



Tet-On[®] & Tet-Off[®] Advanced Inducible Gene Expression Systems

포유류 세포에서 Tetracycline 발현조절 시스템

www.clontech.com

목적 유전자의 발현 조절에는

Tet System의 특징

- 유전자 발현을 Doxycycline의 양에 따라 조절 가능
- 10,000배 이상의 유전자 발현 유도 가능
- 독성 유전자의 발현에 이상적
- 고성능의 Tet-On® & Tet-Off® Advanced System으로 업그레이드

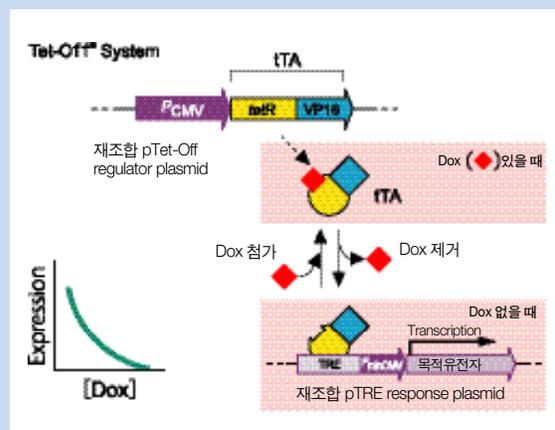
Tet-Off® System 및 Tet-On® System은 *E.coli* tetracycline 내성 오페론 유래 2 종류의 조절인자인 Tet repressor protein(TetR)과 Tet operator DNA sequence (tetO)을 기본으로 한 시스템이다. 두 조절인자를 host genome에 삽입한 double-stable cell line은 tetracycline이나 그 유도체인 doxycycline에 대해서 용량 의존적(dose-dependent)으로 반응하므로, 목적 유전자의 발현을 정확하게 조절할 수 있다.

Tet-Off® System

Tet-Off System은 doxycycline(Dox)이 없을 경우에 목적 유전자의 발현을 유도하는 시스템이다.

이 시스템에서는 tetracycline controlled transactivator (tTA)를 발현하는 Tet-Off regulator plasmid와 tetO 반복 서열을 가지는 tetracycline response element (TRE)를 코딩하는 response plasmid를 사용한다.

tTA는 Tet repressor protein (TetR)과 VP16 activation domain (AD)으로 구성된 융합단백질이다. tTA는 Dox 비존재하에서 tetracycline response element (TRE)와 결합하여 하류의 목적유전자 발현을 유도하는 기능이 있다. 이 Dox에 의한 유전자 발현 유도는 농도 의존적인 반응을 나타낸다

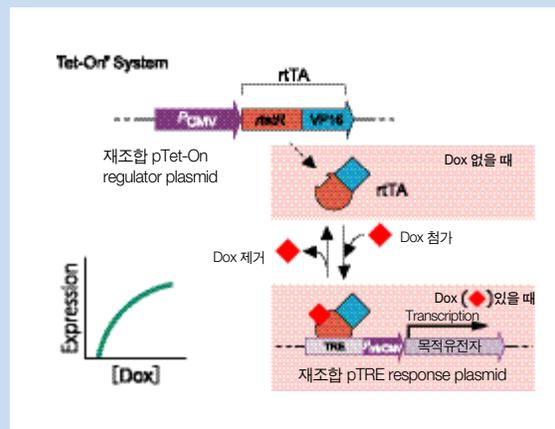


Tet-On® System

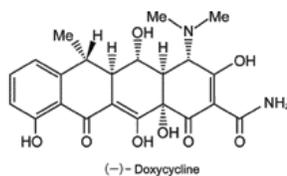
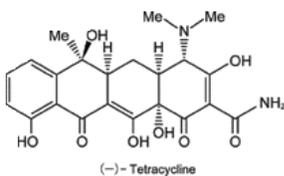
Tet-On System은 doxycycline(Dox)이 존재할 경우 목적 유전자의 발현을 유도하는 시스템이다.

