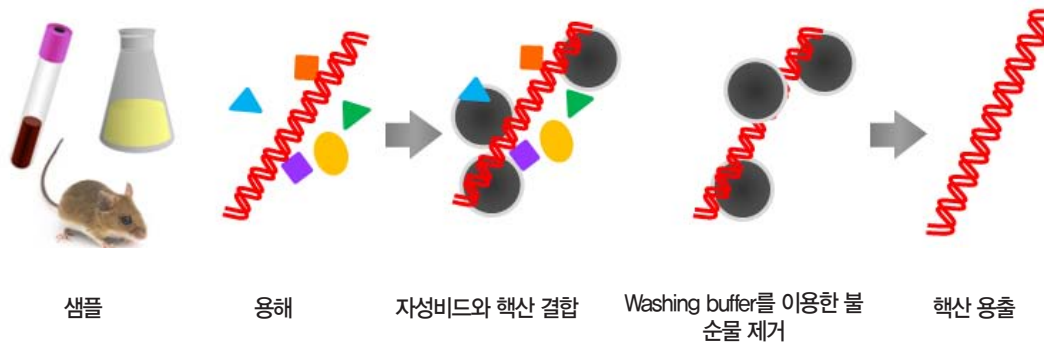
일반적으로 DNA나 RNA를 분리하기 위해서는 먼저 세포막을 파괴해야 합니다. 세포막을 파괴하기 위하여 guanidine hydrochloride, guanidine thiocyanate, SDS등이 사용되며 gram (-) bacteria나 효모 같이 세포벽이 있는 시료의 경우 세포벽을 가수분해하는 lysozyme 등의 전처리를 통해 세포벽을 분해시키는 과정이 필요합니다. 이후 DNA의 경우 단백질을 RNA 혼입을 최소한으로 하도록 진행하며 Proteinase K나 RNase A 처리 및 세척 과정을 거치게 됩니다. RNA의 경우엔 세포막 파괴 시 핵막이 파괴되지 않도록 최대한 주의하여 DNA 혼입을 피하고 RNase에 의한 RNA 가수분해를 최대한 적게 하면서 고순도의 RNA를 추출해야 합니다. (주)바이오니아에서는 다양한 샘플 시료 (혈액, 동물 조직, 배양세포 및 식물 조직 등)로부터 고순도, 고수율로 DNA나 RNA를 추출할 수 있는 전자동 핵산추출장비인 ExiProgen™ 을 개발하였습니다. 본 제품은 높은 DNA/RNA binding 효율을 갖는 실리카 자성입자 (대한민국 특허등록번호: 10-1053023)를 사용하는 제품이며, 사용자 편의성을 고려하여 핵산추출에 필요한 모든 시약 (각종 효소류 포함)이 미리 분주되어 있는 pre-filled buffer cartridge system을 채택하였습니다. 또한, 샘플 시료 및 추출하고자 하는 핵산의 타입에 따라 최적화된 구동 protocol이 장비에 내장되어 있어 재현성이 우수한 핵산 추출을 가능하게 하였습니다.

2. Principle and Selection Guide

2.1. Principle of nucleic acid extraction

Chaotropic salt를 이용한 핵산 추출/정제 기술에 대한 이론은 명확하지 않으나 일반적으로 structured water와 관련된 entropy 효과와 collective salt bridge에 근거하고 있습니다. 자사제품의 lysis buffer에 포함되어 있는 chaotropic salt인 guanidine hydrochloride 나 guanidine thiocyanate가 세포 주위의 물 분자구조를 붕괴하는 성질을 이용하여 표면에 있는 물 분자를 제거하여 세포막 및 단백질 3차 구조를 파괴합니다. 추가로 시료 종류에 따라 가온 과정이나 별도의 성분을 사용하기도 합니다. 이후 핵산이 유리된 상태에서 silica magnetic bead와 chaotropic salt가 만나게 되면 bead 표면에 있는 물 분자들과 용액 내에 있는 양이온 분자가 치환되고 bead 표면의 극성이 양극화 되어 음이온으로 되어있는 핵산의 backbone이 붙게 됩니다. 이 상태에서 장비 내에 장착되어 있는 자석으로 bead를 잡고 washing buffer로 핵산을 제외한 단백질이나 cell debris, buffer 내의 salt 물질을 세척합니다. 생체시료에는 다양한 종류의 PCR 반응 저해물질들이 포함되어 있어 각각의 생체시료의 구성물질의 특성에 따라 이를 제거하기 위한 최적의 세척용액들이 사용됩니다. 핵산을 정제하는 마지막 단계로 핵산의 최적 pH에 적합한 완충제가 포함되어 있는 수용액을 가하게 되면 silica bead 표면에 결합해 있던 핵산이 bead에서 떨어져 나와 원하는 핵산이 고순도로 포함되어 있는 용액을 얻을 수 있게 됩니다.

Figure 1: 실리카 자성 비드를 이용한 핵산 추출 과정



2.2. Selection guide

당사는 다양한 샘플 시료 각각에 최적화된 제품을 개발하였습니다. 제품 군은 크게 DNA prep kit와 RNA prep kit로 구분할 수 있으며 이에 해당되는 제품은 아래와 같습니다.

Target	Sample Type	Available kit	
Genomic DNA	Whole Blood	ExiProgen™ Blood Genomic DNA Kit	(K-4311) p.79
	Animal Tissue	ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit	(K-4312) p.81
	Cultured bacteria	ExiProgen™ Bacteria Genomic DNA Kit	(K-4314) p.85
	Plant tissue	ExiProgen™ Plant Genomic DNA Kit	(K-4315) p.88
Fragment DNA	Plasmid DNA	ExiProgen™ Nano-Plus Plasmid DNA Kit	(K-4381) p.91
	Gel	ExiProgen™ Gel Extraction Kit	(K-4391) p.94
	PCR product	ExiProgen™ PCR Purification Kit	(K-4392) p.97
Total RNA	Animal Tissue	ExiProgen™ Tissue total RNA Kit	(K-4342) p.99
	Plant	ExiProgen™ Plant total RNA Kit	(K-4344) p.103
Virus	Viral DNA	ExiProgen™ Viral DNA/RNA Kit	(K-4371) p.107

각각의 kit는 핵산 추출에 필요한 효소 및 시약이 분주되어 있는 pre-filled buffer cartridge 및 disposable filter tip, elution tube 등의 소모품을 제공하며, 최소 1개부터 16개의 시료에서 동시에 핵산을 추출할 수 있습니다.

또한 (주)바이오니아의 독자적인 기술로 개발된 고효율의 실리카 자성입자가 포함되어 있어, 고순도 고수율의 DNA 및 RNA를 추출할 수 있습니다.

3. Product Information

3.1. ExiProgen™ Blood Genomic DNA Kit



ExiProgen™ Blood Genomic DNA Kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 Ex-iProgen™을 이용하여 전혈 시료로부터 genomic DNA를 추출할 수 있는 제품입니다. 본 제품은 Lysis Buffer와 Proteinase K가 cartridge 내에 모두 포함되어 있어, 전혈 시료를 별도의 전처리 없이 sample loading well에 넣으면 전자동 핵산 추출장비에서 고순도, 고수율의 핵산을 재현성있게 추출할 수 있습니다.

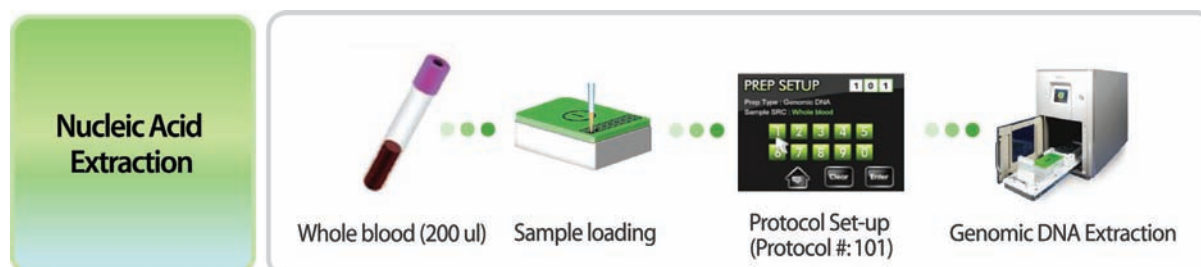
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 enzyme 및 시약이 분주된 pre-filled Buffer cartridge system 사용.
- 최소 1개부터 최대 16개까지의 샘플 시료를 사용 가능.
- 바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 고효율 실리카 자성입자 사용.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Human Blood	200 µl	Up to 3 µg	> 1.8	101
Pig Blood	200 µl	Up to 10 µg	> 1.8	
Cattle	200 µl	Up to 10 µg	> 1.8	

■ Application



■ Experimental Data

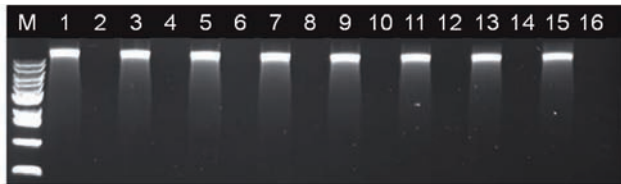


Figure 1: 전혈에서 추출된 genomic DNA의 전기영동 분석 결과

M; Size marker (1 kb DNA Ladder, D-1040, Bioneer)

S; Extraction with whole blood sample

B; Extraction with D.W. only

전혈 (200 μ l)로부터 genomic DNA를 추출한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. Genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination 발생 여부를 확인하기 위해 전혈을 cross로 넣고 나머지 well에는 D.W.만 넣은 후 genomic DNA 추출을 진행 하였습니다. 실험 결과 genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination은 발생되지 않았으며 추출된 genomic DNA의 수율은 평균 3 μ g, 순도 ($A_{260/280}$)는 평균 1.8 이상으로 나타났습니다.

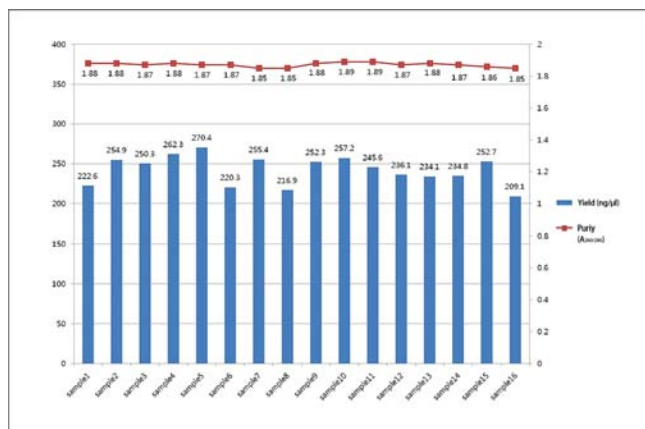


Figure 2: ExiProgen™ Blood Genomic DNA Kit를 이용한 genomic DNA의 추출 재현성

자동화장비 ExiProgen™을 이용하여 동일한 샘플 (전혈 200 μ l)을 16개 각각의 sample loading well에 넣어 추출한 genomic DNA의 농도와 순도를 측정한 결과입니다. 모든 샘플의 농도와 순도는 각각 10%, 0.7%의 CV 값으로 높은 재현성을 보입니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4311	ExiProgen™ Blood Genomic DNA Kit, 96 preps
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 μ l (130 ng/ μ l)
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-7020	Agaro-Power™ System

3.2. ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit



ExiProgen™ Tissue Genomic DNA kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 ExiProgen™ 을 이용하여 동물 조직 시료로부터 높은 수율로 고순도의 genomic DNA 를 추출할 수 있는 제품입니다. 본 제품은 Tissue Lysis buffer와 Proteinase K 가 함께 제공되어 사용자 매뉴얼의 시료 전처리 방법에 따라 동물 조직을 매우 효과적으로 분해할 수 있습니다. 전처리가 완료된 lysate를 sample loading well에 넣으면 전자동 핵산 추출장비에서 재현성있는 결과를 얻을 수 있습니다.

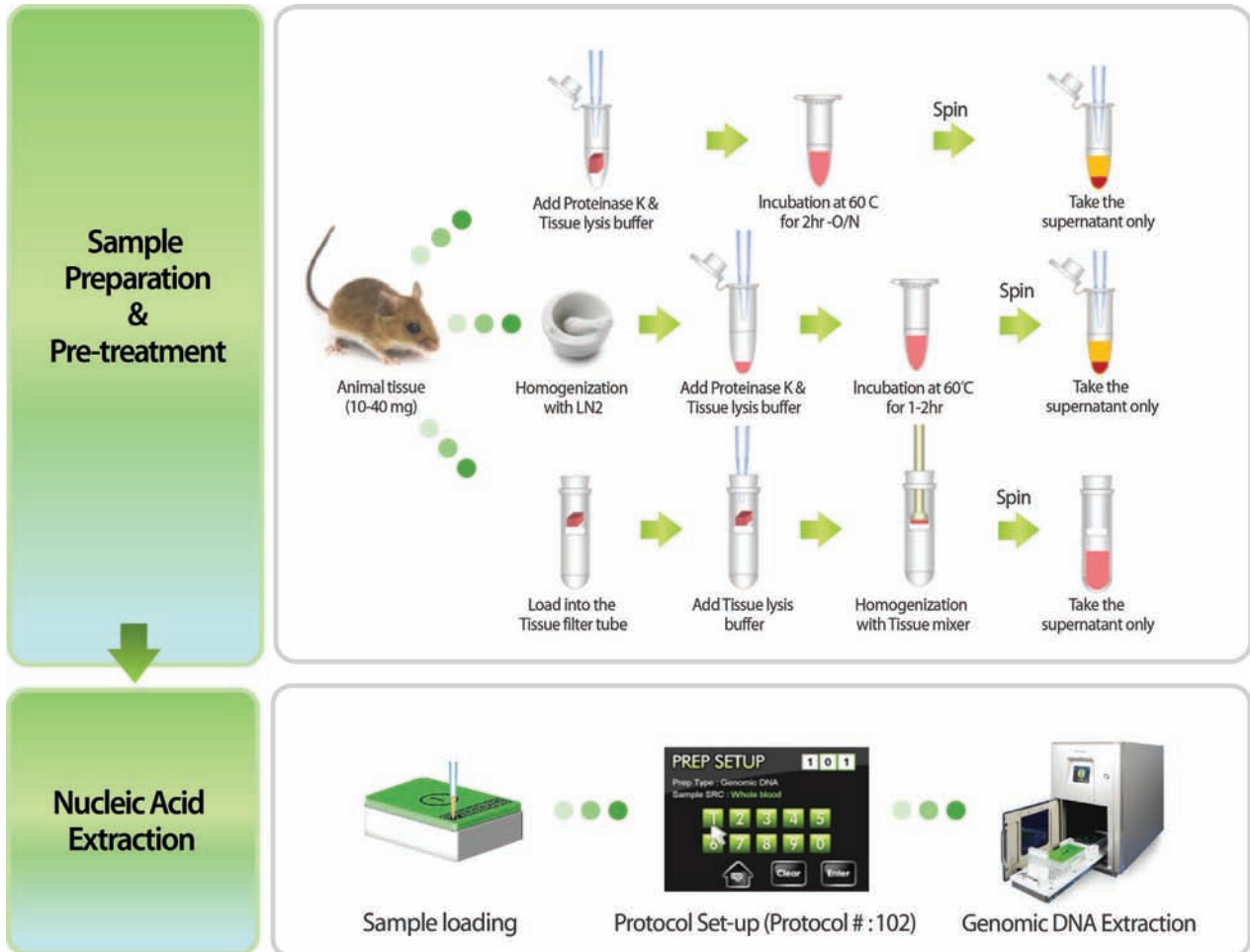
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 enzyme 및 시약이 분주된 pre-filled Buffer cartridge system 사용.
- 다양한 동물 조직 lysis에 최적화된 Tissue Lysis Buffer 제공.
- 최소 1개부터 최대 16개까지의 샘플 시료를 사용 가능.
- 바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 고효율 실리카 자성입자 사용.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Skeletal Muscle	~25 mg	Up to 20 µg	> 1.8	102
Rat Liver	~25 mg	Up to 20 µg	> 1.8	
Rat Lung	~25 mg	Up to 10 µg	> 1.8	
Mouse Tail-tip	~1 cm	Up to 15 µg	> 1.8	
Mouse Brain	~25 mg	Up to 30 µg	> 1.8	
Mouse Heart	~25 mg	Up to 10 µg	> 1.8	
Mouse Kidney	~25 mg	Up to 30 µg	> 1.8	

■ Application



* Muscle, spleen과 같은 연한 조직

조직 25 mg을 1.5 ml tube에 넣고 20 μ l Proteinase K (20 mg/ml)와 Tissue Lysis Buffer 400 μ l를 첨가하여 60°C에서 incubation 합니다. 조직이 완전히 분해되면 8,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액 200 μ l를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

* Mouse Tail과 같은 단단한 조직

액체질소와 막자사발을 이용하여 조직을 파쇄한 후 25 mg을 1.5 ml tube에 옮겨 담습니다. Proteinase K (20 mg/ml) 20 μ l와 Tissue Lysis Buffer 400 μ l를 첨가하여 60 °C에서 incubation 합니다. 조직이 완전히 분해되면 8,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액 200 μ l를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

* Tissue Homogenization Set 이용

Tissue filter tube에 조직 25 mg을 넣은 다음 Tissue Lysis Buffer 100 μ l를 먼저 첨가하여 Tissue Homogenizer로 샘플이 튀지 않도록 주의하며 갈아줍니다. 조직이 완전히 갈아지면 Tissue Lysis Buffer 100 μ l를 추가로 더 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 filter를 통과한 용액 200 μ l를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

Experimental Data

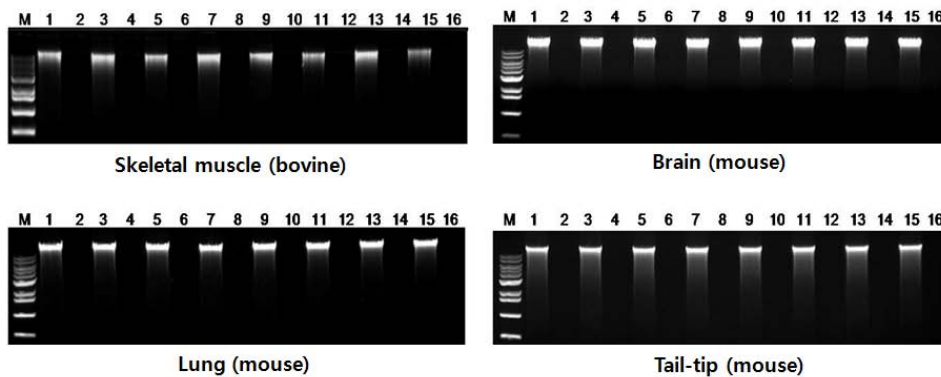


Figure 1: 동물 조직에서 추출된 genomic DNA의 전기영동 분석 결과

M; Size marker (1 kb DNA Ladder, D-1040, Bioneer)

홀수 lane; Extraction with mouse tissue sample

짝수 lane; Extraction with D.W. only

동물조직들 (25 mg/each) 으로부터 genomic DNA를 추출한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. Genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination 발생 여부를 확인하기 위해 tissue sample을 cross로 넣고 나머지 well에는 D.W.만 넣은 후 genomic DNA 추출을 진행하였습니다. 실험 결과 genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination은 발생되지 않았으며 추출된 genomic DNA의 수율은 15~20 µg, 순도(A_{260/280})는 평균 1.8 이상으로 나타났습니다.

