

Tet-On® Advanced System을 이용한 Living Color® Fluorescent Protein Reporters와 miRNA의 유도발현 모니터링

Molecular Biology Group
Clontech Laboratories, Inc.

새로 발견된 RNA interference (RNAi)는 포유류 유전자의 기능과 역할을 규명하는데 사용할 수 있는 매우 유용하고 강력한 방법이다. RNAi 실험 시 RNAi를 일으키는 microRNA (miRNA)를 사용함으로써 miRNA와 짝을 이루는 reporter 유전자를 통하여 miRNA 발현을 추적할 수 있는 장점이 생긴다. Clontech의 miRNA-Living Colors Fluorescent Protein 발현체를 Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System에 삽입하여 살아있는 세포에서 miRNA의 발현 조절하고 모니터링 하면서, 동시에 목적 유전자의 발현 억제를 관찰할 수 있다. 본 시스템은 최적의 miRNA 발현을 나타내는 stable cell line을 동정하거나 목적 유전자의 발현 억제를 잘 조절 할 수 있도록 한다.

Tet-On® Advanced System은 Pol II-based miRNA transcription의 활성을 사용하기 때문에 transgenic animal에서 조직 특이적인 유전자 발현 억제에 이용할 수 있다.

■ 서론

최근 RNAi 기술의 발전에 따라 'loss-of-function method'가 개발되어 보다 빨리 유전자의 기능을 규명할 수 있게 되었다. RNAi는 서열 특이적이고 효과적인 세포내의 유전자 발현 억제 기작이며, 이는 수많은 small noncoding RNA들에 의해 수행된다.

Short hairpin RNAs (shRNAs)는 target mRNA를 서열 특이적으로 분해하는

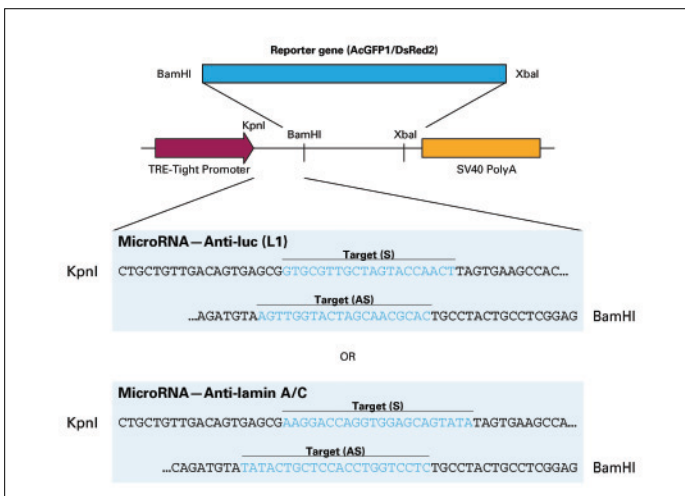


그림 1. Organization of the anti-lamin A/C and anti-Luc (L1) miRNA expression cassettes, Anti-luciferase and anti-lamin A/C miRNA-like sequences, based on the miR-30 miRNA, were joined to the coding regions of AcGFP1 or DsRed2 cDNAs in the pTRE-Tight expression plasmid. Sense (S) and anti-sense (AS) target sequences are connected by a 19 nt loop sequence. Transcripts are processed to yield either an active miRNA or a mature mRNA for the fluorescent protein.

작은 Pol III transcript이다^{1,2)}. MicroRNAs (miRNAs) 또한 작은 hairpin 형태의 RNA로 mRNA를 분해할 수도 있지만, translation 과정을 저해할 수도 있다³⁾. MicroRNA precursor는 다양한 Pol II transcript와 함께 존재하며, 인간, 동 식물, 그리고 바이러스에 이르기까지 두루 존재한다. 이러한 모든 inhibitory RNA들은 small interfering RNA (siRNA) duplex를 만들어내는 과정을 거치고, 여기서 생산된 siRNA는 목적 단백질과 결합하여 RNAi pathway를 따라 그 효과를 발휘하게 된다. Pol III shRNA 발현체를 target 세포로 삽입하면 RNAi가 효과적으로 시작될 수 있다. 그러나, Pol III transcript가 단백질로 쉽게 translation되지 않기 때문에 함께 발현시킨 reporter 단백질을 이용하여 shRNA 발현을 독립적으로 추적하기는 불가능하다. 따라서 shRNA에 의한 유전자 억제가 실패하고 reporter 단백질이 발현되지 않았을 경우 shRNA가 기능을 못해서인지 아니면 단백질 발현 정도가 낮아서인지 결정하기가 어렵다.

