

세포 내 유전자 도입법의 특징과 사용 구분

배양세포 등에 유전자 도입실험을 하고자 할 때 먼저 vector와 도입방법을 선택해야 한다.

TaKaRa에서 판매하고 있는 유전자 도입제품은 retrovirus vector, adenovirus vector, liposome을 이용한 제품이 있으며 각 방법의 특징과 사용에 대하여 소개한다.

■ Retrovirus vector

Retrovirus vector는 사람 또는 동물세포의 genome DNA에 목적 유전자를 효율적으로 도입할 수 있는 방법으로 표적세포에 감염 → 역전사로 cDNA 합성 → 숙주 genome에 도입하는 세 과정으로 이루어진다. 분열증식하고 있는 세포의 염색체 DNA에 유전자를 안정하게 도입할 수 있으므로 장기적으로 안정된 발현을 목적으로 하는 실험에 적합하다. 유전자 도입은 기본적으로는 1 copy이므로 도입 유전자의 발현효율이 문제가 되며 또한 비분열세포에는 유전자를 도입할 수 없는 약점이다.

유전자도입의 첫 단계는 LTR과 packaging signal(Ψ)을 갖는 retrovirus vector plasmid에 목적 유전자를 삽입한다. 얻어진 재조합 vector plasmid를 packaging cell에 도입한다(Packaging signal Ψ 서열을 제거한 provirus DNA-helper plasmid가 도입된 세포에서는 provirus에서 생성한 RNA genome이 virus 입자 내로 들어가지 않는 empty virus particle이 생성된다. Helper cell이라고도 한다). 위 조작으로 재조합 retrovirus를 쉽게 얻을 수 있다(그림 1).

Packaging cell은 세포 은행 등에서 쉽게 구할 수 있으며 packaging cell 중의 helper 유전자(*gag*, *pol*, *env*)와 vector 서열이 재조합되면 자기증식능을 갖는 retrovirus(RCR)가 생성될 수도 있다.

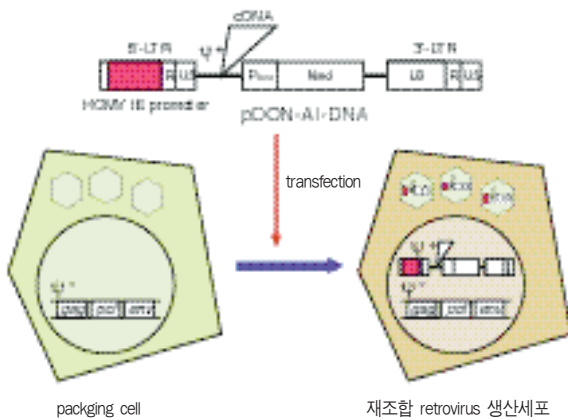


그림 1 변형 retrovirus의 제작
gag : core 단백질 ; *pol* : 역전사효소 ; *env* : envelope protein

당사에서 판매하는 mouse 백혈병 virus(MoMLV) 유래의 retrovirus vector plasmid pDON-AI DNA(TaKaRa Code 3650)¹⁻³⁾은 LTR과 packaging signal 이외의 MoMLV 유래 유전자를 포함하지 않으므로 RCR 출현 가능성이 기존 vector에 비해 아주 낮다.

마지막 단계로 virus 생산세포에서 생산된 재조합 retrovirus를 표적세포에 감염시켜 목적 유전자를 도입한다. 이 때 유전자 도입효율을 높이기 위하여 virus 흡착제로 polybrene이나 재조합 fibronectin fragment(RetroNectin[®] ; TaKaRa Code T100A/B)를 이용할 수 있다. 특히 RetroNectin[®]을 이용하여 조혈모세포에 유전자 도입할 경우 polybrene을 이용한 것 보다 도입효율이 비약적으로 향상된다³⁻⁵⁾(그림 2).

