

# Tet-On & Tet-Off inducible gene expression으로 toxic gene의 expression

Clontech  
a TAKARA BIO company

- pTRE-Tight vector로 Caspase-8의 expression 제어
- Linear Selection Marker를 통해 효율적으로 stable cell line를 획득
- Tet approved FBS로 최고의 inducible 효율

동물세포에 외래 유전자를 도입하여 expression 수준을 자유재로 조절하는 시스템은 유전자 기능해석에 매우 유용하다. 그 중 Tetracycline controlled expression 시스템은 가장 좋은 성능을 갖고 널리 사용되고 있는 방법이다.

이 시스템은 10년 전 Bujard와 Gossen에 의해 최초로 보고된 이래 수많은 유전자 expression 조절에 사용되어 왔다. 다른 inducible gene expression은 대부분 호르몬을 통해서 expression을 조절하기 때문에 호르몬이 세포나 동물에 커다란 영향을 해석을 곤란하게 할 가능성이 있다. 그러나 tetracycline inducible expression 시스템은 포유류에는 거의 영향을 미치지 않는 항생물질인 tetracycline을 사용하고 있어, inducible 시약, 배양세포, transgenic 동물의 expression에 거의 영향을 끼치지 않는다. 또한 유도 효율이 높아 inducible expression 시스템의 표준이 되고 있다.

Clontech에서는 이 시스템의 응용범위를 더욱 넓히기 위하여 induction이 안될 때, 백그라운드 expression 수준을 억제하기 위한 제품개발에 주력하고 있다.

본 고에서는 pTRE-Tight vector, Linear Selection Marker, Tet approved FBS를 소개하면서 세포에 유독한 apoptosis 관련 유전자의 하나인 Caspase-8을 inducible expression하는 실험을 소개하고자 한다.

## pTRE-Tight vector

Tetracycline inducible gene expression은 낮은 백그라운드와 높은 inducible 효율이 특징인데, pTRE-Tight vector는 그 백그라운드 수준을 한층 더 낮출 수 있다. 이 vector는 pTRE2와 비교하여 Tet response promoter를 개선하고, 5' non translation region을 간소화하고, poly A<sup>+</sup> signal을 변경하여(그림 1) 백그라운드의 expression 수준을 큰 폭으로 억제하고 있다(그림 2). 한편 유도 시의 expression 수준은 pTRE2와 동등하여(그림 2) 유도 효율이 큰 폭으로 향상되고 있다. Flow cytometry의 해석(그림 3)에서도 거의 모든 세포의 expression이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

## Linear Selection Marker

Linear Selection Marker는 SV40 promoter, 약제 내성 유전자 및 SV40 poly A<sup>+</sup> signal로 이루어지는 짧은 유전자 단편으로, stable cell line을 높은 효율로 제작할 수 있다. Linear Selection Marker를 사용하면 pTRE2-Hyg/Pur와 같이 약제 내성 유전자가 조합된 vector나 pTK-Hyg/pPUR와 같이 약제 내성 유전자를 expression하는 plasmid를 사용할 때 보다 훨씬 효율적인 stable cell line을 얻을 수 있었다(표 1). 또 이들 stable cell line은 유도 효율이 높은 것도 특징이다.

## Tet approved FBS

Tetracycline inducible gene expression의 능력을 최대한으로 살리고자 한다면 반드시 Tet approved FBS를 사용하기 바란다. FBS는 종종 tetracycline이 혼입되어 있는데, 이는 tetracycline inducible gene expression의 백그라운드를 높이는 원인이 된다(그림 4). Tetracycline을 포함하지 않는다고 광고하는 FBS는 다른 회사에서도 판매되고 있으나, tetracycline inducible gene expression에서 실제로 테스트를 하여 품질관리를 하고 있는 제품은 Tet-Approved FBS 뿐이다.

## Caspase-8의 expression

Caspase-8은 PARP를 절단하는 thiol protease로, apoptosis를 induction하는 것으로 알려져 있다. Caspase-8은 세포 특성이 매우 강하기 때문에 백그라운드 expression 수준이 매우 낮은 inducible gene expression을 사용하지 않으면, 따라서 pTRE-Tight의 성능을 확인하기 위하여 백그라운드 expression 수준이 높아지기 쉬운 HEK293 cell에 Tet-On 시스템을 이용하여 pTRE-Tight vector에 cloning한 Caspase-8 유전자를 제어하였다. 그 결과 그림 5, 6과 같이 pTRE-Tight에서는 백그라운드 expression을 확인할 수 없었고 induction이 안될 때 경우에도 apoptosis가 일어나지 않았다. 이에 비하여 doxycycline을 첨가하여 caspase-8의 expression을 induction한 경우에는 78%의 세포에서 apoptosis가 검출되었다.

