

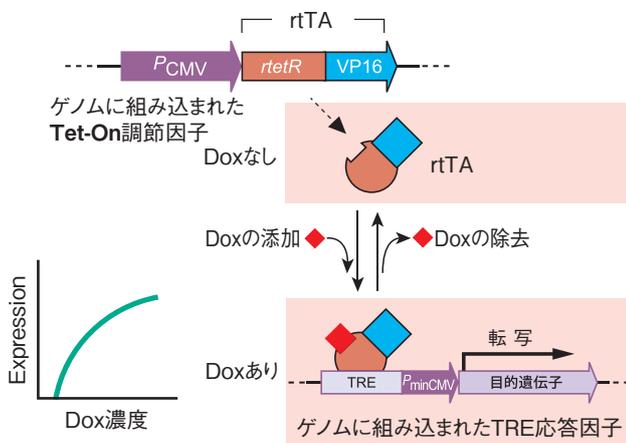
# Tet発現誘導システムガイド



## Tet Systemとは...

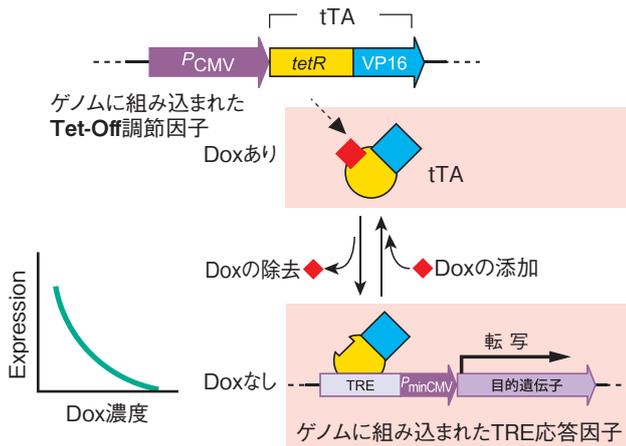
Clontechのテトラサイクリン発現誘導システムは、*E. coli*テトラサイクリン耐性オペロンから得られた2種類の調節性因子、Tetリプレッサータンパク質(TetR)とTetオペレーターDNA配列(tetO)を基にしたシステムです。両因子を宿主ゲノムに組み込んだ安定株は、テトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリン(Dox)に対して容量依存的に応答するため、目的遺伝子の発現を正確に制御することができます。

## Tet-On® System: ドキシサイクリン(Dox)存在下で目的遺伝子を発現



Tet-On® Systemは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)を発現する**Tet-On®調節プラスミド**と、tetO反復配列をもつテトラサイクリン応答因子(TRE)をコードする応答発現プラスミドを使用します。rtTAは変異型Tetリプレッサータンパク質(tTetR)とVP16活性化ドメイン(AD)より構成される融合タンパク質で、**培地中にDoxを添加するとテトラサイクリン応答因子(TRE)と結合して下流の遺伝子発現を誘導します。**

## Tet-Off® System: ドキシサイクリン(Dox)非存在下で目的遺伝子を発現



Tet-Off® Systemでは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子(tTA)を発現する**Tet-Off®調節プラスミド**と、tetO反復配列をもつテトラサイクリン応答因子(TRE)をコードする応答発現プラスミドを使用します。tTAはTetリプレッサータンパク質(TetR)とVP16活性化ドメイン(AD)より構成される融合タンパク質で、**Dox非存在下でテトラサイクリン応答因子(TRE)と結合して下流の遺伝子発現を誘導します。**