■ miRNA 전달을 위한 Tet-On® Advanced System

RNAi 관련 연구에 miRNA를 사용하는 것이 유리한 몇 가지 이유가 있다. 이 강력한 inhibitory RNA는 세포 내에서 shRNA 보다 훨씬 쉽게 만들어진다. 실제로 miRNA는 Pol II에 의해 만들어지는 단백질을 coding하고 있는 mRNA의 intron에서 자주 발견된다. Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System (TaKaRa Code 630930)은 miRNA의 이러한 특징을 이용하여 miRNA 전사를 높은 수준으로 조절할 수 있도록 한다. 또한, reporter 단백질을 coding하는 유전자 서열은 single transcript 내의 miRNA와 결합할 수 있다. Coexpression된 reporter 단백질은 miRNA의 발현을 확인하고 추적하

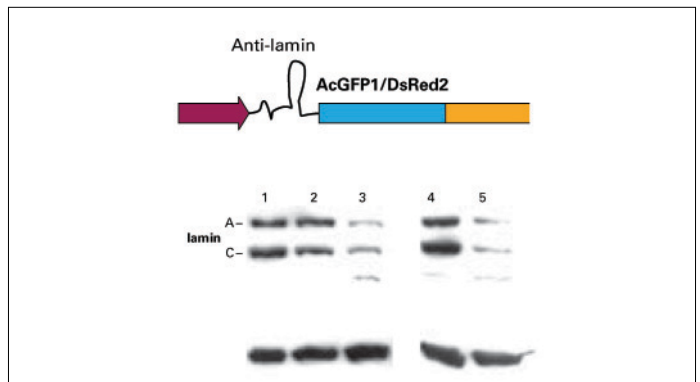


그림 2. Doxycycline-Induced suppression of lamin A/C in HeLa cell lines. Stable, inducible HeLa cell lines were produced that expressed the Tet-On Advanced transactivator and either the pTRE-Tight-lamin A/C-AcGFP1 or DsRed2 construct. Cells were grown in the presence or absence of Dox and assayed after 72 hr by Western Blot analysis. Lane 1: Parental cells. Lane 2: Anti-lamin A/C-AcGFP1 cells without Dox. Lane 3: Anti-lamin A/C-AcGFP1 with Dox (1 µg/ml). Lane 4: Anti-lamin A/C-DsRed2 without Dox. Lane 5: Anti-lamin A/C-DsRed2 with Dox (1 µg/ml).

Tet-On[®] Advanced System을 이용한 Living Color[®] Fluorescent Protein Reporters와 miRNA의 유도발현 모니터링

Continued...

는데 매우 유용하다. Tet-On[®] Advanced System은 강력하게 조절되어 정확하게 발현되는 tetracycline에 의해 제어되는 유전자 발현시스템이기 때문에 이러한 적용이 가능하다⁴⁷. 유전자의 발현 억제 시 독성을 나타내거나 치명적이어서 분석이 힘든 경우, 이러한 inducible RNAi에 의한 제어법은 특별히 더 유용하다. Tet-On[®] Advanced System의 basal expression은 극도로 낮을 뿐만 아니라 원하지 않는 target 유전자의 발현 억제를 방지한다. 반면, 발현을 유도 했을 때는 강력한 유전자 억제 효과를 발휘한다. Promoter 활성보다는 전사 억제를 이용하는 타사의 시스템과는 다르게, Tet-On[®] Advanced delivery 방법은 RNAi에 의해 조절되는 유전자 억제를 조직 특이적으로 조절할 수 있게 한다.

