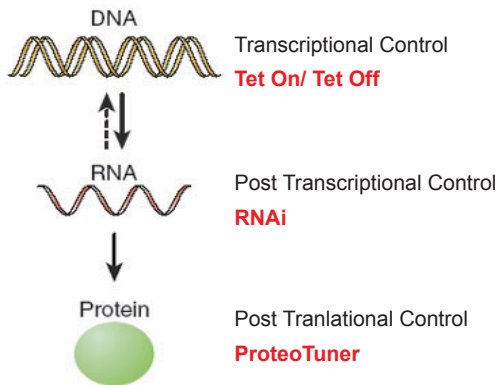


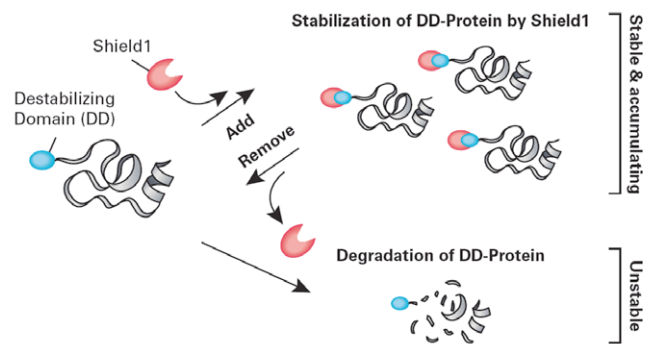
Clontech Lenti-X™ system for conditional regulation 可調控系列

能夠隨心所欲的調控基因表現進而研究基因功能一直都是學者們汲汲追求的目標。從最早的原核系統的 lac inducible system 到真核系統的 Tet inducible system，都是從 Transcription 的層面去調控蛋白質的表現，而近年來，有關 RNAi 的研究如雨後春筍般的湧出，愈來愈多的研究者使用這種 Post-transcriptional regulation 去干擾目標基因的表現。在 2006 年 Dr. Thomas Wandless 的研究團隊在 Cell 期刊發表了一篇用「用蛋白質調控蛋白質表現」的文章，提出了一個全新的概念，首先利用 FBKP12 蛋白其中的一小段 peptide，其帶有 Proteasome 辨認序列，極易經由 Proteasome 作用而水解，此稱為 DD (Destabilizing Domain)。把 DD 作為 tag，表現 DD fusion protein，再利用 DD 小分子 Ligand — Shield1 調控 DD-Protein 穩定性；有 Shield1 保護的目標蛋白可以避免被水解破壞，失去 Shield1 保護的目標蛋白會快速的被降解。

調節基因表現的方法



ProteoTuner 原理簡圖



三個可調控系的比較

ProteoTuner 的優點：

1. 直接 Control Protein 含量
2. 分析最即時的現象 (Kinetic analysis)
3. 不用挑選有效序列 (RNAi)、不必花二個月的時間建立 Stable Cell Lines (Tet inducible system) 一樣可以達到專一性的調控

Tet inducible system 的優點：

1. Lenti-X 是建立 Stable Cell Lines 的最佳方法。
2. 最嚴謹、最一致的調控 (DNA 上的改造)
3. 無需製作融合蛋白

RNAi system 的優點：

1. 利用 Lenti-X shRNA 模擬 Gene Knockout。
2. 唯一能直接抑制「內源性」基因的表現。

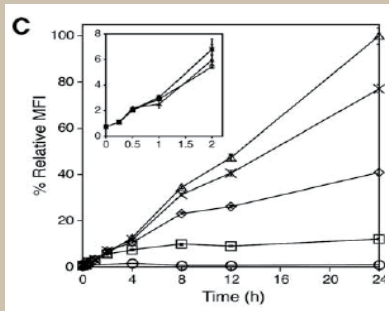
	Tet Systems	RNAi	ProteoTuner
Fast control on level of protein	+	+	+++
	48 -36 hours	24 – 48 hours	30min - hours
Establishing system	2 months	Plasmid 3-5 days	Plasmid 3-5 days Retrovirus 1-2 weeks
Kinetic Analysis	+	+	+++
Tighter regulation	+++	+	+
Control endogenous protein		+++	
Ease of use	++	++	+++
Target specificity	+++	+	+++
Multiple targets	+	+++	+

