

# Control your protein like a Magic!

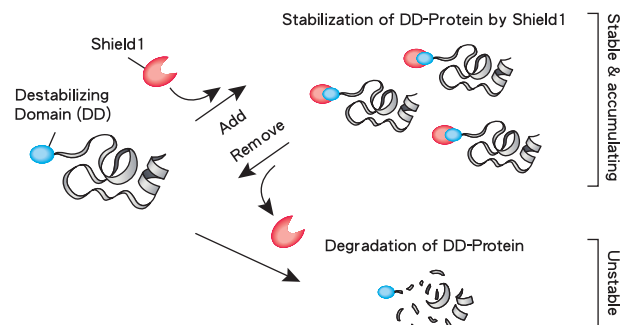


## ProteoTuner Systems

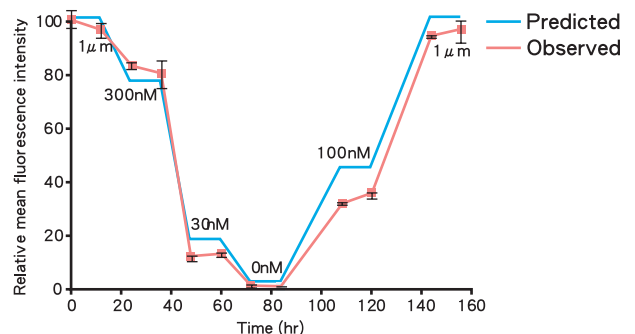
- 市面唯一蛋白質調控系統
- 利用小分子化合物直接調節蛋白質表現
- 數小時內快速調節
- Reversible、Dose-dependent control
- One vector, one ligand
- Widely validated technology



更多資訊請見 [www.clontech.com/tuner](http://www.clontech.com/tuner)



Clone your protein of interest into the DD-containing ProteoTuner vector. Rapidly and reversibly modulate protein levels by adding or removing the Shield1 small molecule.



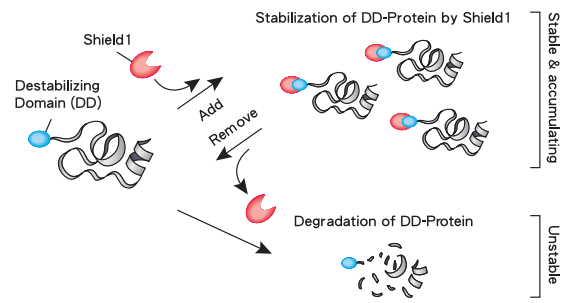
Fusion of the DD to the N-terminus of YFP results in predictable and reversible regulation of intracellular protein levels by Shield1. Reprinted with author's permission from Banaszynski et al. (2006) Cell 126(5):995-1004.

# ProteoTuner™ Systems

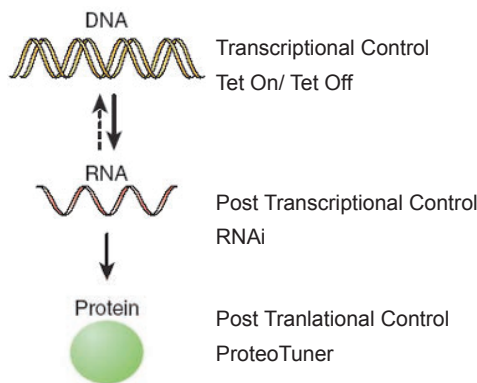
## 直接從蛋白質的 level 調控蛋白表現

Dr. Thomas Wandless 的研究團隊在 2006 年 Cell 期刊上發表了一篇用「利用小分子化合物直接調控蛋白質表現」的文章。作者利用 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 具有遮蔽 DD-Protein 特性；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。如此顛覆了傳統耗時的基因調節方式，讓蛋白質調控的速度在數小時內即可達到。

原理簡圖



### 調節基因表現的方法



調節基因表現的方式比較

	Tet Systems	RNAi	ProteoTuner
Fast control on level of protein	+	+	+++
	48 -36 hours	24 - 48 hours	30min - hours
Establishing system	months	days	days
Kinetic Analysis	+	+	+++
Tighter regulation	+++	+	+
Target specificity	+++	+	+++
Ease of use	++	++	+++