製品の詳細はウェブカタログでもご覧いただけます。

タカラバイオ > バイオ産業支援事業 > ウェブカタログ > 機能解析・サイレンシング

> **Tet-On®/Tet-Off® 発現誘導システム**

Tet System クロンテック



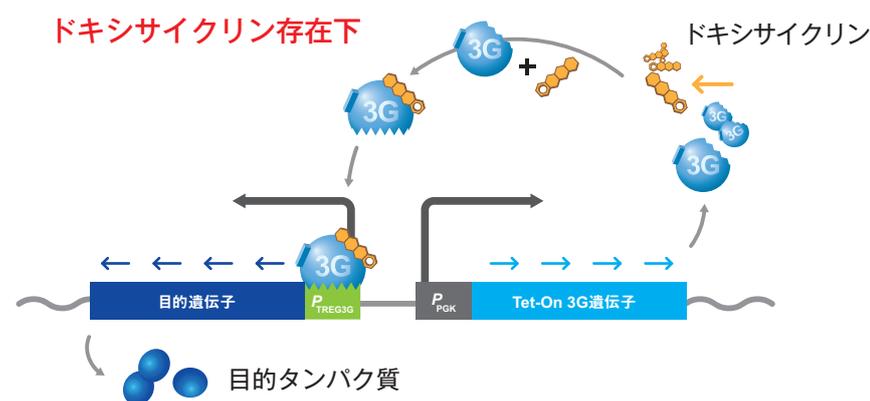
# Tet-On<sup>®</sup> 3G Protein配列とテトラサイクリン応答因子配列をワンベクターに！ Tet-One<sup>™</sup> Inducible Expression System

- ワンベクタータイプなので安定株作製作業は一回だけ。従来品(2ベクター)に比べて発現系の構築が簡単！
- バックグラウンドが低く、ドキシサイクリンに対する感受性が高いため、厳密な遺伝子制御が可能
- プラスミド型とウイルスベクター型(レトロウイルスベクター型、アデノ随伴ウイルスベクター型)の2系統を用意。さらにレトロウイルスベクター型には薬剤選択マーカーとしてpuromycin耐性遺伝子を持つタイプもあり。

## 「Tet-One<sup>™</sup> System」の構造と遺伝子発現制御の仕組み



【上図：ドキシサイクリン非存在下】  
ヒトPKGプロモーターにより、Tet-On<sup>®</sup> 3Gタンパク質は構成的に発現されるが、ドキシサイクリン非存在下ではTRE3Gプロモーター( $P_{TRE3G}$ )に結合できず、目的遺伝子も転写されない。



【下図：ドキシサイクリン存在下】  
培養液中にドキシサイクリンが添加されると、Tet-On<sup>®</sup> 3Gタンパク質は構造変化して $P_{TRE3G}$ に結合し、 $P_{TRE3G}$ 下流にクローニングした**目的遺伝子の転写を活性化**する。

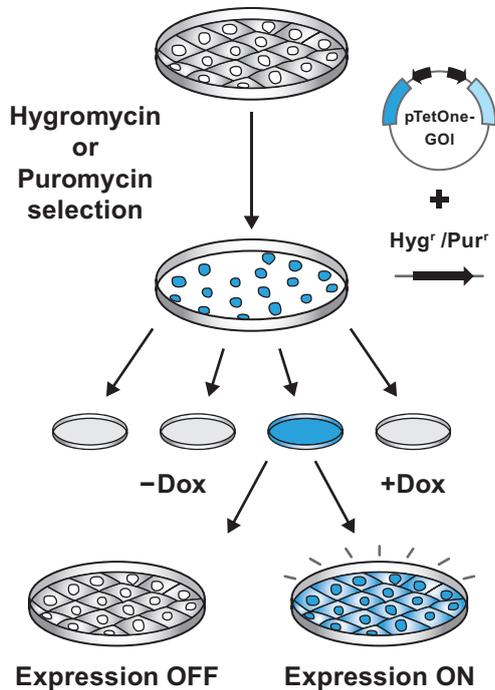
| 製品名   | 製品内容   | 目的遺伝子サイズの目安 | 容量    | 製品コード  | 価格(税別)   | 備考  |
|---|--|-------------|-------|--------|----------|-----|
| <b>Tet-One<sup>™</sup> Inducible Expression System</b>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ pTetOne Vector (調節&amp;応答発現ベクター)</li> <li>・ pTetOne-Luc Control Vector</li> <li>・ Hygromycin, Puromycin Linear Marker</li> <li>・ Tet System Approved FBS (50 ml)</li> <li>・ Xfect Transfection Reagent</li> </ul>     | 特になし        | 1 Kit | 634301 | ¥240,000 | ラ 営 |
| <b>Retro-X<sup>™</sup> Tet-One<sup>™</sup> Inducible Expression System</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ pRetroX-TetOne Vector Set (pRetroX-TetOne Vector, pRetroX-TetOne-Luc Control Vector)</li> <li>・ GP2-293 Packaging Cell Line (<math>2 \times 10^6</math> cell/1 ml)</li> </ul>   | ~3.1 kb     | 1 Kit | 634304 | ¥337,000 | ラ 営 |
| <b>Retro-X<sup>™</sup> Tet-One<sup>™</sup> Inducible Expression System (Puro)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ RetroX Universal Packaging Vector Set (p10A1 Vector, pAmpho Vector, pEco Vector, pVSV-G Vector, pQCLIN Retroviral Vector)</li> <li>・ Tet System Approved FBS (50 ml)</li> <li>・ Xfect Transfection Reagent</li> </ul> | ~2.1 kb     | 1 Kit | 634307 | ¥337,000 | ラ 営 |
| <b>AAVpro<sup>®</sup> Tet-One<sup>™</sup> Inducible Expression System (AAV2)</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ AAVpro Tet-One Vector Set (pAAV-TetOne Vector, pAAV-TetOne-Luc Control Vector)</li> <li>・ pRC2-mi342 Vector</li> <li>・ pHelper Vector</li> <li>・ AAVpro Extraction Solution</li> </ul>                                | ~2 kb       | 1 Kit | 634310 | ¥187,000 | ラ 営 |

