



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018년 2월  
석사학위논문

# IPTG와 젓당을 이용한 유전자 유도 발현 시스템 개발

조선대학교 대학원

의과학과

명승현

# IPTG와 젓당을 이용한 유전자 유도 발현 시스템 개발

Development of the mammalian expression vector system that can be  
induced by IPTG and/or Lactose

2018년 2월

조선대학교 대학원

의과학과

명승현

# IPTG와 젓당을 이용한 유전자 유도 발현 시스템 개발

지도교수 김 태 형

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2017년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

명 승 현

## 명승현의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 이 성 행 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 태 형 (인)

위 원 조선대학교 부교수 송 희 상 (인)

2017년 11월

조선대학교 대학원

목차

LIST OF FIGURES .....	ii
ABSTRACT .....	iii
I. 서론 .....	1
II. 실험 재료 .....	5
1. 세포 .....	5
2. 시약 .....	5
3. 항체 .....	5
4. 형광 공초점 현미경 .....	5
III. 실험 방법 .....	6
1. 세포 배양 .....	6
2. 동물 세포의 형질전환 및 유전자 발현 유도 .....	6
3. Western blot .....	6
4. 형광 공초점 현미경 관찰.....	7
IV. 결과 .....	8
1. Inducible vector 의 구조 .....	8
2. Inducible vector 의 유전자 발현 유도 실험 .....	11
3. IPTG 와 젓당의 부가 효과.....	16
4. 유도 물질의 최적 농도 .....	20
5. 효율적인 유전자의 발현 유도를 위한 Operator 제거.....	22
V. 고찰 .....	26
VI. 참고 문헌 .....	30

## LIST OF FIGURES

Figure 1. The schematic diagram of inducible vector, pCalo5-GFP-LacI

Figure 2. The induction of GFP expression in pCalo5-GFP-LacI by IPTG or lactose in HEK293 cell line

Figure 3. The increase of expression of GFP by co-treatment of IPTG and Lactose in HEK293 cell, HEK293T cell, B16F10 cell, and HeLa cell lines

Figure 4. Optimal concentration for expression of GFP by IPTG and Lactose in HEK293 cell line

Figure 5. The schematic diagram of inducible vector modified from pCalo5-GFP-LacI.

Figure 6. The efficiency of inducible vectors by co-treatment of IPTG and Lactose in HEK293 cell line.

## ABSTRACT

Development of the mammalian expression vector system that can be induced by IPTG and/or Lactose

Myung, Seung Hyun

Advisor : Prof. Kim, Tae Hyoung, Ph.D.

Department of Medical Science,

Graduate School of Chosun University

The technique to regulate gene expression is necessary to study the functions of genes and to treat diseases through gene therapy. Various inducers such as Tetracycline, Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and Doxycycline have been used to control gene expression. Among these system, the Lac operon system is one of the most used system. IPTG, an inducer used in the Lac operon system, has a high affinity for the repressor and is known to penetrate rapidly into mammalian cells and has low toxicity. Therefore, in this study, I made a inducible expression system of target gene that can regulate gene expression by IPTG in the mammalian cells using Lac operon system. In addition, unlike other inducible gene expression vector system using Lac operon, this study confirmed that gene expression can be regulated by Lactose, which is readily available from around, and gene expression is controlled more efficiently by treating IPTG and lactose together. In order to regulate gene expression more efficiently, the number of operators was controlled so that the gene expression could be strongly inhibited when the inducer was not treated. In addition, I used CAG enhancer and CMV promoter-mini, which can strongly induce gene expression in animal cells, to further enhance gene expression when treated with inducers. The CMV promoter-mini was designed to reduce the size of the vector and increase its efficiency using the minimal sequence with the function of the promoter in the CMV promoter. This study confirmed that lactose as well as IPTG could be used as an inducer to regulate gene expression in mammalian cells. Lactose is a disaccharide contained in dairy products such as milk and is easily consumable. Therefore, regulation of gene expression using lactose in combination with IPTG is expected to have great benefits in gene therapy.



## I. 서론

유전자는 인간의 발생, 성장, 노화, 질병 등 인간의 삶과 죽음에 절대적인 영향을 미치는 요소이기 때문에 유전자에 대한 연구는 오래전부터 계속 되어왔다. 많은 연구를 통해 다양한 유전자의 기능이 밝혀졌지만 인간의 유전자가 내포하는 정보의 양이 매우 방대하기 때문에 아직까지 많은 유전자의 기능이 밝혀지지 못했다. 아직까지 기능이 밝혀지지 않은 유전자의 기능을 좀 더 쉽고 효율적으로 연구하기 위해서는 새로운 기술 개발이 필요하다(1,2).

유전자를 연구하는 방법 중 쉽고 간편하게 기능을 파악 할 수 있는 방법으로 특정 유전자를 과발현시키거나 억제하여 다른 유전자들과의 상호관계를 조사한다. 먼저 유전자 발현을 인위적으로 조절하기 위해서는 세포를 형질전환 시켜야 한다. 세포를 형질전환을 시키기 위한 매개체로는 플라스미드 DNA 또는 바이러스를 주로 사용한다. 바이러스는 높은 형질전환 효율을 갖지만 염색체 내부로 삽입이 되어 외부에서 유전자의 발현을 조절하는데 어려움이 있고, 감염된 세포의 유전체에 변이를 유발하거나 감염 위험성을 갖고 있다(1,3,4). 반면에 플라스미드 DNA는 바이러스 보다 안전하며 형질전환 방법에 따라, 세포에 따라 높은 효율로 발현을 유도 할 수 있다(1). 또한 플라스미드를 이용한 대부분의 실험에서는 동물세포 내부에서 복제할 수 있는 시스템이 없는 상태에서 일시적으로 유전자의 발현을 유도하고 사라진다. 따라서 바이러스와 플라스미드 각각의 장·단점을 맞춰 질병 치료에 적합한 시스템을 선택하여 사용한다.

지금까지 유전자의 발현을 on/off 하기 위한 다양한 방법이 개발되었다. 특정 시기에 유전자의 발현을 유도하기 위해 Promoter와 상호작용이 가능한 유도 물질을 사용하는데 대표적인 유도 물질로 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), Tetracycline 등이 있다(5-7). 특정 유도 물질을 이용하여 유전자의 발현을 on/off 하는 방법은 원하는 유전자만을 조절하여 특정 유전자의 기능을 연구할 수 있는 장점이 있다. 이러한 유도 물질을 이용하여 유전자의 발현을 조절할 수 있는 대표적인

방법으로 Cre-LoxP 재조합 방법이 있다(8). 이 방법은 박테리오파지 P1으로부터 유래한 Cre 재조합효소를 이용하여 LoxP라는 특정 염기서열 쌍으로 둘러싸인 DNA 염기서열을 제거함으로써 유전자의 발현을 유도 혹은 제거할 수 있다(8,9). 하지만 이 방법은 유전자의 발현을 조절하는데 있어 비가역적인 방법이다. 또한 Cre-LoxP 시스템으로 형질전환 된 세포는 Cre 재조합효소의 지속적인 발현으로 다른 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있다(6). 또 다른 유전자의 발현을 조절하기 위한 방법으로 RNA 간섭 기술이 있다. 이 기술은 특정 유전자의 anti-sense 서열을 이용하여 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 하지만 이 기술은 유전자의 발현을 억제하기만 하고, 다른 유전자에 대해 비 특이적인 억제 효과를 가져올 수 있다(1,10).

Lac operon 시스템은 대장균에서 발견된 시스템으로 포도당이 적은 환경에서 젓당을 이용하여 생존하기 위한 방법으로 가역적으로 유전자의 발현을 조절할 수 있다(11). Lac operon 시스템은 포도당이 많은 환경에서는 LacI 유전자로부터 만들어지는 Lac repressor가 Promoter 아래에 위치한 Operator라고 하는 특정 염기서열에 결합하여 유전자의 전사를 막고 있지만 포도당이 적고 젓당이 많은 환경에서는 Lac repressor가 젓당의 이성질체인 Allolactose(알로락토스)와 결합하여 Promoter에 전사 인자가 결합하여 유전자의 발현이 가능하게 된다(12).

Lac operon 시스템에서 Operator의 위치와 개수에 따라 유전자 발현을 억제하는 효율이 달라질 수 있기 때문에 Operator의 위치와 개수가 중요하다(12,13). 유전자 발현을 억제하는데 가장 중요한 Operator는 Promoter로부터 3' 쪽에 바로 인접한 Operator이다(14). 이 Operator는 Promoter와 서열이 겹치며 Lac repressor가 Operator에 결합하면 Promoter에 전사 단백질이 결합하지 못하도록 하여 유전자의 발현을 직접적으로 방해한다. 따라서 Promoter의 3'쪽에 겹치는 Operator가 없으면 유전자의 발현은 효과적으로 조절할 수 없다(14). 또한 Promoter로부터 5'쪽으로 약 92bp에 위치한 Operator와 3'쪽으로 401bp에 Operator가 존재하며 Lac repressor가 결합할 수 있다(12-14). Lac repressor가 Promoter로부터 5'쪽과 3'쪽에 위치한 Operator들에

결합하면 억제 단백질 간의 복합체 형성하여 Operator 사이의 DNA는 고리 모양이 형성되어 유전자의 발현을 억제할 수 있다(12,15). 결론적으로 유전자 발현을 조절하는데 Promoter와 서열이 겹치는 Operator가 가장 중요하지만 효과적인 유전자 발현을 조절하기 위해서는 Promoter의 5'쪽으로 92bp떨어진 Operator와 3'쪽으로 401bp 떨어져 위치한 Operator 모두 필요하다(12,14).