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！

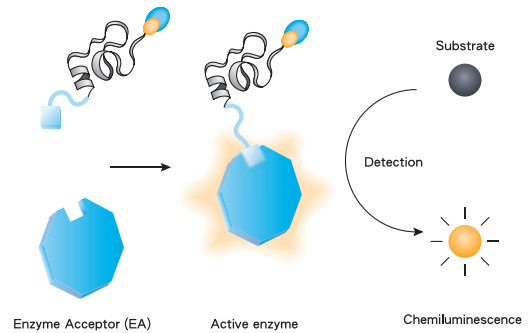
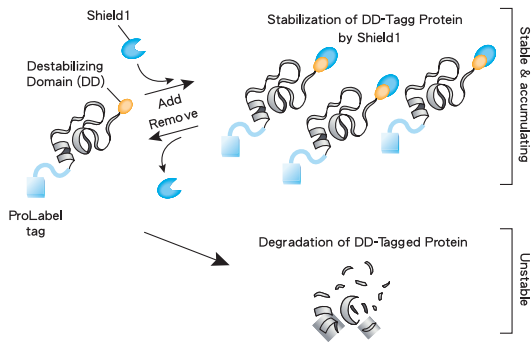
### 多種應用及發表文章

Application	Reference
Monitoring ion channel composition and function	Schoeber, J. P. H. et al. (2009) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296, F204–211.
Manipulating gene repair efficacy of a zinc finger nuclease	Pruett-Miller, S. M. et al. (2009) PLoS Genetics 5(2):e1000376.
Characterizing tumor formation in mice	Banaszynski, L. A. et al. (2008) Nat. Med. 14(10):1123–1127.
Analyzing essential gene function in apicomplexan parasites	Agop-Neresian, C. et al. (2009) PLoS Pathogens 5(1):e1000270. Armstrong, C. M. and Goldberg, D. E. (2007) Nat. Meth. 4(12):1007–1009. Herm-Götz, A. et al. (2007) Nat. Meth. 4(12):1003–1005. Erratum in: Nat. Meth. (2008) 5(1):113.
Tracking dynamic cytoskeletal reorganization	On-Demand Protein Stabilization Using the Lenti-X™ ProteoTuner Systems (October 2008) Clontech XXIII(3):2–3.

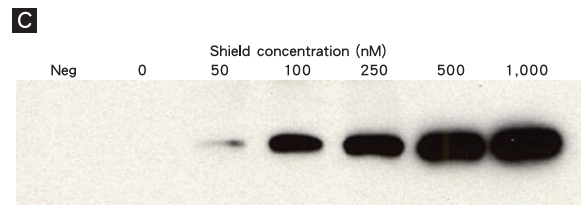
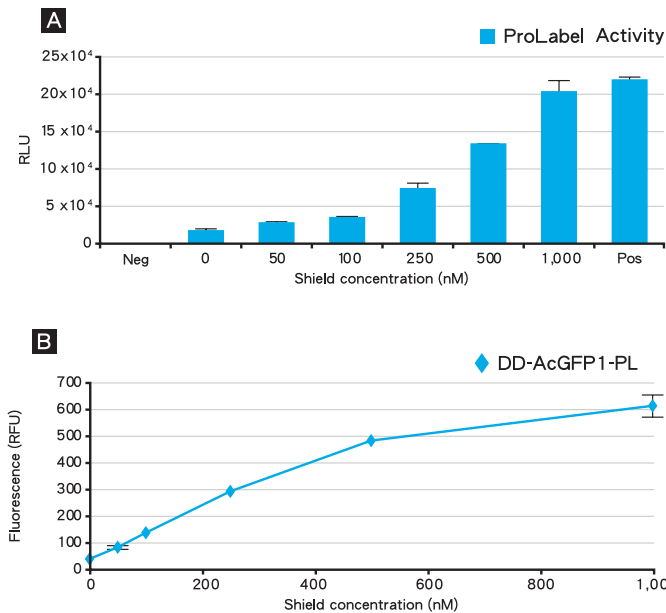
# ProteoTuner™ Quantification Kit

## 不只能調控還能定量

結合 ProLabel 及 ProteoTuner 技術，利用 Shield1 穩定蛋白的同時，也可利用 C 端的 ProLabel tag 來定量目標蛋白的表現量。



### How it works ?



ProLabel activity accurately represents the quantity of Shield1-stabilized protein. Cells were transfected with pDD-AcGFP1-PL, treated with the indicated amounts of Shield1, and the amount of stabilized DD-AcGFP1-PL was quantified by three different methods. Results for the ProLabel assay (Panel A) were consistent with the results measured by flow cytometry (Panel B) and by Western Blot using the Living Colors® A.v. Monoclonal Antibody to detect AcGFP1 (Panel C). Neg = negative control; nontransfected cells. Pos = ProLabel positive control.