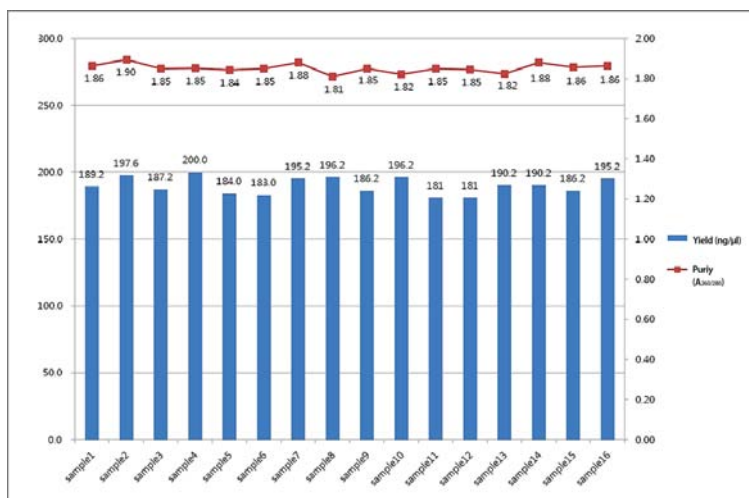


Figure 2: ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit를 이용한 genomic DNA의 추출 재현성

자동화장비 ExiProgen™ 을 이용하여 동일한 샘플 (Rat Liver 10 mg)을 16개 각각의 sample loading well에 넣어 추출한 genomic DNA의 농도와 순도를 측정한 결과입니다. 모든 샘플의 농도와 순도는 각각 3.3%, 1.2%의 CV값으로 높은 재현성을 보입니다.

■ **Related Products**

Cat. no.	Products
A-5041	<i>ExiProgen™</i>
K-4312	<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit, 96 preps
KA-7030	Tissue Homogenization Set (Mixer, Sticks, and Tubes), 100 reactions
KA-7031	Tissue Homogenization Sticks, 100 ea
KA-7032	Tissue Filter Tubes, 100 ea
KA-7033	Tissue Mixer
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

● **AccuPower® PyroHotStart Taq PCR PreMix**

Enzyme-mediated Hotsart

일반적인 PCR반응결과에서 확인되는 낮은 PCR증폭효율과 높은 비특이 반응 생성물은 실온에서 PCR반응물들을 섞을 때부터 발생하는 mispriming과 primer-dimer형성등의 원인으로 인해 발생하게 됩니다. 바이오니아는 이러한 mispriming발생과 primer-dimer현상들을 억제하기 위하여 enzyme-mediated hotstart 방법을 이용한 *AccuPower® PyroHotstart Taq PCR PreMix*를 개발하였습니다. 본 제품은 비특이적 증폭산물과 primer-dimer형성을 최소화하여 반응 특이성과 PCR증폭효율을 높인 장점을 가지고 있으며, complex genomic DNA, low-copy targets 또는 multiple primer pairs등 다양한 PCR증폭반응에 사용하실 수 있습니다.



3.3 ExiProgen™ Bacteria Genomic DNA Kit



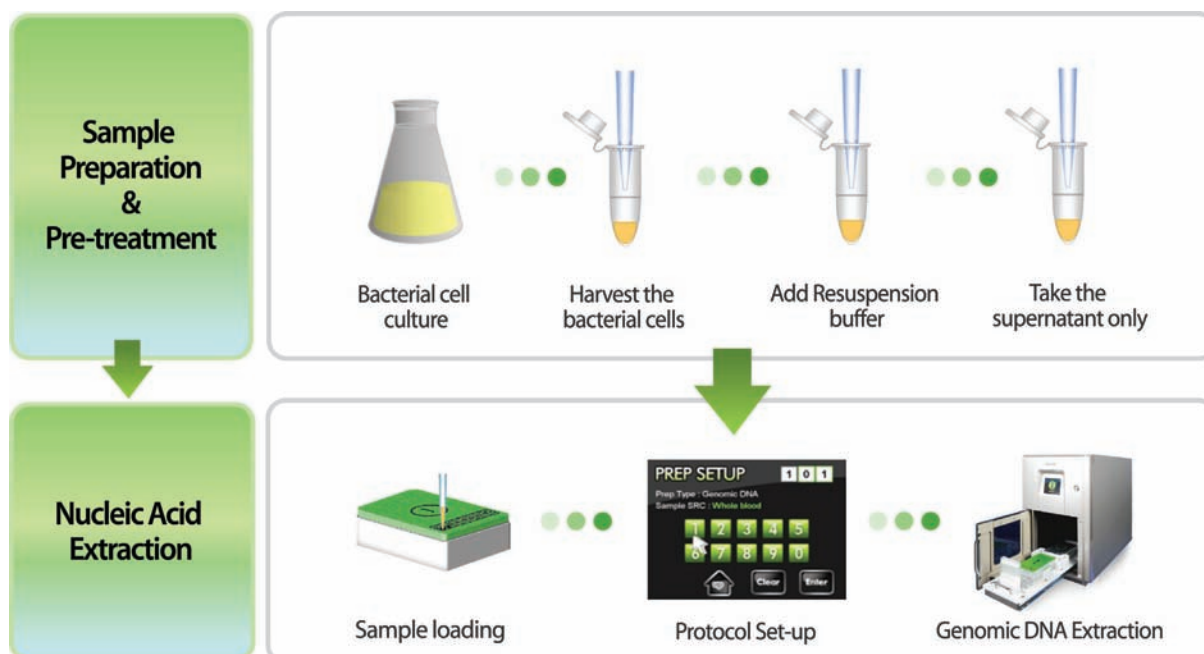
ExiProgen™ Bacteria Genomic DNA Kit는 ExiProgen™을 이용하여 gram (-) bacteria, gram (+) bacteria 시료로부터 높은 수율로 고순도의 genomic DNA를 추출할 수 있는 제품입니다. 각각의 bacterial cell 배양액으로부터 수집된 bacterial cell에 본 제품에 포함된 Resuspension Buffer를 넣고 vortex mixer를 이용하여 완전히 섞어 줍니다. Resuspension된 시료를 sample loading well에 넣으면 Binding Buffer와 혼합되어 실리카 자성입자와 결합합니다. 자성입자와 결합된 핵산은 washing 과정을 거치면서 불순물이 제거되어 고순도의 genomic DNA로 추출됩니다.

■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 enzyme 및 시약이 분주된 Pre-filled Buffer cartridge system 사용.
- Bacterial cell resuspension 및 lysis에 최적화된 Resuspension buffer 제공.
- 바이오니아에서 독자개발한 고효율 실리카 자성입자 사용.
- ExiProgen™를 이용하여 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD ₂₆₀ /280nm	Protocol no.
Cultured <i>E.coli</i>	Up to 1x10 ⁹ cells	Up to 10 µg	> 1.8	108
HeLa cells	Up to 2x10 ⁶ cells	Up to 20 µg	> 1.8	
Lymphocytes	Up to 2x10 ⁶ cells	Up to 10 µg	> 1.8	



■ Application

* Gram (-) Bacteria

선택배지에서 배양된 박테리아를 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거합니다. (최대 1×10^9 cells, $OD_{600nm} = 1.0$ 인 경우 약 1ml) 또는 배양액 1 ml를 취하여 1.5 ml microtube에 옮겨 담습니다. 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거합니다. 제공된 Resuspension Buffer 200 μ l를 넣어 pellet을 풀어준 다음 sample loading tube에 넣고 추출을 시작합니다.

* Gram (+) Bacteria

Gram (+) bacteria의 경우 cell wall을 분해하기 위하여 lysozyme을 이용한 전처리가 반드시 필요합니다. 시료 전처리 및 suspension 과정이 불충분 할 경우 lysis 효율이 떨어져 수율 저하를 일으킬 수 있습니다.

선택배지에서 배양된 박테리아를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거합니다 (최대 1×10^9 cells, $OD_{600nm} = 1.0$ 인 경우 약 1ml) 또는 배양액 1 ml를 취하여 1.5 ml microtube에 옮겨 담고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 제거합니다. 1 x TE (pH 8.0) Buffer 200 μ l를 넣어 pellet을 풀어준 후 lysozyme (50 mg/ml) 20 μ l를 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킵니다.

반응액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거합니다. 제공된 Resuspension Buffer 200 μ l를 넣어 pellet을 풀어준 다음 sample loading tube에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data

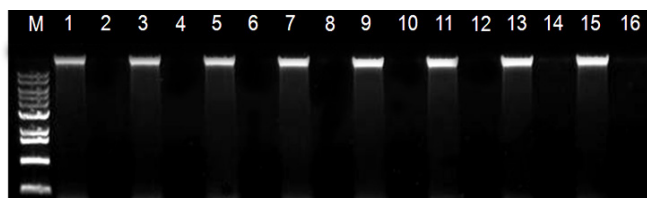


Figure 1: *E.coli* cell (1×10^9 cells)를 이용한 실험 결과
M; Size marker (1 kb DNA Ladder, D-1040, Bioneer)
S; Extraction with *E.coli* cell sample
B; Extraction with D.W. only

E.coli cell (1×10^9 cells)로부터 genomic DNA를 추출한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. Genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination 발생 여부를 확인하기 위해 *E.coli* sample을 cross로 넣고 나머지 well에는 D.W.만 넣은 후 genomic DNA 추출을 진행하였습니다. 실험 결과 genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination은 발생되지 않았으며 추출된 genomic DNA의 수율은 평균 10 μ g, 순도 ($A_{260/280}$)는 평균 1.8 이상으로 나타났습니다.

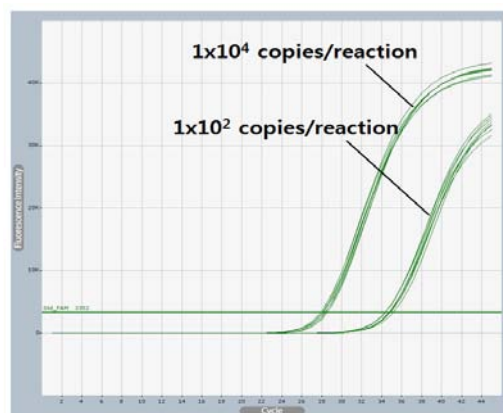


Figure 2: ExiProgen™ Bacteria Genomic DNA Kit를 이용한 genomic DNA의 추출 재현성

자동화장비 ExiProgen™을 이용하여 Staphylococcus aureus 배양 샘플을 희석하여 각각의 sample loading well에 넣어 추출한 genomic DNA를 Real-Time PCR로 증폭한 결과입니다. 1×10^5 copies/well 샘플의 Ct value는 1.1%의 CV값을 보이며, 1×10^3 copies/well 샘플은 0.8%의 CV값으로 높은 재현성을 보입니다.

■ **Related Products**

Cat. no.	Products
A-5041	<i>ExiProgen™</i>
K-4314	<i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit, 96 preps
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2012	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
C-9024	PBS (Phosphate-Buffered Saline), 500 ml
C-9005	TE (pH 8.0), 500 ml
K-6251	<i>AccuPower®</i> 2X <i>GreenStar™</i> Master mix Solution, 100 rxn
A-2040-1	<i>MyGenie™</i> 96 Gradient Thermal Block
A-2060	<i>Exicycler™</i> 96 Real-Time Quantitative Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i>
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

3.4. ExiProgen™ Plant Genomic DNA Kit



ExiProgen™ Plant Genomic DNA Kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 ExiProgen™을 이용하여 각종 plant sample (leaf tissue, seed, root 등) 시료로부터 고수율, 고순도의 genomic DNA를 추출할 수 있는 제품입니다. 본 제품에 포함된 Plant Lysis Buffer와 Proteinase K는 함께 제공된 사용자 매뉴얼의 시료 전처리 방법에 따라 식물 조직을 매우 효과적으로 분해할 수 있습니다. 분해된 시료를 sample loading well에 넣으면 Binding Buffer와 혼합되어 실리카 자성입자와 결합합니다. 자성입자와 결합된 핵산은 washing 과정을 거치면서 불순물이 제거되어 고순도의 genomic DNA로 추출됩니다.

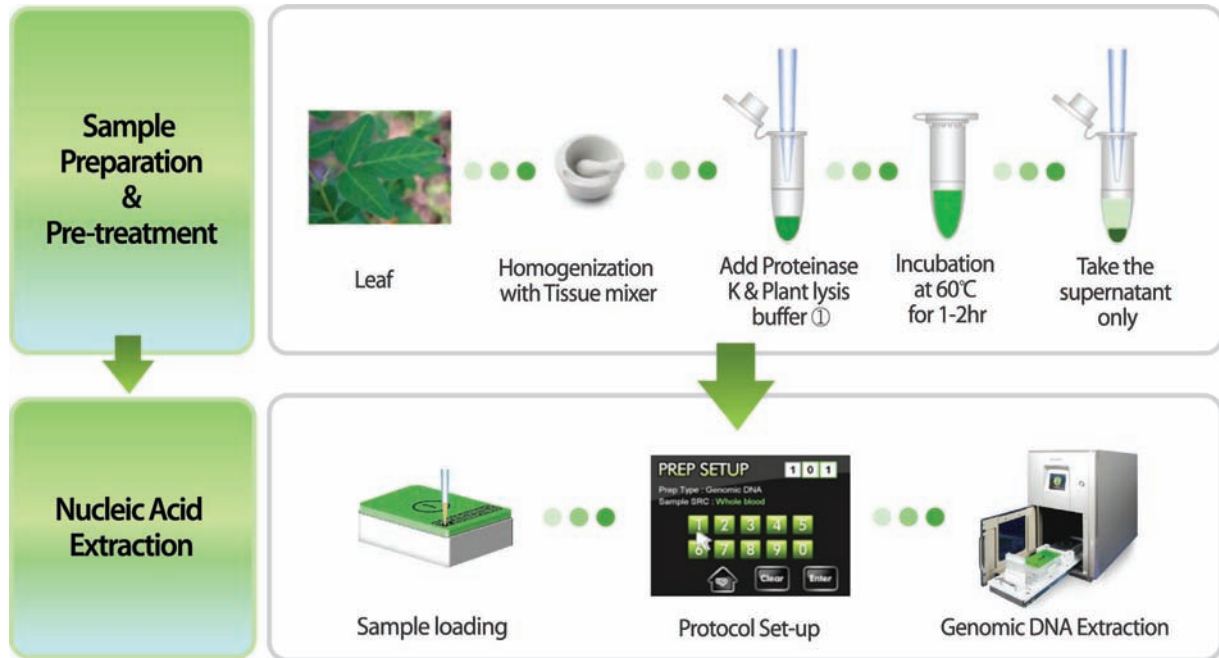
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 enzyme, disposable filter tip, elution tube 등 소모품류 함께 제공.
- Plant sample의 종류에 따라 최적화된 각각의 Plant Lysis Buffer 제공.
- 바이오니아의 독자기술로 개발된 고효율 실리카 자성입자 사용.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type		Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Plant Tissue	상추	Up to 100mg wet weight 20mg dry weight	Up to 15 µg	> 1.8	104
	부추		Up to 15 µg	> 1.8	
	오이		Up to 15 µg	> 1.8	
	감자		Up to 15 µg	> 1.8	
	브로콜리		Up to 4 µg	> 1.8	
Plant Seed	옥수수	Up to 100mg wet weight 20mg dry weight	Up to 10 µg	> 1.8	105
	보리		Up to 8 µg	> 1.8	
	콩		Up to 8 µg	> 1.8	

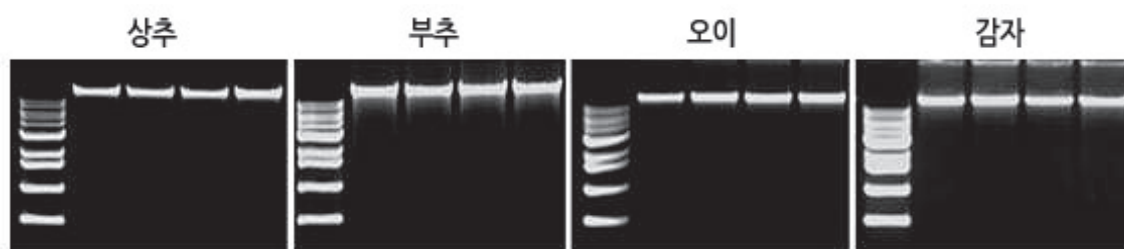
■ Application



* 식물조직

액체질소를 이용하여 식물조직을 파쇄하여 각각 tube에 넣습니다. 샘플에 담긴 tube에 제공된 Proteinase K (20 mg/ml) 20 μ l와 Plant Lysis Buffer 300 μ l를 넣습니다. 60°C에서 최소 1시간 shaking incubation 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 합니다.

