

Low background, High Sensitivity의 새로운 Inducible System 출시!

# Tet-On<sup>®</sup> 3G Inducible Expression System

Tet-On 3G Tetracycline Inducible Gene Expression Systems은 시판되고 있는 가장 강력하면서도 적용성이 뛰어난 제 3세대 inducible mammalian expression system으로, 매우 엄격하게 유전자 발현을 조절할 수 있도록 기존 제품의 성능을 개선하였다. 본 시스템을 이용하면 좀 더 가역적이고 정량적이며 재현성 있게 목적 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 3G 시스템은 Hermann Bujard, Manfred Gossen와 Wolfgang Hillen 연구그룹에 의해 개발되었으며<sup>3,4)</sup>, Background를 현저하게 줄일 수 있도록 개선된 새로운 promoter<sup>1)</sup>와 높은 민감도를 나타낼 수 있도록 개선된 transactivator protein의 조합<sup>2)</sup>으로 기존의 Tet System 기술을 뛰어넘는 혁신적인 시스템이다.

### ■ Tet-On 3G Inducible System의 개요

Tet-On 3G transactivator protein을 발현하며 TRE3G promoter ( $P_{TRE3G}$ )에 의해 조절되는 목적 유전자 (gene of interest; GOI)를 가지고 있는 목적 세포는 doxycycline (Dox; tetracycline analog)이 존재하는 배지에서 높은 수준으로 목적 유전자를 발현한다. Tet-On 3G protein은 Dox가 결합하면 형태적인 변화가 생겨  $P_{TRE3G}$  내의 tet operator (*tetO*)에 결합하게 된다 (그림 1). 새로운 시스템은 기존의 낮은 수준의 TetR-based system (Clontech에서는 판매하지 않는 제품)과는 달리, Tet-On 기술을 적용하여 transcription을 저해하기 보다는 촉진시키는 것으로 월등하게 낮은 basal expression과 높은 목적 유전자 발현이 가능하며, 한층 더 빨라진 반응시간 등의 장점을 가지며 특히 *in vivo* 실험에 최적이다.

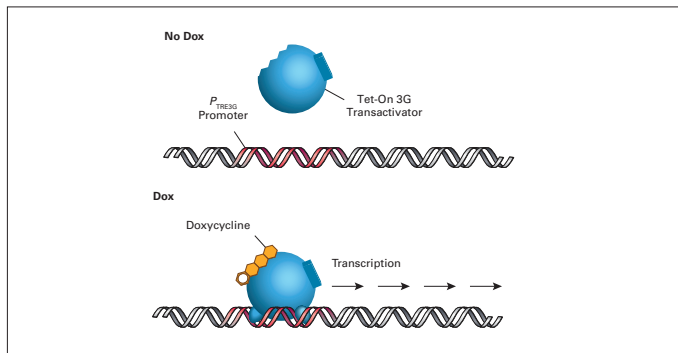


그림 1. The Tet-On 3G systems allow inducible gene expression only in the presence of doxycycline. When Dox binds, the transactivator undergoes a conformational change allowing it to bind tet operator (*tetO*) repeats within the TREG Promoter ( $P_{TRE3G}$ ). The transactivator activates expression through transcription activation domain repeats.

### ■ 월등하게 낮은 background와 높은 감도

Tet 3G system은 두 가지 최적화된 요소의 조합을 통해 기존의 Tet-On System에서 한층 더 업그레이드된 특징을 가지고 있다.

1.  $P_{TRE3G}$  promoter - 기존의 inducible promoter의 변이형으로 약 20 배 가량 background를 줄였다 (그림 2).

2. Tet-On 3G transactivator protein - Inducer인 doxycycline (Dox)에 대한 감도를 획기적으로 높인 변이형으로 아주 낮은 농도의 Dox (5~10 ng/ml)에서도 기존 Tet-On Advanced 보다 100~150 배 이상 발현량을 증가시킬 수 있다 (그림 3).