ラ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

営 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

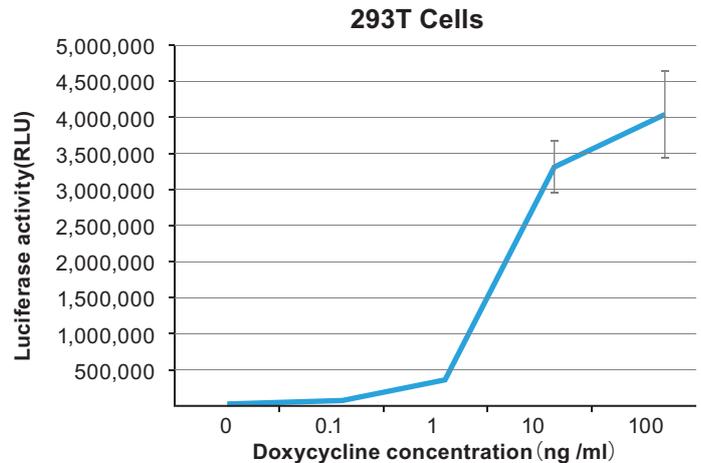
## 発現系構築の流れ —プラスミド型の場合—

- ① 目的遺伝子 (GOI) をクローニングしたpTetOneベクターとリニアセレクションマーカーをターゲット細胞にコトランスフェクションし、薬剤マーカーでセレクションを行う。
- ② 細胞クローンをピックアップし、ドキシサイクリン応答性における目的遺伝子発現を確認してスクリーニングする。



### ■実施例

ドキシサイクリン濃度によるpTetOne-Luc Control Vectorを用いたルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導



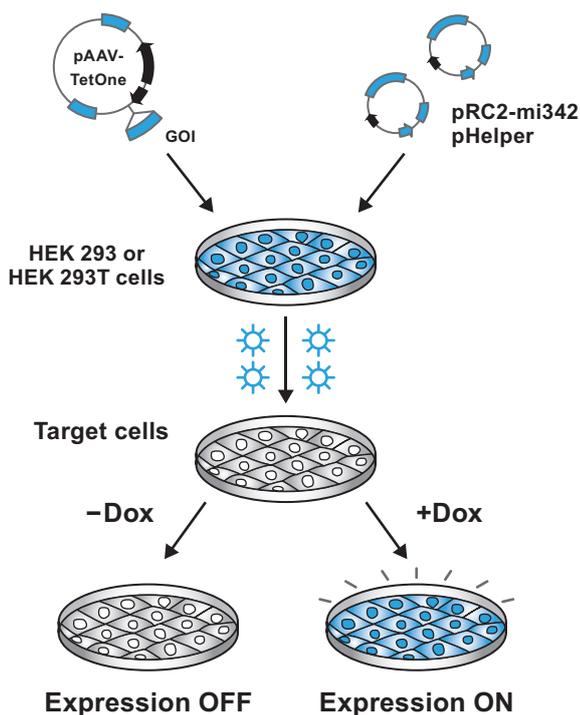
293T細胞にpTetOne-Luc Control Vectorをトランスフェクションし、培養24時間後に10倍段階希釈したドキシサイクリンを添加してルシフェラーゼを誘導した。ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、一過性発現においても1,000倍以上の誘導倍率が観察された。

