

새로운 Mammalian Expression vector

EF1 α Promoter Vector 시리즈

Human elongation factor-1 alpha (EF1 alpha)는 human 유래의 constitutive promoter로, 다양한 *in vitro*, *in vivo* 상황에서 유전자 발현을 조절하는데 사용할 수 있다¹⁾. 또한, EF1 α promoter는 메틸화에 의한 유전자 silencing에 내성이 있기 때문에 안정적인 발현을 위한 세포주 제작에 유용하다는 장점도 있다²⁾. Takara Bio와 Clontech에서는 각각 EF1 α Promoter를 기본으로 한 다양한 형태의 vector 시리즈를 출시하였다.

■ EF1 α promoter를 이용한 실험에

(1) Mouse ES cell에서의 transient 및 stable expression

[방법]

AcGFP1 유전자를 삽입한 pBApo-EF1 α Neo 및 pBApo-CMV Neo (TaKaRa Code 3240)를 Xfect™ Stem Transfection Reagent (TaKaRa Code 631320)를 이용하여 각각 mouse ES세포 (E14TG2a)에 transient 하게 도입하였다.

유전자 도입 48 시간 후 E14TG2a 세포를 회수하여 Flow cytometer에서 AcGFP1 발현 세포를 측정하였다 (transient expression). 형광을 발현하는 세포의 비율을 % positive로 나타내고, 각 positive 세포의 AcGFP1의 발현 강도를 MFI (Mean of Fluorescent Intensity)로 나타내었다. 또, 회수 세포를 1:40 으로 희석 후 계대배양하여, G418 (TaKaRa Code 631307)을 최종 농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 첨가한 선택배지에서 배양하였다. 같은 방법으로 희석 후 계대배양을 2 회 실시하여 배양된 세포를 약제 내성 집단으로 Flow cytometer에서 내성 세포 집단의 AcGFP1 발현정도를 확인하였다 (stable expression).

[결과]

Transient expression에서 이미 EF1 α promoter는 CMV promoter에 비해 4.6 배 (MFI 값)의 높은 발현효율을 나타내었다. Stable expression 실험에서도 EF1 α promoter는 높은 발현효율을 나타내어 (MFI값의 5.8 배), 마우스 ES세포 (E14TG2a)에서 EF1 α promoter를 이용한 유전자 발현이 매우 효율적임을 확인할 수 있었다 (그림 1).

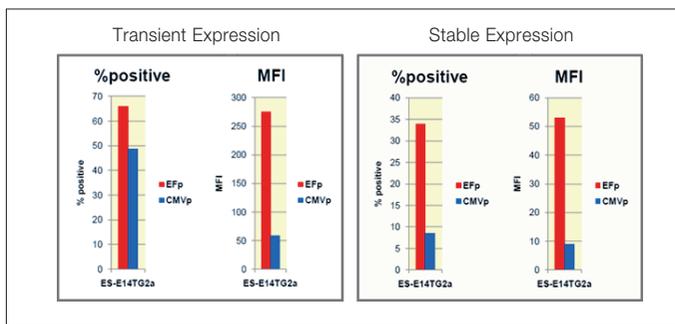


그림 1. Mouse ES 세포에서의 transient expression 및 stable expression 비교

(2) Lentiviral system을 이용한 유전자 도입 후 발현 비교

[방법]

Mouse ES cell line E14, D3에 Clontech의 Lenti-X™ Lentiviral system을 이용하여 각각 CMV promoter와 EF1 α promoter의 조절 하에 AcGFP1을 발현하는 plasmid를 도입하였다. 감염 5 일 후 FACS의 FL1 channel에 의해 AcGFP1의 발현을 관찰하였다.

[결과]

두 종류의 cell line에서 모두 CMV promoter보다 EF1 α promoter를 이용하였을 때 AcGFP1이 더 많이 발현되었다 (그림 2). 이는 Wang et al., 2008에서 보고된 바와 같이 CMV promoter와 비교하여 EF1 α promoter의 silencing 비율이 더 낮아 목적으로 하는 유전자를 더 높은 수준으로 발현시키는 것이다.