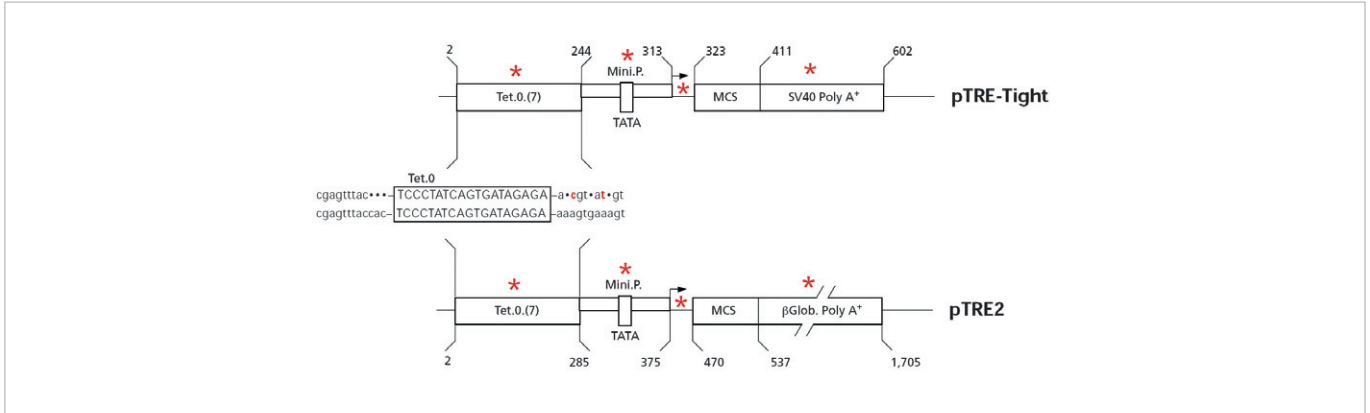


그림 1 TRE-Tight와 TRE2 vector의 비교

pTRE-Tight에서는 Tet operator의 간격을 6-7 염기 줄였다. Minimal CMV promoter와 5' non translation region도 짧고, 짧아진 SV40 poly A<sup>+</sup> 서열을 사용하고 있다. Promoter는 Dr. H. Bujard의 연구실에서 pTet14 promoter로 개발되었다.

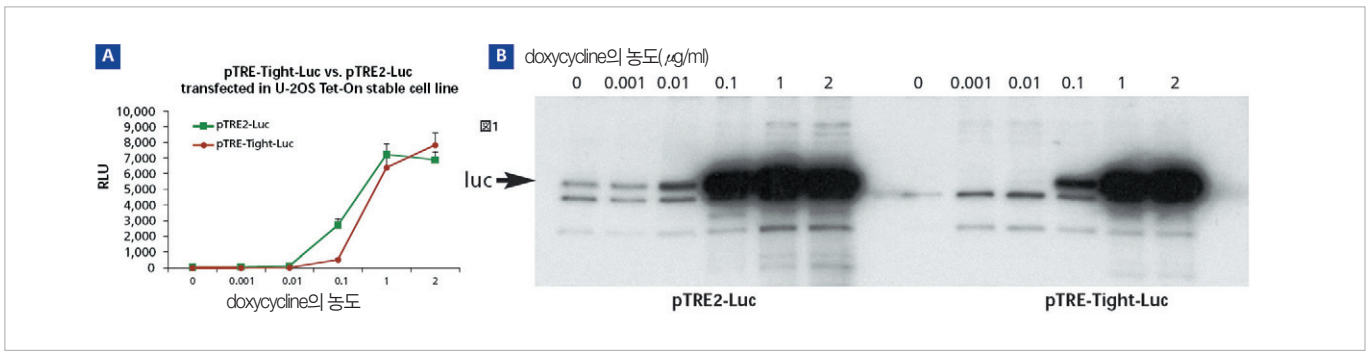


그림 2 pTRE-Tight에 의한 백그라운드의 저하

Tet-On U2-OS cell에 pTRE-Tight-Luc 또는 pTRE2-Luc를 도입하여 다양한 doxycycline 농도에서 배양하였다.