■ Fluorescent Reporter에 miRNA 연결

Clontech에서는 두 개의 다른 target 유전자 (endogenous lamin A/C 유전자와 luciferase transgene)의 RNAi 유도 억제 실험을 통하여 본 시스템의 유용성을 입증하였다. 각각 anti-lamin A/C와 anti-luciferase (L1)에 해당하는 miR-30-like 서열을 포함하는 miRNA-based expression construct를 만들고, 형광 단백질 cDNA 서열의 5' -말단에 연결시켰다 (그림 1). 각 miRNA 서열은 G. J. Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, NY) 연구실에서 개발한 온라

인 miRNA/shRNA design tool을 이용하여 제작되었고, 22 개 염기의 sense와 anti-sense 서열이 19 개의 nucleotides로 구성된 loop에 의해 연결된 형태이다⁴⁸. miRNA의 발현을 추적하기 위해 Living Colors[®] 형광 단백질인 DsRed2와 AcGFP1을 reporter 단백질로 사용하였다. 이렇게 만들어진 construct는 세포 안에서 RNA precursor를 거쳐 활성 miRNA로 만들어지고, 형광단백질을 coding하는 일부 mRNA는 processing 되지 않고 intact한 상태로 남아 있었다⁴⁹.

Tet-On[®] Advanced System의 TRE-Tight promoter는 Tet-On[®] Advanced reverse transactivator에 의해 조절되는 miRNA fusion transcripts를 발현시키는데 사용되었다. pTRE-Tight plasmid를 HEK 293 Tet-On[®] Advanced Cell Line (TaKaRa Code 630931)에 도입시키거나, pTet-On-Advanced expression plasmid와 함께 HeLa cell에 도입시켜 stable cell line을 제작하여 doxycycline (Dox; a tetracycline derivative)에 의해 RNAi 유도 target 유전자의 억제와 형광 단백질 발현이 동시에 유도될 수 있었다.

■ Endogenous HeLa Cell Lamin 발현의 억제

Anti-lamin-DsRed2와 anti-lamin-AcGFP1은 HeLa cell 내의 lamin 발현을 억제하는데 사용되었다. Tet-On[®] Advanced System에 의해 조절되는 anti-lamin miRNA construct를 발현하는 stable HeLa cell line을 제작하였다. Dox의 존재 하에 배양된 transfection된 HeLa cell의 lamin 단백질 발현 양이 크게 감소되었고, 이를 Western blot으로 확인하였다 (그림 2). 반면, Dox가 존재하지 않았을 때 자란 parental cell과 transfection된 세포는 정상 수준의 lamin 단백질을 발현하였다. Dox를 투여하였을 경우 살아있는 세포에서 형광 단백질이 높은 수준으로 발현되는 것이 관찰되었다 (그림 3). 이와 같은 결과는 형광 단백질과 함께 발현된 miRNA가 세포 내 target 유전자의 발현을 효과적이고 특이적으로 억제하였고, 남아있는 intact mRNA 양이 reporter 단백질을 확인하는데 충분했다는 것을 보여준다.

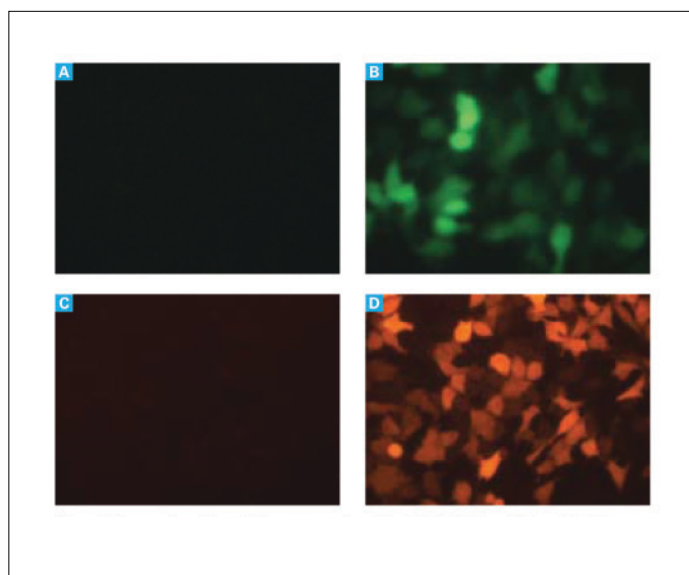


그림 3. Doxycycline-induced fluorescence in anti-lamin A/C HeLa cell lines. The HeLa cell lines described and treated as in Figure 2 were visualized by fluorescence microscopy. Panel A, Anti-lamin A/C-AcGFP1 cells without Dox, Panel B, Anti-lamin A/C-AcGFP1 cells with Dox (1 ug/ml), Panel C, Anti-lamin A/C-DsRed2 cells without Dox, Panel D, Anti-lamin A/C-DsRed2 cells with Dox (1 ug/ml). Dox treatment-induced strong fluorescence in cells that also exhibited lamin A/C knockdown.