분리된 상층액을 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.



■ Experimental Data

Figure 1: 다양한 식물 시료에서 추출된 genomic DNA의 전기영동 분석 결과

M; Size marker (1 kb DNA Ladder D-1040, Bioneer), Lane 1-8; 추출된 genomic DNA

다양한 샘플 시료로부터 genomic DNA를 추출한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. 추출된 genomic DNA는 모두 degradation 없이 온전하게 잘 추출되었음을 확인할 수 있으며 추출된 genomic DNA의 수율은 1~10 μ g, 순도(A₂₆₀/A₂₈₀)는 평균 1.8 이상으로 나타났습니다.

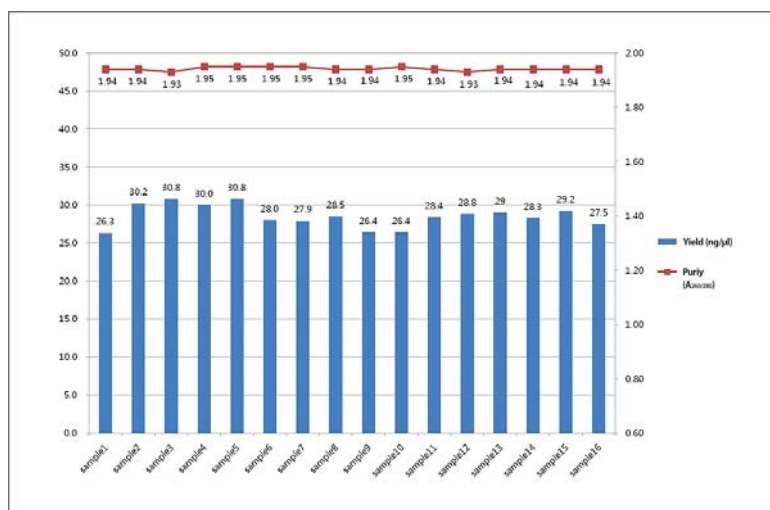


Figure 2: *ExiProgen™* Plant Genomic DNA Kit를 이용한 genomic DNA의 추출 재현성

자동화장비 *ExiProgen™*을 이용하여 동일한 샘플 (건조된 배추 20 mg)을 16개 각각의 sample loading well에 넣어 추출한 genomic DNA의 농도와 순도를 측정한 결과입니다. 모든 샘플의 농도와 순도는 각각 4.0%, 0.4%의 CV 값으로 높은 재현성을 보입니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	<i>ExiProgen™</i>
K-4315	<i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit, 96 preps
KB-0111	Proteinase K Powder, 25 mg x 2 ea
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 kb DNA Ladder, 500 μl (130 ng/μl)
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

3.5. ExiProgen™ Nano-Plus Plasmid DNA Kit



ExiProgen™ Nano-Plus Plasmid DNA Kit 는 Plasmid DNA가 삽입된 Com-petent Cell 에서 Plasmid DNA 를 분리하기 위한 kit 입니다. Silica magnetic bead 와 그에 최적화된 시약으로 고농도, 고순도 plasmid DNA를 분리/정제할 수 있도록 고안된 제품입니다. Kit에서 제공되는 Solution 1, 2, 3는 Birnboim의 alkaline lysis method에 바이오니아의 독창적인 세포잔해입자 및 단백질 제거기술 (대한민국 등록특허: 10-0850430)이 결합된 용액들로써 용액 내 포함된 nano-particle에 의해 insoluble complex (nano debris) 가 매우 단단하게 tube 벽면에 고정됨으로써 종래 실험 방법에 비해 훨씬 더 깨끗하게 cleared lysate 를 얻을 수 있습니다. 이러한 전처리를 거친sample

을 kit 의 loading칸에 주입하여 최대 16개의 샘플을 20분만에 추출하여 실험자의 실험적인 시간낭비를 최소화하여 생물공학 연구에 많은 기여를 할 수 있습니다.

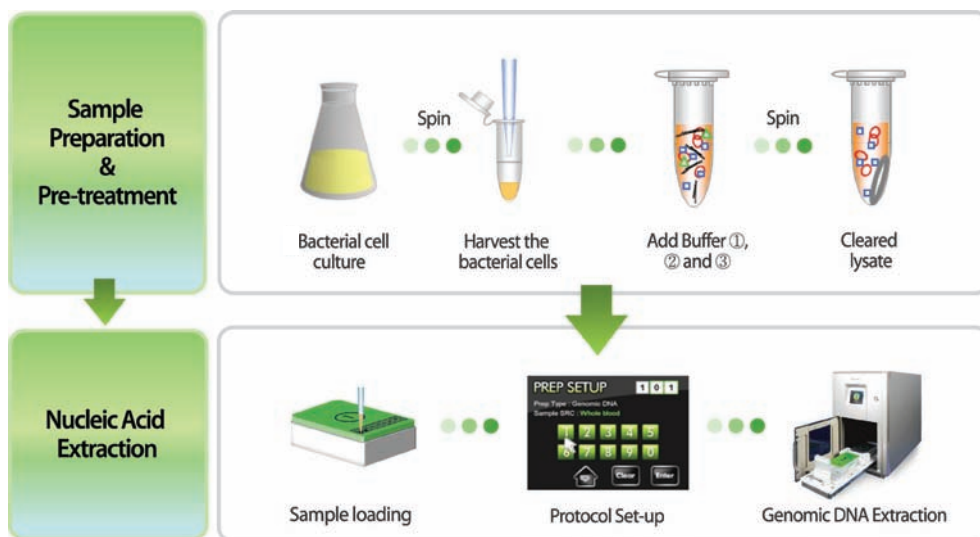
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 enzyme 및 시약이 분주된 pre-filled buffer cartridge system 사용.
- 핵산 추출에 필요한 disposable filter tip, elution tube 등 소모품류 함께 제공.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성있는 결과를 얻을 수 있음.
- 자동화 추출 장비로 추출된 고순도 plasmid DNA는 다양한 실험에 이용.
 - Ligation & transformation
 - Transfection
 - Microinjection
 - Restriction digestion
 - PCR & Real-Time PCR
 - Fluorescent sequencing

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
<i>E.coli</i> competent cell	~ 4x10 ⁹ CFU/ml	Up to 20 µg	> 1.8	703

■ Application



* Growth of bacterial cultures

Plasmid DNA 경우 선택 marker인 항생제가 포함된 배지에서 배양된 박테리아로부터 추출합니다. 추출되는 plasmid DNA의 수율, quality 등은 copy number, strain, 배지종류, 배양시간에 따라 좌우됩니다. 37℃에서 12~16시간 동안 진탕배양기에서 흡광도 (OD_{600nm}) 1.0~2.0으로 배양합니다. 배양된 박테리아를 alkaline lysis하여 cleared lysate을 만든 후, 상층액을 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Technical Note

* Antibiotic Selection Marker

Plasmid DNA의 삽입 유무를 확인하기 위해서 사용되는 항생제는 여러가지 종류가 있으며 사용자의 용도와 편의에 알맞게 사용할 수 있습니다. 적정 농도는 아래 표와 같습니다.

Antibiotics	Working concentration
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	170 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Tetracycline HCl	50 µg/ml
Carbenicillin	50 µg/ml

* Antibiotic Selection Marker

Plasmid	Origin replication	Copy number	Classification
pSC101 and derivatives	pSC10	~5	Very low copy
pACYC and derivatives	p15A	10~12	Low copy
pBR322 and derivatives	pMB1	15~20	Low copy
pGEM® vectors	pMB1	300~400	High copy
pBluescript vectors	ColE1	300~500	High copy
pUC vectors	pMB1	500~700	High copy
pTZ vectors	pMB1	>1,000	High copy

*** endA- and endA+ *E.coli* Strains**

endA+ Strains:

JM83, JM101, JM110, BL21(DE3), HB101, CJ236, LE392, MC1061, RR1, TB1, TG1, BMH71-18, ES1301, P2392, Q358, NM series, PR series, Y10 series, wild-type

endA- Strains:

DH5 α , DH1, DH20, DH21, BJ5183, JM103, JM105, JM106, JM107, JM108, JM109, NM294, SK1590, SK1592, SK2267, SRB, XL1-Blue, XLO

■ Experimental Data

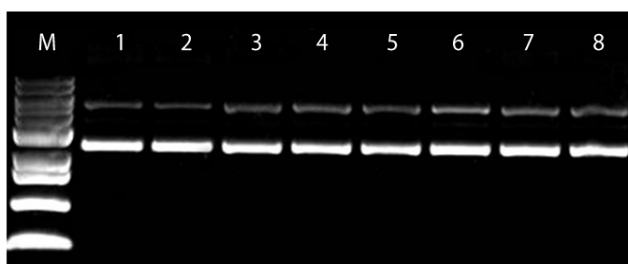


Figure 2: ExiProgen™ 으로 추출한 plasmid 전기영동 이미지

M; Size marker; 1 kb DNA Ladder (D-1040, Bioneer)

lane1~8; Plasmid extraction from DH-5 α cell

pGEM vector plasmid를 삽입한 DH-5 α cell을 LB broth에 overnight 하여 배양하여 O.D._{600nm}에서 1.5 (약 1×10^9 copies/ml)의 배양액 3 ml에서 추출한 결과입니다 (동일 시료로 8회 반복).

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4381	ExiProgen™ Nano-Plus Plasmid DNA Kit, 96 preps
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 μ l (135 ng/ μ l)
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 μ l (130 ng/ μ l)
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
E-1111 ~ E2162	Restriction Enzymes
A-7020	Agaro-Power™ System

3.6. ExiProgen™ Gel Extraction Kit



ExiProgen™ Gel Extraction Kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 ExiProgen™을 이용하여 최대 500 mg의 gel에서 다양한 size의 fragment DNA를 추출하는데 있어서 매우 높은 recovery를 나타내는 제품입니다. 본 제품에 포함된 solubilization buffer 처리 후 sample loading well에 넣으면 Binding Buffer와 혼합되어 실리카 자성입자와 결합합니다. 자성입자와 결합된 핵산은 washing 과정을 거치면서 불순물이 제거되어 고순도의 fragment DNA로 추출됩니다.

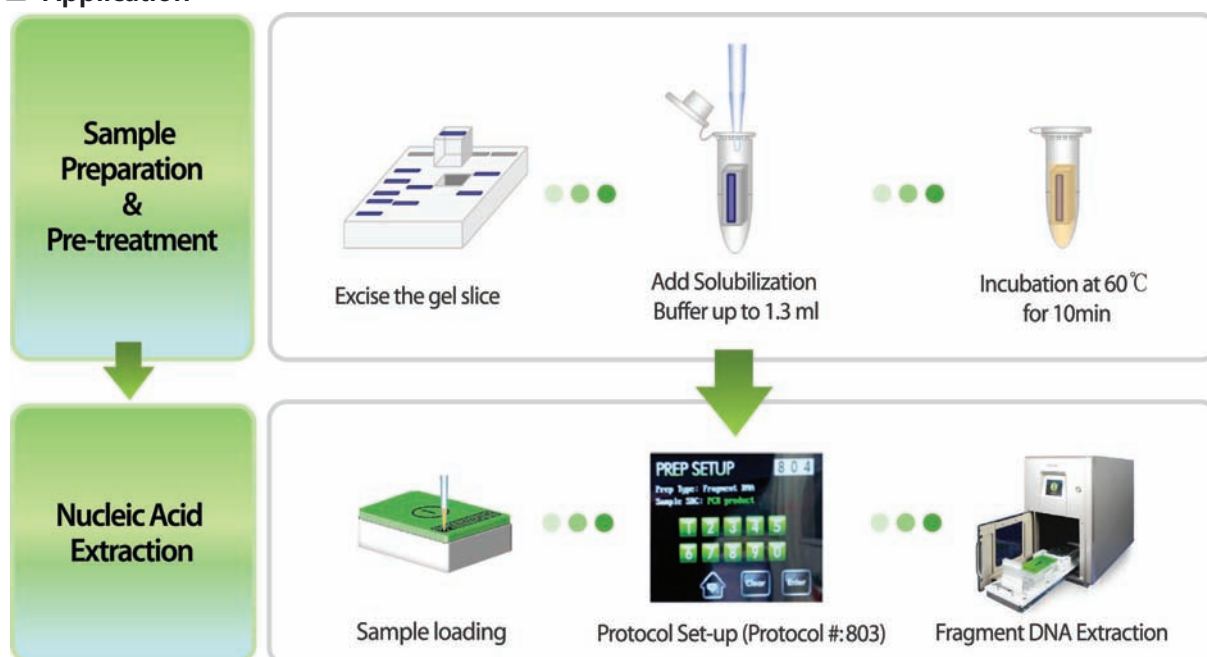
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 시약이 분주된 pre-filled buffer cartridge system 사용.
- 다양한 size의 fragment DNA 추출에 최적화된 solubilization buffer 제공.
- (주) 바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 실리카 자성입자 사용.
- 고순도, 고수율의 fragment DNA 추출 가능.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type	Sample amount	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Gel slice	~ 500 mg	> 1.8	803

■ Application



*** Pre-treatment**

정제할 gel slice를 1.5 ml microtube에 넣고 solubilization buffer를 1.3 ml까지 채워 넣습니다. 60℃에서 gel slice가 완전히 녹으면 용출액 1.3 ml를 모두 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data

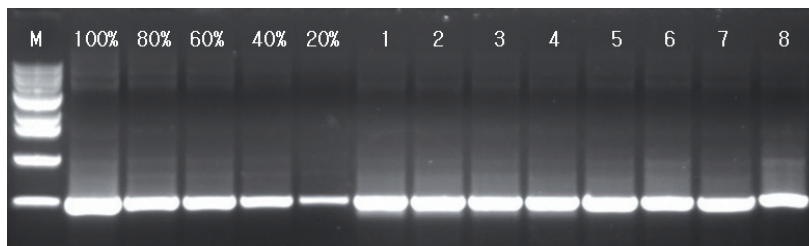


Figure 1: Gel에서 추출된 fragment DNA의 전기영동 분석 결과

Lane M; 1 kb DNA Ladder (D-1040, Bioneer),

Lane 1, 2, 3, 4; *ExiProgen™* Gel Extraction Kit (K-4391, Bioneer)

Lane 5, 6, 7, 8; Company A's kit

AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix (K-2631, Bioneer)와 *MyGenie™* 96 Gradient Thermal Block (A-2040-1, Bioneer)를 사용하여 PCR 수행 후 예상 크기가 500 bp인 DNA를 합성하였습니다. 합성된 시료를 1% agarose gel에서 전기영동 후 500 mg이 되도록 gel을 잘라 자사 제품 및 경쟁사의 gel extraction kit를 사용하여 추출 후 전기영동을 수행하여 성능을 비교하였습니다. 전기영동 결과상에서 성능을 보다 객관적으로 확인하기 위하여 좌측에 시료 사용량의 100%~20%에 해당하는 계산수치상의 양을 전기영동 수행하였습니다. 전기영동 사진 확인 결과 500 bp 크기의 fragment DNA의 회수율은 80% 이상으로 나타났으며 각각의 순도 ($A_{260}/_{280}$)값은 모두 1.8 이상으로 나타났습니다.