Lac operator와 Lac repressor를 이용한 유전자 발현을 조절하는 시스템을 동물 세포에도 적용하기 위해 다양한 방법들이 개발되었다(6,12,16-18). 이전까지는 Lac operon 시스템에서 유도 물질로 사용되는 것은 Allolactose와 Allolactose의 유사체인 IPTG로 알려져 있었다(19). Allolactose는 대장균에서 LacZ 유전자에 의해 발현되는  $\beta$ -galactosidase에 의해 젓당( $\beta$ -1-4 glycosidic linkage)으로부터 전환된 이성질체로 galactose와 glucose가  $\beta$ -1-6 glycosidic linkage로 연결되어 있다. Allolactose와 억제 단백질의 결합 친화도가 IPTG보다 2배나 높기 때문에 더욱 높은 효율로 유전자의 발현 유도가 가능할 것이다(20). 하지만 Allolactose는 Lac repressor와 결합한 뒤 분해되기 때문에 자유로워진 Lac repressor가 다시 Operator에 결합할 수 있는 문제가 있다. IPTG는 Allolactose의  $\beta$ -1-6 glycosidic linkage 부분과 유사한 구조를 가지고 있으며 Lac repressor와 결합하여 분해되지 않아 Lac repressor와 떨어지지 않는 결합이 가능하다. 또한 대장균은 LacZ 유전자를 갖고 있기 때문에 젓당을 유도 물질로 사용하여도 Allolactose로 전환하여 유전자 발현을 강하게 유도할 수 있다. 하지만 동물세포에서는 LacZ 유전자가 없기때문에 젓당을 이용하여 유전자 발현을 조절할 수 없다고 생각되었다. 그렇기 때문에 동물 세포에서 Lac operator를 이용한 시스템은 대부분 IPTG를 이용하여 유전자의 발현 유도를 확인하였다. 하지만 본 연구에서는 동물세포에서 유전자 발현을 조절하기 위해 젓당을 유도 물질로 사용하였다. 젓당은 Allolactose의 이성질체이며  $\beta$ -1-6 glycosidic linkage을 갖지 않기 때문에 Repressor에 영향을 미칠 수 있을 것이라 생각하였다. 또한 Lac operon은 젓당을 에너지 원으로 사용하기 위한 시스템이기 때문에 젓당 또한 유도 물질로 사용할 수 있을 것이라

생각하였다. 젓당을 이용한 유전자 발현 조절이 된다면 매우 큰 이점을 가져올 수 있다. 젓당은 우유에 풍부하게 존재하기 때문에 본 연구에서 만든 시스템을 이용한다면 유전자 발현 연구를 더욱 쉽고 효율적으로 연구하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

## II. 실험 재료

### 1. 세포

HEK293 세포, HEK293T 세포, HeLa 세포, B16F10 세포 모두 한국 세포 주 은행(Korean Cell line Bank, KCLB)에서 구매하여 사용하였다.

### 2. 시약

세포 배양을 위해 필요한 배지는 Gibco 회사의 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 제품(Cat. 12100046)을 사용하였고, Fetal Bovine Serum(FBS)는 Merk(Cat. TMS-013-BKR)에서 구매, Penicillin-Streptomycin은 CORNING(Cat. 30-002-LC)에서 구매, Gentamycin은 Duchefa Biochemie(Cat. G0124.0005)에서 그리고 Ciprofloxacin은 Sigma(Cat. 17850-5G-F)에서 구매하여 사용하였다. 세포를 형질전환 시키기 위해 사용한 polyethylenimine(PEI) 는 Poly Science(Cat. 24765-2) 에서 구매하여 사용하였다. 유전자 발현을 유도하기 위해 사용한 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside(IPTG)(Cat. 11533021)와 Lactose(Cat. L-3625)는 Sigma 제품을 구매하여 사용하였다.

### 3. 항체

Anti-GFP는 SANTA CRUZ(Cat. sc-8334)에서 구매, Anti-GAPDH는 Cell Signaling(Cat. 2118S)에서 구매하였고, Anti-Actin은 Millipore(Cat. MAB1501)에서 구매하여 사용하였다.

### 4. 형광 공초점 현미경

Olympus IX81-ZDC 제품을 사용하여 형질 전환 된 세포로부터 발현되는 Green fluorescent protein과 Hoechst를 이용하여 세포의 핵을 관찰하였다.

### III. 실험 방법

#### 1. 세포 배양

배아 신장 세포인 HEK293 세포와 HEK293T 세포, 사람 자궁경부암 세포인 HeLa 와 쥐의 피부 흑색종 세포인 B16F10 세포 모두 5% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin-Streptomycin, Ciprofloxacin, Gentamycin 이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 가 있는 조건으로 배양하였다.

#### 2. 동물 세포의 형질 전환 및 유전자 발현 유도

HEK293 세포의 형질 전환을 위해 플라스미드 DNA 와 polyethylenimine(PEI)를 1:3 비율로 사용하였다. 1.5 ml tube 에 pCalo5-GFP vector 혹은 pCalo5-BPL-GFP vector 를 각각 20 µg 씩 넣고 PEI 를 60 µg 을 넣고 DMEM 배지로 3 ml 까지 부피를 맞춘다. 그리고 충분히 섞어준 후 HEK293 세포가 있는 T75 플라스크에 DNA 가 들어있는 혼합물을 넣어준다. 8 시간 후 새로운 DMEM 배지로 바꿔주고 다시 8 시간 후에 24-well 플레이트로 각각 나눠 키운다. 16 시간 후 IPTG 와 젓당을 각각 농도 별로 처리하고 유전자 발현 정도를 형광 공초점 현미경으로 관찰한다.

#### 3. Western Blot

유전자 발현을 유도하기 위해 IPTG 그리고/혹은 젓당을 처리하고 각각 0 시간, 24 시간 후 스크래퍼를 이용하여 세포를 모두 모으고 6000 Xg 에서 원심분리 한 뒤 부유층은 모두 버린다. 원심 분리 후 가라 앉은 덩어리(pellet)를 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate(SDS), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1/1000 Protease inhibitor cocktail(sigma, P8340)) 100 µl 를 넣고 충분히 섞어준다. 단백질의 양은 BCA 방법으로 정량 하였고, 정량을 하기 위한 표준 단백질로는 Bovine serum albumin(BSA, Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다. BCA

방법으로 정량한 샘플 단백질 30  $\mu\text{g}$  과 Loading buffer(최종 농도- 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA 그리고 0.02% bromophenol blue)를 섞고 끓는 물에서 10분간 끓여 단백질이 1차 구조를 형성하도록 만든다. Green fluorescent protein(GFP)와 GAPDH 를 검출하기 위해 10% Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 을 사용하여 전기영동을 하였다. 단백질의 크기를 비교하기 위해 Protein marker 로 Triple color protein marker(BIOFACT, SM306-500)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 Gel 은 Transfer buffer(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Methanol, pH8.5)에서 400 mA 로 110 분 동안 PVDF blotting membrane(Amersham Hybond, A10205107)으로 transfer 하였다. Transfer 를 마친 Membrane 은 4% Skim milk 가 들어있는 0.05% TBST 용액(20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 1 시간 동안 Blocking 을 한다. 그리고 검출하고자 하는 단백질과 결합하는 항체를 각각의 PVDF membrane 과 2시간 동안 반응시킨다. 2시간 후 PVDF membrane 을 0.05% TBST 용액으로 10분씩 3번 씻어주고 1차 항체에 결합하는 2차 항체를 다시 Membrane 과 1시간 동안 반응시킨다. 1 시간 후 0.1% TBST 용액으로 13 분씩 3 번 씻어준다. 각 항체의 희석 배수는 1:3000 으로 0.05% TBST 에 희석하여 사용하였다.

#### 4. 형광 공초점 현미경 관찰

GFP 와 Hoechst 를 관찰하기 위해서 유전자의 발현을 유도한 뒤 관찰하고자 한 시간이 되면 10  $\mu\text{g/ml}$  의 Hoechst 를 각 well 에 처리하고 10 분 동안 빛을 차단시키고 반응시킨다. 10 분후 1X PBS 로 각 well 를 씻고 4% Paraformaldehyde 를 300  $\mu\text{l}$  씩 각 well 에 처리하고 10 분 동안 세포를 고정시킨다. 다시 1X PBS 로 각 well 을 씻어 주고 1X PBS 를 300  $\mu\text{l}$  채우고 형광 공초점 현미경을 이용하여 GFP 와 Hoechst 를 관찰한다. GFP 의 excitation 파장은 488 nm 이고 emission 파장은 500 – 536 nm 이다. 그리고 Hoechst 의 excitation 파장은 405 nm 를 사용하였고, emission 파장은 441 – 480 nm 에서 관찰하였다.

## IV. 결과

### 1. Inducible vector의 구조

Lac repressor와 Operator를 이용하여 유전자 발현을 조절하기 위해서는 Operator의 개수와 위치가 중요하다(12-14). 본 연구에서는 기존 연구 결과들을 바탕으로 동물세포에서 유전자 발현을 조절하기 위한 시스템을 만들었다. 우선 동물세포에서 유전자 발현을 강하게 유도하기 위해 CAG enhancer와 CMV promoter-mini를 pcDNA6에 삽입하였다. 그리고 유전자의 발현을 효과적으로 억제하기 위해 operator를 5개를 삽입하였다. 각 operator의 위치는 CMV promoter-mini의 3'쪽에 3개, CAG enhancer와 CMV promoter-mini의 사이에 1개, 그리고 CAG enhancer의 5'쪽에 1개를 삽입하였다. pcDNA6의 Multi Cloning Site(MCS)자리에 유전자 발현의 정도를 눈으로 확인하기 위해 Green Fluorescent Protein(GFP)를 삽입하여 대조군 벡터인 pCalo5-GFP를 설계하였다(Figure 1(A)). 그리고 대조군 벡터에 LacI 유전자와 SV40 promoter를 넣어 Inducible vector인 pCalo5-GFP-LacI를 만들었다(Figure 1(B)). 이 벡터는 억제 단백질을 만드는 유전자인 LacI를 포함하여 자체적으로 유전자의 발현을 억제할 수 있다(Figure 1(C)). 따라서 우리가 IPTG 혹은 젓당과 같은 유도 물질을 이용하여 인위적으로 유전자의 발현을 유도하면 Lac repressor가 유도 물질에 의해 기능을 상실하게 되어 유전자의 발현이 가능하게 된다(Figure 1(D)). 또한 LacI 유전자는 Blasticidin 저항성 유전자와 자가 절단 단백질인 P2A 유전자와 붙어있어 이 벡터로 형질 전환된 세포를 Blasticidin 을 이용하여 선택적으로 선별이 가능하여 특정 유전자 연구를 더 효율적으로 수행할 수 있다(Figure 1(A)).