Panel A: 세포 추출액의 luciferase 활성, Panel B: Anti luciferase 항체로 western blot

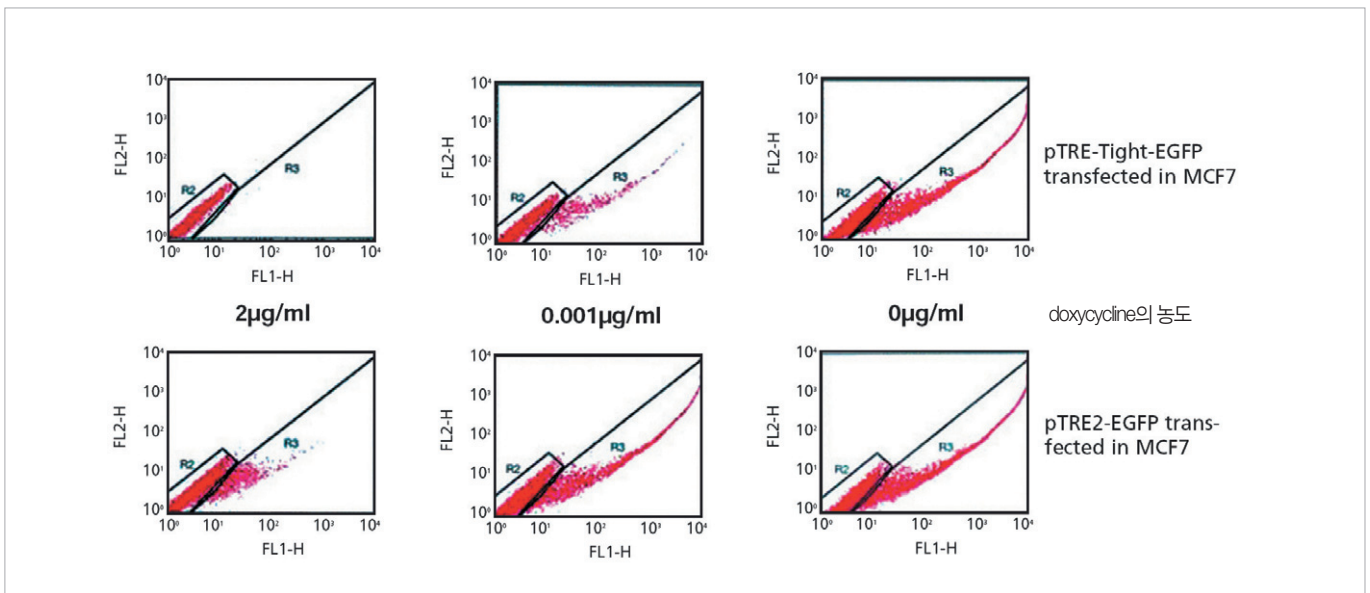


그림 3 Flow cytometry로 pTRE-Tight의 낮은 백그라운드 확인

Tet-Off MCF7 cell에 pTRE-Tight-EGFP 또는 pTRE2-EGFP를 도입하여 다양한 doxycycline 농도에서 배양하였다. FACS Calibur의 488 nm 레이저를 사용하여 flow cytometry로 분석하였다.

## 결론

당사의 tetracycline inducible gene expression은 지난 10년 동안 풍부한 실적으로 많은 연구자들 사이에서 이용되고 있다. 지금까지 수많은 개선이 이루어져 매우 독성이 높은 유전자까지도 엄격하게 조절할 수 있게 되었다. 최신 tetracycline inducible expression 기술을 활용하여 여러분의 연구를 효율적으로 전개하고자 한다면 pTRE-Tight vector, Linear Selection Marker, Tet approved FBS의 사용을 권장한다.