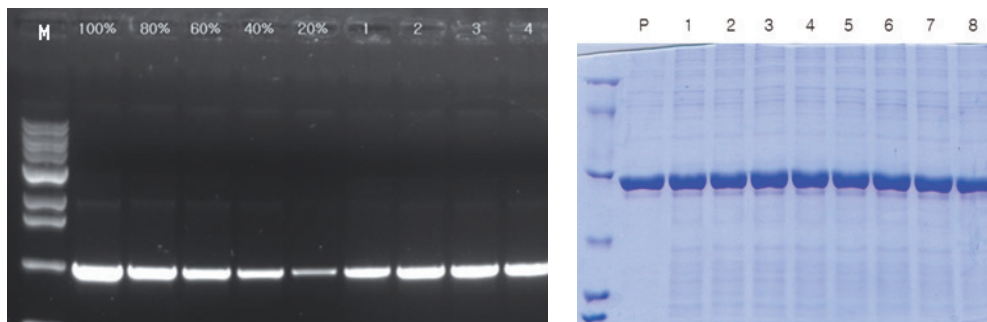


Figure 2: Gel에서 추출된 fragment DNA의 단백질 합성 결과

Lane M; 1 Kb DNA Ladder (D-1040, Bioneer), Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; *ExiProgen™* Gel Extraction Kit (K-4391, Bioneer)

P; Positive control

AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix (K-2631, Bioneer)와 *MyGenie™* 96 Gradient Thermal Block (A-2040-1, Bioneer)를 사용하여 PCR 수행 후 예상 크기가 500 bp인 DNA를 합성하였습니다. 합성된 시료를 1% agarose gel에서 전기영동 후 500 mg이 되도록 gel을 잘라 자사 제품 및 경쟁사의 gel extraction kit를 사용하여 추출 후 전기영동을 수행하여 성능을 비교하였습니다. 이 후 추출한 fragment DNA로 *ExiProgen™* EC Protein Synthesis Kit (K-7302, Bioneer)를 사용해 단백질 합성을 시도하여 합성에 문제가 없는지 확인하였습니다. 대조군과 비교해 볼 때 단백질 합성에 이상이 없음을 확인하였습니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4391	ExiProgen™ Gel Extraction Kit, 96 preps
K-2631	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix, 96 tubes
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
E-1111 ~ E2162	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7103	AccuPower® Ligation PreMix, 96 tubes, 0.2 ml 8-tube strip, 96tubes, 20 µl reaction/tube
A-2040-1	MyGenie™ 96 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™
A-7020	Agaro-Power™ System

● **AccuPower® Taq PCR PreMix**

동결건조 타입으로 탁월한 안정성과 재현성 제공

AccuPower® Taq PCR PreMix 는 바이오니아의 특허기술(등록특허 KR 10-0162270-0000)인 동결건조 방식으로 DNA polymerase, dNTPs 및 reaction buffer등 PCR수행에 필요한 구성성분을 1회 분량씩 혼합한 제품입니다. 실험자는 template DNA, primers 및 PCR grade water만 첨가함으로써 PCR 반응을 수행할 수 있습니다. 또한 안정화 물질이 첨가되어있어 냉동 보관 할 경우에는 2년 동안 활성이 안정적으로 유지되는 획기적인 제품 입니다.



3.7. ExiProgen™ PCR Purification Kit



ExiProgen™ Purification Kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 ExiProgen™을 이용하여 PCR 반응물을 비롯한 다양한 효소 반응물로부터 각종 불순물들을 완벽히 제거하여 고순도의 fragment DNA를 정제할 수 있도록 개발된 제품입니다. 본 제품에 포함된 Binding Buffer를 첨가 후 sample loading well에 넣으면 실리카 자성입자를 이용해 핵산을 결합합니다. 자성입자와 결합된 핵산은 washing buffer 처리로 불순물이 제거되어 고순도의 fragment DNA로 추출됩니다. 정제된 fragment DNA는 sub-cloning, sequencing, southern blotting, northern blotting 등 다양한 downstream 실험에 사용됩니다.

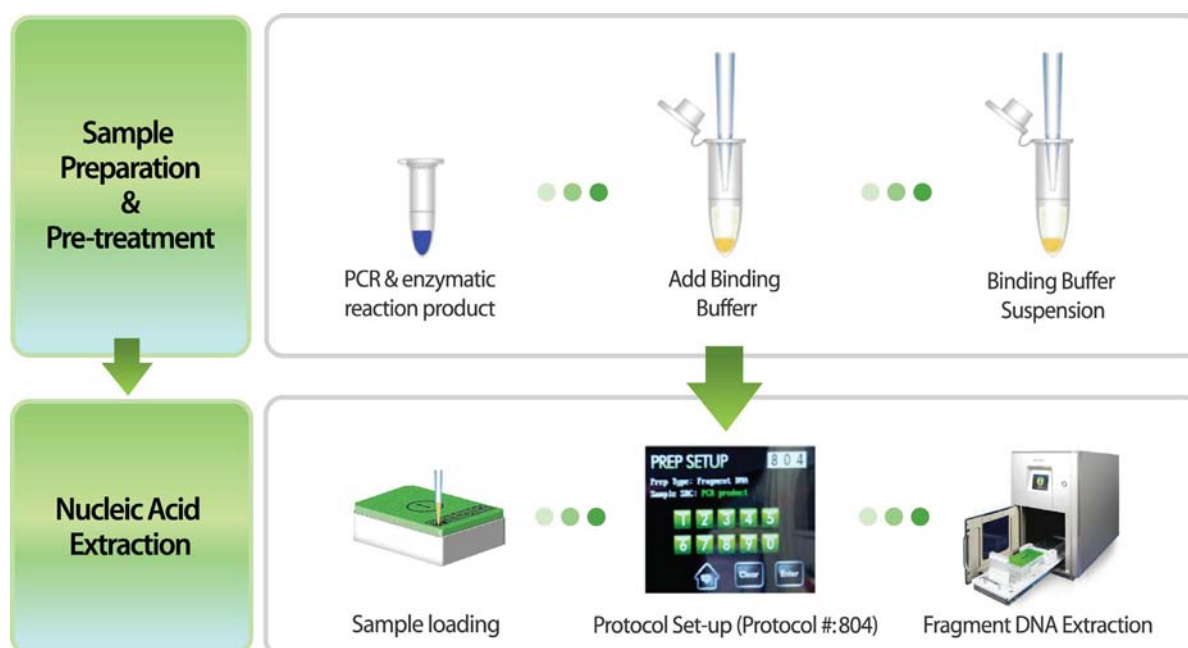
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 시약이 분주된 pre-filled buffer cartridge system 사용.
- 다양한 size의 fragment DNA 추출에 최적화된 Binding buffer 제공.
- (주)바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 실리카 자성입자 사용.
- 고순도, 고수율의 fragment DNA 추출 가능.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type	Sample amount	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
PCR product	200 µl	> 1.8	804

■ Application



*** PCR product**

PCR product에 바로 PCR Binding Buffer 0.5 ml를 넣고 잘 섞은 후 buffer cartridge ①의 sample loading well에 500 µl 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data

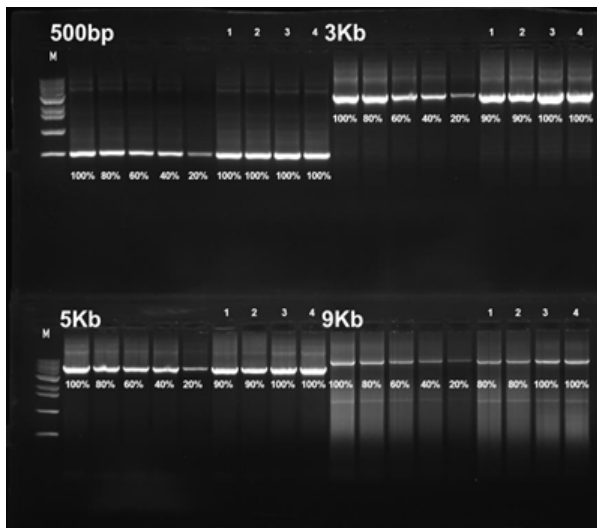


Figure 1: PCR 반응물에서 추출된 fragment DNA의 전기영동 분석결과

Lane M; 1 kb DNA Ladder (D-1040, Bioneer), Lane 1, 2; Company A's kit, Lane 3, 4; ExiProgen™ PCR purification kit (K-4392, Bioneer).

AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix (K-2632, Bioneer)와 MyGenie™ 96 Gradient Thermal Block (A-2040-1, Bioneer)를 사용하여 PCR 수행 후 예상 크기가 500 bp, 3 kb, 5 kb, 9 kb인 DNA를 합성하였습니다. 합성된 시료를 자사 제품 및 경쟁사의 PCR purification kit를 사용하여 추출 후 전기영동을 수행하여 성능을 비교하였습니다. 전기영동 결과상에서 성능을 보다 객관적으로 확인하기 위하여 좌측에 시료 사용량의 100% - 20%에 해당하는 수치상의 DNA양으로 전기영동을 수행하여 비교하였습니다. 전기영동 사진 확인 결과 500 bp 크기의 fragment DNA의 회수율은 80% 이상으로 나타났으며 각각의 순도 ($A_{260/280}$) 값은 모두 1.8 이상으로 나타났습니다.

■ Related Products

Cat no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4392	ExiProgen™ PCR Purification Kit, 96 preps
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2012	AccuPower® PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	MyGenie™ 96 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™
A-7020	Agaro-Power™ System

3.8. ExiProgen™ Tissue total RNA Kit



ExiProgen™ Tissue total RNA Kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 ExiProgen™을 이용하여 동물 조직 시료로부터 고수율, 고순도의 total RNA를 추출할 수 있는 제품입니다. 본 제품에 포함된 사용설명서에 따라 Tissue Lysis Buffer ①을 이용하여 동물 조직 시료 전처리를 수행합니다. 시료 전처리가 완료된 샘플에 Tissue Lysis Buffer ②를 넣고 잘 섞어준 후 4℃, 13,000 rpm에서 15 분간 원심분리를 수행합니다. 본 과정을 통해 lysis된 cell debris와 denature 된 protein, chromosomal DNA가 제거됩니다. 이때 하얀색의 막이 형성되는데 이 막을 손상시키지 않은 채 상층액을 조심스럽게 취하여 sample loading well에 넣으면 binding buffer와 혼합되어 실리카 자성입자와 결합합니다. 자성입자와 결합된 핵산은 washing 과정을 거치면서 불순물이 제거되어 고순도의 RNA로 추출됩니다.

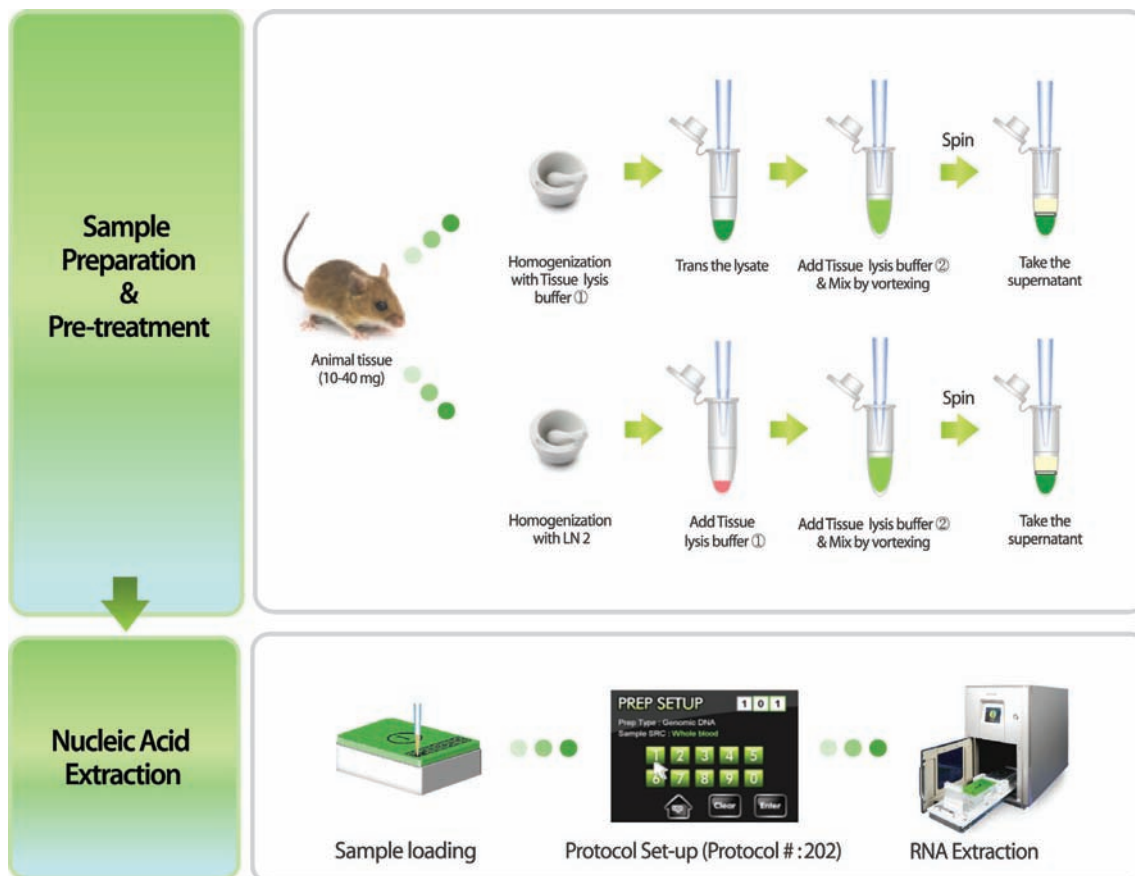
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 시약이 분주된 pre-filled buffer cartridge system 사용.
- 핵산 추출에 필요한 disposable filter tip, elution tube 등 소모품류 함께 제공.
- 다양한 종류의 animal tissue sample의 lysis에 최적화된 Tissue Lysis Buffer 제공.
- 바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 실리카 자성입자 사용.
- 전자동 핵산 추출장비(ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Liver	15 mg	25 µg	> 1.9	202
Eye-ball	1 ea	10 µg	> 1.9	
Brain	20 mg	8.5 µg	> 1.9	
Tail-tip	15 mg	4 µg	> 1.9	

■ Application



* 막자사발을 이용한 방법

액체질소와 막자사발을 이용하여 20 mg의 조직을 파쇄한 후 1.5 ml tube에 넣고 Tissue Lysis Buffer ① 400 μ l를 첨가하여 15초간 vortex합니다. Tissue Lysis Buffer ② 200 μ l를 첨가하여 15초간 vortex하고 얼음에서 5분간 둡니다. 4°C 로 12000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액 200 μ l를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

* 기계적 파쇄를 이용한 방법

최소 얼음 위에서 20 mg의 조직을 Tissue Lysis Buffer ① 400 μ l를 첨가하여 Tissue Ruptor 등의 기계 믹서 혹은 Bead Crusher 로 파쇄한 후 Tissue Lysis Buffer ② 200 μ l를 첨가하여 15초간 vortex하고 얼음에서 5분간 둡니다. 4°C 로 12000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액 200 μ l를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data

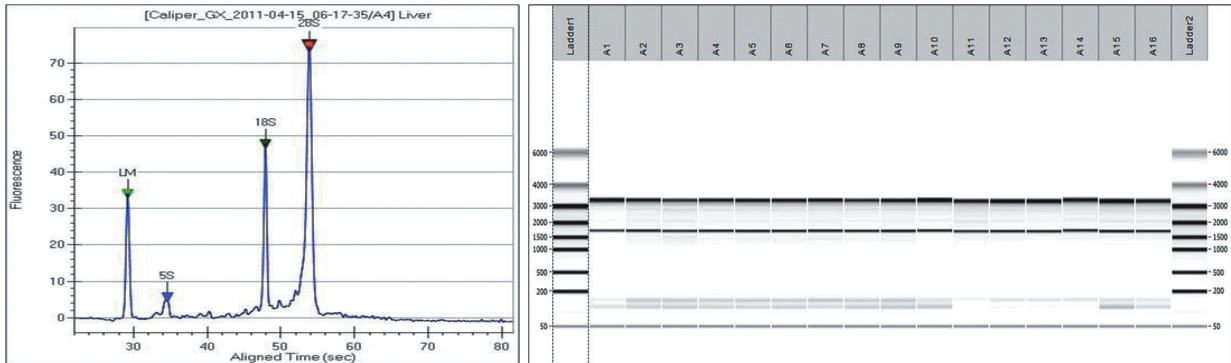


Figure 1: Rat의 조직에서 추출된 total RNA의 분석 결과

Rat liver sample (15 mg)로부터 total RNA를 추출한 후 LabChip GX (Caliper Life Science)를 이용하여 추출된 RNA의 quality를 분석한 결과입니다. rRNA의 각 subunit이 잘 관찰되는 것으로 보아 total RNA 추출 과정 중 RNA의 분해 없이 온전하게 RNA가 추출되었음을 알 수 있습니다. 또한, 수율은 평균 25 µg이며 평균 RQS는 9.5 이상으로 나타났습니다.