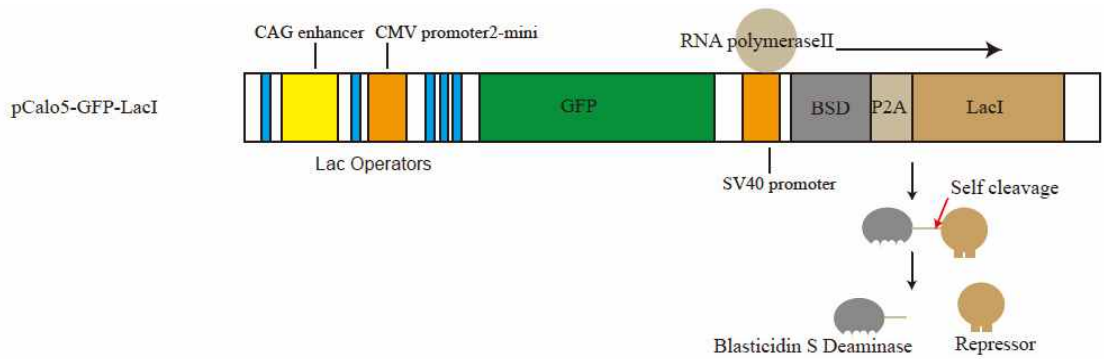
(A)

pCalo5-GFP



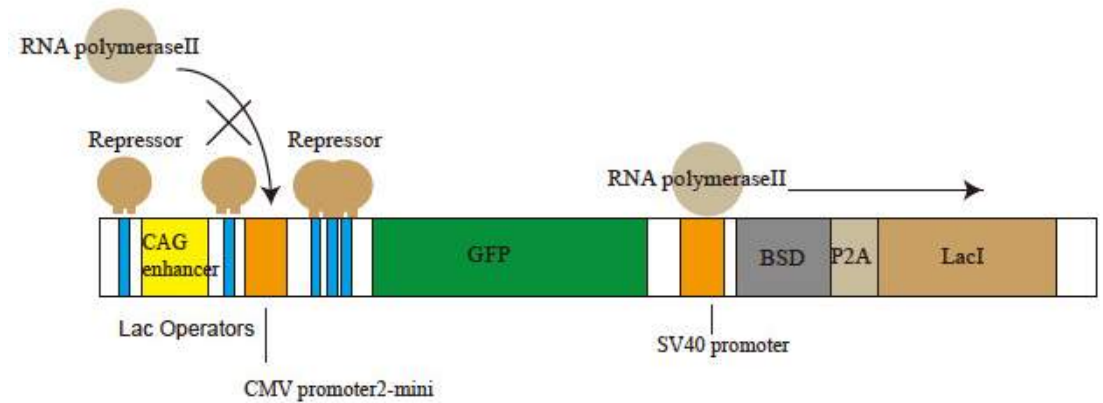
(B)

pCalo5-GFP-LacI



(C)

Turn off



(D)

Turn on

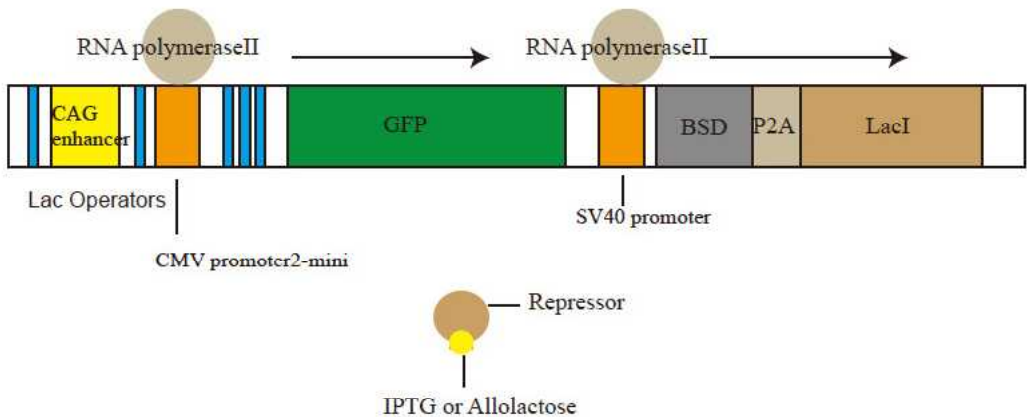


Figure 1. The scheme of inducible vector, pCalo5-GFP-LacI

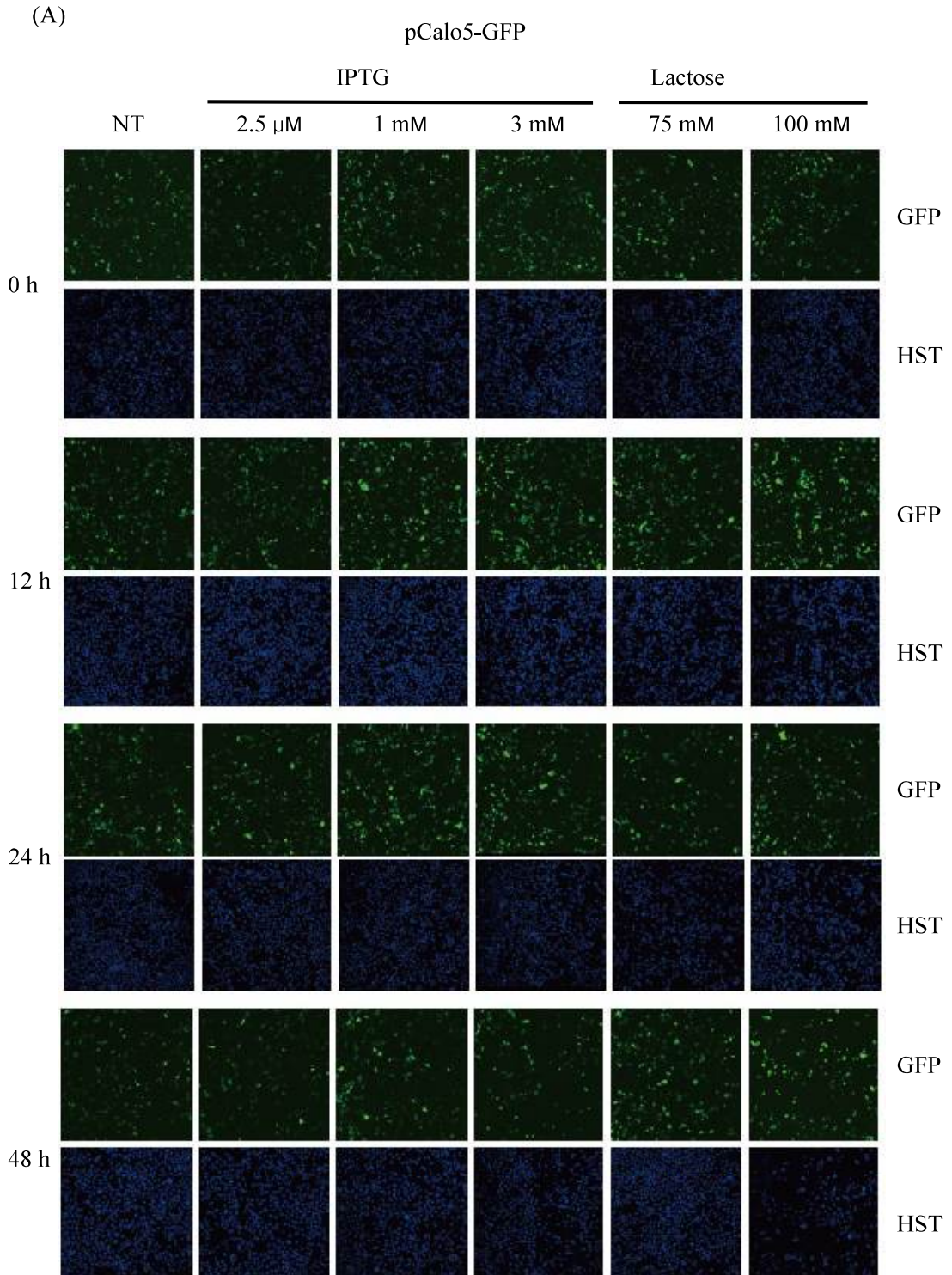
- (A) The control vector, pCalo5-GFP against pCalo5-GFP-LacI
- (B) The inducible vector, pCalo5-GFP-LacI has five operators, Blasticidin gene, P2A gene and LacI gene. Three operators are located downstream from the CMV promoter and upstream from the GFP ORF. The other operator is located between the promoter and the enhancer, and another one is located upstream from the enhancer.
- (C) The GFP expression is suppressed by inhibition of repressors when the inducers are not treated.
- (D) When the inducers are treated, repressors are bind to inducers such as IPTG and then cause structural change in DNA binding motif of N-terminal. After that, The GFP can be expressed by transcription factors.