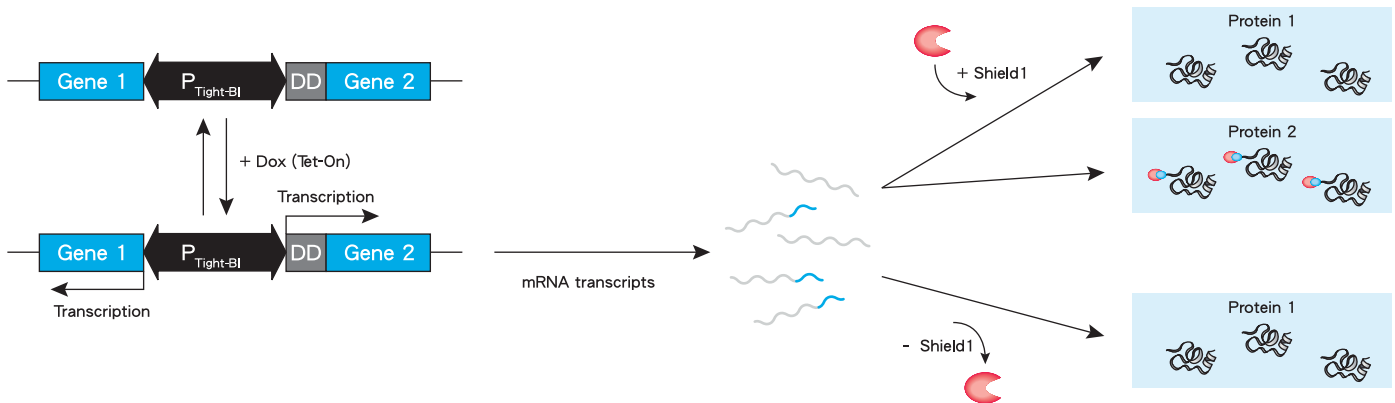
### 更多 ProteoTuner 產品家族



Catalog	Product Name	Package
632167	Retro-X ProteoTuner IRES System	each
632168	Proteo Tuner-IRES2 System	each
632171	Retro-X ProteoTuner System	each
632172	ProteoTuner System	each
632173	Lenti-X ProteoTuner System	each
632175	Lenti-X ProteoTuner Green System	each
631074	Lenti-X™ ProteoTuner™ C System	each
631072	ProteoTuner™ C System	each
632188	Shield1, in vivo	5 mg
632189	Shield1	500 ul
631037	Shield1	60ul
632196	ProteoTuner™ Quantitation System	each

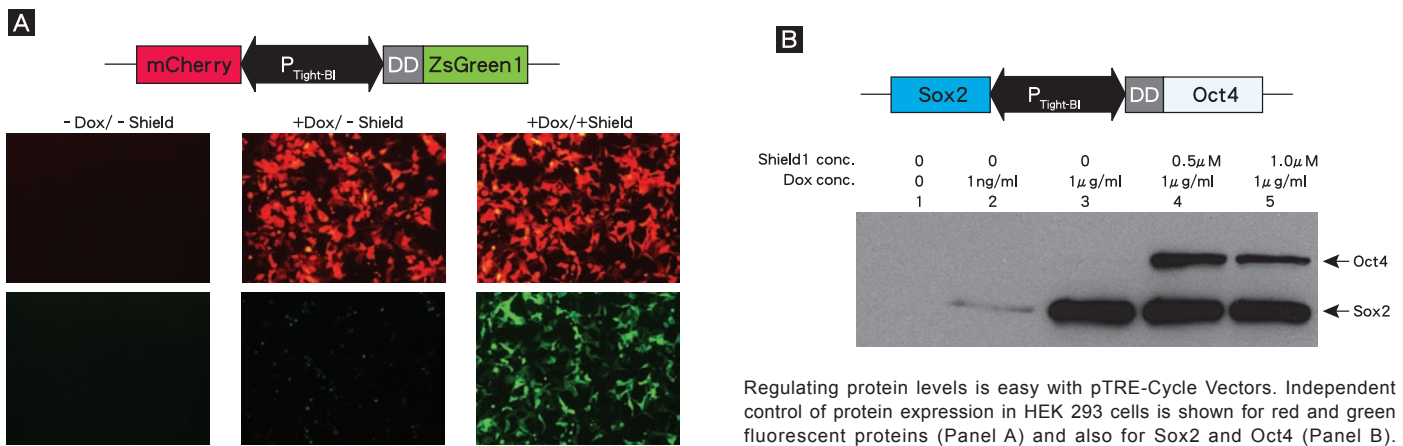
# Two-Tiered Control of Inducible Expression