두 가지 요소를 조합하면 Dox 10 ng/ml에서도 목적 유전자를 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 뿐만 아니라 (그림 4), background 발현이 매우 낮아 transient cotransfection 시 발현 유도시점과 발현을 유도하지 않은 시점에서 발현량이 27,000 배 이상 차이가 나는 것을 확인하였다. (MCF cells, data not show)

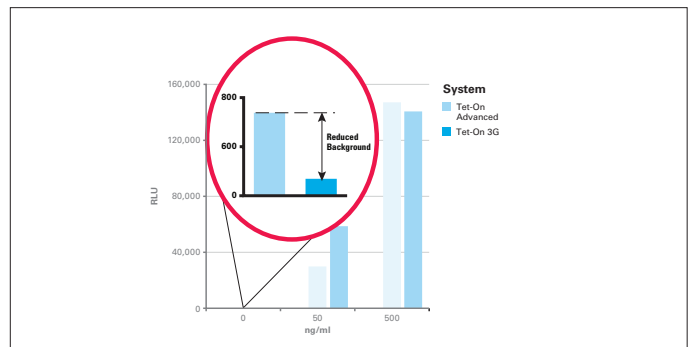


그림 2. The  $P_{TRE3G}$  promoter results in significantly reduced basal expression, HEK 293 cells were transiently cotransfected with both the response vectors (containing luciferase) and regulator vectors from each of the Tet-On 3G and Tet-On Advanced Inducible Expression Systems. The cells were cultured in the presence and absence of Dox, and after 24 hr, luciferase expression was measured. Although both systems provided strong expression in the presence of Dox, the Tet-On 3G System produces far lower background expression in the absence of Dox (inset).

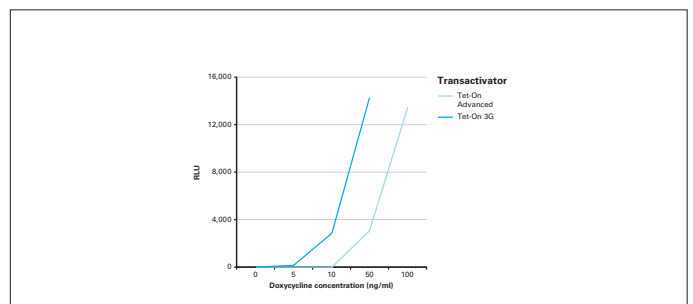


그림 3. Tet-On 3G demonstrates higher sensitivity to doxycycline than Tet-On Advanced. Tet-On 3G and Tet-On Advanced genes were integrated at the same locus in a stable HLF33 cell line expressing luciferase from a TRE promoter. For each of these two double-stable cell lines, induced luciferase expression was measured in response to a range of doxycycline (Dox) concentrations. At 5–10 ng/ml Dox, induced expression was 100–150-fold higher for the Tet-On 3G cell line, and at 50 ng/ml, expression was 4.6 fold higher (data kindly provided by Professor W. Hillen and Dr. C. Berens, University of Erlangen).

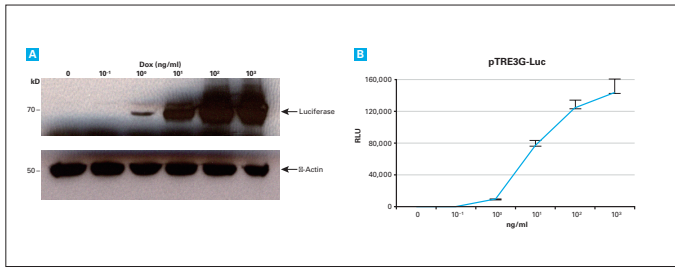


그림 4. Tet-On 3G is highly sensitive to as little as 10 ng/ml of doxycycline. Following cotransient transfection of pCMV-Tet3G and pTRE3G-Luc in HeLa cells, increasing levels of Dox were added and expression of luciferase was measured using an anti-luciferase antibody (Panel A) and a luciferase assay (Panel B). Induced expression was very high even with Dox concentrations as low as 10 ng/ml, and was detectable even at 0.1 ng/ml Dox.

■ Tet-On 3G System - 2 개의 변형된 요소의 강력한 조합

(1) Tet-On 3G Transactivator Protein

Tet-On 3G는 Tet-On Advanced transactivator protein의 성능을 개선하여 doxycycline에 대한 감도를 높였다<sup>4)</sup>. Tet-On 3G Transactivator Protein은 변형된 bacterial Tet repressor (TetR)와 3 개의 minimal VP16 activation domain를 결합하여 새로운 transcriptional activator protein (transactivator)을 만들었으며, 기존의 Tet-On Advanced transactivator에서 5 개의 아미노산을 변형시켰다 (다양한 Tet-On transactivator 서열 비교는 www.clontech.com 사이트 참조). Tet-On 3G는 기존 버전에 비해 아주 높은 발현율을 나타내며, 낮은 Dox 농도에도 민감하게 반응한다. 이 Dox 농도는 세포배양 또는 transgenic 연구에서 세포독성을 나타낼 수 있는 수준보다 아주 낮은 농도이다. 따라서 높은 Dox 농도를 유지하기 어려운 조직 (예를 들면 brain)에서 *in vivo* 실험을 위하여 특히 유용하게 사용할 수 있게 되었다.