## 2. Inducible vector 의 유전자 발현 유도 실험

Lac operon 시스템은 Glucose 가 적은 환경에서 젓당을 에너지원으로 이용하기 위한 시스템 이다. 따라서 Glucose 가 없는 환경에서 Lactose 를 분해하기 위해 대장균은 Lac operon 시스템을 개시하고 이때 발현되는 LacZ 유전자에 의해 만들어지는  $\beta$ -galactosidase 는 젓당을 Allolactose 로 바꾼다. 그리고 Allolactose 는 Repressor 와 결합하여 유전자의 발현을 유도한다. 하지만 Allolactose 는 Repressor 에 의해 분해되어 지속적인 유전자 발현을 유도할 수 없다. 따라서 Allolactose 의  $\beta$ -1-6 glycosidic linkage 와 유사한 구조를 갖는 IPTG 를 만들었다. IPTG 는 세포 내 침투성이 좋고 세포 독성이 낮은 장점을 갖고 있어서 동물세포에서 Lac operon 을 이용하는 대부분의 연구에서 IPTG 를 유도 물질로 사용한다. 하지만 IPTG 는 Allolactose 보다 Repressor 에 결합하는 능력이 2 배 가량 떨어지기 때문에 박테리아에서 단백질을 발현하는 것보다 효율이 매우 떨어진다(20). 따라서 본 연구에서는 Allolactose 의 이성질체인 젓당을 유도 물질로 사용하였다. 젓당은 Lac operon 시스템이 에너지원으로 이용하기 위한 물질이기 때문에 본 연구에서는 젓당 또한 유도 물질로 사용가능 할 것이라 생각하여 젓당을 이용한 유전자 발현 조절 실험을 수행하였다.

먼저 본 연구에서 개발한 시스템에서 유전자의 발현이 어느 시점에서 일어나는지, 얼마나 발현을 유도할 수 있는지 확인해보았다. Inducible vector 의 유전자 발현 조절 정도를 비교하기 위해 먼저 HEK293 세포 주에 Lac repressor 가 발현 되는 실험군 벡터인 pCalo5-GFP-LacI 와 Lac repressor 가 발현 되지 않는 대조군 벡터인 pCalo5-GFP 를 각각 형질전환 시켰다. 그리고 형질전환 된 세포는 24-well plate 로  $1 \times 10^5$  cells/well 로 나누고 유도 물질을 이용하여 유전자의 발현을 확인하였다. 유전자의 발현을 비교하기 위한 표지 단백질인 GFP 의 발현으로 비교해본 결과 대조군 벡터를 형질전환 시킨 세포들은 유도 물질과 무관하게 유전자의 발현을 항상 하는 것을 확인할 수 있다(Figure 2(A)). 하지만 실험군 벡터인 pCalo5-GFP-LacI 를 형질전환 시킨 세포들은 유도 물질을 처리하지 않았을 때 시간이 경과하여도 GFP 의 발현이 유도

되지 않은 것을 확인할 수 있다. 본 연구에서 만든 Inducible vector, pCalo5-GFP-LacI, 가 효과적으로 유전자의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있다. 또한 IPTG 를 처리하고 24 시간 이후부터 IPTG 의 농도가 1 mM 과 3 mM 에서 GFP 의 발현이 가장 높게 나타났다. 그리고 IPTG 를 3mM 을 처리하였을 때 GFP 의 발현 정도가 1 mM 을 처리하였을 때와 비슷하였다(Figure 2(B)). 따라서 이 시스템에서 IPTG 는 1 mM 에서 유전자 발현을 최대로 유도할 수 있는 포화 농도로 보인다. 또한 유도 물질을 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때 젓당을 처리한 실험군에서도 유전자의 발현이 유도 되는 것을 확인하였다(Figure 2(B)). 따라서 젓당 또한 Lac operon 시스템에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 유도 물질로 사용 가능한 것을 확인하였다. 하지만 IPTG 를 처리한 실험군 보다 발현의 정도가 약하고 삼투압의 영향으로 세포가 많이 죽는 것을 확인하였다.



(B)