- ◆ 第一層由 DNA Level 嚴謹的調控 ~ Tet inducible system
- ◆ 第二層由 Protein level 快速、可逆的調控 ~ ProteoTuner system
- ◆ 自由自在獨立調控兩蛋白表現

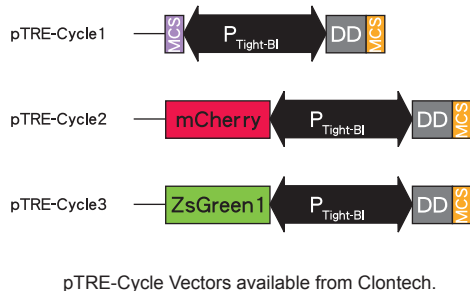


由雙向的 Tight-BI Promoter 表現兩個蛋白，Tight-BI Promoter 受 Tet repressor ( Tet-On/ Tet-Off ) 調控，以 Tet-On 為例，Promoter 在 Doxycyclin 存在下而活化，產生兩種蛋白，其中一個蛋白在 N 端接有 DD Tag。DD (Destabilizing Domain) 為 FBKP12 蛋白其中的一小段 peptide，其帶有 Proteasome 辨認序列，極易經由 Proteasome 作用而水解，因此 DD fusion protein 極不穩定，而小分子化合物 Shield1 的作用就像個盾牌可以保護的 DD fusion protein，免被水解破壞，而再一次洗去 Shield1 的話，DD fusion protein 又會快速的被降解，但依蛋白特性不同略有差異，以 GFP 為例，在移除 Shield1 四小時後 GFP 才會消失，而對於 Luciferase 只要 30 分鐘。如此兩層的調控模式，協助您更容易研究兩個有細胞毒性的蛋白的交互影響。

## How it works ?



## 三種載體

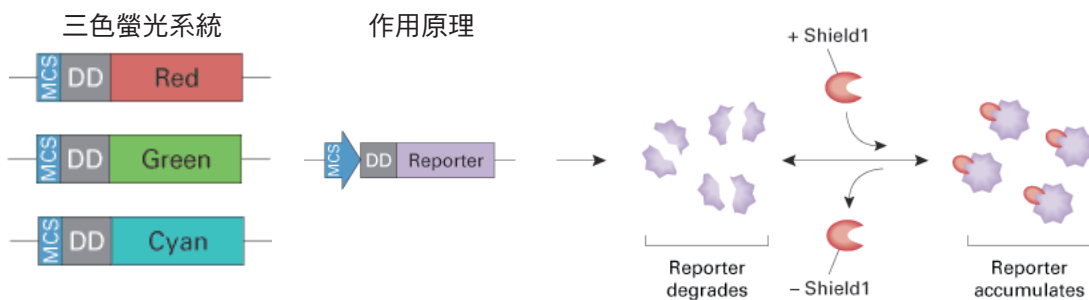


Catalog	Product Name	Package
631115	pTRE-Cycle1 Vector	20 ug
631116	pTRE-Cycle2 Vector	20 ug
631117	pTRE-Cycle3 Vector	20 ug
631069	pTet-On® Advanced Vector	20 ug
631070	pTet-Off® Advanced Vector	20 ug
631073	DD Monoclonal Antibody	50 ul
631311	Doxycycline 5 g	5 g
631101	Tet System Approved FBS, US-Sourced	500 ml

