

가장 빠르고 간편한 Tet inducible expression system

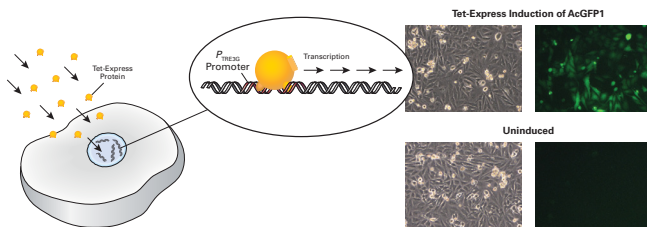
Tet-Express™ Inducible Expression

- 신속한 셋업—Tet-On/Tet-Off cell line을 구축할 필요 없음
- 신속한 발현 유도—2시간 만에 최대 발현의 80% 도달
- Doxycycline-free 프로토콜—세포에 Tet-Express transactivator를 직접 첨가

Tet-Express 유도 발현 시스템은 기존 Clontech의 강력한 Tet-On/Tet-Off 시스템⁽¹⁻³⁾보다 더 빠르고 간편화된 시스템으로 Tet-On/Tet-Off와 달리, 단일 vector와 Tet-Express 단백질 그리고 doxycycline-free 프로토콜로 구성되어 있다. 타겟 유전자는 TRE 프로모터로 조절되며 세포 배양 배지에 Tet-Express를 몇 μ l를 첨가하면 발현을 유도할 수 있다. 따라서 Tet-Express 시스템을 적용하면 테트라사이클린(tetracycline)으로 전사를 조절하는 유도 발현 시스템을 다양한 세포에 신속하게 구축할 수 있으며, 특히 클론 선별 과정을 적용할 수 없는 세포에도 적용할 수 있다.

Tet-Express란 무엇인가?

Tet-Express는 Clontech의 Tet-Off Advanced transcriptional activator (transactivator) 단백질로 self-transduction하도록 변형되고 최적화되었다. Self-transduction이란 단백질 번역 경로를 통해 스스로 세포막으로부터 핵으로 이동하는 능력을 의미한다. 테트라사이클린(tetracycline) 부재시 Tet-Express가 프로모터에 결합하여 발현을 활성화시킨다. 따라서 유전자 전사를 활성화시키는데 별도의 독시사이클린(doxycycline)의 투여가 필요하지 않다. Tet-Express와 함께 제공되는 Intensifier Reagent는 단백질 도입 효율을 높인다.



Tet-Express 시스템은 Tet-On 3G 시스템과 같이 강력하게 조절되는 P_{TRE3G} 프로모터로 타겟 유전자를 발현시킨다. 그러나 Tet-On 3G 시스템과 달리, self-transducing Tet-Express transactivator를 세포에 직접 첨가하면 되기 발현이 유도 때문에 tetracycline transactivator를 발현시키는 double-stable cell line을 구축할 필요가 없다.

신속한 유전자 발현 유도

Tet-Express 처리했을 때와 하지 않았을 때의 유전자 발현을 TRE 프로모터로 조절되는 HeLa 세포내 luciferase 유전자 발현을 통해 비교했다. Tet-Express 첨가시 2시간 후 luciferase 발현이 최대 발현의 80% 이상으로 신속하게 증가하는 것이 확인되었으며 Tet-Express를 처리하지 않았을 때는 발현이 나타나지 않았다(그림 1).

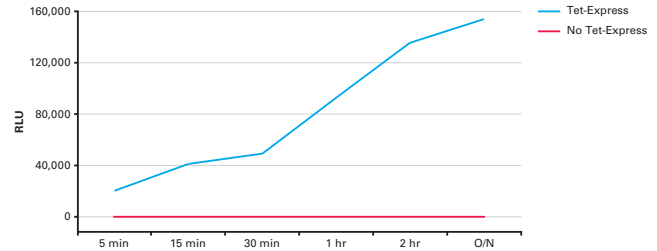


그림 1. Tet-Express rapidly induces gene expression from TRE promoters. HeLa cells containing a stably integrated luciferase expression cassette under the control of a TRE promoter were treated with Tet-Express and compared to untreated cells from the same HeLa cell culture at different time points. 88% of maximal expression was achieved in just 2 hr.

광범위한 세포에서 높은 발현 유도와 낮은 백그라운드

Tet-Express 시스템은 transactivator를 발현하도록 별도의 세포주를 구축할 필요가 없기 때문에 복수의 클론 선별 과정이 필요없다. 따라서 순차적인 클론 선별 과정을 거치기 어려운 primary cell과 같은 세포주에 특히 더 유용하다. Tet-Express는 광범위한 세포주에 매우 효과적이다(그림 2).