표 1. Three Generations of Tet-On Inducible Expression Systems

Name	Generation	Transactivator Protein	Inducible Promoter
Tet-On System	1st	Tet-On	P <sub>TRE2</sub>
Tet-On Advanced System	2nd	Tet-On Advanced	P <sub>TIGHT</sub>
Tet-On 3G System	3rd	Tet-On 3G	P <sub>TRE3G</sub>

(2) P<sub>TRE3G</sub> Inducible Promoter

Inducible promoter인 P<sub>TRE3G</sub>는 매우 낮은 기본 발현 수준을 나타내다가 induction 되면 최고의 발현효율을 나타낸다<sup>3)</sup>. CMV promoter의 상류에 19 bp의 tet operator 서열이 7 개 반복하여 위치하고 있는데, 이를 tetracycline response element (TRE)라 부른다. tet operator 반복서열은 모든 Tet-On 시스템에서 공통적으로 사용되었지만 (그림 5), P<sub>TRE3G</sub>의 연결부위 서열 간격이 변형되었으며, 중앙 부분은 무작위 (random)로 정렬되어 있다. minimal CMV promoter 상의 element도 마찬가지로 일부 변형되어 있다.

P<sub>TRE3G</sub>는 endogenous mammalian transcription factor 결합부위가 없고 transactivator protein이 없는 경우 활성화되지 않기 때문에 어느 TRE-containing promoter에서보다도 낮은 basal expression을 나타낸다.

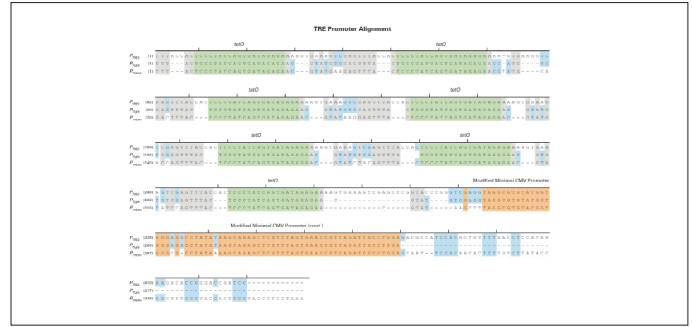


그림 5. Sequence comparison of the three generations of TRE promoters sold by Clontech. Each promoter consists of 7 identical repeats of the tet operator sequence (green), and contains a minimal CMV promoter-although this sequence has been mutated to consensus in P<sub>TRE3G</sub><sup>3)</sup>. Moreover, in P<sub>TRE3G</sub> the spacer sequences between the tetO repeats are evenly spaced and contain randomized central sequences.

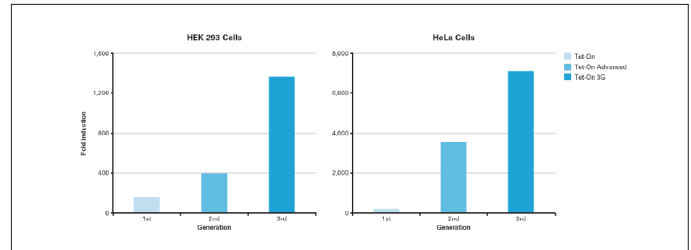


그림 6. Comparison of the three generations of Tet-On. Panel A shows the transactivator and inducible promoter combinations for each generation of the Tet-On system. Tet-On was launched by Clontech in 1996 at the time this was the premier inducible expression system, and its performance has only been surpassed by subsequent generations of the Tet-On system. Panel B shows co-transient transfection experiments with both vectors in HEK 293 and HeLa cells. Although Tet-On Advanced shows great improvement over the original Tet-On System when comparing the difference between the induced and the uninduced states (fold induction), Tet-On 3G shows even higher fold induction due to the significantly reduced basal expression provided by the P<sub>TRE3G</sub> promoter.