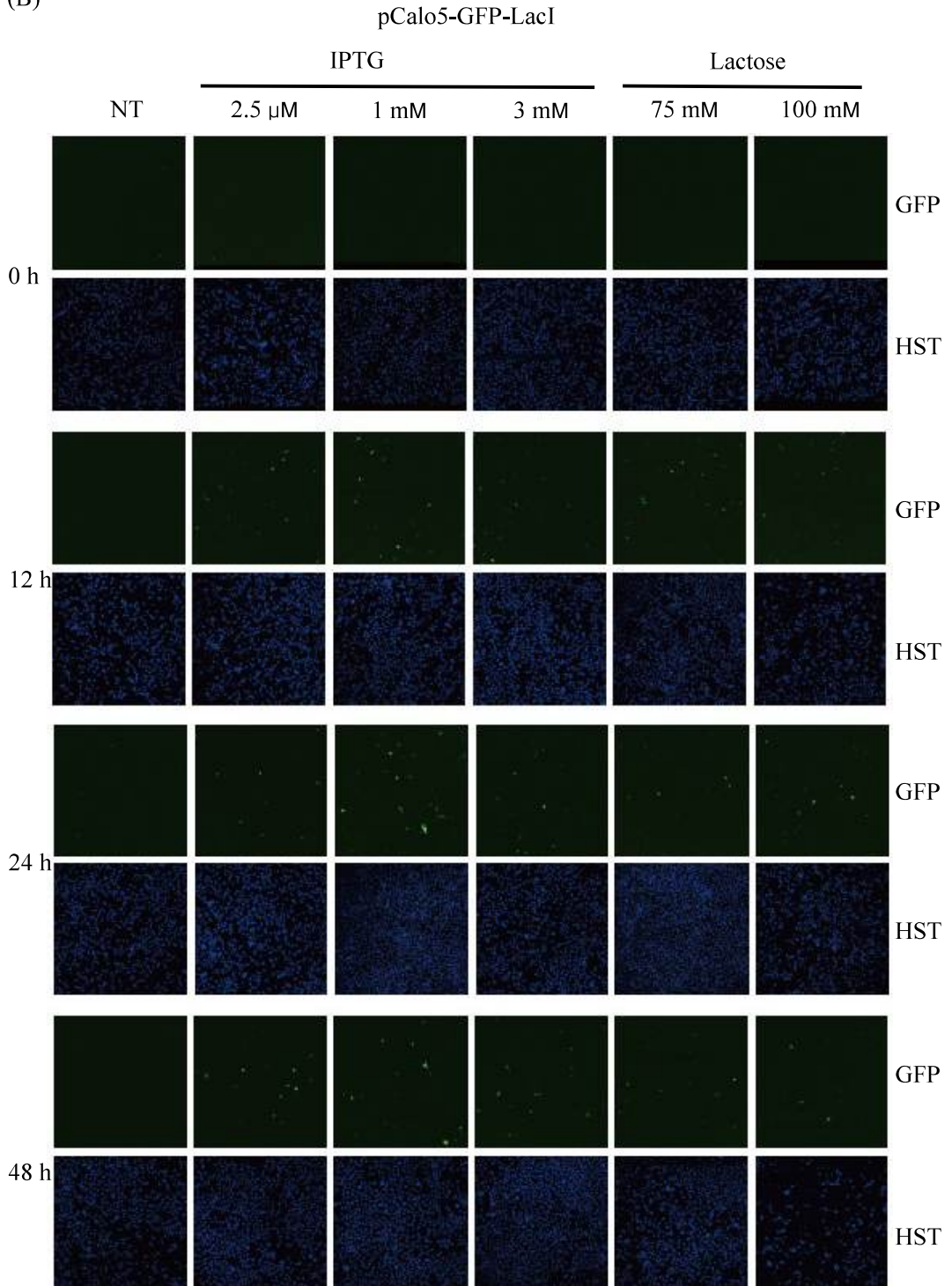


Figure 2. The expression of GFP using IPTG or Lactose in HEK293 cell line

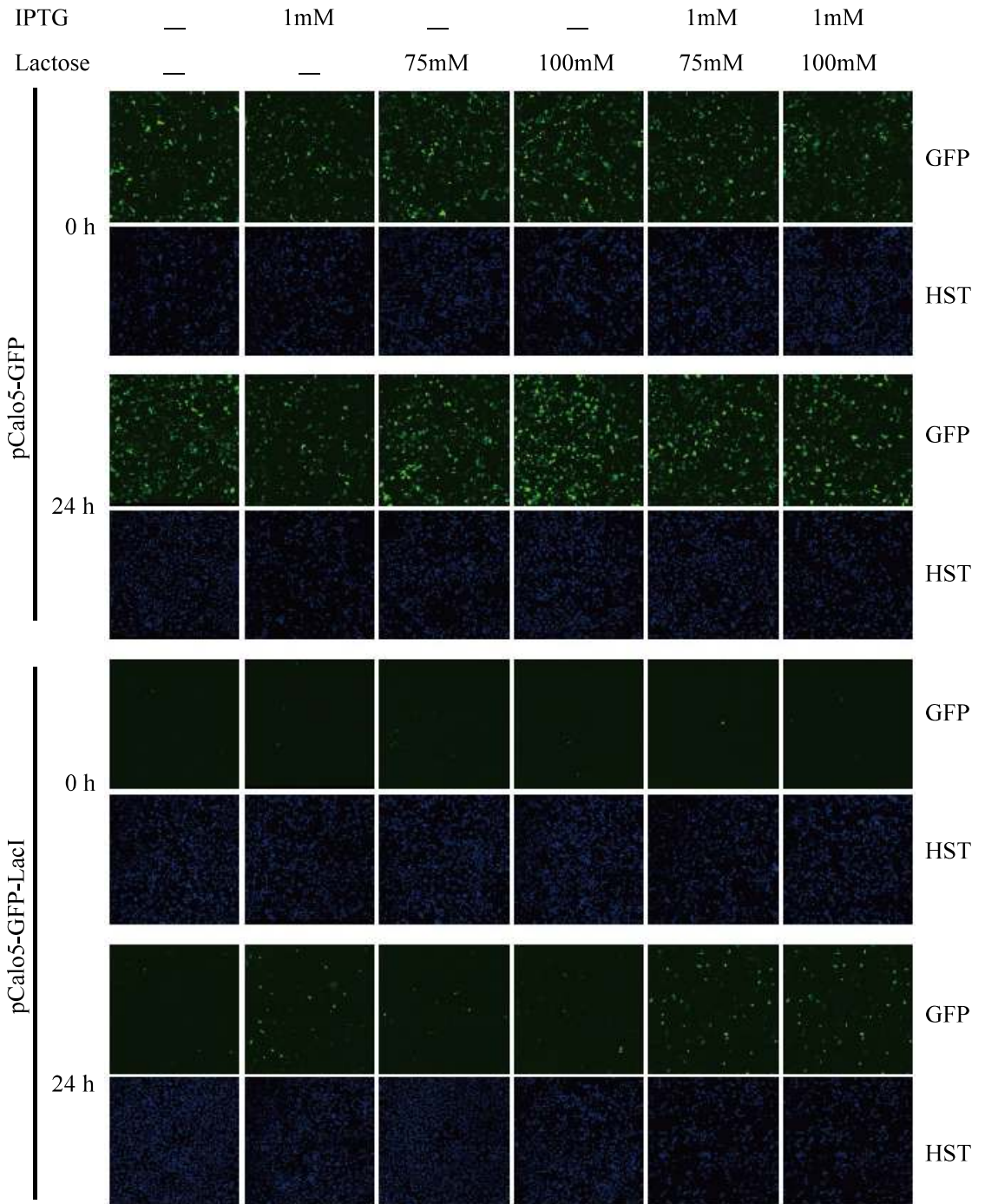
Transfected HEK293 cells were seeded into 24 well plates( $1 \times 10^5$  cells/well) before induction of gene expression. Various concentrations of IPTG or Lactose were treated into transfected HEK293 cells for the indicated time. After indicated time,  $10 \mu\text{g/ml}$  of Hoechst were treated into each well for 10 minutes and 4% Paraformaldehyde were treated into each well for fixation of cells for 10 minutes. The green color represent GFP expressed HEK293cells and The Blue color represent nucleus stained by Hoechst(HST).

### 3. IPTG 와 젓당의 부가 효과

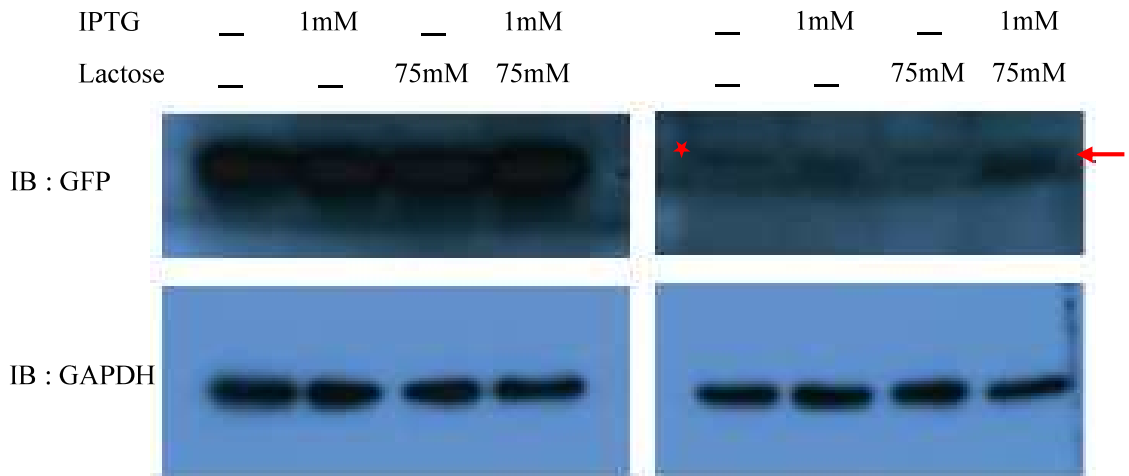
IPTG는 젓당의 유사체로써 Lac repressor와 비가역적으로 결합하여 억제 단백질을 방해하지만 Figure 2의 결과를 보면 GFP의 발현을 유도하기에는 충분하지 못한 것으로 보인다. 유도 물질로 사용되는 IPTG와 Allolactose는 Lac repressor와 같은 부위에 결합하지만 결합 친화도는 다르다(20). 따라서 GFP의 발현을 위한 IPTG의 농도가 이미 포화상태일 경우 더 이상 GFP의 발현을 유도하기 힘들지만 젓당의 결합 친화도가 더 높거나 결합 부위가 다르다면 IPTG와 결합하지 못한 억제 단백질들과 젓당이 결합하여 GFP의 발현을 더욱 유도할 수 있을 것이다. 따라서 IPTG 와 젓당을 함께 처리하여 GFP의 발현을 확인해 보았다. Figure 3(A)에서 보는 바와 같이 pCalo5-GFP-LacI로 형질전환 된 세포에서 IPTG와 젓당을 각각 처리하는 것보다 함께 처리했을 때 더욱 효과적으로 GFP발현을 유도하는 것을 관찰하였다. 또한 이를 정량적으로 확인하기 위해 pCalo5-GFP-LacI로 형질 전환 된 세포에 IPTG와 젓당을 각각 또는 동시에 처리하고 24시간 후에 Western blot으로 관찰한 결과 IPTG와 젓당을 동시에 처리하는 것이 GFP의 발현을 더욱 강하게 유도할 수 있는 것을 확인하였다(Figure3(B)). 또한 사람의 자궁 경부암 세포인 HeLa와 쥐의 흑색종 세포인 B16F10 세포 주에서도 이 시스템이 적용가능 하다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3(C)).



(A)



(B)



(C)

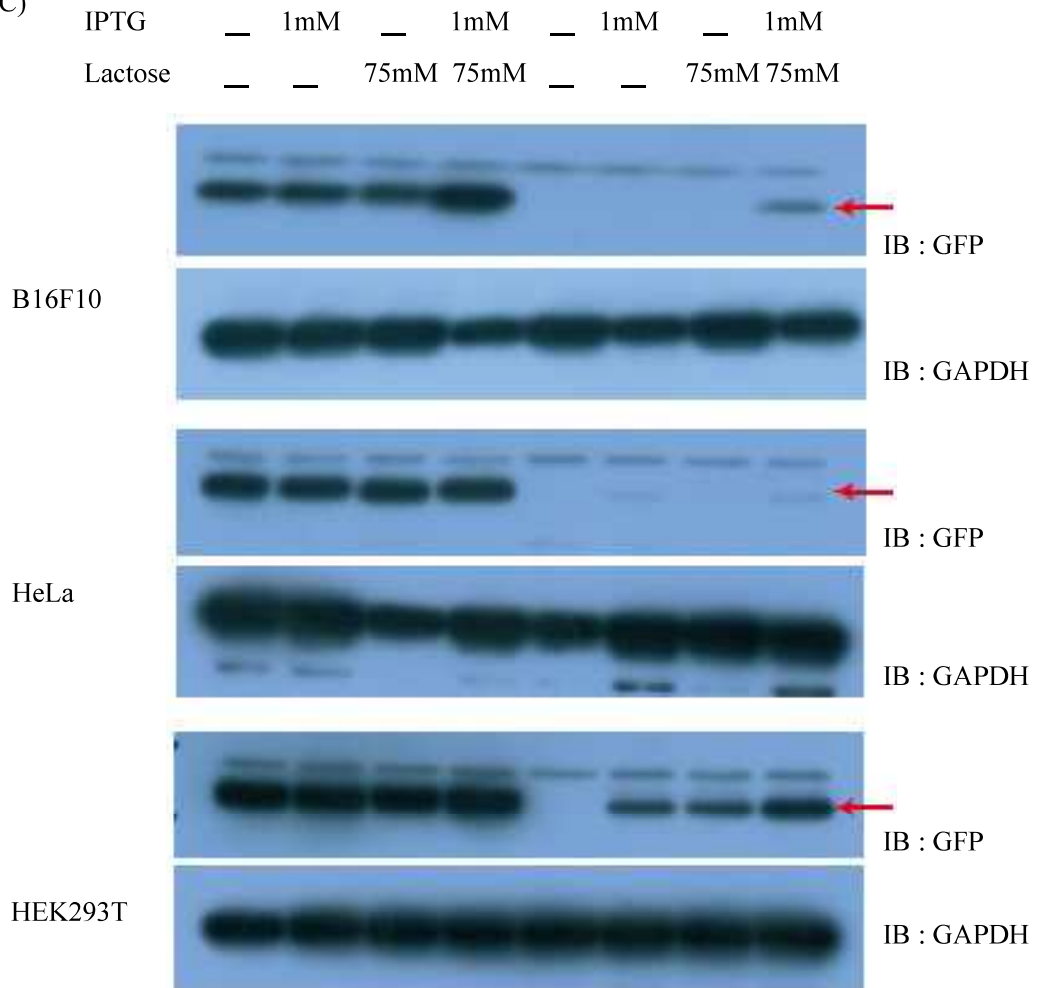


Figure 3. The increase of expression of GFP by co-treatment of IPTG and Lactose in HEK293 cell line

(A) HEK293 cells transfected with indicated vector were seeded into 24 well plates( $1 \times 10^5$  cells/well) before induction of gene expression. After 8 hours, Various concentrations of IPTG and/or Lactose were treated into transfected HEK293 cells for 0 hour and 24 hours. After indicated times,  $10 \mu\text{g/ml}$  of Hoechst were treated into each well for 10 minutes and 4% Paraformaldehyde were treated into each well for fixation of cells for 10 minutes. The green color represent GFP expressed HEK293 cells and The Blue color represent nucleus stained by Hoechst(HST).