※ルシフェラーゼ活性：

RLU (relative light units=相対発光量) を指標として測定

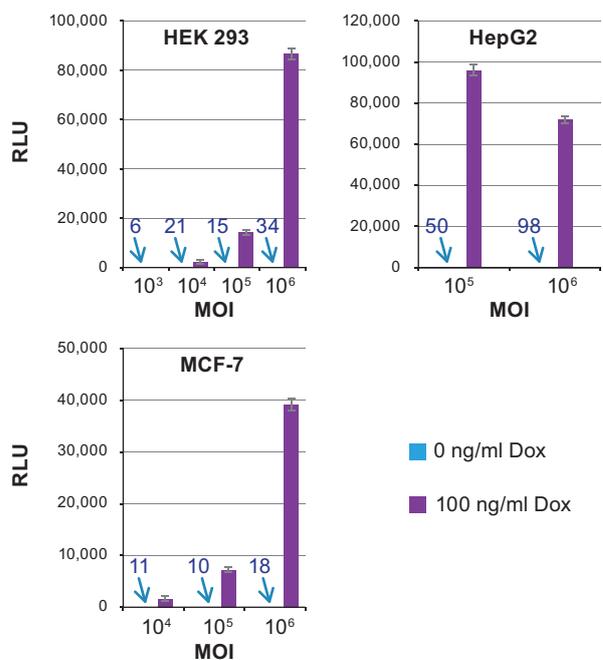
## 発現系構築の流れ —ウイルスベクター型(アデノ随伴ウイルス: AAV)の場合—

- ① 目的遺伝子 (GOI) をクローニングしたpAAV-TetOneとpRC2-mi342およびpHelperを細胞にトランスフェクションし、24時間から72時間培養後にAAVベクターを含む上清を回収する。
- ② 目的細胞へAAVベクターを添加し、ドキシサイクリンの応答性における目的遺伝子の発現を確認してスクリーニングする。



### ■実施例

TetOne-Luc Control AAVベクターを用いたルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導



HEK 293、HepG2、MCF-7細胞にTetOne-Luc Control AAVベクターを異なるMOIで感染させた。形質導入済みの細胞をドキシサイクリン処理あり(100 ng/ml Dox)、なし(0 ng/ml Dox)で48時間培養後、ルシフェラーゼアッセイを行った。MOI 10<sup>5</sup>以上のDoxありの細胞において非常に高い誘導倍率が得られた。