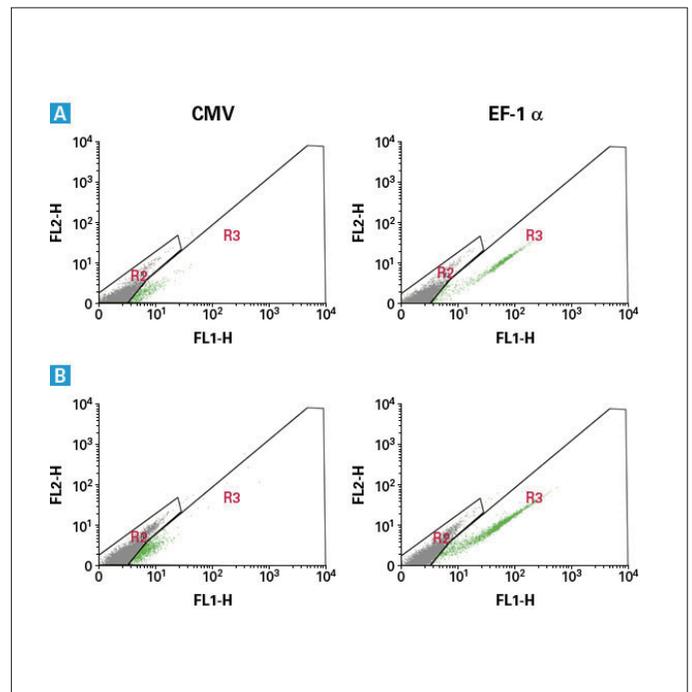


그림 2. Expression of AcGFP1 driven by the EF-1 alpha promoter in stem cell lines is higher than expression driven by the CMV promoter. The mouse embryonic stem cell lines E14 (Panel A) and D3 (Panel B) were transduced by Lenti-X lentivirus, expressing AcGFP1 either under the control of the CMV promoter or the Elongation factor alpha (EF-1 alpha) promoter. The expression level of AcGFP1 in infected cells 5 days post infection was monitored by FACS analysis using the FL1 channel. The expression of AcGFP1 driven by the EF-1 alpha promoter in both stem cell lines was considerably higher compared to the CMV promoter. This is mainly due to a considerably lower rate of silencing of the EF-1 alpha promoter in stem cells compared to the CMV promoter as published by Wang et al., 2008³⁾.

■ EF1 α Promoter Vector 시리즈

(1) Takara Bio 의 pBApo-EF1 α DNA 시리즈

Takara Bio에서는 EF1 α Promoter를 탑재한 mammalian cell 용 expression vector인 pBApo-EF1 α Neo DNA (TaKaRa Code 3243) 와 pBApo-EF1 α Pur DNA (TaKaRa Code 3244)를 출시하였다. 각 vector는 EF1 α promoter와 Herpes Simple Virus의 Thymidine Kinase 내 PolyA signal을 탑재하고 있다. Cloning site에 목적 유전자의 ORF를 삽입하여 목적 유전자의 expression plasmid를 얻을 수 있고, 유전자 발현 이외에 pri-microRNA 등의 전사 산물 발현에도 이용할 수 있다. Mammalian cell의 selection marker로 neomycin 또는 puromycin을 포함하고 있으므로, 실험에 맞는 적절한 vector를 선택하여 사용한다 (그림 3). 또한, vector 내부의 「promoter+ORF+polyA signal」 cassette를 쉽게 adenovirus vector로 옮길 수 있어 adenoviral delivery system을 이용하고자 할 때도 유용하다. 재조합 adenovirus 제작에는 Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version) Ver. 2 (TaKaRa Code 6170)를 이용할 수 있다.

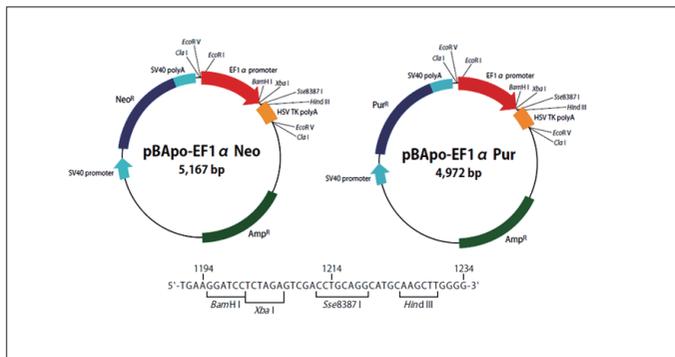


그림 3. pBApo-EF1 α Neo DNA, pBApo-EF1 α Pur DNA 의 구조

■ Clontech의 EF1 α Promoter Vector 시리즈

Clontech에서는 EF1 α Promoter를 기본으로 하여 다양한 형광단백질을 포함하거나, IRES (internal ribosome entry sequence) 서열로 2개의 유전자를 한꺼번에 발현시키거나, Myc, His tag이 포함된 여러 종류의 vector를 출시하였다 (그림 4). Vector는 일반적인 transfection에 이용하는 plasmid 형태와 Lentivirus delivery system에 적용할 수 있는 lentiviral vector 형태로 나뉘어 있다.