- RQS (RNA Quality Score): 추출된 RNA의 quality를 수치화하여 나타낸 값으로 각 rRNA 피크의 높이 및 넓이, 분해된 RNA fragment 피크 등을 종합적으로 계산하여 표시합니다. Agilent사에 의해 개발된 RIN (RNA Integrity Number)와 동일한 개념이며, 보통 0부터 10까지 수치로 나타내는데 10에 가까울수록 RNA의 quality가 좋은 것으로 판단할 수 있습니다.

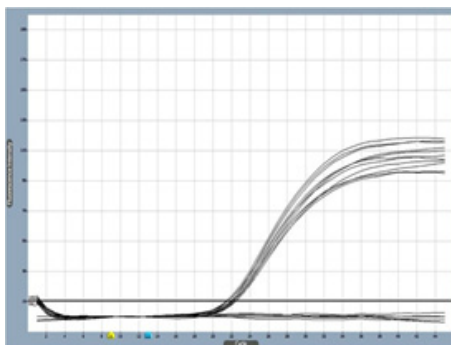


Figure 2: 추출된 total RNA를 이용한 RT-PCR 결과

Rat liver sample 15 m으로부터 total RNA를 추출한 후 Accuowr® RocketScript™ RT PreMix (K-2101, Bioneer)와 AccuPower® Dualstar™ qPCR PreMix (K-6110, Bioneer) 그리고 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (A-2060)를 이용하여 RT-qPCR을 수행한 결과입니다.

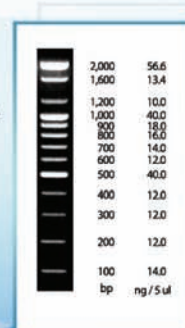
■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4342	ExiProgen™ Tissue total RNA Kit, 96 preps
KA-7030	Tissue Homogenization Set (Mixer, Sticks, and Tubes), 100 reactions
KA-7031	Tissue Homogenization Sticks, 100 ea
KA-7032	Tissue Filter Tubes, 100 ea
KA-7033	Tissue Mixer
KB-0111	Proteinase K Powder, 25 mg x 2 ea
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2101	AccuPower® RocketScript™ RT PreMix, 96 tubes
K-2501	AccuPower® RocketScript™ RT-PCR PreMix, 96 tubes
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	MyGenie™ 96 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™
A-7020	Agaro-Power™ System

● AccuLadder™ DNA ladder

선명하고 정확한 size maker

넓은 size range로 다양 size의 DNA를 정확하게 구분할 수 있으며 상온에서도 안정적으로 보관이 가능한 Molecular size marker 제품입니다. 10bp의 짧은 DNA도 매우 정확하고 선명하게 확인이 가능할 뿐 아니라 25kb의 Long size를 갖는 DNA도 Agarose gel에서 정확하게 확인이 가능합니다. TBE 및 TAE buffer 모두 사용이 가능합니다. 바이오니아의 Molecular size marker는 다양한 size와 선명하고 정확하게 Size를 구분할 수 있는 획기적인 제품입니다.



3.9. ExiProgen™ Plant total RNA Kit



ExiProgen™ Plant total RNA Kit는 전 자동 핵산 추출 장비인 ExiProgen™ 을 이용하여 leaf tissue, root, flower, seed 등 다양한 종류의 식물 시료로부터 고수율, 고순도의 total RNA를 추출할 수 있는 제품입니다. 본 제품에 포함된 사용설명서에 따라 전처리가 완료된 식물 시료를 sample loading well에 넣으면 binding buffer와 혼합되어 실리카 자성입자와 결합합니다. 자성입자와 결합된 핵산은 washing 과정을 거치면서 불순물이 제거되어 고순도의 RNA로 추출됩니다.

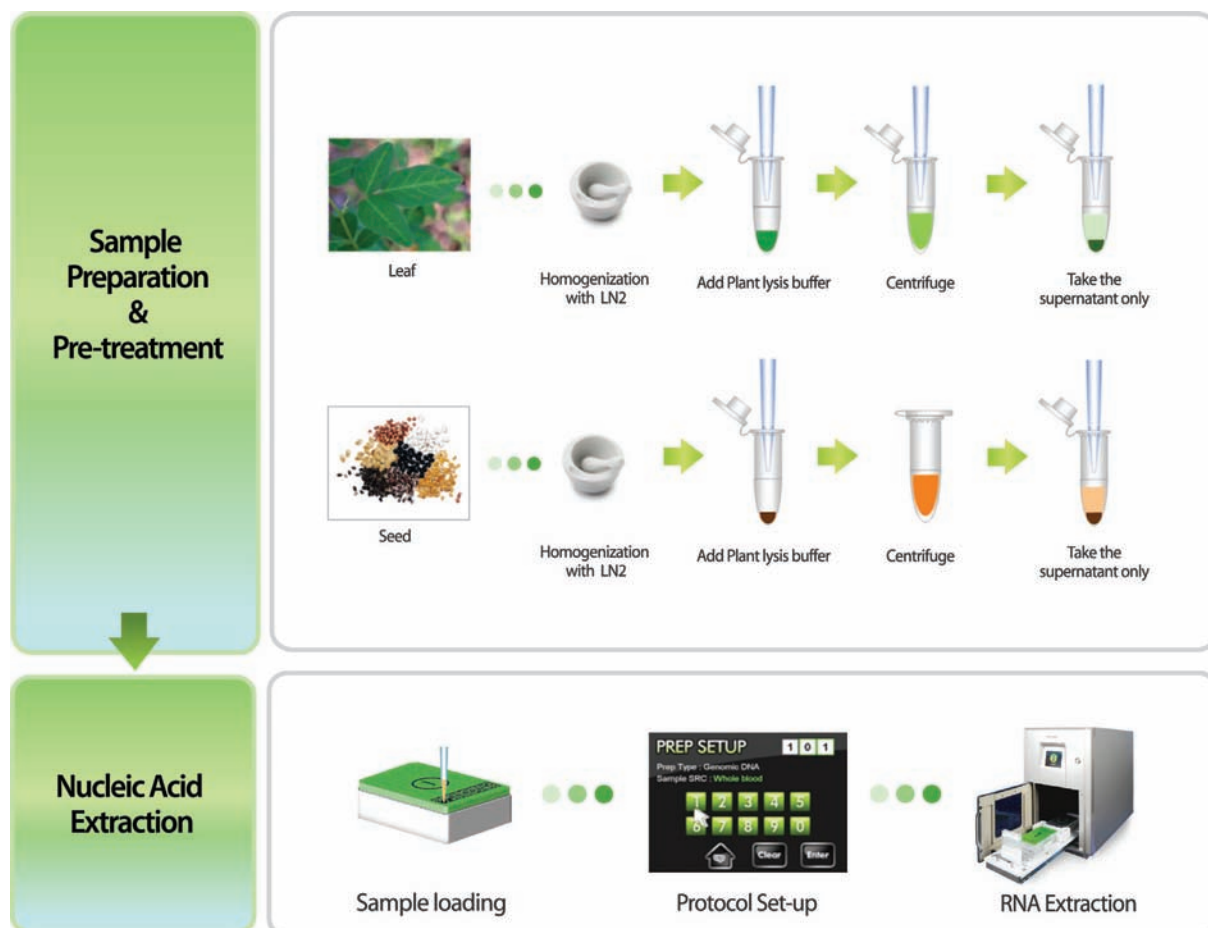
■ Features and Benefits

- 핵산 추출에 필요한 시약이 분주된 pre-filled buffer cartridge system 사용.
- 핵산 추출에 필요한 disposable filter tip, Elution tube 등 소모품류 함께 제공.
- 다양한 종류의 식물 시료에 최적화된 Plant Lysis Buffer 제공.
- 바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 실리카 자성입자 사용.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Specification

Sample type		Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Plant Tissue	벼잎	Up to 100 mg wet weight, 20 mg dry weight	Up to 3 µg	>9.5	204
	브로콜리		Up to 5 µg	>9.5	
	배추		Up to 10 µg	>9.5	
Plant Seed	옥수수	Up to 100 mg wet weight, 20 mg dry weight	Up to 5 µg	>9.5	205
	배추		Up to 10 µg	>9.5	
	콩		Up to 10 µg	>9.5	

■ Application



* Plant tissue, Seed

액체질소를 이용하여 100 mg의 식물조직을 파쇄하고 tube에 넣습니다. 샘플이 담긴 tube에 Proteinase K (20 mg/ml) 20 µl와 Plant Lysis buffer 300 µl를 넣습니다. 60°C에서 최소 1시간 shaking incubation 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리합니다. 분리된 상층액 200 µl를 sample loading well 에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data

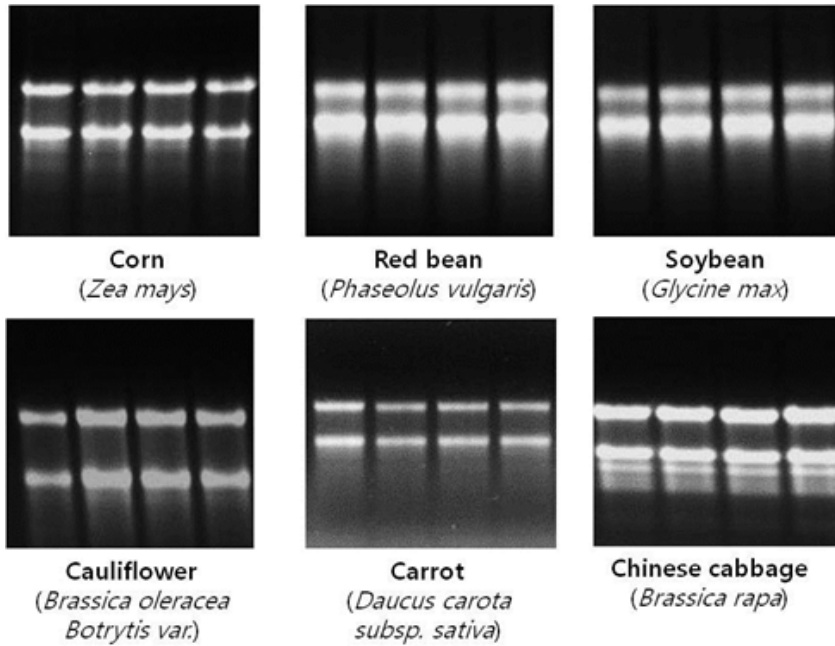


Figure 1: 다양한 식물 시료에서 추출된 total RNA의 분석 결과

다양한 식물 시료로부터 total RNA를 추출한 후 agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. rRNA의 각 subunit이 잘 관찰되는 것으로 보아 total RNA 추출 과정 중 RNA의 분해 없이 intact하게 RNA가 추출되었음을 알 수 있습니다.



Figure 2: 식물 시료에서 추출된 total RNA의 LabChip GX 분석 결과

식물 조직으로부터 total RNA를 추출한 후 LabChip GX (Caliper Life Science)를 이용하여 추출된 RNA의 quality를 분석한 결과입니다. rRNA의 각 subunit이 잘 관찰되는 것으로 보아 total RNA 추출 과정 중 RNA의 분해 없이 intact하게 RNA가 추출되었음을 알 수 있습니다. 또한, 수율은 평균 10 µg 이며 평균 RQS는 9.5 이상으로 나타났습니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4344	ExiProgen™ Plant total RNA Kit, 96 preps
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2101	AccuPower® RocketScript™ RT PreMix, 96 tubes
K-2501	AccuPower® RocketScript™ RT-PCR PreMix, 96 tubes
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	MyGenie™ 96 Thermal Block
A-7040	ExiSpin™
A-7020	Agaro-Power™ System

● **AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix**

Real Time PCR(SYBR green I dye)에 최적화된 키트

AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix는 SYBR Green I dye, 반응 버퍼, dNTPs, 안정화제, Thermostable DNA polymerase와 바이오니아의 Hot-start PCR 기술(등록특허 KR 10-0292883, US 12682456)인 Thermostable 이용한 enzyme-mediated Hotsart 기술이 적용된 Real Time PCR 제품입니다. q-PCR에 필요한 모든 시약을 한 튜브에 동결 건조시킨 제품으로 ready-to-use PreMix 제품입니다. 또한, 본 제품에 사용된 화학적 안정화제는 -20 °C에서 보관할 때 2년까지 효소의 활성을 유지시킵니다.

AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix는 사용자가 원하는 target gene과 primer만을 첨가하여 실험할 수 있는 편리성과 특이성, 고효율을 보이는 q-PCR Kit로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있습니다.



3.10. ExiProgen™ Viral DNA/RNA Kit

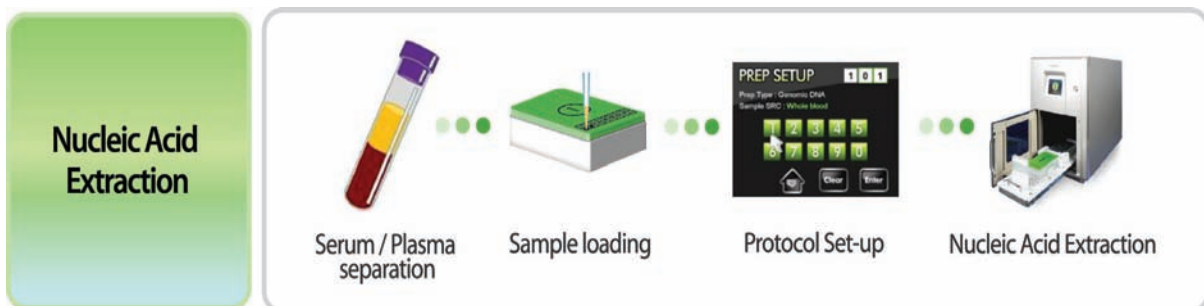


ExiProgen™ Viral DNA/ RNA Kit는 전자동 핵산추출장비인 ExiProgen™을 이용하여 serum, plasma, CSF, saliva 등 cell free body fluid와 swab 등 다양한 시료로부터 고순도의 Viral DNA/RNA를 추출할 수 있는 제품입니다. 본 제품에 포함된 사용설명서에는 serum, plasma, CSF, saliva 등 다양한 검체에 따라 각각 최적화된 전처리 방법이 자세히 설명되어 있습니다. Buffer Cartridge에는 추출 과정 중 바이러스 핵산의 분해 방지 및 binding 효율 증대를 위한 carrier RNA 및 효율적인 sample lysis를 위한 Proteinase K가 건조된 상태로 들어 있습니다.

■ Features and Benefits

- 핵산추출에 필요한 enzyme 및 carrier RNA, 시약들이 분주된 pre-filled buffer cartridge system 사용.
- 다양한 검체 종류에 최적화된 전처리 실험 방법 제공.
- 최소 1개부터 최대 16개까지의 샘플 시료를 사용 가능.
- 바이오니아의 독자적 기술로 개발, 생산된 실리카 자성입자 사용.
- 전자동 핵산 추출장비 (ExiProgen™)를 이용하는 제품으로 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음.

■ Application



* Storage

추출된 바이러스 핵산을 장시간 보관할 경우 -20℃에서 보관해야 합니다. 냉동 보관된 핵산을 반복적으로 냉 · 해동할 경우 핵산 분해의 원인이 될 수 있으므로 소량 분주하여 보관합니다.

■ Experimental Data

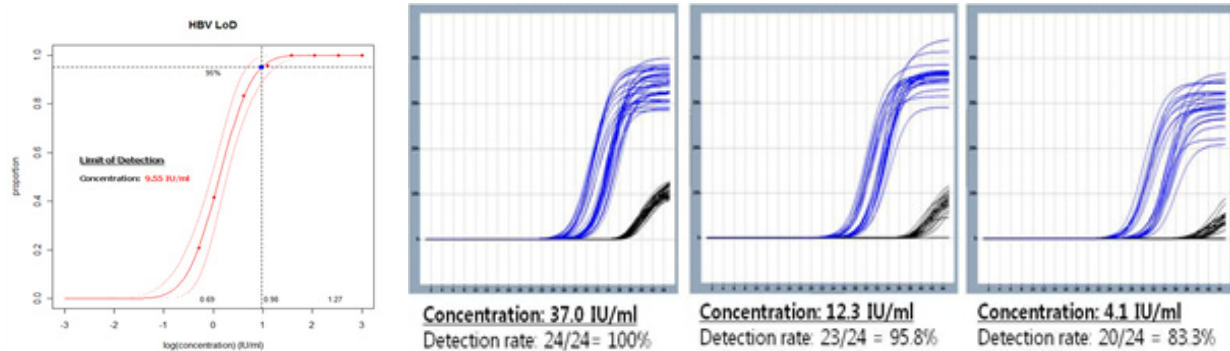


Figure 1: HBV 표준물질을 이용한 최소추출한계 확인

저농도 HBV 표준물질과 *AccuPower*® HBV Quantitative PCR Kit (HBV-1111, Bioneer), *Exicycler*™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (A-2060, Bioneer)을 이용하여 추출 효율을 확인한 결과 10 IU/ml 이하의 저농도 바이러스도 높은 효율로 추출됩니다.