P<sub>TRE3G</sub> promoter와 Tet-On 3G transactivator의 두 구성요소의 조합을 통하여 현재 시판되고 있는 어떠한 inducible expression system과 비교하여도 유도될 때와 유도되지 않을 때 매우 큰 발현 차이를 나타내었다 (그림 6).

■ 다양한 Tet-On 3G Vector

Clontech에서는 그림 7에서와 같이 다양한 형태의 Tet-On 3G vector가 포함된 시스템을 판매하고 있으며, 각 시스템에는 아래 구성품도 포함되어 있다.

- Tet-On transactivator vector (pCMV-Tet3G 또는 pEF1a-Tet3G)
- P<sub>TRE3G</sub> promoter와 multiple cloning site가 포함된 TRE response vector
- hygromycin & puromycin linear selection markers
- Tet Approved FBS
- Xfect™ transfection reagent

(1) Transactivator Vectors

pCMV-Tet3G는 CMV promoter로부터 Tet-On 3G protein을 발현시키는 vector로 EF1α Version을 제외한 모든 Tet-On 3G System에 포함되

어 있다. Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1 $\alpha$  Version) (TaKaRa Code 631167)에는 EF-1  $\alpha$  promoter로부터 transactivator를 발현하는 vector가 포함되어 있다.

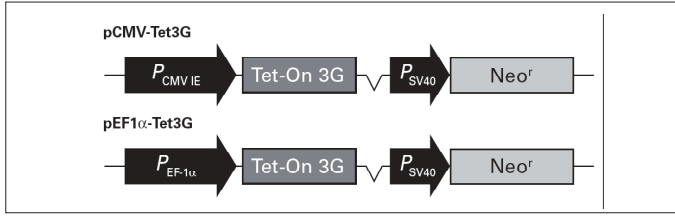


그림 7. Tet-On 3G Transactivator Vectors

(2) Response Vectors

모든 response vector는 P<sub>TRE3G</sub> promoter를 포함하고 있다. pTRE3G는 Tet-On 3G Inducible Expression System (TaKaRa Code 631168)과 Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1 $\alpha$  Version) (TaKaRa Code 631167)의 구성품이다. 두 종류의 목적 유전자를 함께 발현시킬 수 있는 pTRE3G-IRES는 bicistronic Tet-On 3G system에 포함되어 있다. 목적에 따라 빨간색 또는 녹색 형광단백질이 포함된 mCherry 또는 ZsGreen1 system을 선택할 수도 있다.

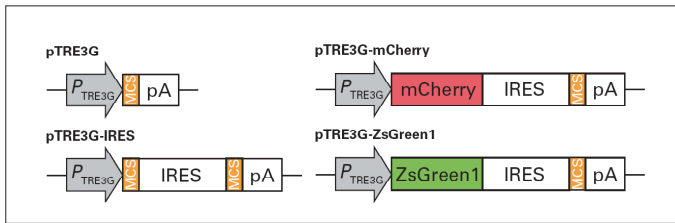


그림 8. Tet-On 3G Response Vectors

(3) Linear Selection Markers

각각의 clone을 선별하기 위해 hygromycin 또는 puromycin linear selection marker를 사용하며, 이는 모든 Tet-On 3G system에 포함되어 있다.

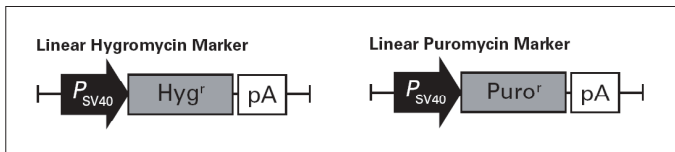


그림 9. Linear Selection Markers

■ 조혈모세포 (hematopoietic cell)와 줄기세포 (Stem cell)에서의 유도 발현

Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1 $\alpha$  Version)은 EF-1 alpha promoter가 포함된 Tet-On 3G System 버전으로 이를 이용하면 시간이 지남에 따라 CMV promoter에서 유전자 silencing 현상이 나타난다고 알려진 줄기세포, 조혈모세포 등의 세포 타입에서도 Tet-On 3G transactivator를 장기간 안정적으로 발현시킬 수 있다 (그림 10). Clontech에서는 CMV 유래 vector를 사용하였을 때 클론간의 발현에 차이를 나타내거나 발현정도가 낮다고 알려진 Jurkat cell을 이용해 EF-1 alpha 버전의 시스템을 테스트하였다. 기존의 Tet-On system과는 달리

EF-1 alpha promoter로부터 Tet-On 3G transactivator protein을 발현시켰을 때 83%의 Jurkat Tet-On 3G 클론이 높은 유도발현을 보임을 확인하였고, 2,000 배 이상의 높은 유도발현을 나타낸 클론도 33% 나 되었다 (그림 10).