이 시스템에서는 reverse tetracycline controlled transactivator (rtTA)를 발현하는 Tet-On regulator plasmid와 tetracycline response element (TRE)를 코딩하는 response plasmid를 사용한다. Response plasmid는 Tet-Off System과 공통으로 사용할 수 있다.

rtTA는 변이형 Tet repressor protein (rTetR)과 VP16 activation domain (AD)으로 구성된 융합단백질이다. rtTA는 Dox 존재하에서 tetracycline response element (TRE)와 결합하여 하류의 목적유전자 발현을 유도하는 기능이 있다. 이 Dox에 의한 유전자 발현 유도는 농도 의존적인 반응을 나타낸다



Tip!



왼쪽 그림은 tetracycline과 doxycycline의 화학구조이다. Tet System에서는 doxycycline이 tetracycline에 비해 100배 정도의 높은 감도를 가지고 있다.

Tet System이 최적!

버전 UP!

백그라운드 발현이 중요한 경우에는

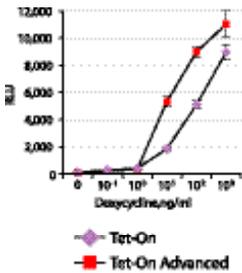
Tet-On® & Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression System 추천

- Regulator plasmid (r)TA 유전자의 (r)TetR, VP16 domain을 변형하여 코돈 빈도를 포유류 세포의 발현에 최적화
- Response plasmid로 pTRE-Tight를 사용

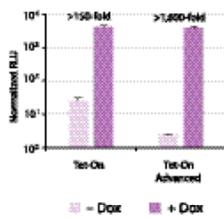


- 백그라운드 최소 (leaky 감소)
- 세포 독성 감소
- Doxycycline에 대한 감도가 10배 증가

A Dox에 대한 감도가 10배 증가



B 백그라운드 발현을 실질적으로 제거



새로운 Tet-On Advanced System에서는 rTA 단백질을 개량해 Dox에 대한 감도를 10배 증가시키는(A) 한편, Dox 비존재하에서도 잔존하는 TRE 결합 활성을 한층 더 억제하였다(B). rTA 유전자의 호스트 세포내 발현 레벨이 향상되고, 세포독성도 감소되었다.

pTRE-Tight 벡터는

pTRE-Tight 시리즈 벡터는 목적 유전자의 기저 발현량을 매우 낮게 억제하는 한편 높은 유도성을 갖춘 벡터이다. pTRE-Tight는 독성이 있는 단백질의 발현과 같이 백그라운드 발현을 허용할 수 없는 경우에 특히 유용하다. 종래의 Tet-On/Tet-Off System에도 사용할 수 있다. 항생제 내성 마커가 없기 때문에 Linear Selection Markers 또는 포유류 selection vectors와 co-transfection하여 사용한다.

Linear Selection Markers

제품명	Size	Code
Linear Hygromycin Marker	2 ug	631625
Linear Puromycin Marker	2 ug	631626

포유류 Selection Vectors

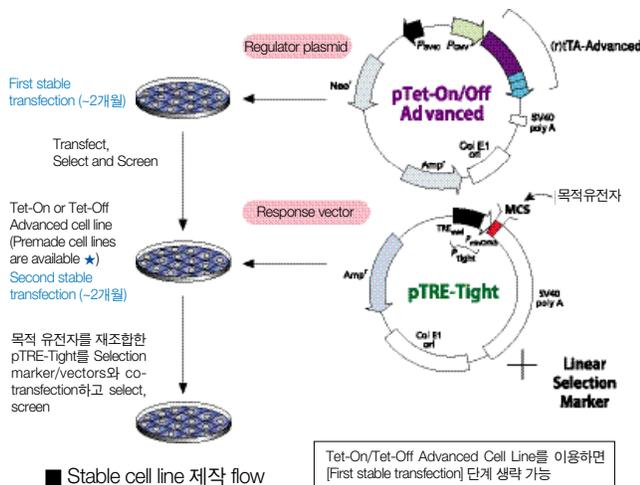
제품명	Size	Code
pPUR Vector	25 ug	631601
pTK-Hyg Vector	10 ug	631750