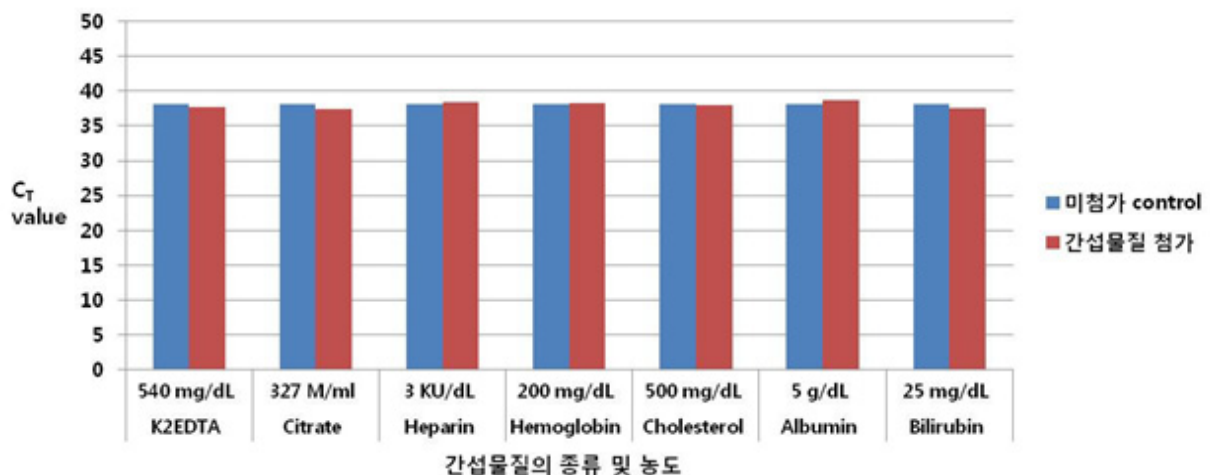


Figure 2: Body fluid에 포함된 impurity의 제거 확인 결과

혈액 내 포함될 수 있는 다양한 물질과 혼합된 저농도 샘플 (30 IU/ml HBV)을 추출하여 Real-Time PCR 결과에 미치는 영향을 확인 하였습니다. *AccuPower*® HBV Quantitative PCR Kit (HBV-1111, Bioneer)와 *Exicycler*™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (A-2060, Bioneer)을 이용하여 추출한 eluant를 증폭한 결과 control 표준물질과 간섭물질이 포함된 표준물질의 ΔCt 값이 0.70이며, 고순도 viral DNA가 추출된 것을 확인할 수 있습니다.

■ **Related Products**

Cat. no.	Products
A-5041	<i>ExiProgen™</i>
K-4371	<i>ExiProgen™</i> Viral DNA/RNA Kit, 96 preps
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2101	<i>AccuPower® RocketScript™</i> RT PreMix, 96 tubes
K-2501	<i>AccuPower® RocketScript™</i> RT-PCR PreMix, 96 tubes
K-2012	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	<i>MyGenie™</i> 96 Thermal Block
A-2060	<i>Exicycler™</i> 96 Real-Time Quantitative Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i>
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

4. Application

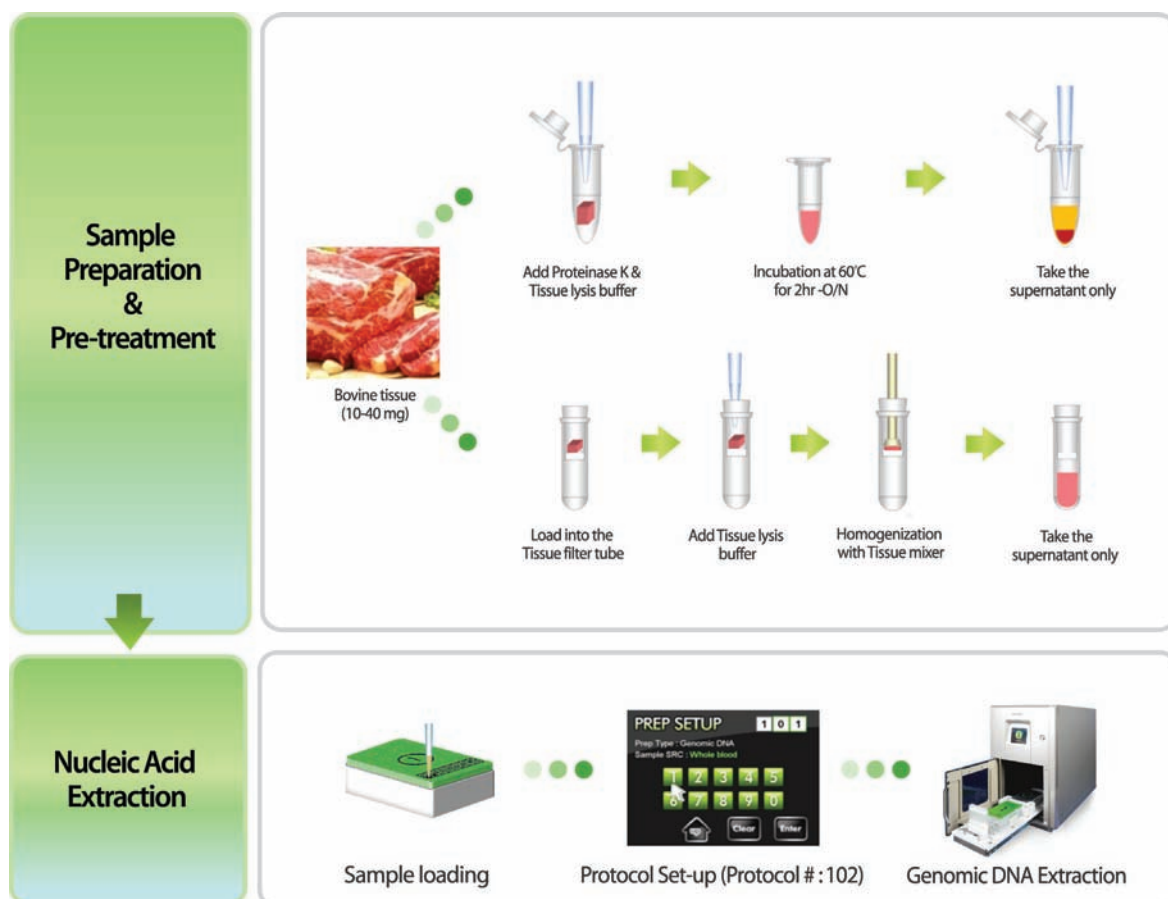
4.1 ExiProgen™을 이용한 소고기 조직의 genomic DNA 추출

한우판별 검사에서 이용하는 소고기 조직의 genomic DNA를 추출하기 위하여 ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit를 사용합니다. 소고기 시료로부터 genomic DNA를 매우 효율적으로 추출할 수 있도록 최적화된 lysis buffer를 비롯하여 genomic DNA 추출에 필요한 효소 (Proteinase K, RNase A) 및 시약들이 분주된 buffer cartridge가 제공됩니다.

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Bovine Muscle	10~40 mg	Up to 10 µg	> 1.8	102

■ Application



* 연한 조직

조직 25 mg을 1.5 ml tube에 넣고 20 µl Proteinase K (20 mg/ml)와 Tissue Lysis Buffer 400 µl를 첨가하여 60°C에서 incubation

합니다. 조직이 완전히 분해되면 8,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액 200 µl를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

* Tissue Homogenization Set 이용

Tissue filter tube에 조직 25 mg을 넣은 다음 Tissue lysis buffer 100 µl를 먼저 첨가하여 Tissue Homogenizer로 샘플이 튀지 않도록 주의하며 갈아줍니다. 조직이 완전히 갈아지면 Tissue Lysis Buffer 100 µl를 추가로 더 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 filter를 통과한 용액 200 µl를 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data

M S B S B S B S B S B S B S B S B



Figure 1: 소고기 조직 시료에서 추출된 genomic DNA의 전기영동 분석 결과

M; Size marker (1 kb DNA Ladder, D-1040, Bioneer)

S; Extraction with bovine tissue sample

B; Extraction with D.W. only

소고기 조직 시료 (40 mg)으로부터 genomic DNA를 추출한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. Genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination 발생 여부를 확인하기 위해 소고기 조직 시료를 cross로 넣고 나머지 well에는 D.W.만 넣은 후 genomic DNA 추출을 진행하였습니다. 실험 결과 genomic DNA 추출 과정 중 cross-contamination은 발생되지 않았으며 추출된 genomic DNA의 수율은 평균 10 µg, 순도($A_{260/280}$)는 평균 1.8 이상으로 나타났습니다.

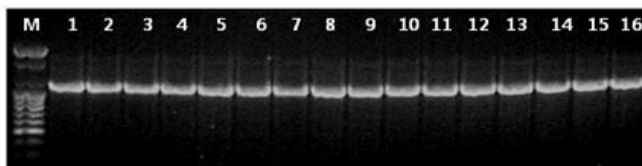


Figure 2: 소고기 조직의 genomic DNA에서 GAPDH 유전자를 증폭한 결과

소고기 조직 (40mg)에서 genomic DNA를 추출한 후, MyGenie™ 96 Thermal Block (A-2040-1)을 이용하여 GAPDH 유전자를 증폭한 후 1% agarose gel로 확인한 결과입니다. 16개의 샘플에서 모두 동일한 사이즈 (1kb)에서 증폭되어 높은 재현성을 확인할 수 있습니다.

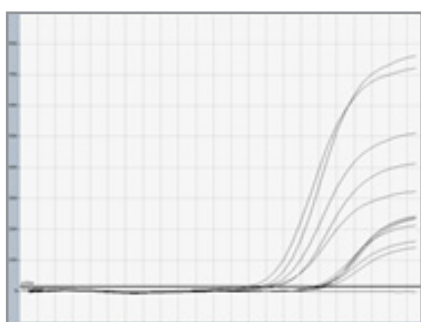


Figure 3: Real-Time PCR을 이용하여 한우 판별 결과

Black; FAM - 한우판별 probe

ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit를 이용하여 추출한 genomic DNA를 template로 한우판별 marker 증폭한 결과입니다.

판별 marker 유전자를 포함하고 있는 샘플의 경우 signal이 detection 됩니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	<i>ExiProgen™</i>
K-4312	<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit, 96 preps
KA-7030	Tissue Homogenization Set (Mixer, Sticks, and Tubes), 100 reactions
KA-7031	Tissue Homogenization Sticks, 100 ea
KA-7032	Tissue Filter Tubes, 100 ea
KA-7033	Tissue Mixer, 1 ea
KB-0111	Proteinase K Powder, 25 mg x 2 ea
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2012	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	<i>MyGenie™</i> 96 Thermal Block
A-2060	<i>Exicycler™</i> 96 Real-Time Quantitative Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i>
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System

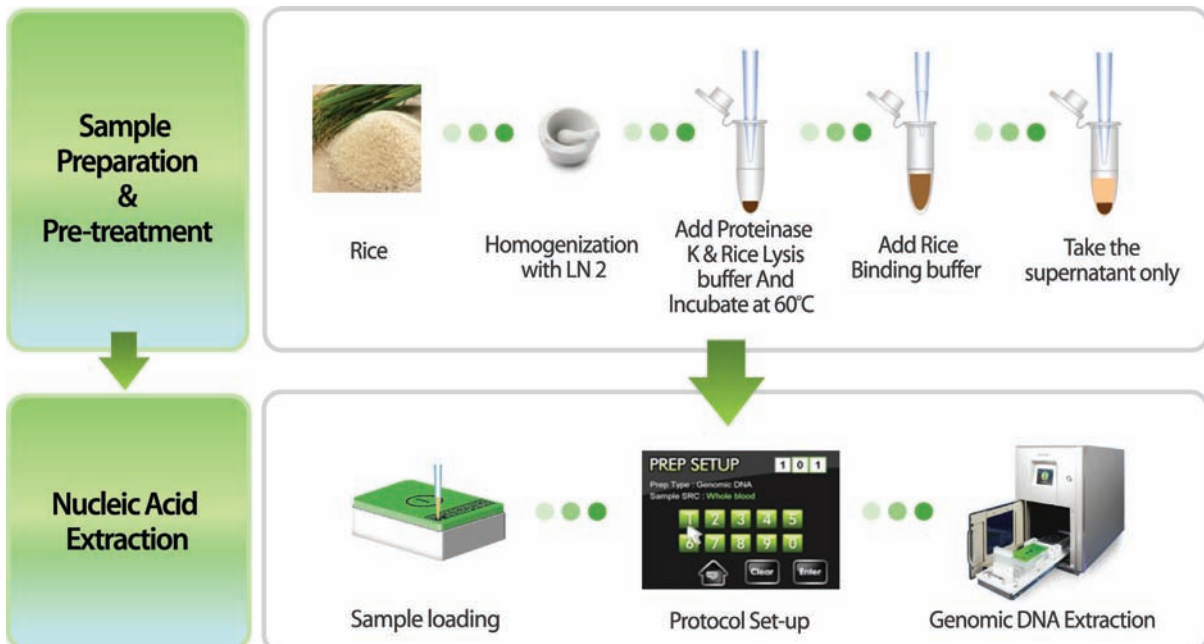
4.2 ExiProgen™ 이용한 쌀 종자 genomic DNA 추출

쌀 품종 판별을 위하여 genomic DNA를 추출할 경우 자동핵산추출장비인 ExiProgen™ 과 ExiPrep™ Rice Genomic DNA (K-3200-CR)를 사용할 수 있습니다. 쌀 시료로부터 genomic DNA를 매우 효율적으로 추출할 수 있도록 최적화된 lysis buffer와 enzyme 및 시약들이 분주된 buffer cartridge가 모두 제공되어 사용자 편의성이 극대화 되었습니다.

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Rice	10~20 mg	1~2 µg	> 1.8	106

■ Application



* 쌀알

건조된 쌀알을 막자사발을 이용하여 파쇄하거나 액체질소를 이용하여 파쇄한 후 각각 tube에 넣습니다. 샘플에 담긴 tube에 제공된 Proteinase K (20 mg/ml) 20 µl와 Rice Lysis Buffer 400 µl를 넣습니다. 60°C에서 최소 30분간 shaking incubation 하여 쌀 조직이 분해되면 Rice Binding Buffer를 200 µl를 넣고 강하게 vortex합니다. 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 분리된 상층액을 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

Experimental Data

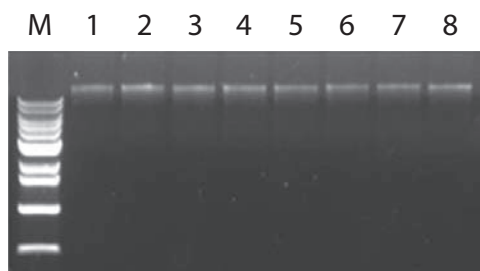


Figure 1: 쌀에서 추출된 genomic DNA의 전기영동 분석 결과

M; Size marker (1 kb DNA Ladder, D-1040, Bioneer)

Lane 1-8; Extraction with rice samples

도정된 백미 시료로부터 genomic DNA를 추출한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다

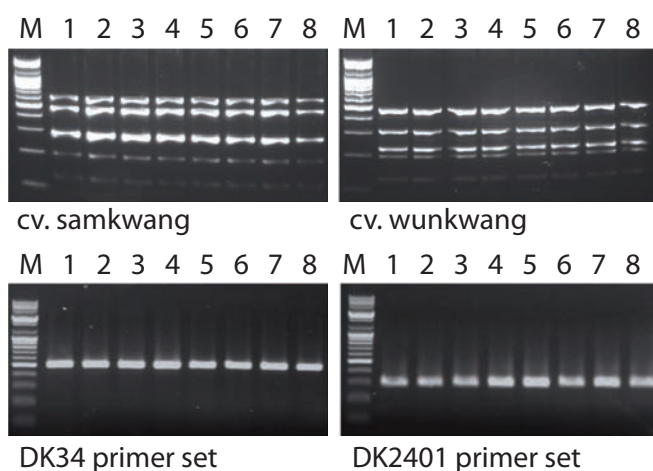


Figure 2: 쌀에서 추출된 genomic DNA를 이용한 PCR 결과

M; Size marker (100 bp DNA Ladder, D-1030, Bioneer)

Lane 1-8; PCR product with extracted genomic DNA

추출된 genomic DNA를 이용하여 각각의 PCR primer set로 PCR을 수행한 후 1% agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과입니다. 삼광, 운광 품종에 대한 marker size band가 정확히 확인되며 DK34, DK2401 marker size도 일치합니다.