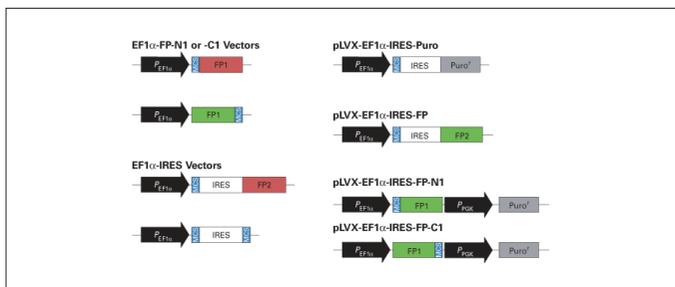


그림 4. EF-1 alpha expression vectors for many applications. Plasmid and lentiviral vector choices are available carrying the EF-1 alpha promoter. IRES: internal ribosome entry sequence; FP1: fluorescent protein (AcGFP1, DsRed-Monomer, or mCherry); FP2: fluorescent protein (mCherry or ZsGreen1); MCS: multiple cloning site.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
pBApo-EF1 α Neo DNA	20 μ g	3243
pBApo-EF1 α Pur DNA	20 μ g	3244
pEF1 α -IRES Vector	10 μ g	631970
pEF1 α -IRES-AcGFP1 Vector	10 μ g	631971
pEF1 α -IRES-DsRed-Express2 Vector	10 μ g	631980
pEF1 α -IRES-ZsGreen1 Vector	10 μ g	631976
pEF1 α -AcGFP1-N1 Vector	10 μ g	631973
pEF1 α -AcGFP1-C1 Vector	10 μ g	631974
pEF1 α -DsRed-Monomer-N1 Vector	10 μ g	631978
pEF1 α -DsRed-Monomer-C1 Vector	10 μ g	631977
pEF1 α -DsRed-Express2 Vector	10 μ g	631979
pEF1 α -mCherry-N1 Vector	10 μ g	631969
pEF1 α -mCherry-C1 Vector	10 μ g	631972
pEF1 α -tdTomato Vector	10 μ g	631975
pEF1 α -E2-Crimson Vector	10 μ g	631981
pLVX-EF1 α -IRES-Puro Vector	10 μ g	631988
pLVX-EF1 α -IRES-mCherry Vector	10 μ g	631987
pLVX-EF1 α -IRES-ZsGreen1 Vector	10 μ g	631982
pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 Vector	10 μ g	631983
pLVX-EF1 α -AcGFP1-C1 Vector	10 μ g	631984
pLVX-EF1 α -mCherry-C1 Vector	10 μ g	631985
pLVX-EF1 α -mCherry-N1 Vector	10 μ g	631986
pLVX-EF1 α -DsRed-Monomer-C1 Vector	10 μ g	631989
pLVX-EF1 α -DsRed-Monomer-N1 Vector	10 μ g	631990
pEF1 α -Myc Vector	10 μ g	631991
pEF1 α -HA Vector	10 μ g	631992
pBApo-CMV Neo DNA	20 μ g	3240
pBApo-CMV Pur DNA	20 μ g	3241
pBApo-CMV DNA	20 μ g	3242
Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version) Ver. 2	1 kit (5회용)	6170
pAcGFP1-N1 Vector	20 μ g	632469
pAcGFP1-C1 Vector	20 μ g	632470
Xfect™	100 회/300 회	631317/631318
Xfect™ Stem	100 회/300 회	631320/631321
Puromycin	25 mg/100 mg	631305/631306
G418	1 g/5 g	631307/631308

■ 참고문헌

1. Teschendorf, C., et al. (2002) *Anticancer Res.* **22**(6A):3325-3330.
2. Kim S, et al. (2007) *Stem Cells Dev.* **16**(4):537-45.
3. Wang, et al. (2008) *Stem Cells Dev.* **17**:279-289.

*License Notice : [7], [8]