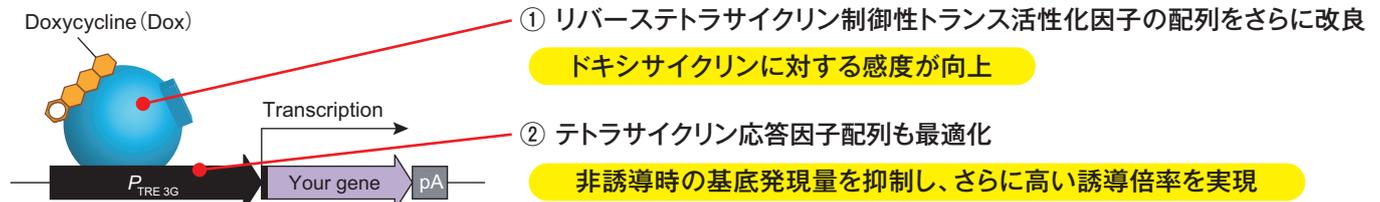
### 第3世代のTet発現誘導システム

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

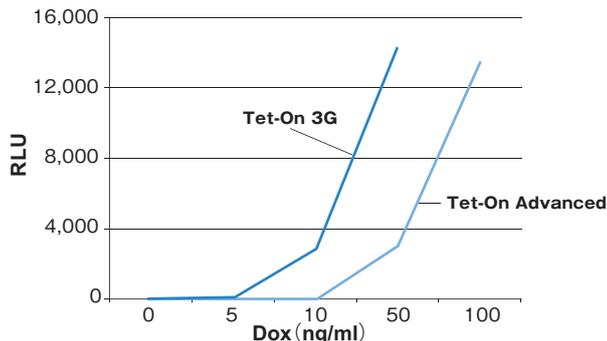
● Tetシリーズ中で最も高い誘導倍率を実現

● ドキシサイクリンに対する感度がさらに向上

## Tet Advanced Systemからの2つの改良点



### ■実施例1 ドキシサイクリンに対する感度が向上

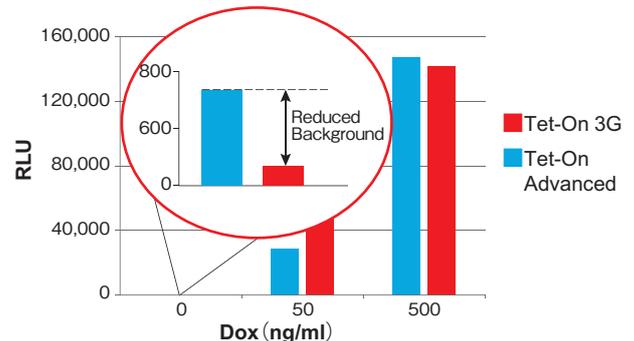


TREプロモーターからルシフェラーゼを誘導発現する安定発現株 HLF33の同じ部位に、Tet-On 3GおよびTet-On Advanced遺伝子をそれぞれ導入した。各二重安定発現株でのルシフェラーゼの誘導発現量をDox濃度を変えて測定した。

Tet-On 3G細胞での発現誘導は5~10 ng/mlの範囲で100~150倍高くなり、50 ng/mlでは発現量が4.6倍高くなった。

(データはUniversity of Erlangen, W. Hillen教授およびDr. C. Berensのご厚意による。)

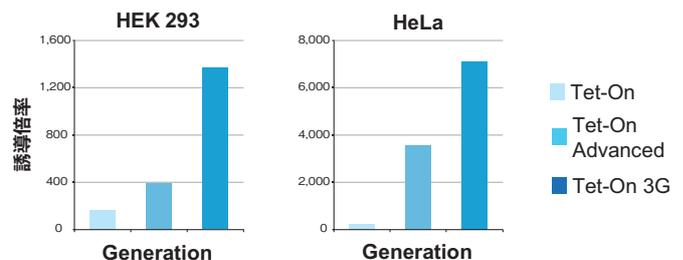
### ■実施例2 基底発現レベルがさらに低下



Tet-On 3G SystemまたはTet-On Advanced Systemを用いて、HEK 293細胞にそれぞれ一過性に調節ベクターと応答発現ベクター（ルシフェラーゼ遺伝子を発現）を導入した。細胞をDox+/−の状態では24時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。DoxなしではTet-On 3Gのバックグラウンドが非常に低いことが分かる(拡大図部分)。また、Doxありの条件下ではどちらのシステムでも非常に強い発現誘導が確認できた。

### ■実施例3 高い誘導倍率 (S/N比) を実現

Tet-On、Tet-On Advanced、Tet-On 3Gの各システムを用いてルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導を行った(1 μg/ml Dox により誘導)。Dox処理から18時間後にルシフェラーゼ活性を測定した(n=3)。一過性のコトランスフェクション実験でも、Tet-On 3G Systemは従来のシステムよりも非常に高い誘導倍率を示した。