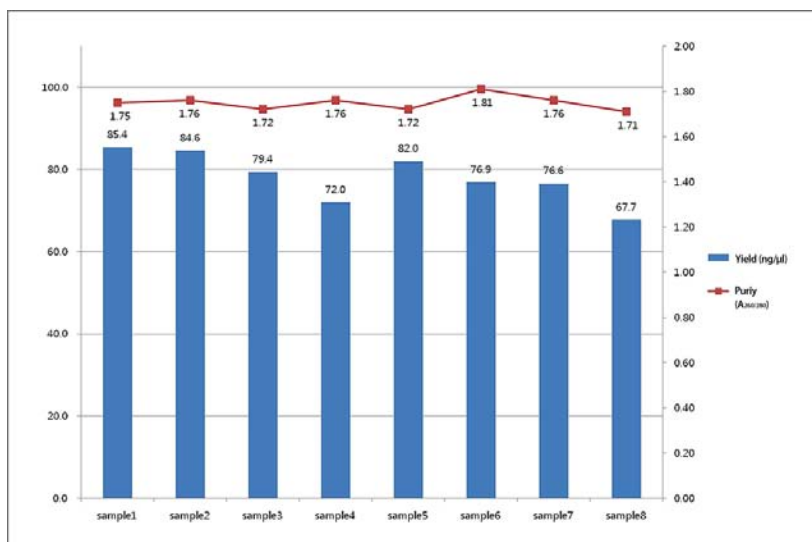


Figure 3: ExiProgen™ Rice Genomic DNA Kit를 이용한 genomic DNA의 추출 재현성

자동화장비 ExiProgen™을 이용하여 동일한 샘플(쌀알 10 mg)을 16개 각각의 sample loading well에 넣어 추출한 genomic DNA의 농도와 순도를 측정한 결과입니다. 모든 샘플의 농도와 순도는 각각 21.8%, 1.8%의 CV 값으로 높은 재현성을 보입니다.

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	<i>ExiProgen™</i>
K-3200-CR	<i>ExiPrep™</i> Rice Genomic DNA Kit, 96 preps
KB-0111	Proteinase K Powder, 25 mg x 2 ea
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2012	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	<i>MyGenie™</i> 96 Thermal Block
A-2060	<i>Exicycler™</i> 96 Real-Time Quantitative Thermal Block
A-7040	<i>ExiSpin™</i>
A-7020	<i>Agaro-Power™</i> System
K-2010 ~ K-2017	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix
K-2018 ~ K-2018-1	<i>AccuPower®</i> PCR Master mix
K-2611 ~ K-2614	<i>AccuPower® PyroHotStart Taq</i> PCR PreMix
K-2631 ~ K-2634	<i>AccuPower® ProFi Taq</i> PCR PreMix
K-2022 ~ K-2027	<i>AccuPower® Pfu</i> PCR PreMix
K-6100 ~ K-6104	<i>AccuPower® DualStar™</i> qPCR PreMix
K-6200 ~ K-6214	<i>AccuPower® Greenstar™</i> qPCR PreMix
K-6251 ~ K-6254	<i>AccuPower® 2X Greenstar™</i> qPCR Master Mix
K-6600 ~ K-6603	<i>AccuPower® Plus DualStar™</i> qPCR PreMix

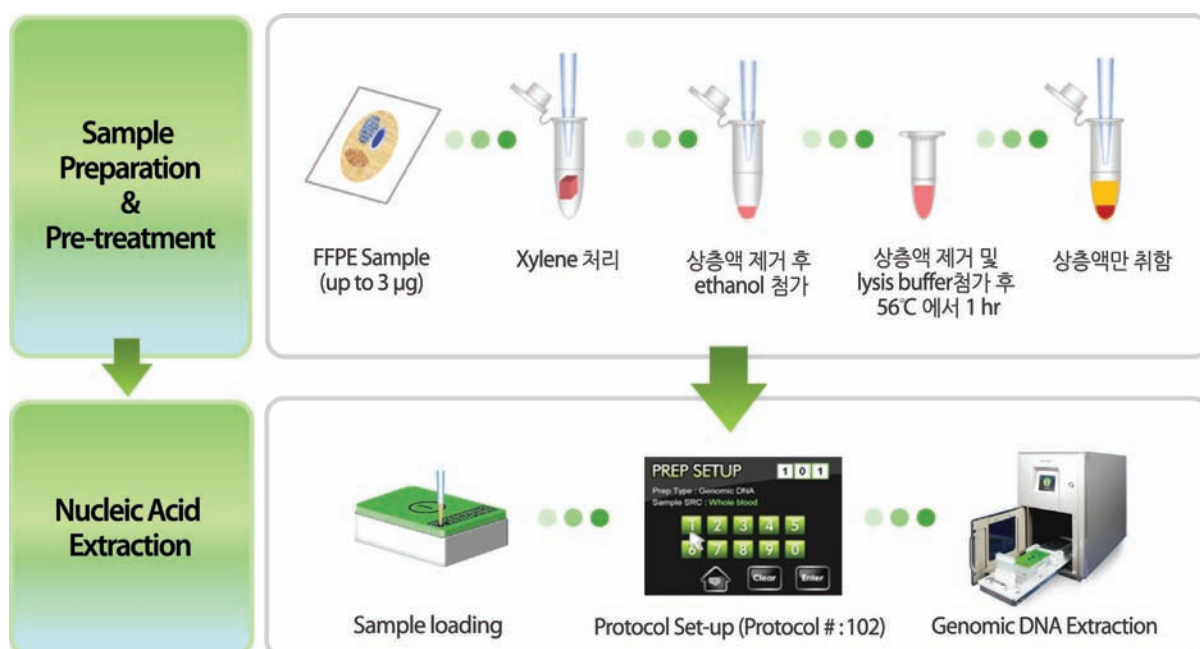
4.3 ExiProgen™을 이용한 paraffin embedding sample에서의 genomic DNA 추출

ExiProgen™ Tissue Genomic DNA kit를 사용하여 조직검사를 위한 FFPE sample에서 genomic DNA를 추출할 수 있습니다.

■ Specification

Sample type	Sample amount	DNA yield	Ratio OD _{260/280nm}	Protocol no.
Tissue Paraffin ribbon	1 Slide	Up to 3 µg	> 1.8	102

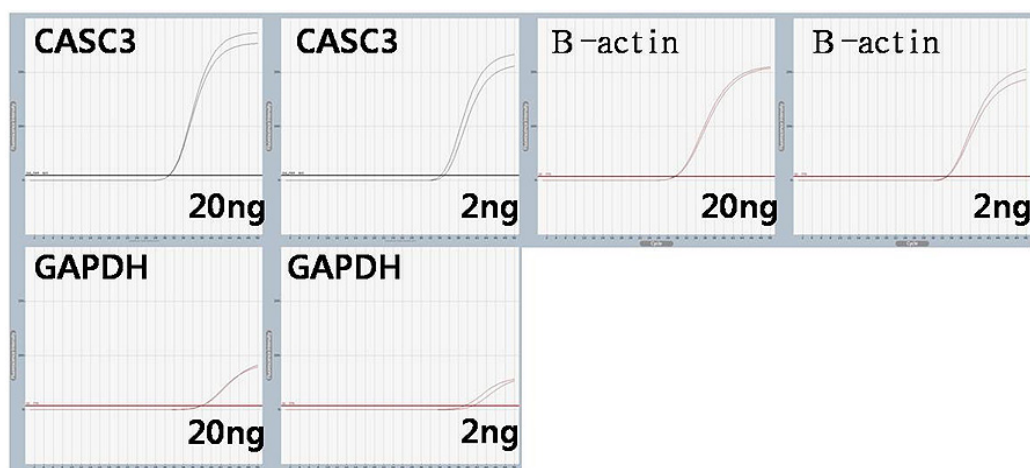
■ Application



* FFPE Slide 시료

FFPE Slide 시료 (~ 3 µg)를 1.5 ml tube에 옮기고, 1 ml의 xylene을 넣어 10초간 강하게 섞은 후 2분간 실온에서 13,000 rpm 이상으로 원심분리 합니다. 상층액을 제거한 후, 1 ml의 ethanol을 넣고 잘 섞어 줍니다 (vortex). 다시 실온에서 2분간 13,000 rpm 이상으로 원심분리하여 상층액을 제거하고 뚜껑을 연 상태로 10분간 실온에 두어 남아 있는 ethanol을 증발시켜 제거합니다. ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit의 lysis buffer 200 µl와 Proteinase K 20 µl를 사용하여 56도에서 1시간 incubation하고, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 분리된 상층액을 sample loading well에 넣고 추출을 시작합니다.

■ Experimental Data



	CASC3				B-actin				GAPDH			
	20 ng		20 ng		20 ng		20 ng		20 ng		20 ng	
Ct	30.9	31.0	34.2	35.0	29.5	29.6	33.1	32.9	38.0	38.0	39.4	41.1
Mean	31.0		34.6		29.5		33.0		38.0		40.3	
Cv%	0.2		1.5		0.1		0.2		0		3.0	

Figure 1: Breast cancer FFPE Slide의 genomic DNA에서 유전자를 Real-Time PCR로 증폭한 결과

Breast cancer FFPE Slide sample에서 추출한 genomic DNA로 다양한 gene을 target 으로 하여 Real-Time PCR 한 결과 입니다. PCR Inhibition 없이 원활하게 증폭됨을 확인할 수 있습니다

■ Related Products

Cat. no.	Products
A-5041	ExiProgen™
K-4312	ExiProgen™ Tissue Genomic DNA Kit, 96 preps
KB-0111	Proteinase K Powder, 25 mg x 2 ea
D-1030	AccuLadder™ 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	AccuLadder™ 1 kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-2012	AccuPower® PCR PreMix, 96 tubes, 20 µl reaction
C-9100	Agarose, 100 g
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
A-2040-1	MyGenie™ 96 Thermal Block
A-2060	Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block
A-7040	ExiSpin™
A-7020	Agaro-Power™ System

5. Troubleshooting guide

당사의 ExiProgen™ 핵산 추출 키트 류를 이용하여 핵산 추출이 잘 되지 않는 경우, 아래의 troubleshooting guide를 참조하시어 해결하시기 바랍니다. 아래의 내용은 당사의 제품을 사용하는 데 있어서 효율적인 핵산 추출을 위해 흔히 발생할 수 있는 일반적인 문제점에 대한 해결방법을 예시하고 있습니다. 아래의 모든 경우에 해당하지 않는 문제점이 있으실 경우나 특수한 시료로부터 핵산추출 문제에 대해서는 exiprep-support@bioneer.com으로 문의해 주시기 바랍니다. (단, 새로운 프로토콜 개발을 통한 고객지원은 당사의 자체적인 판단에 의해 결정되며 무상지원 대상에 해당되지 않을 수도 있다는 점을 유의하시기 바랍니다.)

1. 핵산이 추출되지 않는 경우

원인	해결방안
시료의 양이 너무 적거나 많음	사용설명서에 명시된 시료량을 사용하지 않을 경우 성능을 보장할 수 없습니다. 반드시 사용설명서에 표기된 양을 사용하여 주시기 바랍니다.
전처리 과정의 미처리	시료에 따라 별도의 전처리 과정이 필요합니다. 전처리 과정 진행시 반드시 사용설명서에 표기된 방법으로 진행하여 주시기 바랍니다.
유효기간이 지난 제품의 사용	당사의 핵산 추출 키트의 유효기간은 2년입니다. 반드시 제품 옆면에 유효기간을 확인하여 사용해 주시기 바랍니다. 유효기간의 지난 제품의 경우 성능을 보장할 수 없습니다.
부적절한 제품 보관	키트 보관 온도는 15℃ – 30℃ 입니다. 15℃ 이하에서 보관할 경우 용액내 석출이 발생할 수 있으며 30℃ 이상에서 보관할 경우 cartridge의 포장에 이상이 발생하여 오염될 수 있습니다. 제품 보관에 유의하여 주시기 바랍니다.
kit와 맞지 않는 Protocol의 사용	핵산추출 kit마다 ExiProgen™ 장비에서의 고유 protocol이 있습니다. ExiProgen™ 장비에서 사용하시는 핵산추출 kit에 적용되는 protocol 외에 다른 protocol을 선택하여 사용하시는 경우 핵산이 추출되지 않을 수 있습니다. 사용하시고자 하는 핵산추출 kit에 해당하는 protocol을 장비에서 선택하여 사용해주시기 바랍니다.
장비 오작동	장비의 성능을 개선하기 위해 ExiProgen™ 장비의 protocol 업데이트가 진행되었을 시, 재부팅하지 않고 사용하시면 장비가 오작동하여 핵산이 추출되지 않을 가능성이 있습니다. ExiProgen™ 장비의 protocol 업데이트를 하신 경우, 장비를 재부팅해주시기 바랍니다.
카트리지가 위치의 뒤바뀜	1번 cartridge와 2번 cartridge의 위치가 뒤바뀐 경우, 핵산 추출이 되지 않습니다. Base plate에 핵산추출 kit를 올바르게 위치하여 사용해주시기 바랍니다.
Tip을 Tip rack에 꽂지 않은 경우	Tip rack에 Tip을 꽂아 장비내 장착하지 않으면, 장비는 구동되나 핵산이 추출되지 않습니다. 반드시 사용설명서를 숙지하시고 Tip을 Tip rack에 꽂아 사용해주시기 바랍니다.
카트리지가 Sealing film punching을 하지 않은 경우	매뉴얼을 숙지하시고 샘플 수에 맞춰 사용하는 Tip의 위치와 일치하도록 정확한 위치의 cartridge Sealing film에 구멍을 뚫어 사용해주시기 바랍니다.
시료를 Sample loading well에 분주하지 않은 경우	시료는 반드시 Sample loading well에 분주하여야 합니다. 다른 위치에 분주할 경우, 핵산추출이 되지 않을 수 있습니다.
잘못된 위치에 Elution tube를 삽입한 경우	잘못된 elution tube rack 위치에 elution tube가 삽입된 경우 추출된 핵산을 회수할 수 없게 됩니다. 사용설명서를 숙지하시고 elution tube를 정확한 elution tube rack 위치에 삽입한 후 사용해 주시기 바랍니다.

2. 추출된 핵산의 농도 (Yield)가 낮은 경우

원인	해결방안
시료의 양이 너무 적거나 많음	사용설명서에 명시된 시료량을 사용하지 않을 경우 추출된 핵산의 농도가 낮아질 수 있습니다. 반드시 사용설명서에 표기된 양을 사용하여 주시기 바랍니다.
부적절한 전처리 과정	전처리가 필요한 시료의 경우 반드시 사용설명서에 표기된 방법에 따라 전처리를 수행하여 주시기 바랍니다. Lysis buffer를 시료에 처리시 시료가 완전히 녹지 않을 경우 추출 효율이 떨어질 수 있습니다. Lysis buffer 처리 후 가온 과정이 필요한 kit의 경우 incubation 과정 중간에 여러 차례 inverting을 실시해주시면 추출율을 높일 수 있습니다.
시료의 보관 상태 이상	시료 보관 중에 핵산이 분해되어 추출된 핵산의 농도가 낮을 수 있습니다. 가급적 신선한 시료를 사용하여 주시기 바랍니다.
Cartridge의 뒤집힘 또는 기울어짐	Cartridge 보관 및 사용 전 기울이거나 반대로 뒤집어 둔 경우, cartridge 내 용액이 cartridge 벽면 또는 윗면에 남게 되어 추출 효율에 영향을 줄 수 있습니다. 이러한 경우 cartridge를 spin down하여 용액이 cartridge 벽면 또는 윗면에 남아있지 않도록 한 후, 사용해주시기 바랍니다.
유효기간이 지난 kit의 사용	유효기간이 지난 제품의 경우 성능을 보장할 수 없습니다. 당사의 핵산 추출 kit의 유효기간은 2년입니다. 반드시 제품 옆면에 유효기간을 확인하여 사용해주시기 바랍니다.
변질된 핵산추출 kit의 사용	kit 보관 온도는 15℃ – 30℃ 입니다. 15℃ 이하에서 보관할 경우 용액내 석출이 발생할 수 있으며, 이런 경우 용액의 조성비의 변하여 추출 효율이 떨어질 수 있습니다. 30℃ 이상에서 보관할 경우 cartridge의 변형 및 용액의 변성이 발생할 수 있습니다. 보관온도에 유의하여 사용해주시기 바랍니다.
kit와 맞지 않는 protocol의 사용	핵산추출 kit마다 ExiProgen™ 장비에서의 고유 Protocol이 있습니다. ExiProgen™ 장비에서 사용하시고자 하는 핵산추출 kit에 적용되는 protocol 외에 다른 protocol을 선택하여 사용하시는 경우 핵산 추출 효율이 떨어지거나 추출이 안될 수 있습니다. 사용하시고자 하는 핵산추출 kit에 해당하는 protocol을 장비에서 선택하여 사용해주시기 바랍니다.