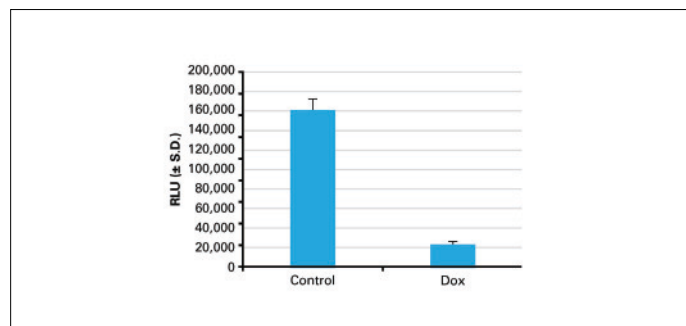


그림 4. Doxycycline treatment reduces luciferase activity in HEK-293 cells transfected with the Anti-Luc-DsRed2 reporter. Hek-293 cell lines stable transformed with Tet-On Advanced were transiently cotransfected with pCMV-Luc and pTRE-Tight-L1-DsRed2 in triplicate at a ratio of 1:2, and then grown in the presence of Dox (1 ug/ml) for 72 hr. The L1 miRNA induced by Dox treatment caused a 85% reduction in luciferase activity, S.D. = standard deviation.

Tet-On[®] Advanced System을 이용한 Living Color[®] Fluorescent Protein Reporters와 miRNA의 유도발현 모니터링

Continued...

■ Luciferase Transgene 억제

Luciferase transgene의 inducible suppression을 관찰하기 위한 cell line으로 HEK 293 Tet-On[®] Advanced Cell Line을 사용하였다. pTRE-Tight-L1-DsRed2 construct와 luciferase expression plasmid인 pCMVLuc을 일시적으로 도입한 세포를 72 시간 동안 Dox를 처리하거나 혹은, 처리하지 않은 조건에서 배양했다. Luciferase 발현을 분석한 결과, Dox가 처리된 세포에서 발현된 L1 miRNA가 Dox 처리되지 않은 세포에 비해 luciferase 효소 활성이 85%까지 감소되었다 (그림 4). 또한 Dox 처리한 세포에서만 강력한 DsRed2 형광 발색이 나타났는데, 이는 luciferase gene이 효과적으로 발현 억제 되었음을 나타낸다 (그림 5).

■ 결론

이와 같은 일련의 실험들은 miRNA에 의해 유도된 목적유전자의 발현 억제를 조절하는데 Tet-On[®] Advanced System의 적용과 reporter gene으로써 형광 단백질을 같이 발현시키는 것이 유용하다는 것을 보여준다. 목적 단백질의 발현량 감소나 기능적인 분석을 통해 평가하는 miRNA 활성 보다, whole cell fluorescence가 stable cell line을 선별하는데 유용할 수 있다. 이러한 다기능 construct는 쉽게 Tet-On[®] Advanced System과 통합되어 정확하고 강력한 유전자 억제를 가능하게 한다. 장기간 동안 RNAi 실험을 필요로 하는 세포 내의 유전자 연구의 host로 현재 많은 Tet system cell line들이 사용되고 있다.

■ 참고문헌

1. Paddison, P., et al. (2002) *Genes & Devel.* **16**(8):948-958.
2. Du, T. & Zamore, P. (2005) *Development* **132**(21):4645-4652.
3. Bartel, D. (2004) *Cell* **116**(2):281-297.
4. Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(12):5547-5551.
5. Gossen, M., et al. (1995) *Science* **268**(5218):1766-1769.
6. Urlinger, S., et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(14):7963-7968.
7. Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System (January 2006) *Clontechiques* **XXI**(2):1-3.
8. Hannon Lab Website: <http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNA/RNAi.cgi?type=shRNA>.
9. Cai, X., et al. (2004) *RNA* **10**(12):1957-1966.