Tet System 구축을 위한 시간과 노력을 절약하려면

Tet-On® & Tet-Off® Advanced Cell Lines 추천

목적 유전자를 발현하는 안정 제어성 세포주 구축에
필요한 시간을 약 2개월 단축 가능

Tet System를 사용하기 위해서는 우선 호스트 세포에 Tet-On/Tet-Off Advanced regulator plasmid를 transfection하여, (r)TA-Advanced 안정 발현 세포주를 제작해야 한다. 안정 세포주를 얻기 위해서는 약 2개월간의 시간이 걸리며, 이와 같은 단계는 아래의 표에 소개하는 Tet-On & Tet-Off cell line를 사용하여 생략할 수 있다.



◆ Tet-On & Tet-Off Advanced cell line (★)

Cell lines	Tet-On Advanced	Tet-Off Advanced	Tet-On	Tet-Off
CHO AA8 Cell Line				○
CHO-K1 Cell Line			○	
HeLa S3 Cell Line				○
HeLa Cell Line	○	○	○	○
HT-1080 Cell Line				○
Jurkat Cell Line			○	○
MCF7 Cell Line	○	○	○	○
MDCK Cell Line				○
MEF/3T3 Cell Line				○
PC12 Cell Line			○	○
Saos-2 Cell Line				○
U-2 OS Cell Line			○	
HEK 293 Cell Line	○	○		○
T47D Cell Line			○	○
HepG2 Cell Line	○	○		

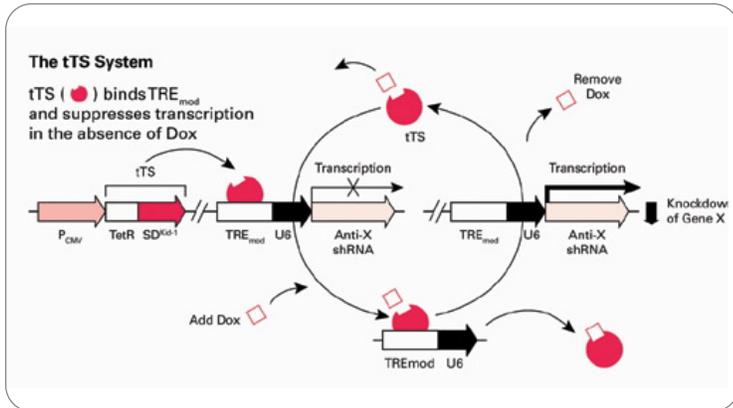
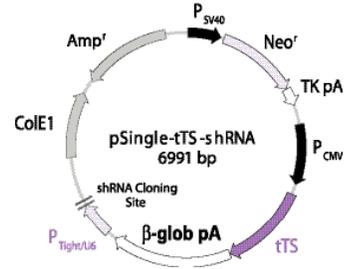
Tet - Inducible RNAi Systems

Inducible RNAi를 위한 Single Vector System

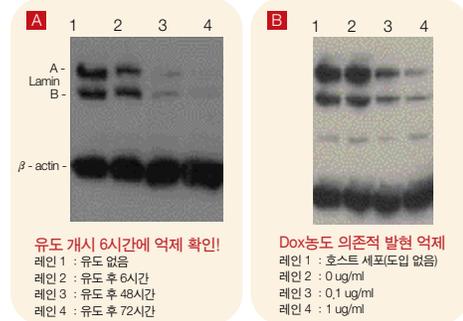
Knockout Single Vector Inducible RNAi System (Code 630933)

- shRNA expression vector와 regulator vector가 하나의 vector에!
- 번거로운 Tet 안정 발현 세포주 구축이 불필요!
- 실험 기간을 수주로 단축 가능!
- 유도 개시 6시간 후에 단백질 발현 억제 확인!
- Dox 농도 의존적으로 유전자 발현 억제 가능!