(B), (C) After induction of GFP expression by IPTG and/or Lactose at the indicated concentrations, transfected cell lysates were prepared in RIPA buffer. To compare level of GFP expression, GFP were detected. GAPDH(B) and Actin(C) was used as control protein. Reactive bands were indicated by arrow, and asterisk indicated nonspecific bands.

#### 4. 유도 물질의 최적 농도

Figure.3 에서 IPTG와 젓당을 함께 처리함으로써 GFP의 발현이 더욱 효과적으로 유도 되는 것을 확인하였다. 따라서 이 시스템을 더욱 효과적으로 사용하기 위해 유도 물질의 최적 농도를 확인해 보았다. IPTG의 농도는 유전자의 발현을 최대로 유도 할 수 있는 포화 농도인 1mM 로 고정하고 젓당의 농도를 다양하게 처리하여 GFP의 발현을 비교하였다(Figure 4). IPTG 1mM 에 젓당을 함께 처리 하였을 때 젓당의 농도가 증가함에 따라 GFP의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 젓당의 농도가 높아질 수록 죽은 세포가 많이 관찰 되었다. 젓당의 농도가 높아지는 만큼 삼투압이 높아지기 때문에 세포가 죽는 것으로 판단된다. 따라서 세포가 죽지 않으며 GFP의 발현을 가장 높은 수준으로 유도 할 수 있는 젓당의 농도는 75mM로 정하였다.

IPTG 와 젓당의 동시 처리로 GFP의 발현 정도가 크게 증가하였으나 특정 유전자의 기능을 연구하거나 유전자 치료를 위해서 원하는 유전자의 발현을 더욱 강하게 유도할 필요가 있다. 따라서 유전자의 발현을 효과적으로 on/off 할 수 있도록 이 벡터 시스템의 보완이 필요하다.

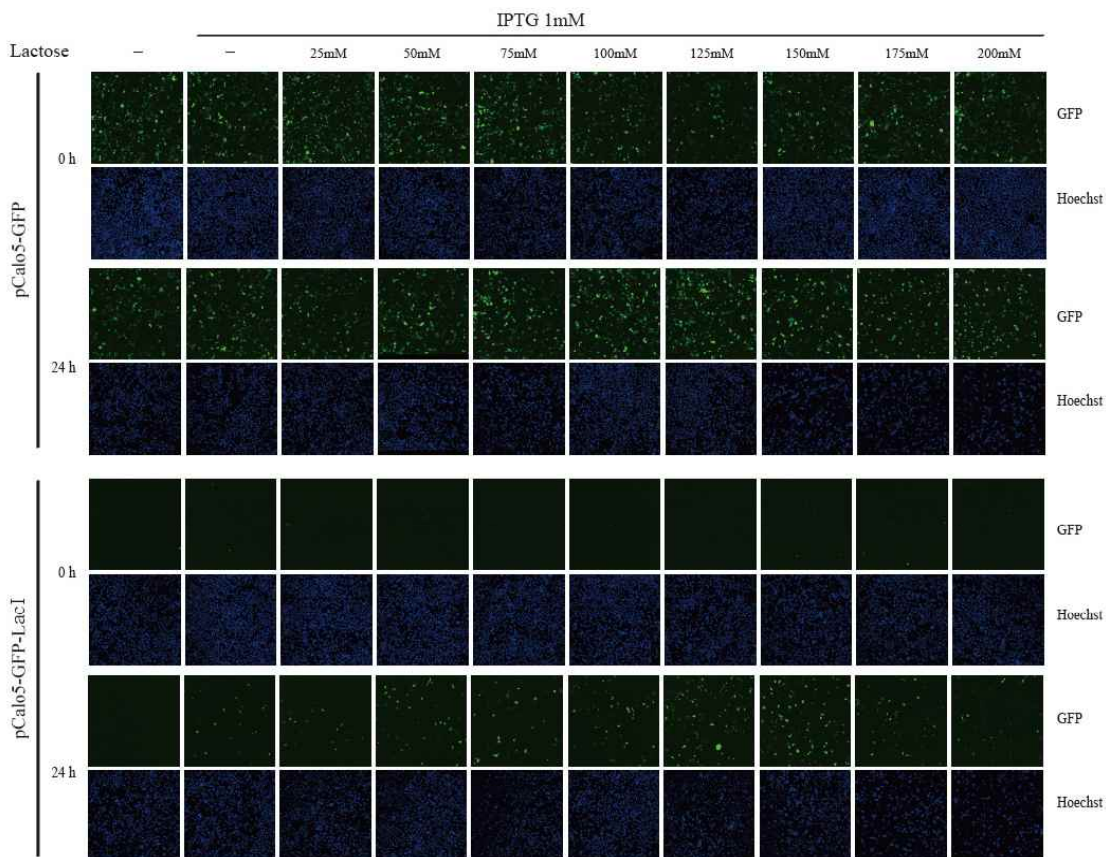


Figure 4. Optimal concentration for expression of GFP by IPTG and Lactose in HEK293 cell line

HEK293 cells transfected with indicated vector were seeded into 24 well plates( $1 \times 10^5$  cells/well) before induction of gene expression. After 8hours, Various concentrations of IPTG and/or Lactose were treated into transfected HEK293 cells for 0 hour and 24 hours. After indicated times,  $10 \mu\text{g/ml}$  of Hoechst were treated into each well for 10 minutes and 4% Paraformaldehyde were treated into each well for fixation of cells for 10 minutes. The green color represent GFP expressed HEK293cells and The Blue color represent nucleus stained by Hoechst.

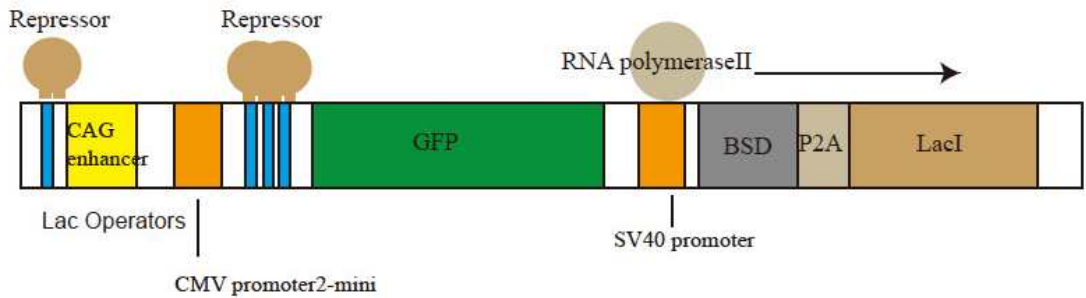
## 5. 효율적인 유전자의 발현 유도를 위한 Operator 제거

이 벡터는 다섯 개의 Operator 가 들어있어 유전자 발현을 효과적으로 막을 수 있지만, Lac repressor 가 lac operator 에 결합할 수 있는 기회가 많아 유전자 발현을 유도하여도 발현이 상당히 떨어져 있다. 그렇기 때문에 이 벡터 시스템을 좀 더 효율적으로 사용하기 위해 각각의 Operator 를 제거해 새로운 벡터를 다시 만들었다. pCalo5-GFP-LacI-Del-II 벡터는 pCalo5-GFP-LacI vector 에서 Promoter 와 Enhancer 사이에 있는 한 개의 lac operator 를 제거하여 만든 벡터이다(Figure 5(A)). 그리고 pCalo5-GFP-LacI-Del-III 벡터는 Promoter 의 3' 쪽에 위치한 세 개의 lac operator 를 제거하여 만든 벡터이다(Figure 5(B)).

각각의 lac operators 가 제거된 이 벡터들을 이용하여 IPTG 와 젓당에 의한 유전자 발현을 유도해 보았다. pCalo5-GFP-LacI-Del-II 벡터는 pCalo-GFP-LacI 벡터보다 젓당 75 mM 과 IPTG 1 mM 을 함께 처리하였을 때 GFP 의 발현이 pCalo5-GFP-LacI 로 형질전환된 세포보다 더 증가하였다(Figure 6(A)). 또한 이를 정량적으로 확인한 결과 pCalo5-GFP-LacI 보다 pCalo5-GFP-LacI-DelIII 로 형질전환된 세포에서 IPTG 1 mM 과 젓당 75 mM 을 처리했을 때 유전자 발현 유도 효율이 더욱 높은 것을 확인할 수 있다(Figure 6(B)). 하지만 pCalo-GFP-LacI-Del-III 벡터로 형질전환을 시킨 세포에서는 GFP 의 발현이 유도 물질의 처리와 무관하게 발현 되는 것을 확인하였다(Figure 6(A)). Promoter 의 진행방향으로 Operator 가 없기 때문에 유전자의 발현을 억제하지 못한 것으로 판단된다. 이 결과는 박테리아에서 Promoter 의 3'쪽에 위치한 Operator 가 가장 중요하다고 알려져 있는 기존의 연구들과 일치한 결과이다(14). 이 결과를 통해 기존에 대장균을 통해 확인된 Operator 의 위치와 중요성을 확인할 수 있다(13-15). 본 연구를 통해 Lac operator 의 개수를 조정하여 IPTG 와 젓당을 함께 처리함으로써 GFP 의 발현을 더욱 효과적으로 유도할 수 있는 시스템을 만들었고, IPTG 와 젓당을 함께 처리하여 유전자 발현 효율을 높일 수 있다는 것을 확인하였다.