A Protein Alternative to RNAi

Nature Methods 譽之為繼 RNAi 後，最受注目的一顆星

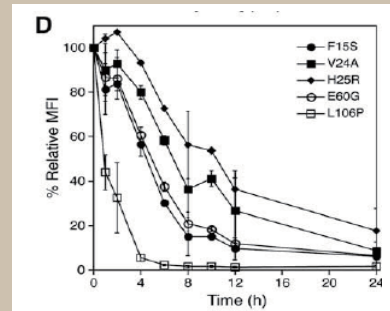
在 Dr. Thomas Wandless 發表 Cell 這篇文章後，幾天之內，即收到超過五十個來自世界各地的研究團隊請求分享這組試劑，隨後繼續繼續有更多的物種、更多不同種的蛋白的應用表發。Dr. Thomas Wandless 自豪說，目前還沒有不成功的蛋白。DD-Protein 在移除掉 Shield1 保護後，反應降解的時間依蛋白特性略有不同，很穩定的 GFP 要花 4 個小時才能除去，不穩定的 Luciferase 在 30 分鐘後即降解。相較於 RNAi 或 Tet inducible system 而言，真的是快多了！

1. 蛋白質的量具可調性 (Tunability)



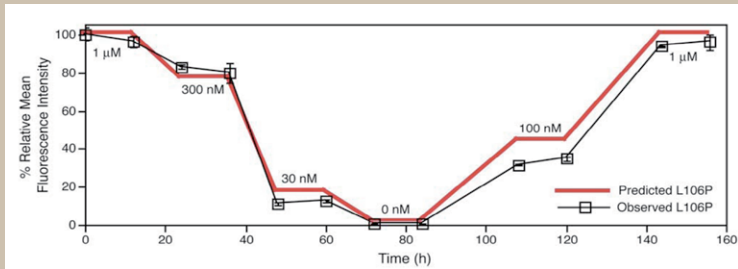
Stabilization of protein over time with the addition of different concentrations of Shield1. (□ 30nM, ◇ 100nM, * 300 nM, △ 1uM, ○ mock)

2. 極短時間內的可逆的反應 (Reversible action)



Destabilization of protein over time with "wash out" of Shield1.

3. 預期值與觀察值關係度高



Fusion of an FKBP Destabilizing Domain to the N Terminus of YFP Results in Predictable and Reversible Small-Molecule Regulation of Intracellular Protein Levels

Images adapted from Banaszynski et al. *Cell* 126, 995-1004, September 8, 2006

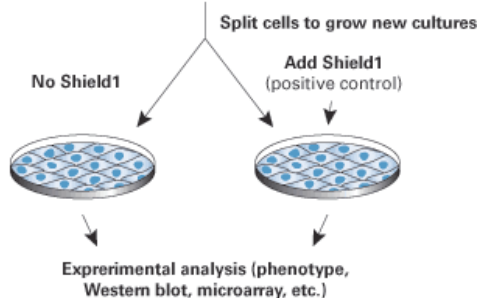
超簡單的流程

1 建構與 Destabilized Domain Fusion 的 Construct

2 送入目標細胞 (plasmid 或 virus)



3 用 Shield1 控制目標蛋白的壽命



產品資訊

Cat No	Product Description	Package
632171	Retro-X ProteoTuner System	pRetroX-PTuner Vector& Shield1 (60 ul)
632172	ProteoTuner System	pPTuner Vector & Shield1 (60 ul)
632167	Retro-X ProteoTuner IRES system	pRetroX-PTuner IRES Vector &Shield1(60ul)
632168	ProteoTuner IRES2 System	pPTuner IRES2 Vector & Shield1 (60 ul)
632173	Lenti-X ProteoTuner Green system	pLVX-Ptuner Green Vector & shield1 (60uL)
632175	Lenti-X ProteoTuner system	pLVX-PTuner Vector & shield1 (60uL)
631037	Shield1 small package	60ul of Sheild1
631038	Shield1 large package	200ul of Sheild1