# On-demand Fluorescent Reporter System

## 有了 DD Tag，Reporter assay 背景值更低

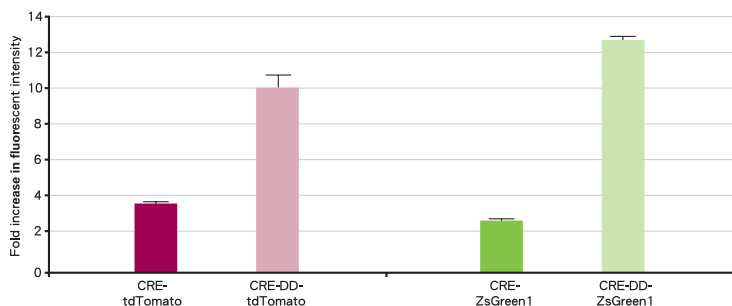
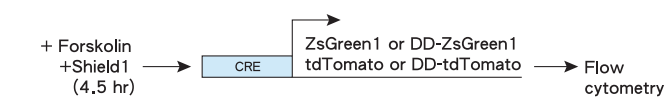
- **Live reporter system**：On-demand reporter system 提供三種螢光蛋白分析系統，可隨時分析，不消耗您珍貴的細胞，不用時間點，可以反覆測定，可以讓您一次實驗得到更多 Data。
- **Reduce background**：Assay 背景值除了來自於 Basal promoter 的活性外，也來自於 Reporter 的穩定性 (半衰期)。例如，螢光蛋白的半衰期長，因此螢光背景值就比較強，對於反覆測定的實驗來說，基因表現差距有可能因此拉不開。On-demand reporter system 的螢光蛋白或冷光酵素皆有 DD Tag，在細胞中會快速被水解，因此大幅降低背景值，更大大提升 Assay 可信度。
- **減少 Reporter gene 對細胞的毒害**：雖然目前的螢光蛋白經過改造已經大幅降低細胞毒性，但長期表現這些螢光蛋白，可能還是會對細胞造成傷害。因此可利用 On-demand reporter system，在需要分析時，添加 shield1，穩定螢光蛋白或冷光酵素。Shield1 在分析結束後移除，Reporter 又快速被水解，如此即使是 stable cell line 也不怕蛋白的細胞毒性造成細胞死亡。



### 與傳統 Reporter 系統比較

	On-Demand Fluorescent Protein Reporter Systems	Traditional Reporter Systems
背景	普遍低 (無論何種 Promoter)	與 Promoter 有很大的關係
訊號	亮 (各色螢光相對 EGFP 的亮度為：紅色 2.8 倍，綠色 2.4 倍，藍色 1.8 倍)	與螢光蛋白特性有關，一般而論，亮度高的，背景也高。
Signal-to-noise ratio	高，因為背景低	低，因為背景高
除去螢光訊號	簡單，只需移除 Shield1	困難，需等螢光蛋白壽命終止
細胞毒性	低，因為螢光蛋白在分析時才會發螢光	高，螢光蛋白會持續發亮，依不同蛋白特性，對細胞有不同程度的毒害

### 更高的 signal-to-noise ratio



DD-Fluorescent Protein promoter reporters provide a much greater fold increase in signal intensity than traditional fluorescent protein reporters, which do not contain the DD. HEK 293 cells were transfected with plasmids encoding the following reporters: CRE-tdTomato, CRE-DD-tdTomato, CRE-ZsGreen1, and CRE-DD-ZsGreen1. 24 hr later, the cells were stimulated with 10  $\mu$ M forskolin and simultaneously treated with 1  $\mu$ M Shield1. After 4.5 hr, fluorescence intensity was measured via flow cytometry, and fold induction was calculated. The tdTomato and ZsGreen1 reporters containing the DD had three- and six-fold greater fluorescence intensity respectively, than the versions without the DD, due to the latter's increased background levels.

# Stable expression of on-demand reporter with Lenti-X system

## 病毒包裹系統 -- Lenti-X™ HTX Packaging System

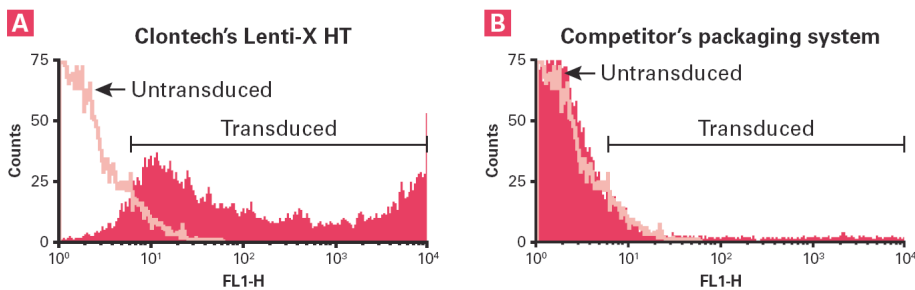
- 採用第四代安全病毒包裹系統，讓 Lentivirus 體外重組機率趨近於零。
- Lenti-X 病毒包裹系統，利用多重反向活化基因表現方式，避免 Promoter 間相互干擾，讓病毒產量更高。
- 市售病毒系統中，Titer 最高，趨近 10<sup>9</sup> IFU/ml。