■ "All-in-one", single-vector system.



The Knockout Single Vector Inducible RNAi System uses a modified form of the tightly regulated, tetracycline-controlled gene expression system.



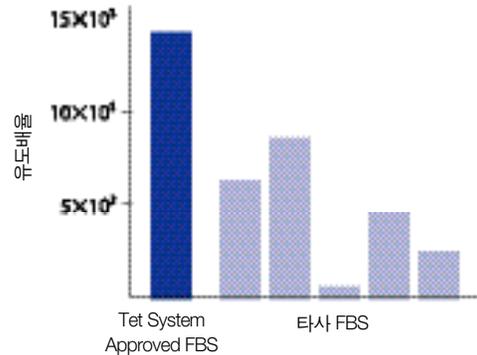
Anti-LaminA/C shRNA를 발현하는 HeLa 안정 세포주로 Dox 유도에 의한 LaminA/C의 유전자 발현 억제를 western blot에 의해 분석. A는 Dox 농도 1 ug/ml로 유도. B는 모두 72시간 유도.

Tet System Approved Fetal Bovine Serum

- Tet cell line에서 조절성 발현유도 시험 완료!
- Tet 유도기능이 보증된 FBS는 Clontech에서만 제공!
- 잔존 tetracycline 활성에 대한 염려 No!

Tet System Approved Fetal Bovine Serum (FBS)은 Tet 세포주로 tetracycline 발현유도 시험을 실시하여 그 성능이 완벽하게 발휘하는 것이 보증된 FBS이다. 시판의 antibiotics-free 혈청에서는 잔존하는 tetracycline 활성을 가지고 있는 경우가 있어, 백그라운드 발현 가능성이 있다. Tet System Approved FBS를 사용하면 이러한 염려를 해소하여 보다 정확한 Tet System 실험을 실시할 수 있다.

제품명	Size	Code
Tet System Approved FBS, US-Sourced	50 ml	631105
	500 ml	631101
Tet System Approved FBS, USDA-Approved	50 ml	631107
	500 ml	631106



타사 FBS를 사용했을 경우의 CHO-AA8-Luc Tet-Off control 세포 주의 luciferase 활성 유도 비교
 Tet System Approved FBS는 타사 FBS보다 백그라운드 발현 레벨이 낮고, 높은 유도배율을 얻을 수 있는 것을 알 수 있다.

Tet-On® & Tet-Off® System 제품일람

추천 Tet-On Advanced & Tet-Off Advanced 시스템

제품명	용도	Size	Code
Tet-Off Advanced Inducible Gene Expression System	기저 발현을 억제한 개량형 Tet-Off system	1 Kit	630934
Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System	기저 발현을 억제한 개량형 Tet-On system	1 Kit	630930

System 내용 : pTet-On Advanced Vector 또는 pTet-Off Advanced Vector, pTRE-Tight Vector, pTRE-Tight-Luc Vector, Linear hygromycin selection marker
 U2-OS-Luc Tet-On Control Cell Line(Tet-On) 또는 CHO-AA8-Luc Tet-Off Control Cell Line(Tet-Off), Tet System Approved FBS (50 ml)

추천 Tet-On Advanced & Tet-Off Advanced Vector

제품명	용도	Size	Code
pTet-Off Advanced Vector	기저 발현을 억제한 개량형 Tet-Off regulator vector	20 ug	631070
pTet-On Advanced Vector	기저 발현을 억제한 개량형 Tet-On regulator vector	20 ug	631069