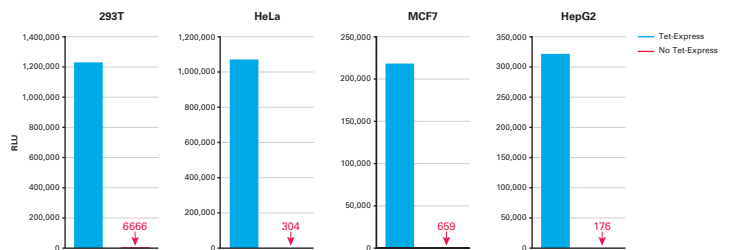


그림 2. Tet-Express works well with a broad range of cell types. Cultures of 293T cells, HeLa cells, MCF7 cells, and HepG2 cells were transfected with a plasmid that expresses luciferase under the control of a TRE promoter. The next day, cells from the four transfected cell cultures were treated with Tet-Express according to the standard protocol and incubated overnight—in parallel with untreated cells from each transfected culture. On the following day, treated and untreated cells were assayed for luciferase activity.

TRE를 포함하는 프로모터 중 가장 낮은 기저발현

p_{TRE3G} vector는 모든 Tet-On 3G와 Tet-Express 시스템에 포함되어 있다. 이 vector의 P_{TRE3G} 프로모터는 극도로 낮은 기저 발현과 발현 유도시 높은 최대 발현을 유도한다(4; 참고 www.clontech.com/teton3g). Minimal CMV 프로모터 상류에 위치한 19 bp tet operator 서열이 7회 반복되어 있으며, 이것을 tetracycline response element (TRE)라고 한다. tet operator repeats 서열은 모든 Tet 시스템에서 동일하지만 P_{TRE3G} 의 junction sequences가 고른 간격이 되도록 변경되

있고 중앙 부분이 임의 배치되어 있다. 추가적으로, minimal CMV 프로모터의 element(요소)도 일부 변경되었다(그림 3).

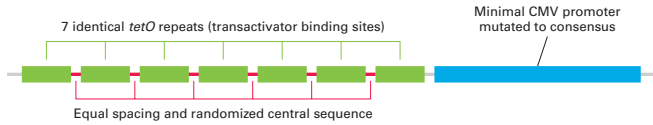


그림 3. The P_{TRE3G} promoter is designed to ensure the lowest basal expression of any TRE-containing promoter. This promoter consists of 7 identical tetO repeats, separated by randomized central sequences of equal length.

P_{TRE3G} 프로모터에 내인성 endogenous 포유류 전사 요소가 결합할 수 있는 사이트가 부족하기 때문에 transactivator 단백질이 없을 때는 minimal CMV 프로모터가 비활성화된다. 따라서 TRE를 포함하는 프로모터 중에서 P_{TRE3G} 의 기저 발현이 가장 낮다. 기저 발현은 western blot으로 검출되지 않았고 transactivator가 첨가되었을 때 최고 수준으로 발현이 유도되었다(그림 4).

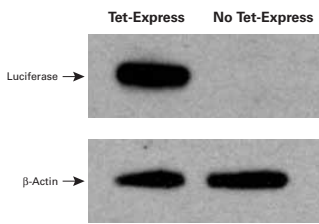


그림 4. Basal expression from the P_{TRE3G} promoter is undetectable by Western analysis. HeLa cells containing a stably integrated tetracycline-inducible luciferase expression cassette were treated with Tet-Express according to the standard protocol and incubated overnight—in parallel with untreated cells from the same HeLa cell culture. The next day, lysates of treated and untreated cells were prepared and blotted with antiluciferase and anti-actin antibodies.

4 종류의 Tet-Express 시스템

Tet-Express 유도 발현 시스템(P_{TRE3G} vector 포함)은 또한 3종류의 다른 vector 형태로도 판매되고 있다. 이 vector들은 Tet-Express Inducible Expression System (Bicistronic Version), Tet-Express Inducible Expression System(with mCherry)과 Tet-Express Inducible Expression System (with ZsGreen1) 형태로 판매되고 있다.

시스템 구성품

- Tet-Express (25 rxns—Tet-Express Transactivator와 Intensifier Reagent 포함)
- P_{TRE3G} 프로모터로 목적 유전자 발현 조절 vector
- 컨트롤 vector : P_{TRE3G} 프로모터로 luciferase 발현 조절
- 2종의 선행화된 선별마커 (hygromycin, puromycin)
- Tet Approved FBS
- Xfect transfection reagent

References

1. Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(12):5547-5551.
2. Gossen, M. *et al.* (1995) *Science* 268(5218):1766-1769.
3. Urlinger, S. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14):7963-7968.
4. Low, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H. & Gossen, M. (2010) *BMC Biotechnology* 10:81.

| 제품명 | Code | Vector Map | SIZE | Applications |
|---|------------------|------------|---------------------|--|
| Tet-Express Inducible Expression System | 631169 | | each | 유도 발현이 강력하게 조절된다. |
| Tet-Express Inducible Expression System (Bicistronic Version) | 631170 | | each | 2개의 유전자를 유도 발현시킨다. |
| Tet-Express Inducible Expression System (mCherry) | 631171 | | each | 적색의 형광 단백질은 mCherry를 목적 유전자와 함께 발현시킨다. |
| Tet-Express Inducible Expression System (ZsGreen1) | 631172 | | each | 녹색 형광 단백질인 ZsGreen1을 목적 유전자와 함께 발현시킨다. |
| Tet-Express | 631177 631178 | | 25 rxns 100 rxns | |