3. 추출된 핵산의 순도 (Purity)가 낮은 경우

원인	해결방안
유효기간이 지난 kit의 사용	유효기간의 지난 제품의 경우 성능을 보장할 수 없습니다. 당사의 핵산 추출 kit의 유효기간은 2년입니다. 반드시 제품 옆면에 유효기간을 확인하여 사용해주시기 바랍니다.
변형된 cartridge의 사용	kit 보관 온도는 15℃ – 30℃ 입니다. 30℃이상에서 보관하여 cartridge가 변형되면 elution buffer에 에탄올 및 염의 오염이 발생될 수 있습니다. 제품의 보관 온도 조건에 유의하여 주시고, 외관상 부풀어 올랐거나 휘어짐이 나타난 cartridge는 사용하지 마시기 바랍니다.
Cartridge Sealing 필름의 Punching이 불완전하게 된 경우	Cartridge Sealing 필름이 불완전하게 뚫린 경우, Tip 끝에 sealing 필름이 닿아 용액간 오염이 발생하여 수 있습니다. 사용전 cartridge Sealing 필름을 완전하게 뚫고 사용해주시기 바랍니다.
시료의 양이 너무 많음	사용설명서에 명시된 시료량을 초과하여 사용하는 경우 추출된 핵산의 순도가 낮아질 수 있습니다. 반드시 사용설명서에 표기된 양을 사용하여 주시기 바랍니다.
불충분한 전처리 과정	전처리 과정이 충분히 진행되지 않은 경우, 경우에 따라 단백질 제거가 불완전하게 진행되어 추출된 핵산의 순도가 떨어질 수 있습니다. 전처리가 필요한 시료의 경우 반드시 사용설명서에 표기된 방법에 따라 전처리를 수행하여 주시기 바랍니다
kit와 맞지 않는 protocol의 사용	핵산추출 kit마다 ExiProgen™ 장비에서의 고유 Protocol이 있습니다. ExiProgen™ 장비에서 사용하시고자 하는 핵산추출 kit에 적용되는 protocol외에 다른 protocol을 선택하여 사용하시는 경우 핵산 추출 효율 및 추출된 핵산의 순도가 떨어집니다. 반드시 사용하시고자 하는 핵산추출 kit에 해당하는 protocol을 장비에서 선택하여 사용해주시기 바랍니다.

4. 장비의 이상 동작이 발생한 경우

장비의 이상 동작으로 작동이 멈추었을 때는 LCD 화면의 작동 모드에서 'STOP' 혹은 'Pause'를 클릭하고 충돌이 일어난 위치랑 장비 및 kit의 손상여부를 확인합니다. 동작을 중지시키고 장비가 초기화되면 kit를 모두 제거하는 것을 권장합니다. Tip이 장비에 장착되어 있을 경우 모든 kit 제거 후 장비 Display 초기 'Menu'의 'MISC SET' 버튼으로 Syringe Block을 앞으로 가져오고 Tip을 버릴 빈 용기를 밑에 두고 'Setup'-'TIP OUT' 버튼으로 제거할 수 있습니다. 만약 초기화 및 kit 제거불량 등의 이상이 발생하여 실행이 불가능하면 업체에 수리의뢰를 요청합니다.

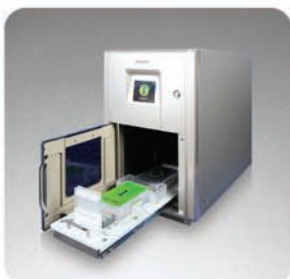
원인	해결방안
장비 Protocol 업데이트	장비의 성능을 개선하기 위해 ExiProgen™ 장비의 Protocol 업데이트가 진행되었을 시, 재부팅하지 않고 사용하시면 장비의 오작동 가능성이 있습니다. ExiProgen™ 장비의 Protocol 업데이트를 하신 경우, 장비의 전원을 껐다가 다시 켜주시기 바랍니다.
cartridge Sealing 필름을 Punching하지 않고 동작 시킴	cartridge Sealing 필름을 뚫지 않고 사용하게 되면, Tip이 cartridge에 꽂혀 작동이 멈추게 됩니다. 반드시 사용전 cartridge Sealing 필름을 뚫고 사용해주시기 바랍니다.
Waste tray의 미장착	Waste tray를 장착하지 않고 사용하시면, cartridge 내 모든 용액이 장비 내부로 스며들어 장비의 회로 계통의 고장을 일으킬 수 있습니다. 사용전 사용설명서를 숙지하시고 Waste tray를 반드시 장착하신 후 장비를 구동하시기 바랍니다.
cartridge 커버를 제거하지 않았음	cartridge 커버 (투명한 플라스틱 재질)를 제거하지 않고 장비를 동작시키면 Tip과 커버가 충돌하여 장비 동작 이상을 일으킬 수 있습니다. cartridge 커버를 제거하신 후 장비를 동작시켜주시기 바랍니다.
cartridge의 불완전한 장착	cartridge가 Base plate에 들뜬 상태로 끼워진 경우, Tip이 휘어지며 장비가 오작동 하게 됩니다. cartridge를 장착하실 때, Base plate에 밀착하도록 장착해주시기 바랍니다.
휘어진 Tip의 사용	휘어진 Tip을 사용하는 경우, Tip과 cartridge의 충돌이 발생할 수 있습니다. 휘어진 Tip이 있을 경우, 반드시 정상 Tip으로 교환하여 사용해주시기 바랍니다.

5. 장비 이상 동작 관련

원인	해결방안
장비의 이상 혹은 전원 이상, 잘못된 protocol 업데이트	Protocol을 재 업데이트하고 아무것도 넣지 않는 상태로 작동시켜 정상적으로 종료되는지 확인합니다. 필요시 업체에 수리의뢰를 요청합니다.
Tip loading 중 충돌, Buffer Cartridge 뚜껑 미제거, 기기내 kit의 잘못된 장착 또는 잘못된 protocol 업데이트	충돌 확인 시 LCD 화면의 작동 모드에서 'STOP' 혹은 'Pause'를 클릭하고 충돌이 일어난 위치와 장비 및 kit의 손상여부를 확인합니다. 손상 시 동작을 중지시키고 장비가 초기화되면 kit를 모두 제거하고 재 실행하는 것을 권장합니다. Tip이 Syringe Block에 꽂혀있는 경우 모든 kit 제거 후 장비 Display 초기 'Menu'의 'MISC SET' 버튼으로 Syringe Block을 앞으로 가져옵니다. Tip을 버릴 바구니를 밑에 두고 'Setup'-'TIP OUT' 버튼으로 제거할 수 있습니다. 만약 초기화 및 kit 제거불량 등의 이상이 발생하여 실행이 불가능하면 업체에 수리의뢰를 요청합니다.

6. Ordering Information

Instruments



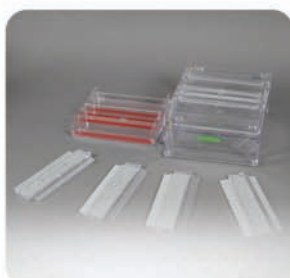
- **ExiProgen™**
(Cat. no. A-5041)

세계최초 전자동 단백질 합성 및 핵산추출 장비



- **MyGenie™ 96/384 Gradient Thermal**
(Cat. no. A-2040-1)

1분만에 384 well, 1536 well 등의 다른 block으로 쉽게 교체하여 사용할 수 있는 혁신적인 PCR Machine



- **Agaro-Power™**
(Cat. no. A-7020)

loading adapter가 부착된 agarose gel electrophoresis kit 미숙련자도 최대 96개의 sample을 2~3분 내로 빠르게 loading 할 수 있도록 개발된 제품



- **ExiSpin™**
(Cat. no. A-7040)

실험 과정 중 반복되는 vortex와 spin-down 과정을 결합한 자동화 장비로서 Centrifuge와 vortex 기능을 사용자가 기기 자체의 program을 이용하여 자동으로 반복 수행할 수 있음



- **LabChip GX®**
(122000)

단백질 분석 및 정량을 위한 완벽한 솔루션

Protein synthesis & purification kits

Cat. no.	Products
K-7400	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 16 reactions
K-7401	<i>ExiProgen™ ProXpress</i> PCR Template Kit, 32 reactions
K-7250	<i>AccuRapid™</i> Cell-Free Protein Expression Kit, 45 µl x 24 reactions
K-7260	<i>AccuRapid™</i> Midi Protein Expression Kit, 1 ml x 5 reactions
K-7270	<i>AccuRapid™</i> Maxi Protein Expression Kit, 10 ml x 1 reaction
K-7280	<i>AccuRapid™</i> Protein Synthesis Kit, 5 reactions
k-7300	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 16 reactions
K-7301	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 32 reactions
K-7302	<i>ExiProgen™</i> EC Protein Synthesis Kit, 96 reactions
K-7310	<i>ExiProgen™</i> EC-Maxi Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7320	<i>ExiProgen™</i> EC-Tagfree Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7330	<i>ExiProgen™</i> EC-Disulfide Protein Synthesis Kit, 8 reactions
K-7220	<i>ExiProgen™</i> His-Tagged Protein Purification Kit, 16 reactions
K-7221	<i>ExiProgen™</i> His-Tagged Protein Purification Kit, 32 reactions
K-7230	<i>ExiProgen™</i> Cell-Based Protein Purification Kit, 16 reactions

Related Products for Protein synthesis & purification kits

Cat. no.	Product Name
N-8229	1 $\times$ primer F/R sets (N-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
N-8230	1 $\times$ primer F/R sets (C-terminus 6x His-tag), each 5 nmole ¹
K-2631	<i>AccuPower® ProFi Taq</i> PCR PreMix, 96 tubes, 20 μ l reaction/tube
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 μ l (135 ng/ μ l)
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 kb DNA Ladder, 500 μ l (130 ng/ μ l)
K-3034-1	<i>AccuPrep®</i> PCR Purification Kit, 50 reactions
K-3035-1	<i>AccuPrep®</i> Gel Purification Kit, 50 reactions
C-9100	Agarose, 100 g
C-9100-1	Agarose, 500 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE , 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
K-7350	pBIVT vectors set-1
K-3111	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 200 reactions
K-3112	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit, 50 reactions
K-3122	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit, 25 reactions
K-3131	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 25 reactions
K-3132	<i>AccuPrep®</i> Nano-Plus Plasmid Maxi Extraction Kit, 10 reactions
K-3030	<i>AccuPrep®</i> Plasmid Extraction Kit 200 reactions
K-3030-1	<i>AccuPrep®</i> Plasmid Extraction Kit 50 reactions
C-9027	10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 500 ml
C-9001	40% Acrylamide, 500 ml
D-2020	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Low), 500 μ l
D-2010	<i>AccuLadder™</i> Protein Size Marker (Broad), 500 μ l

Nucleic Acid Extraction kits

Cat. no.	Product Name
K-4311-1	<i>ExiProgen™</i> Blood Genomic DNA Kit, 16 preps
K-4311-2	<i>ExiProgen™</i> Blood Genomic DNA Kit, 32 preps
K-4311	<i>ExiProgen™</i> Blood Genomic DNA Kit, 96 preps
K-4311-4	<i>ExiProgen™</i> Blood Genomic DNA Kit, 192 preps
K-4312-1	<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit, 16 preps
K-4312-2	<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit, 32 preps
K-4312	<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit, 96 preps
K-4312-4	<i>ExiProgen™</i> Tissue Genomic DNA Kit, 192 preps
K-4314-1	<i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit, 16 preps
K-4314-2	<i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit, 32 preps
K-4314	<i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit, 96 preps
K-4314-4	<i>ExiProgen™</i> Bacteria Genomic DNA Kit, 192 preps
K-4315-1	<i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit, 16 preps
K-4315-2	<i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit, 32 preps
K-4315	<i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit, 96 preps
K-4315-4	<i>ExiProgen™</i> Plant Genomic DNA Kit, 192 preps
K-4342-1	<i>ExiPrep™</i> Tissue total RNA Kit, 16 preps
K-4342-2	<i>ExiPrep™</i> Tissue total RNA Kit, 32 preps
K-4342	<i>ExiPrep™</i> Tissue total RNA Kit, 96 preps
K-4342-4	<i>ExiPrep™</i> Tissue total RNA Kit, 192 preps
K-4344-1	<i>ExiProgen™</i> Plant total RNA Kit, 16 preps
K-4344-2	<i>ExiProgen™</i> Plant total RNA Kit, 32 preps
K-4344	<i>ExiProgen™</i> Plant total RNA Kit, 96 preps
K-4344-4	<i>ExiProgen™</i> Plant total RNA Kit, 192 preps
K-4371-1	<i>ExiProgen™</i> Viral DNA/RNA Kit, 16 preps
K-4371-2	<i>ExiProgen™</i> Viral DNA/RNA Kit, 32 preps
K-4371	<i>ExiProgen™</i> Viral DNA/RNA Kit, 96 preps
K-4371-4	<i>ExiProgen™</i> Viral DNA/RNA Kit, 192 preps
K-4381-1	<i>ExiProgen™</i> Nano-Plus Plasmid DNA Kit, 16 preps
K-4381-2	<i>ExiProgen™</i> Nano-Plus Plasmid DNA Kit, 32 preps
K-4381	<i>ExiProgen™</i> Nano-Plus Plasmid DNA Kit, 96 preps
K-4381-4	<i>ExiProgen™</i> Nano-Plus Plasmid DNA Kit, 192 preps
K-4391-1	<i>ExiProgen™</i> Gel Extraction Kit, 16 preps
K-4391-2	<i>ExiProgen™</i> Gel Extraction Kit, 32 preps

Nucleic Acid Extraction kits

Cat. no.	Product Name
K-4391	<i>ExiProgen™</i> Gel Extraction Kit, 96 preps
K-4391-4	<i>ExiProgen™</i> Gel Extraction Kit, 192 preps
K-4392-1	<i>ExiProgen™</i> PCR Purification Kit, 16 preps
K-4392-2	<i>ExiProgen™</i> PCR Purification Kit, 32 preps
K-4392	<i>ExiProgen™</i> PCR Purification Kit, 96 preps
K-4392-4	<i>ExiProgen™</i> PCR Purification Kit, 192 preps

Related Products for Nucleic Acid Extraction kits

Cat. no.	Product Name
KA-7030	Tissue Homogenization Set (Mixer, Sticks, and Tubes), 100 reactions
KA-7031	Tissue Homogenization Sticks, 100 ea
KA-7032	Tissue Filter Tubes, 100 ea
KA-7033	Tissue Mixer
KB-0111	Proteinase K Powder, 25 mg x 2 ea
C-9024	PBS (Phosphate-Buffered Saline), 500 ml
C-9005	TE (pH8.0), 500 ml
C-9100	Agarose, 100 g
C-9100-1	Agarose, 500 g
C-9002	5X TBE, 1 gal
C-9004	5X TAE, 500 ml
C-9029	6X Agarose Gel Loading Buffer, 2 ml
D-1030	<i>AccuLadder™</i> 100 bp DNA Ladder, 250 µl (135 ng/µl)
D-1040	<i>AccuLadder™</i> 1 Kb DNA Ladder, 500 µl (130 ng/µl)
K-7103	<i>AccuPower®</i> Ligation PreMix, 0.2ml 0.2 ml 8-tube strips, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
E-3061	T4 DNA Ligase, 20,000 U
E-3111	Tfi DNA Ligase, 2,000 U
E-1111 ~ E2162	Restriction Enzymes
K-2012	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl
K-2601	<i>AccuPower®</i> Taq PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2012-1	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix (with UDG), 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-5050	<i>AccuPower®</i> HotStart PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2611	<i>AccuPower®</i> PyroHotStart PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube

Cat. no.	Product Name
K-5050-1	<i>AccuPower®</i> HotStart PCR PreMix (with UDG), 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2022	<i>AccuPower®</i> <i>Pfu</i> PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2631	<i>AccuPower®</i> <i>ProFi Taq</i> PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2111	<i>AccuPower®</i> Multiplex PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2115	<i>AccuPower®</i> Gold Multiplex PCR PreMix, 0.2 ml thin-wall 8-tube strip with attached cap, 96 tubes, 20 µl reaction/tube
K-2044 ~ K-2050	<i>AccuPower®</i> CycleScript RT PreMix
K-2040 ~ K-2043	<i>AccuPower®</i> RT PreMix
K-2055 ~ K-2057	<i>AccuPower®</i> RT/PCR PreMix
K-2101 ~ K-2104	<i>AccuPower®</i> <i>RocketScript™</i> RT PreMix
K-2201 ~ K-2204	<i>AccuPower®</i> <i>RocketScript™</i> Cycle RT PreMix
K-2501 ~ K-2504	<i>AccuPower®</i> <i>RocketScript™</i> RT-PCR PreMix
K-2211 ~ K-2214	<i>AccuPower®</i> <i>RocketPlex™</i> RT-PCR
K-6700 ~ K-6703	<i>AccuPower®</i> <i>RocketScript™</i> RT-qPCR PreMix
K-2010 ~ K-2017	<i>AccuPower®</i> PCR PreMix
K-2018 ~ K-2018-1	<i>AccuPower®</i> PCR Master Mix
K-2611 ~ K-2614	<i>AccuPower®</i> <i>PyroHotStart Taq</i> PCR PreMix
K-2631 ~ K-2634	<i>AccuPower®</i> <i>ProFi Taq</i> PCR PreMix
K-2022 ~ K-2027	<i>AccuPower®</i> <i>Pfu</i> PCR PreMix
K-6100 ~ K-6104	<i>AccuPower®</i> <i>DualStar™</i> qPCR PreMix
K-6200 ~ K-6214	<i>AccuPower®</i> <i>DualStar™</i> qPCR PreMix
K-6251 ~ K-6254	<i>AccuPower®</i> 2X <i>Greenstar™</i> qPCR Master Mix
K-6600 ~ K-6603	<i>AccuPower®</i> Plus <i>DualStar™</i> qPCR PreMix