개량형 Response vectors pTRE-Tight 시리즈

Tet-On Advanced & Tet-Off Advanced, Tet-On, Tet-Off 시스템에 사용가능

제품명	용도	Size	Code
pTRE-Tight Vector	기저 발현량을 억제한 TRE response vector	각 20 ug	631059
pTRE-Tight-BI Vector	2 유전자를 동시 발현 제어 가능한 발현 vector		631068
pTRE-Tight-DsRed2 Vector	형광 리포터를 발현하는 컨트롤 response vectors		631061
pTRE-Tight-AcGFP1 Vector			631063
pTRE-Tight-ZsGreen1 Vector			631062
pTRE-Tight-BI-AcGFP1 Vector			631066
pTRE-Tight-BI-DsRed-Express Vector	목적 유전자와 형광 리포터를 동시 발현 제어 가능한 vectors		631065
pTRE-Tight-BI-DsRed2 Vector			631064
pTRE-Tight-BI-ZsGreen1 Vector			631067

Tet-On & Tet-Off System 기본 Vectors

Basic 타입의 Tet-On & Tet-Off regulator vectors 및 response vectors

제품명	용도	Size	Code
pTet-Off Vector	Tet System regulator vector	각 20 ug	631017
pTet-On Vector			631018
pTet-tTS Vector	Tet-On의 background 억제하기 위한		631011
pTRE2 Vector	Tet response vector		631008
pLP-TRE2 Acceptor Vector	Creator System 대응용 Tet response vector		631016
pTRE2pur Vector	Puromycin 또는 Hygromycin 선택 마커를 탑재		631013
pTRE2hyg Vector			631014

Tet-On & Tet-Off를 이용한 RNAi 유도 시스템

Knockout inducible RNAi System

제품명	용도	Size	Code
Knockout Single Vector Inducible RNAi System	1 벡터에 의한 shRNA 발현 조절 시스템	1 Kit	630933
Knockout Tet RNAi System H	Tet System를 이용한 shRNA 발현 시스템	각 1 Set	630925
Knockout Tet RNAi System P			630926
HEK 293 tTS Cell Line	tTS 발현 안정 세포주	각 1 ml	630927
HeLa tTS Cell Line			630928
MCF7 tTS Cell Line			630929

Tet-On & Tet-Off를 이용한 Adenovirus · Retrovirus 발현 시스템

Adeno-X Tet-On & Tet-Off Expression System

제품명	용도	Size	Code
Adeno-X Tet-Off Expression System 1	유도성 Adenovirus 발현계	각 1 Set	631022
Adeno-X Tet-On Expression System 1			631050
Adeno-X Tet-Off Expression System 2		5 회	631058

Retro-X Tet-On & Tet-Off Advanced Inducible Expression System

제품명	용도	Size	Code
Retro-X Tet-Off Advanced Inducible Expression System	유도성 Retrovirus 발현계, 기저 발현을 억제한 개량형 Tet-Off system	각 1 Set	632105
Retro-X Tet-On Advanced Inducible Expression System	유도성 Retrovirus 발현계, 기저 발현을 억제한 개량형 Tet-On system		632104
RevTet-Off System compatible with Creator Cloning	Creator 시스템을 이용한 유도성 Retrovirus 발현계	각 1 Set	631023
RevTet-On System compatible with Creator Cloning			631024
pRetroX-Tight-Hyg Vector	기저 발현을 억제한 Hyg 마커 탑재 Retrovirus response vector	20 ug	631034
pRevTRE Vector	Retrovirus response vector	20 ug	631002
pLP-RevTRE Acceptor Vector	Creator 시스템을 이용한 Retrovirus 발현 vector	20 ug	631015
pRevTet- Off- IN Vector	Retrovirus용 regulator vectors	각 20 ug	631001
pRevTet- Off Vector			631003
pRevTet- On Vector			631007

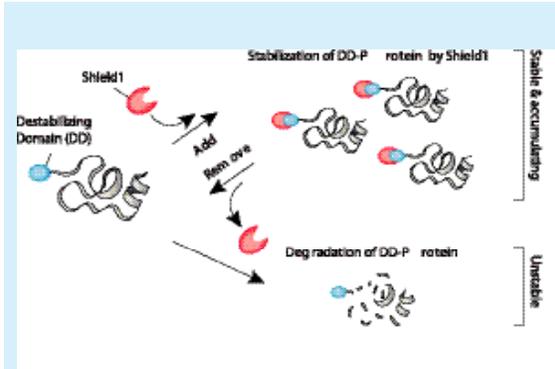
Control your protein level like magic!