(A)

pCalo5-GFP-LacI-DelII



(B)

pCalo5-GFP-LacI-DelIII

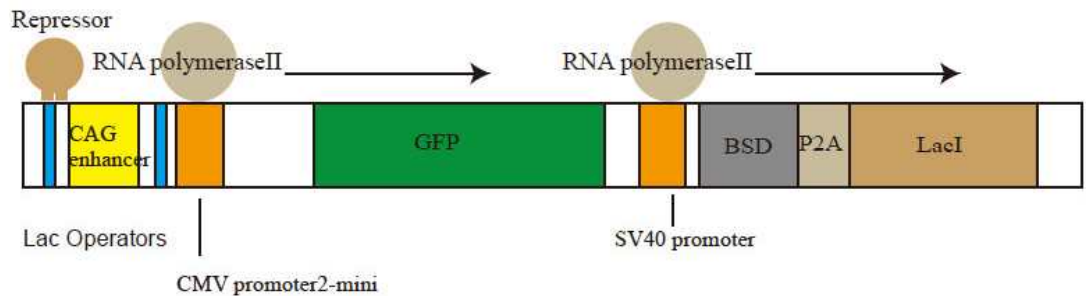
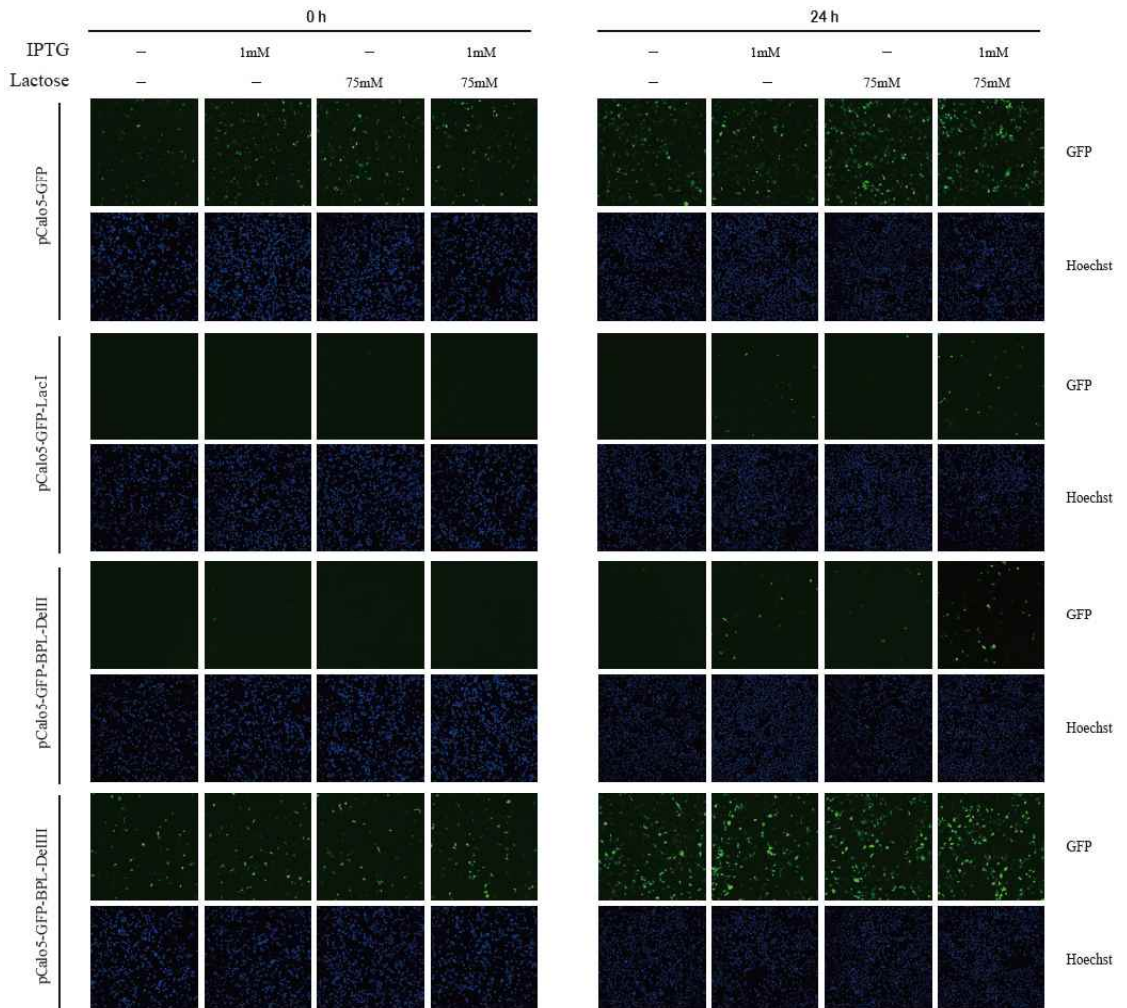


Figure 5. The scheme of inducible vector modified from pCalo5-GFP-LacI.

- (A) The inducible vector, pCalo5-GFP-LacI-DelII was modified from pCalo5-GFP-LacI by eliminate operator located between CMV promoter and Enhancer.
- (B) The inducible vector, pCalo5-GFP-LacI-DelIII was modified from pCalo5-GFP-LacI by eliminate operators located between CMV promoter and GFP ORF.

(A)





(B)

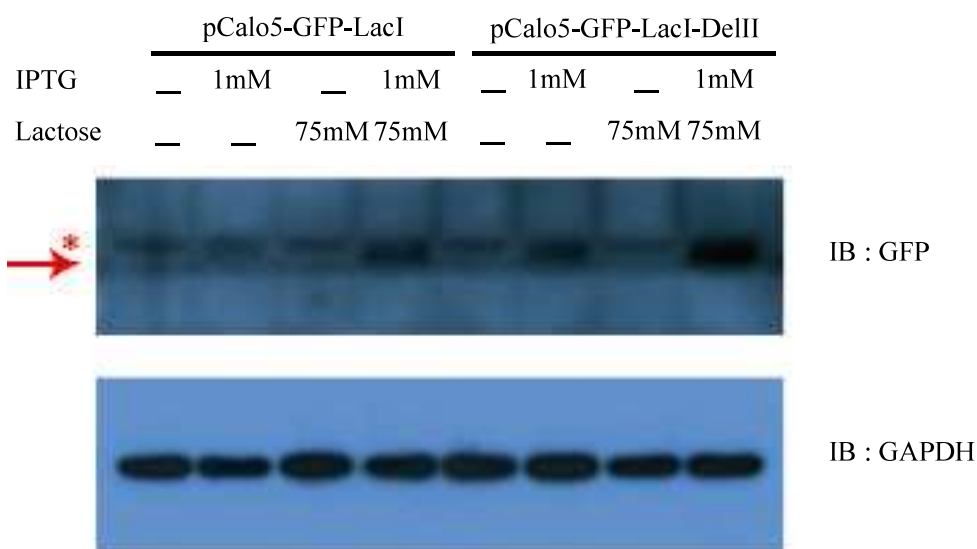


Figure 6. The efficiency of inducible vectors by co-treatment of IPTG and Lactose in HEK293 cell line.

- (A) HEK293 cells transfected with indicated vectors were seeded into 24 well plates( $1 \times 10^5$  cells/well) before induction of gene expression by IPTG and/or Lactose. After 8 hours, various concentrations of IPTG and/or Lactose were treated into transfected HEK293 cells for 0 hour and 24 hours. After indicated times,  $10 \mu\text{g/ml}$  of Hoechst were treated into each well for 10 minutes and 4% Paraformaldehyde were treated into each well for fixation of cells for 10 minutes. The green color represent GFP expressed HEK293 cells and The Blue color represent nucleus stained by Hoechst.
- (B) After induction of GFP expression by IPTG and/or Lactose at the indicated concentrations for 24 hours, transfected cell lysates were prepared in RIPA buffer. To compare level of GFP expression, GFP were detected. GAPDH was used as control protein. Reactive bands were indicated by arrow, and asterisk indicated nonspecific bands.

## V. 고찰

과학의 발전으로 인위적인 유전자의 발현 또는 억제로 세포의 변화를 관찰함으로써 특정 유전자의 기능과 역할을 예측할 수 있었고, 이를 이용한 유전자 치료가 가능해졌다. 따라서 유전자의 발현을 조절하는 기술을 매우 중요하며 목적에 따라 다양한 방법으로 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 그 중 한 방법으로 Lac Operators를 이용한 방법은 IPTG의 높은 결합 친화도( $K_a = 10^6 M^{-1}$ )(21), 세포 내로 빠른 침투성과 낮은 독성을 갖는 장점을 갖는다. 또한 다른 유도 물질들과 비교해 상대적으로 온도와 pH에 더 안정적이다(22). 이러한 여러 장점을 갖기 때문에 Lac operon 시스템을 동물 모델에 적용하기 위한 노력이 계속되어 왔으며 IPTG를 이용한 유전자 발현이 가능한 시스템이 개발 되었다.(6,16,17,23). 하지만 Lac Operator-repressor 를 이용한 대부분의 방법들은 유전자 발현을 극적으로 turn on/off 하지 못하고, IPTG만을 이용한다(6,18). 즉 모든 Operator가 억제 단백질에 의해 완전히 닫히지 않아 유전자 발현이 조금씩 일어나거나 유도 물질의 결합친화도의 한계로 유전자 발현이 높은 수준으로 일어나지 않는다. 따라서 본 연구는 Lac operon 시스템의 변형을 통해 유전자의 발현을 극적으로 억제하고, IPTG에 부가적으로 젓당을 처리하여 유전자 발현을 더욱 효과적으로 조절 할 수 있는 시스템을 만들기 위해 시행되었다.