| 製品名  | Tet-On調節ベクター | TRE応答発現ベクター     | 製品コード  | 価格(税別)   | 備考     |
|--|--------------|-----------------|--------|----------|--------|
| Tet-On <sup>®</sup> 3G Inducible Expression System                       | pCMV-Tet3G   | pTRE3G          | 631168 | ¥247,000 | ラ<br>堂 |
| Tet-On <sup>®</sup> 3G Inducible Expression System (EF1alpha Version)    | pEF1α-Tet3G  |                 | 631167 | ¥247,000 |        |
| Tet-On <sup>®</sup> 3G Inducible Expression System (Bicistronic Version) | pCMV-Tet3G   | pTRE3G-IRES     | 631166 | ¥247,000 |        |
| Tet-On <sup>®</sup> 3G Inducible Expression System (with ZsGreen1)       | pCMV-Tet3G   | pTRE3G-ZsGreen1 | 631164 | ¥262,000 |        |
| Tet-On <sup>®</sup> 3G Inducible Expression System (with mCherry)        | pCMV-Tet3G   | pTRE3G-mCherry  | 631165 | ¥262,000 |        |

☞ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

☞ 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

#### <製品内容>

- ・ Tet-On調節ベクター
- ・ TRE応答発現ベクター
- ・ Control Vector (pTRE3G-Luc)
- ・ Hygromycin, Puromycin Linear Marker
- ・ Tet System Approved FBS (50 ml)
- ・ Xfect Transfection Reagent

EF1α：胚性幹細胞のようにプロモーターがサイレンシングを受ける場合に有用

IRES：2種類のタンパク質を同時に発現可能

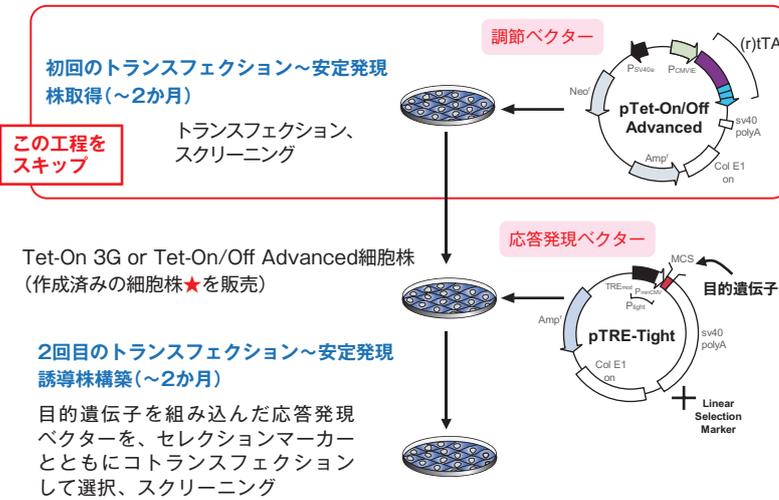
mCherry：高輝度赤色蛍光タンパク質 ZsGreen1：緑色蛍光タンパク質

## 調節因子(トランス活性化因子)安定発現株

# Tet-On<sup>®</sup> 3G, Tet-On<sup>®</sup> / Tet-Off<sup>®</sup> Advanced細胞株

- トランス活性化因子を導入済みの細胞株
- 目的遺伝子の発現誘導システム構築に要する時間を大幅に短縮

トランス活性化因子安定発現株を用いることで、最初の安定なTet-On 3GまたはTet-On/Tet-Off Advancedホスト細胞株作製工程をスキップでき、目的遺伝子の安定な発現誘導株の構築に要する時間を2か月近く短縮可能です。



### Tet細胞株(★各1 ml) 製品コード、価格は裏面参照

| 細胞名               | Tet-On 3G | Tet-On Advanced | Tet-Off Advanced |
|-------------------|-----------|-----------------|------------------|
| Jurkat Cell Line  | ●         |                 |                  |
| CHO Cell Line     | ●         |                 |                  |
| NIH/3T3 Cell Line | ●         |                 |                  |
| HEK 293 Cell Line | ●         | ●               | ●                |
| HeLa Cell Line    | ●         |                 | ●                |
| HepG2 Cell Line   |           | ●               |                  |
| MCF7 Cell Line    |           | ●               | ●                |

- <製品内容>
- ・ Tet-On or Off Cell Line
  - ・ Tet-On or Off Luciferase Control Cell Line
  - ・ Tet System Approved FBS (50 ml)