EF-1 alpha promoter는 줄기세포의 유전자 발현에 적합하며, Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1  $\alpha$  version)이 mouse embryonic stem cell에서 매우 잘 작동하는 것을 확인하였다 (그림 11).

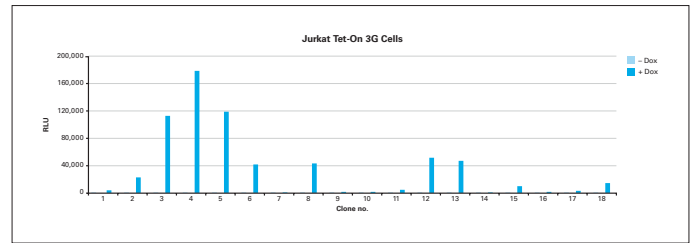


그림 10. Tet-On 3G (EF1 $\alpha$  Version) provides inducible expression in hematopoietic cells. Jurkat cells were transfected with pEF1 $\alpha$ -Tet3G using Xfect transfection reagent, and stable clones were selected by limiting dilution. 18 stable clones were then tested for inducibility by transient transfection using pTRE3G-expressing luciferase. Six out of eighteen clones showed more than 2,000 fold induction via transient transfection.

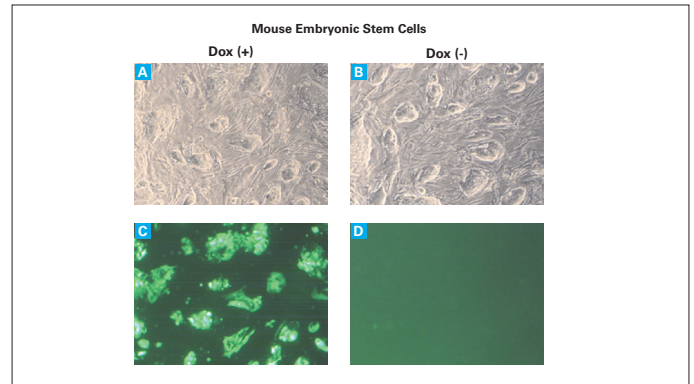


그림 11. Tet-On 3G (EF1 $\alpha$  Version) provides inducible expression in stem cells. Mouse embryonic stem cells (ES-E14TG2a mES cells) were cotransfected with pTRE3G-ZsGreen1 and pEF1 $\alpha$ -Tet3G using Xfect Stem transfection reagent. The stem cells show ZsGreen1 expression only in the presence of Dox (Panel C).

■ 2 종의 유전자를 동시에 유도발현시키는 IRES Bicistronic Vector 시리즈 Tet-On 3G Inducible Expression System (Bicistronic Version)을 이용하면 두 개의 목적 유전자를 동시에 발현시킬 수 있다. Vector의 핵심이 되는 요소인 internal ribosome entry site (IRES) 서열은 두 개의 MCS 사이에 위치한다. IRES가 위치함으로써 두 개의 목적 유전자는 하나의 mRNA로 전사되어 두 개의 단백질로 발현된다. 진핵생물의 mRNA 번역은 대부분 5' cap에서 시작되지만, IRES 서열이 존재하면 ribosome이 결합하여 안쪽에 위치한 두 번째 MCS에서도 번역이 시작된다. 따라서 하나의 bicistronic mRNA 전사체에서 두 개의 단백질이 동시에 발현되게 된다 (그림 12, 13).