우리는 Allolactose 의 이성질체이며  $\beta$ -1-6 glycosidic linkage 을 갖지 않은 젓당을 이용하면 억제 단백질의 기능에 영향을 줄 수 있을 것이라 생각하여 젓당을 이용하여 Lac Operator-repressor 시스템에 이용해 보았다. 본 실험 결과 젓당을 유도 물질로 사용하였을 때 유전자 발현을 유도할 수 있었고, IPTG 와 함께 처리함으로써 더욱 효과적으로 유전자 발현을 유도하였다(Figure.5). 젓당이 동물 세포 내로 어떻게 들어가는지에 대해 아직까지 알려진 바가 없지만 본 실험 결과에서는 젓당만 처리하였을 때에도 유전자의 발현이 약하게 증가하는 것으로 볼 때 젓당이 세포 내로 들어가 억제 단백질의 기능을 상당부분 억제할 수 있는 것으로 판단된다. 그리고 젓당과 IPTG 를 함께 처리 하였을 때 유전자 발현이 상당히 증가하는 것을 볼 때

젓당의 역할을 추론해볼 수 있다. 젓당이 IPTG 의 세포 내로 확산을 도와줄 수 있거나, 혹은 젓당이 세포 내로 들어가 IPTG 와 결합하지 않고 있는 Lac repressor 와 결합하거나 억제 단백질의 다른 부위에 결합하여 IPTG 의 결합을 더욱 유도할 수 있을 것이다.

Lac operator 의 개수와 위치는 유전자의 발현을 조절하는데 중요한 영향을 미친다(12,13). 본 논문에서 처음 사용한 벡터인 pCalo5-GFP-LacI 는 5 개의 Operators 를 포함하며 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있었지만 유전자 발현의 유도가 잘 되지 않았다. 많은 Operators 로 유전자의 발현을 억제하여 유전자 발현 유도가 잘 일어나지 않은 것으로 판단하여 나는 Operator 의 개수를 조절하여 유전자의 발현을 조절하였다. Promoter 로부터 3'쪽에 위치한 3 개의 Operators 를 제거하여 pCalo5-GFP-LacI-DelIII 를 만들었지만 유전자 발현의 조절이 되지 않았다. 이 결과는 이전의 대장균의 Lac operon 시스템에서의 연구 결과와도 일치하는 결과이다(13,14). 다음으로 본 논문에서는 Promoter 와 Operator 사이에 위치한 Operator 를 제거하여 pCalo5-GFP-LacI-DelIII 를 만들었다. 대장균에서 Promoter 로부터 5'방향과 3' 방향에 위치한 Operator 는 92bp 가 떨어져 있음에도 Operator 에 결합한 Repressors 가 사랑체를 형성하여 Lac operon 을 조절하기에 충분하기 때문에(13,15) Operators 간의 거리가 약 480bp 만큼 떨어져 있는 pCalo5-GFP-LacI-DelIII 벡터도 유전자의 발현을 조절하기에 충분할 것으로 판단된다.

Enhancer 앞에 위치한 Operator 를 제거하여 유전자 발현을 확인하지 못하였으나 pCalo5-GFP-LacI-DelIII 보다 유전자 발현 유도 효율이 떨어질 것으로 추측된다. Lac operon 에서 Lac repressor 에 의해 Lac operator 간의 고리 모양 형성으로 유전자의 발현이 억제 되기 때문에 Enhancer 앞에 위치한 Operator 는 Promoter 뒤에 위치한 Operators 와 고리 구조를 형성하기에 충분한 거리를 갖고 있어 유전자의 발현을 더욱 억제할 것으로 생각된다.

본 연구에서 아쉬운 점은 유전자의 발현을 완전히 막지 못하고 아직까지 미량의 GFP 가 발현되는 것을 보았다. 하지만 특정 유전자의 기능 연구 혹은 유전자 치료를 하기 위해서는 유전자의 발현을 완전히 막을 수 있어야 하며 유도 물질의 농도에 따라 유전자 발현을 높은 수준까지 유도할 필요가 있다. 따라서 본 실험에서 사용한 시스템을 좀 더 보완하여 유전자의 발현을 더욱 강력하게 조절 할 수 있어야한다. 또한 본 실험에서 만든 시스템은 형질전환 후 일시적인 유전자 발현 유도를 관찰하였다. 하지만 유전자의 기능 연구, 유전자 치료 등을 수행하기 위해서는 지속적인 유전자 발현 조절이 필요한 경우가 많다. 때문에 본 시스템을 세포 내에서 좀 더 안정적으로 유지할 수 있는 방법을 적용시켜 볼 필요가 있다. 또한 하나의 유전자 발현을 조절하는 것도 중요하지만 다수의 유전자 발현을 다양한 유도 물질을 이용하여 조절 할 수 있다면 유전자 간의 다양한 상호작용을 좀 더 명확히 연구할 수 있을 것이다.

사람은 젖당을 분해 할 수 있는 Lactase 를 갖고 태어나며 대부분의 Lactase 는 소장 상피 세포에서 발현되며 대장에서도 소량 발현되는 것으로 알려져 있다(24). 또한 유아기에 Lactase 의 발현 수준이 높지만 대부분의 사람들은 성장하면서 Lactase 의 발현이 점차 감소하며 젖당의 불내증을 갖게 된다. 본 연구에서는 사람 배아 신장 세포인 HEK293 세포 주에서 진행하여 Lactase 의 발현이 되지 않을 것으로 생각된다. 하지만 본 실험에서 젖당을 이용하여 GFP 의 발현을 유도할 수 있는 것을 확인하였으며 젖당과 IPTG 를 동시에 처리하여 더욱 높은 수준으로 GFP 의 발현을 유도할 수 있었다. 또한 사람 자궁 경부암 세포인 HeLa 와 쥐 흑색종 세포에서도 젖당과 IPTG 를 동시에 처리하여 GFP 의 발현이 증가하는 결과를 확인하였다. 즉 젖당의 분해 능력의 유무와 상관없이 젖당이 세포 내에서 Lac repressor 와 상호작용을 통해 유전자의 발현을 조절 할 수 있는 것을 확인하였다.

아직까지 젖당이 어떻게 작용 하였는지는 본 실험 결과로 알 수 없지만 IPTG 와 함께 처리함으로써 유전자 발현 유도가 더욱 효과적인 것을 확인하였다. 또한 본

실험의 결과로 젓당을 다른 Lac operator-repressor 시스템에 적용하여 유전자 발현 효율을 증가 시킬 수 있을 것이라 기대한다. 그리고 젓당은 우유에 특히 많이 들어있는 이당류로 쉽게 구할 수 있기 때문에 젓당을 이용하여 유전자의 발현을 조절함으로써 유전자 치료에 더욱 큰 효과를 기대할 수 있을 것이다.

## VI. 참고 문헌

1. Kim, T. K., and Eberwine, J. H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173-3178
2. Recillas-Targa, F. (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol* 34, 337-354
3. Luten, J., van Nostrum, C. F., De Smedt, S. C., and Hennink, W. E. (2008) Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J Control Release* 126, 97-110
4. Xu, Z. L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T., and Hayakawa, T. (2001) Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 272, 149-156
5. Gossen, M., and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551
6. Deans, T. L., Cantor, C. R., and Collins, J. J. (2007) A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. *Cell* 130, 363-372
7. Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., and Tobes, R. (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 326-356
8. Sauer, B., and Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170
9. Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486
10. Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., and Turner, D. L. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6047-6052
11. Jacob, F., and Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3, 318-356
12. Scrable, H. (2002) Say when: reversible control of gene expression in the mouse by lac. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13, 109-119
13. Oehler, S., Eismann, E. R., Kramer, H., and Muller-Hill, B. (1990) The three operators of the lac operon cooperate in repression. *EMBO J* 9, 973-979
14. Santillan, M., and Mackey, M. C. (2008) Quantitative approaches to the study of bistability in the lac operon of Escherichia coli. *J R Soc Interface* 5 Suppl 1, S29-39
15. Friedman, A. M., Fischmann, T. O., and Steitz, T. A. (1995) Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* 268, 1721-1727
16. Brown, M., Figge, J., Hansen, U., Wright, C., Jeang, K. T., Khoury, G., Livingston, D. M., and Roberts, T. M. (1987) lac repressor can regulate expression from a hybrid SV40 early promoter containing a lac operator in animal cells. *Cell* 49, 603-612
17. Hu, M. C., and Davidson, N. (1987) The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell* 48, 555-566
18. Edamatsu, H., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1997) Inducible high-level expression vector for mammalian cells, pEF-LAC carrying human elongation factor 1alpha promoter and lac operator. *Gene* 187, 289-294
19. Daber, R., Stayrook, S., Rosenberg, A., and Lewis, M. (2007) Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors. *J Mol Biol* 370, 609-619
20. Wyborski, D. L., and Short, J. M. (1991) Analysis of inducers of the E.coli lac repressor

- system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res* 19, 4647-4653
21. Gilbert, W., and Muller-Hill, B. (1966) Isolation of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1891-1898
  22. Politi, N., Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., Cusella De Angelis, M. G., and Magni, P. (2014) Half-life measurements of chemical inducers for recombinant gene expression. *J Biol Eng* 8, 5
  23. Cronin, C. A., Gluba, W., and Scrable, H. (2001) The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes Dev* 15, 1506-1517
  24. Troelsen, J. T., Mitchelmore, C., Spodsberg, N., Jensen, A. M., Noren, O., and Sjostrom, H. (1997) Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homoeodomain protein Cdx-2. *Biochem J* 322 ( Pt 3), 833-838