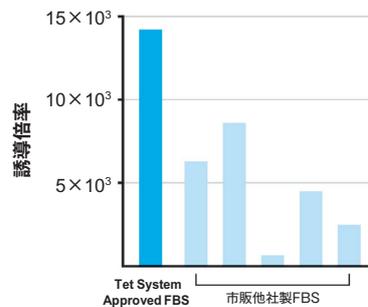
## Tetシステム仕様ウシ胎児血清

# Tet System Approved FBS

- Tet細胞株での調節性発現誘導機能を試験済みのFBS
- 残存テトラサイクリン様活性の懸念なし

Tet細胞株でテトラサイクリン調節性誘導能の機能試験(※)を行い、その性能が発揮されることを確認した高品質のウシ胎児血清です。市販の抗生物質フリー血清の場合は、血清中のテトラサイクリン様活性によりバックグラウンドを上げる可能性があります。Tet System Approved FBSを使用すれば、このような懸念を排除して実験を行うことができます(右図参照)。

※Clontech の Tet System Approved FBS で行っている高感度な試験は、Tet-inducible Systemを使った機能的な試験であり、化学的分析で行うウシ胎児血清中テトラサイクリン存在試験とは異なります。



| 製品名                                    | 容量     | 製品コード  | 価格(税別)   |
|--|--------|--------|----------|
| Tet System Approved FBS, US-Sourced    | 50 ml  | 631105 | ¥19,000  |
|  | 500 ml | 631101 | ¥135,000 |
| Tet System Approved FBS, USDA-Approved | 50 ml  | 631107 | ¥18,000  |
|  | 500 ml | 631106 | ¥130,000 |

## TetR Monoclonal Antibody

- Tetシステム構築時のトランス活性化因子高発現細胞株のスクリーニングに

TetRタンパク質の全長を免疫源に用いて作製されたモノクローナル抗体です。本抗体を用いたウェスタンブロットングにより、Tetシステムのトランス活性化因子の発現を確認できます。

### 本抗体を用いてウェスタンブロットングが可能なシステム

- ・ Tet-One<sup>™</sup> Inducible Expression System
- ・ Tet-On 3G Inducible Expression System
- ・ Tet-On/Tet-Off Advanced Inducible Gene Expression System
- ・ Tet-Off Gene Expression System

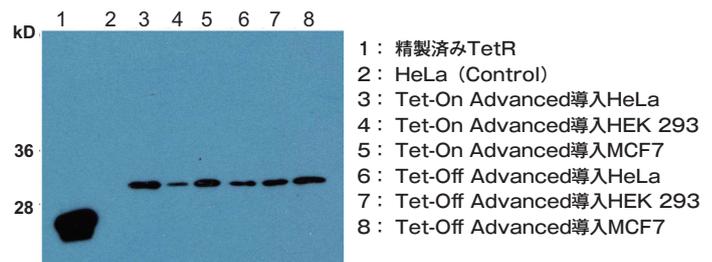
#### [注意]

- 1: TetR抗体によるウェスタンブロットングは、ルシフェラーゼ発現応答ベクター(pTRE-Tight-Luc Control Vector)による機能的な試験の代用にはなりません。誘導性の高い細胞株の多くは本抗体では検出できないレベルでトランス活性化因子を発現しています。
- 2: TetR Monoclonal Antibodyは、従来型のpTet-On VectorとpTet-tTS VectorのTetRタンパク質の検出、およびKnockout Inducible RNAi System(製品コード 630925、630926、630933)には使用できません。

### ■実施例

#### Tetシステムトランス活性化因子のウェスタンブロット検出

精製済みTetRタンパク質、HeLa細胞(プラスミド未導入)、pTet-On AdvancedベクターまたはpTet-Off Advancedベクターを導入し樹立化したHeLa、HEK 293、およびMCF7からの細胞抽出液を用いて、本抗体によるウェスタンブロット解析を行った結果を示す。



| 製品名                                  | 容量     | 製品コード  | 価格(税別)   |
|--------------------------------------|--------|--------|----------|
| TetR Monoclonal Antibody (Clone 9G9) | 40 µg  | 631131 | ¥52,000  |
|                                      | 200 µg | 631132 | ¥136,000 |