■ 유도발현을 확인하기 위한 형광단백질 선택

Clontech에서는 같은 IRES 기술을 적용하여 매우 밝은 빨간 형광단백질 (mCherry)를 엄밀하게 조절하는 Tet-On 3G Inducible Expression

System (with mCherry)과 매우 밝은 녹색 형광단백질 (ZsGreen1)을 조절하는 Tet-On 3G Inducible Expression System (with ZsGreen1)을 함께 출시하였다. Dox를 처리한 후 세포가 빨간색 또는 녹색으로 변화했다면, 목적유전자가 유도발현 되었음을 의미하므로, 이를 통해 높은 효율로 유도발현 되는 클론을 선별할 수 있다 (그림 13).

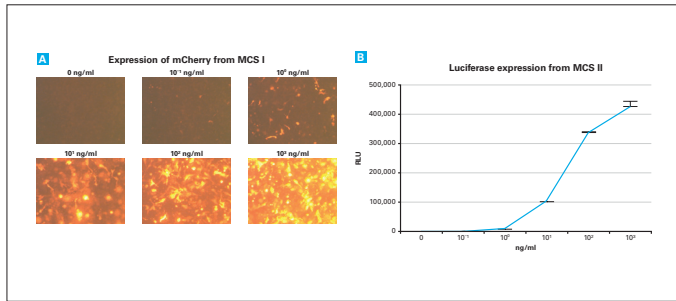


그림 12. Co-inducible expression of two genes from a single bicistronic transcript. pTRE3G-IRES expressing both mCherry, from MCS I, and luciferase, from MCS II, was cotransfected with pCMV-Tet3G into HeLa cells with increasing levels of Dox. Induced expression of mCherry was monitored by fluorescent microscopy (Panel A) and luciferase expression was measured using a luciferase assay (Panel B).

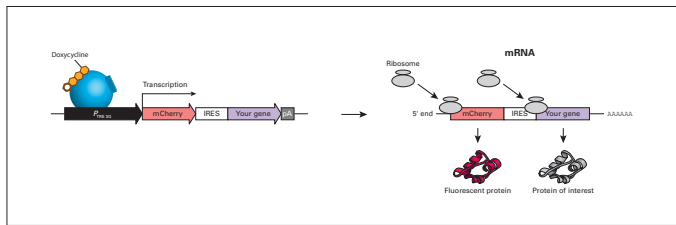


그림 13. Monitor inducible expression and easily screen for inducible clones using bright fluorescent proteins. Clones created using the Tet-On 3G Inducible Expression System (with mCherry) or Tet-On 3G Inducible Expression System (with ZsGreen1) will respectively fluoresce red and green, but only in the presence of Dox. The size (bp) of the fluorescent protein gene is optimal for maximum expression of your GOI from the internal ribosome entry site (IRES).

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
Tet-On 3G Inducible Expression System	each	631168
Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1 $\alpha$ Version)	each	631167
Tet-On 3G Inducible Expression System (Bicistronic Version)	each	631166
Tet-On 3G Inducible Expression System (with mCherry)	each	631165
Tet-On 3G Inducible Expression System (with ZsGreen1)	each	631164
Tet System Approved FBS	50 ml	631107
	500 ml	631106
Doxycycline	5 g	631311
TetR Monoclonal Antibody (Clone 9G9)	40 $\mu$ g	631131
	200 $\mu$ g	631132

■ 최적화된 Tetracycline Approved Serum

Tet-On 3G system은 감도가 크게 증가되었기 때문에 tetracycline-free 가 보장된 fetal bovine serum을 선택하는 것이 매우 중요하다 (그림 14). Clontech에서 판매되는 serum은 실제 Tet inducible cell line에 재현성있는 테스트를 진행하여 Tet-On 3G 실험의 basal expression에 영향을 미치지 않음이 확인된 제품이다. 각 Tet-On 3G system에는 50 ml의 프리미엄 Tet-Approved FBS가 제공된다.



그림 14. To ensure low background with Tet-On 3G, it is essential to use fetal bovine serum that is functionally tested. Clontech offers four such serum options, including serum that is sourced from the US, Mexico, and Australia, as well as US-sourced serum that is additionally tested for use in mouse embryonic stem cells.

■ 참고문헌

- Low, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H. & Gossen, M. Ameliorating the dynamic properties of the Tet system by altered minimal promoter design. *Manuscript submitted for publication.*
- Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B. & Das, A. T. Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. (2006) *Gene Ther.* **13**(19):1382 – 1390.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(12):5547 – 5551.
- Urlinger, S. *et al.*, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(14):7963 – 7968.

\*License Notice : [3]