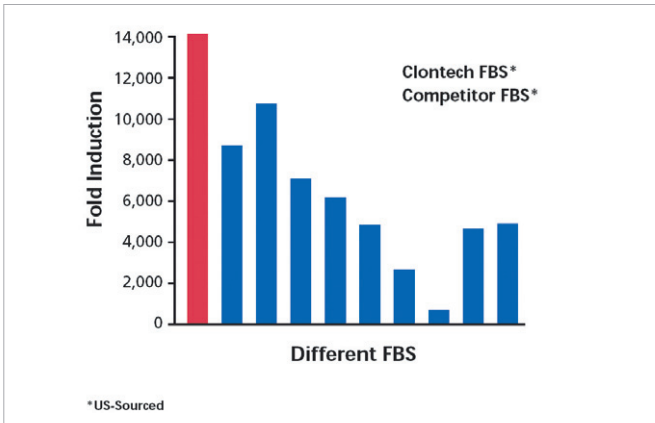


그림 4 각사의 FBS를 Tet 시스템으로 평가

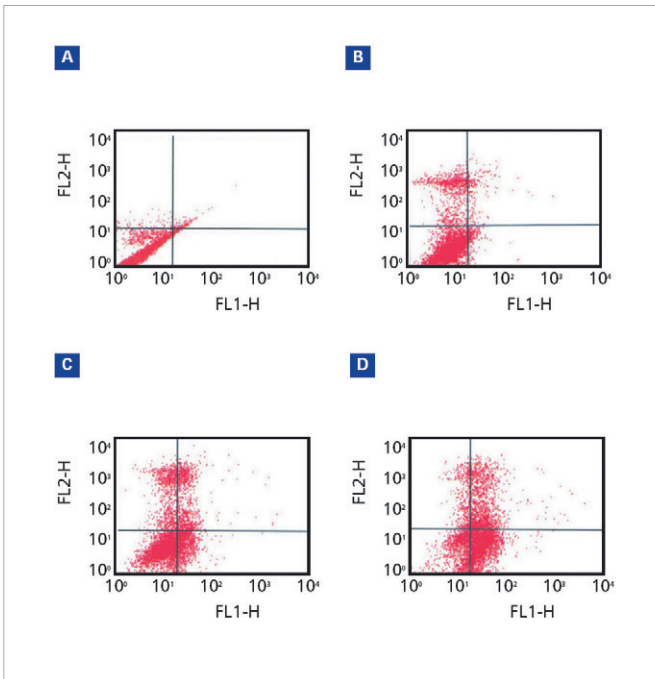


그림 5 Procaspase-8의 inducible expression에 의한 cell death  
HEK293-Tet-On-caspase-8 세포를 각종 농도의 doxycycline에서 6시간 배양하고 회수한 후, 고정하고 염색을 하였다. 세포는 FACS Calibur로 분석하였다.  
Panel A : doxycycline 0 µg/ml; cell death는 관찰되지 않음.  
Panel B : doxycycline 0.01 µg/ml; ~20% cell death 확인.  
Panel C : doxycycline 0.1 µg/ml; ~42% cell death 확인.  
Panel D : doxycycline 1 µg/ml; ~78% cell death 확인.

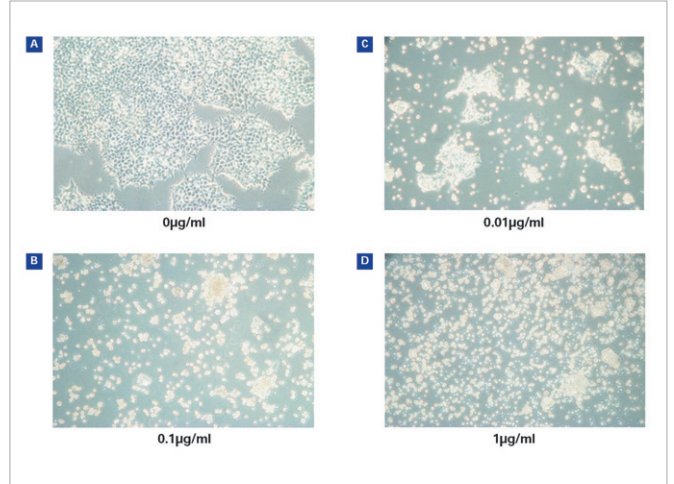


그림 6 HEK293 Tet-On-caspase-8 cell  
세포를 각종 doxycycline 농도에서 배양하고 12시간 후에 Zeiss Axioskop50 현미경으로 관찰하였다. 세포는 doxycycline 첨가 후 12시간 이내에 apoptosis가 발생되고 있었다.

표 1 각종 transfection을 통해 얻은 Positive Clone

Vector	# Positive Clone	% Positive Clone
<b>Hygromycin</b>		
pTRE-Hyg	8/27	30%
pTK-Hyg*	2/5	40%
Linear Hyg	22/28	79%