ProteoTuner™

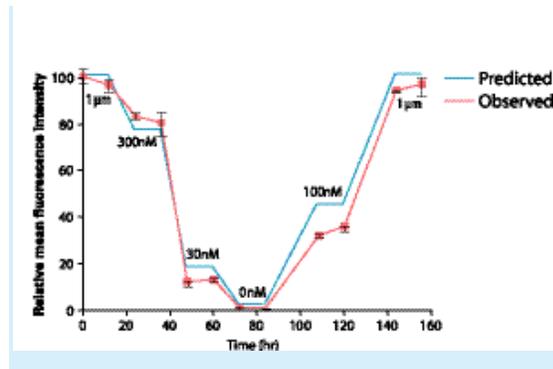
세포내 표적 단백질의 양을 신속, 가역적, 특이적으로,
유전자 레벨이 아닌 단백질 레벨로 컨트롤 가능!!

ProteoTuner System은 12 kDa의 **Destabilization domain (DD)**과 membrane-permeable small molecule (75 kDa) ligand인 **Shield1**으로 구성되어 있으며, 세포내 목적 단백질의 양을 빠른 속도로 가역적인 조절이 가능한 시스템이다. 목적 유전자를 DD-Tag가 있는 vector에 클로닝하여 발현시키면, DD fusion protein은 세포내에서 proteosomal degradation 과정을 거치지만, 배양 배지에 Shield1을 넣으면 Shield1이 DD에 결합하여 DD fusion protein의 분해를 막는 원리이다.

■ Ligand-dependent, targeted and reversible protein stabilization



■ Predictable and reversible, Shield1-dependent regulation intracellular protein



References

1. LA Banaszynski, LC Chen, LA Maynard-Smith, AG Ooi, and TJ Wandless, A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules, *Cell*, 2006 Sep 8;126(5):995-1004
2. LA Banaszynski and TJ Wandless, Conditional control of protein function, *Chem, Biol*, 2006 Jan;13(1):11-21, Review
3. Armstrong CM, Goldberg DE, An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*, *Nat Methods*, 2007 Dec;4(12):1007-9, Epub 2007 Nov 11,
4. A Herm-Gotz, C Agop-Nersesian, S Munter, JS Grimley, TJ Wandless, F Frischknecht, and M Meissner, Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*, *Nat Methods*, 2007 Dec;4(12):1003-5, Epub 2007 Nov 11,
5. Lystranne A, Maynard-Smith, Ling-chun Chen, Laura A. Banaszynski, A. G. Lisa Ooi, and Thomas J. Wandless, A directed approach for engineering conditional protein stability using biologically silent small molecules, *J Biol Chem*, 2007 Aug 24;282(34):24866-72, Epub 2007 Jul 1,
6. R Berdeaux, N Goebel, L Banaszynski, H Takemori, T Wandless, GD Shelton, and M Montminy, SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes, *Nat Med*, 2007 May;13(5):597-603, Epub 2007 Apr 29,

제품명	Vector type	Antibiotic Resistance ¹	Fluorescent Protein	Size	Code
ProteoTuner System	Plasmid	Kanamycin / G418	None	each	632172
ProteoTuner IRES2 System	Plasmid	Kanamycin / G418	AcGFP1	each	632168
Retro-X ProteoTuner System	Retroviral	Ampicillin / Puromycin	None	each	632171
Retro-X ProteoTuner IRES System	Retroviral	Ampicillin / None	ZsGreen1	each	632167
Shield1				60 ul	631037
Shield1				200 ul	631038

¹ Bacterial / eukaryotic

Takara

다카라코리아바이오테크놀로지주식회사

153-779 서울특별시 금천구 가산동 뉴티캐슬 601호

Tel : 02 - 2081- 2510 Fax : 02 - 2081- 2500

URL : www.takara.co.kr E-mail : support@takara.co.kr