## [ Tet発現誘導システム ] その他の製品ガイド

| 製品名  | 概要  | 容量     | 製品コード  | 価格(税別)   | 備考  |
|--|---|--------|--------|----------|-----|
| <b>レトロウイルスベクタータイプのTet発現誘導システム</b>                                    |   |        |        |          |     |
| Retro-X™ Tet-On® 3G Inducible Expression System                      | 組換えレトロウイルスを用いてTet遺伝子発現システムを構築             | 1 Kit  | 631188 | ¥302,000 | ラ 営 |
| Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System (Puro)                 |   |        | 634307 | ¥337,000 |     |
| Retro-X™ Tet-Off® Advanced Inducible Expression System               |   |        | 632105 | ¥240,000 | *   |
| <b>アデノウイルスベクタータイプのTet発現誘導システム</b>                                    |   |        |        |          |     |
| Adeno-X™ Adenoviral System 3 (Tet-On 3G Inducible)                   | 組換えアデノウイルスを用いてTet遺伝子発現システムを構築             | 1 Kit  | 631180 | ¥315,000 | ラ 営 |
| <b>Tet-On® バイディレクショナル発現システム</b>                                      |   |        |        |          |     |
| Tet-On® 3G Bidirectional Inducible Expression System                 | 両方向性ベクターにより、2つの遺伝子の同時かつ均等な発言当節が可能なシステムを構築 | 1 Kit  | 631337 | ¥247,000 | ラ 営 |
| Tet-On® 3G Bidirectional Inducible Expression System (with mCherry)  |   |        | 631338 | ¥262,000 |     |
| Tet-On® 3G Bidirectional Inducible Expression System (with ZsGreen1) |   |        | 631339 | ¥262,000 |     |
| <b>Tet-On® / Tet-Off® Advanced発現誘導システム (Dual Expression)</b>         |   |        |        |          |     |
| Tet-On® Advanced IRES Fluorescent Vector Set                         | 蛍光タンパク質の共発現により、システム構築時に迅速な細胞株選択が可能        | 各40 µl | 631112 | ¥143,000 | *   |
| Tet-Off® Advanced IRES Fluorescent Vector Set                        |   |        | 631113 | ¥143,000 |     |
| <b>細胞周期モニタリングベクター</b>  |   |        |        |          |     |
| pTRE-CellCycle Vector  | 培養細胞または生きた組織の細胞周期をリアルタイムにモニタリング           | 10 µg  | 631466 | ¥110,000 | *   |
| <b>Tet-ProteoTuner™ 二段階発現調節ベクター</b>                                  |   |        |        |          |     |
| pTRE-Cycle1 Vector   | 目的遺伝子の発現を、転写制御とタンパク質分解制御で二段階に調節           | 各40 µl | 631115 | ¥130,000 | *   |
| pTRE-Cycle2 Vector   |   |        | 631116 | ¥148,000 |     |
| pTRE-Cycle3 Vector   |   |        | 631117 | ¥148,000 |     |
| <b>Tet-On® 3G Cell Line</b>  |   |        |        |          |     |
| HEK 293 Tet-On® 3G Cell Line   | 3G System樹立済みCell Line                    | 各1 ml  | 631182 | ¥190,000 | ラ 営 |
| HeLa Tet-On® 3G Cell Line  |   |        | 631183 | ¥190,000 |     |
| <b>Tet-On® / Tet-Off® Advanced Cell Line</b>                         |   |        |        |          |     |
| HEK 293 Tet-Off® Advanced Cell Line                                  | Advanced System樹立済みCell Line              | 1 ml   | 631152 | ¥157,000 |     |
| <b>関連製品</b>  |   |        |        |          |     |
| Doxycycline  | Tetシステム誘導用ドキシサイクリン                        | 5 g    | 631311 | ¥39,000  |     |

ラ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。 営 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

\* ご購入前にMTA (Material Transfer Agreement)をご確認ください。詳細は弊社ウェブカタログでご確認ください。

・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。

・本チラシに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

・本チラシ記載の価格は2023年6月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2023年6月修正

## タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <https://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店