■ 관련제품

제 품 명	용 량	TaKaRa Code
Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System	each	630930
HEK 293 Tet-On Advanced Cell Line	each	630931
HepG2 Tet-On Advanced Cell Line	each	630932
pTRE-Cycle1	20 µg	631061
pTRE-Cycle2	20 µg	631066
pTRE-Cycle3	20 µg	631064

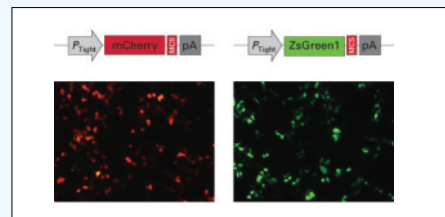
* License Notice : [8,12 13]

Tet-On[®] Advanced Expression System과 형광단백질 벡터의 핵심 요소만을 활용한

Mir-X[™] Inducible miRNA Red & Green System

(TaKaRa Code 631118 & 631120)

- Tet-On[®] System을 이용한 강력한 발현
- Red/Green 형광 단백질 marker를 이용한 inducible miRNA 발현



pmRi를 발현하는 MCF-7 Tet-On[®] Advanced cell

www.takara.co.kr

형광단백질 항체 시리즈

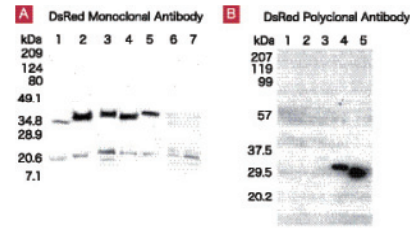
형광단백질 및 융합단백질을 검출하고 싶을 때는...

Living Colors[®] Antibody

- Western Blot
- Immuno precipitation
- Immuno cytochemistry

Living Colors[®] 시리즈에는 형광단백질을 검출하는 다양한 monoclonal antibody와 polyclonal antibody가 있다.

각 항체는 lot 간에 일정한 성능을 보증하며 형광단백질은 물론, N말단, C말단 융합 단백질의 검출도 가능하다.



Western blot detection of DsRed and its variants.

A HeLa cells were transiently transfected with the following vectors, and then analyzed by Western blot with the DsRed Monoclonal Antibody. Lane 1: pDsRed2-N1, Lane 2: pDsRed2-C1, Lane 3: pDsRed1-C1, Lane 4: pDsRed2-Mito (N-terminal fusion), Lane 5: pDsRed2-Nuc (C-terminal fusion), Lane 6: control (untransfected cells). A 20 kDa, non-specific band appears with extended exposure.

B Western blot with the DsRed Polyclonal Antibody. Lane 1: 25 ng of recombinant AcGFP1 protein. Lanes 2-5: HEK-293 cells were stably transfected with the following vectors, Lane 2: pAcGFP1, Lane 3: Control (untransfected cells), Lane 4: pDsRed-Monomer-N1, Lane 5: pDsRed-Express-N1.

형광단백질	추천하는 antibody	TaKaRa Code	적용가능한 실험
AcGFP1	GFP Monoclonal Antibody	632375	WB, IP, IC
	A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)	632380, 632381	WB, IP, IC
	Full-Length A.v. Polyclonal Antibody	632459, 632460	WB, IP
	A.v. Peptide Antibody	632376, 632377	WB, IP, IC
AmCyan1	Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody	632475	WB
AsRed2	Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody	632475	WB
mBanana	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
mCherry	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
DsRed2	Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody	632475	WB
	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
DsRed-Express	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
DsRed-Express2	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
DsRed-Monomer	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
HcRed1	Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody	632475	WB
	HcRed Polyclonal Antibody	632452	WB
mOrange	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
mPlum	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
mRaspberry	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
mStrawberry	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
tdTomato	DsRed Monoclonal Antibody	632392, 632393	WB, IP
	DsRed Polyclonal Antibody	632496	WB, IP, IC
ZsGreen1	Full-Length ZsGreen Polyclonal Antibody	632474	WB
	Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody	632475	WB
ZsYellow1	Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody	632475	WB
EGFP*	GFP Monoclonal Antibody	632375	WB, IP, IC
EYFP*	A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)	632380, 632381	WB, IP, IC
EYFP*	Full-Length A.v. Polyclonal Antibody	632459, 632460	WB, IP

WB= Western Blot. IP= Immunoprecipitation IC= Immunocytochemistry * 종매품 : vector만 종매