### 第 4 代最安全病毒包裹系統

Packaging system	Resistant colonies <sup>a</sup>		Pelleted CA protein <sup>b</sup>	
	+VSV-G	-VSV-G	-tat	+tat
	Lentiviral	900	0	110
Trans-lentiviral	0	0	ND	ND

Wu et al. 在 2000 Molecular therapy 發表中提出，一般的 Lentivirus 仍潛藏高重組率，而 Trans-Lentivirus 則觀察無此現象。

### 僅需 10μl 即可感染一整盤的 HeLa Cell

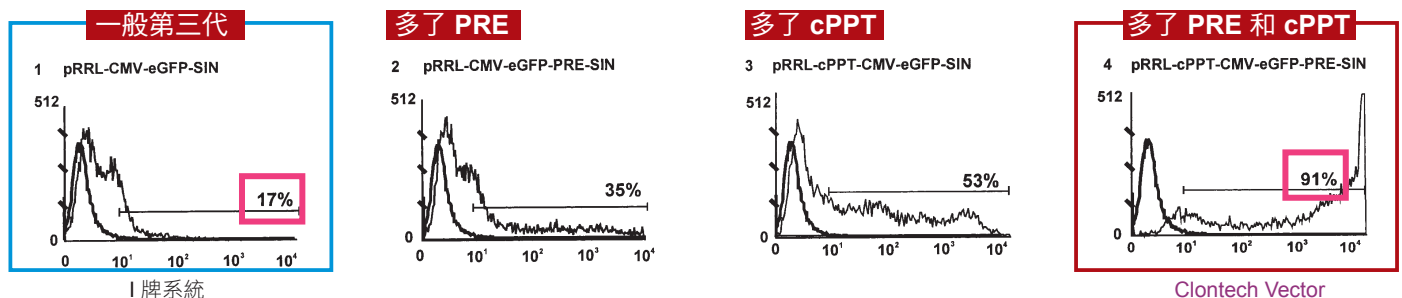
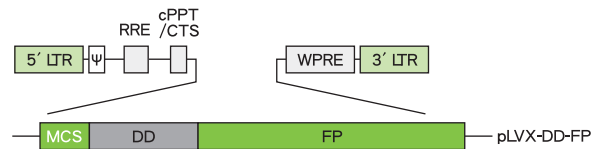


(A) Number of puromycin-resistant HeLa-puro cell colonies produced upon infection with VSV-G pseudotyped (VSV-G) or non-pseudotyped (VSV-G) recombinant vector particles. The numbers shown are representative of three independent experiments.

(B) Two days following transfection (tat) or mock transfection (tat) of puromycin-resistant cell cultures with the pCMV-tat expression plasmid, the supernatants were analyzed for pelletable (125,000g, 2 h) HIV-1 capsid (CA) protein using HIV-1 p24 antigen ELISA (Coulter Inc.). The concentration of CA protein is expressed as ng/ml.

## 病毒表現載體

- 採用最新病毒表現載體，包含 cPPT、WPRE 等重要序列。
  - cPPT: central polypurine tract, 協助 Viral RNA genome 入核，讓病毒感染率更高
  - WPRE: 協助 RNA processing, 讓病毒 titer 及表現是更高。
- 含括 cPPT 及 WPRE 序列的病毒載體比陽春型的病毒表現量高出 74%。



## Stem Cell Reporter 新上市! Hot

On-demand Reporter system						Precloned On-demand Reporter system					
DD Fluorescent Protein Reporter Systems			Lenti-X™ DD Fluorescent Protein Reporter Systems			Pluripotent reporter system					
tdTomato	AmCyan1	ZsGreen1	tdTomato	AmCyan1	ZsGreen1	Oct4 DD		Sox2 DD			
632190	632191	632192	631753	631748	631751	tdTomato	ZsGreen1	tdTomato	ZsGreen1		
						631993	632001	631997	632005		
Precloned On-demand Reporter system						Lenti-X™ Oct4 DD				Lenti-X™ Sox2 DD	
CRE DD			NF κ B DD			tdTomato	ZsGreen1	tdTomato	ZsGreen1		
632087	632089	632085	632081	632083	632079	631995	632003	631999	632007		