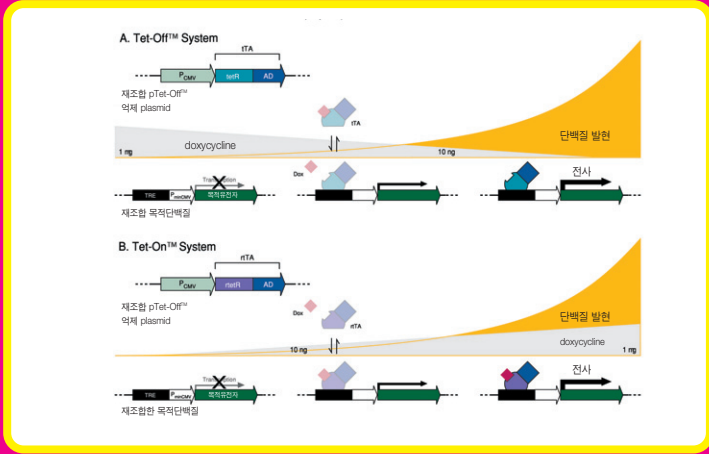
<b>Puromycin</b>		
pTRE2-Pur	4/11	36%
pPur*	3/7	42%
Linear Pur*	6/8	75%

\* Co-transfection을 이용한 selection marker와 expression vector(pTRE-Tight-Luc)의 비율은 1:20 이다.

제품명	Size	Code
pTRE-Tight Vector	20 µg	631059
pTRE-Tight-EGFP Vector	20 µg	631060
pTRE-Tight-DsRed2 Vector	20 µg	631061
Linear Hygromycin Marker	2 µg	631625
Linear Puromycin Marker	2 µg	631626
Tet System Approved FBS, US-Sourced	50 ml	631105
	500 ml	631101
Tet System Approved FBS, USDA-Approved	50 ml	631107
	500 ml	631106

최고의 유전자 발현 조절 시스템

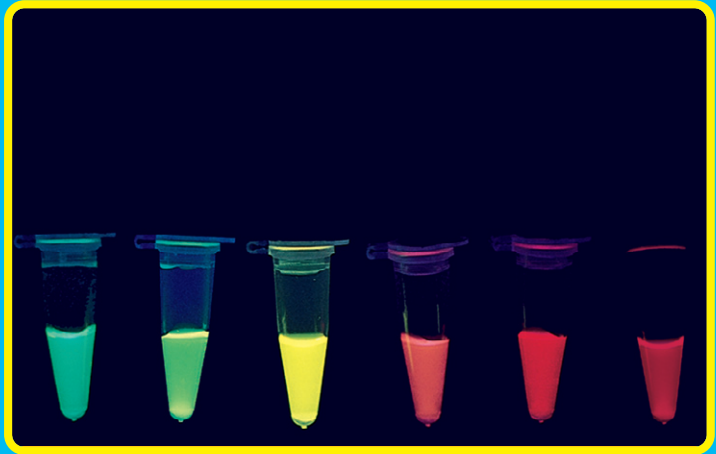
# Tet-On™ & Tet-Off™ System



- 정확한 dose dependent expression 억제
- 매우 낮은 expression에서 높은 수준 유도
- Transgenic mouse와 배양세포에서 좋은 결과
- 많은 Tet 유도 세포주 선택 가능
- Retrovirus 및 adenovirus expression계에 사용

Gene Expression, Protein localization의 실시간 관찰에 이상적인 시스템

# Living Colors™ Reef Coral Fluorescent Protein



- 하나의 라이선스로 복수의 형광단백질 이용 가능
- 많은 색깔(남색, 녹색, 황색 및 3개의 서로 다른 적색)로 다중 염색에 이상적
- 살아있는 세포 분석으로 신속하게 검출 가능

**Clontech**  
 a TAKARA BIO company



Takara Technical Support Line

462-120 경기도 성남시 중원구 상대원동 66-2 생명공학커뮤니티 Bio21 **TEL 031-739-3320** FAX 031-739-3321 E-mail support@takara.co.kr

[지역별 전문대리점] 다인바이오(주)(서울, 인천, 경기, 강원) 031-748-8166/ (주)화인라이프사이언스(서울, 인천, 경기) 02-2026-5350 (주)라인바이오(대전, 충청) 042-471-6666

(주)브니엘바이오(대구, 경북) 053-381-3611 대한과학(부산, 경남) 051-245-6582 SNT(진주) 055-759-2522 (주)삼화교역(전주, 전북) 063-227-3700

(주)진성에스엠알(광주, 전남) 062-672-7631 한라바이오랩(제주) 064-726-3251~4

\* 서울, 경기, 인천 : Clontech 제품은 2개 대리점으로 운영, 더욱 더 편리하게 구매하실 수 있습니다. Clontech : 다인바이오(주), (주)화인라이프사이언스, TaKaRa : 다인바이오(주)