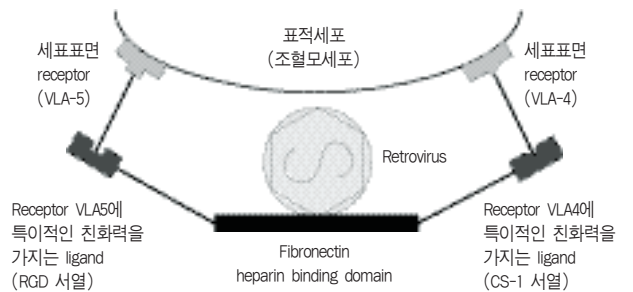


그림 2 RetroNectin[®]에 의한 유전자 도입촉진 기작

■ Adenovirus vector

가능한 한 많은 세포에 유전자를 도입하여 일시적으로 목적 단백질을 대량 발현하고자 하는 경우 adenovirus vector가 가장 유리하다. 고역가의 virus를 얻을 수 있으며 human, mouse, rat 등 폭넓은 포유류(림프구 등의 혈구계세포 제외)에 이용할 수 있고 증식세포 뿐만 아니라 비분열세포에도 감염하는 이점이 있다. 또한 동물개체로의 직접 주입·투여에 의한 *in vivo* 유전자 도입이 가능하여 고형암에 직접접종, 근육 접종도 이루어지고 있다.

지금까지 재조합 adenovirus는 제작과정이 복잡할 뿐만 아니라 비효율적이었기 때문에 널리 사용하지 못했으나 TaKaRa에서 판매하고 있는 재조합 adenovirus 제작 kit인 Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150)을 이용하면 재조합 virus를 간편하게 고효율로 제작할 수 있다⁶⁾(그림 3). 또한 종래에 곤란하였던 세포 독성 유전자 삽입 재조합 adenovirus의 제작은 Adenovirus Cre/loxP Kit(TaKaRa Code 6151)을 병용함으로써 이러한 문제를 해결할 수 있다⁷⁾(그림 4).

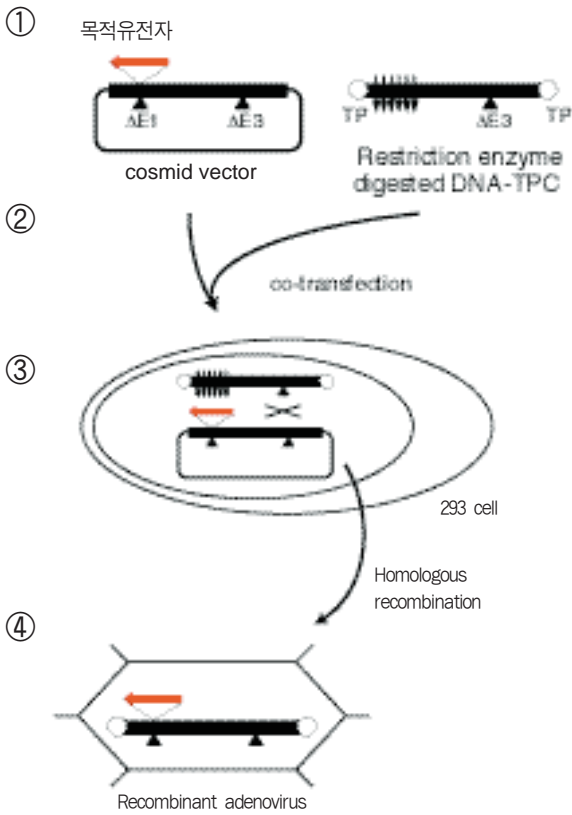


그림 3 COS-TPC법으로 재조합 adenovirus의 제작

- ① Cosmid vector(adenovirus genome 대부분을 포함하고 있다)에 목적 유전자를 도입한다.
- ② 얻어진 cosmid와 제한효소 처리한 DNA-TPC를 293 cell에 co-transfection한다.
- ③ 세포 내에서 homologous recombination이 일어나 recombinant adenovirus가 출현한다.
- ④ 제조한 recombinant adenovirus는 많은 세포에 고효율로 감염하여 목적 유전자를 발현한다.

■ Cationic Liposome

Virus vector를 사용하지 않고 naked DNA를 세포에 도입하는 방법(DNA transfection법)으로는 calcium-phosphate법, cationic liposome법, electrophoration법 등이 있으며 여기서는 liposome법에 대하여 설명한다. 이 방법은 양으로 하전된 지질이중막 liposome와 음으로 하전된 DNA를 섞어 복합체를 형성한다. 전체로서 양으로 하전된 복합체를 음으로 하전한 세포표면에 결합하여 빈식 또는 막융합으로 DNA가 세포내에 도입되는 방법이다. 조작이 간단하고 도입유전자의 발현효율이 높아서 일시적으로 목적 유전자 발현의 실험에 적합하다. 세포의 종류나

표

유전자 도입 방법	retrovirus vector	adenovirus vector	liposome
유전자도입효율	중	고	중
비분열세포에의 유전자도입	-	+	±
염색체로의 삽입(장기발현)	+	-	-
도입유전자의 발현효율	저~중	고	고

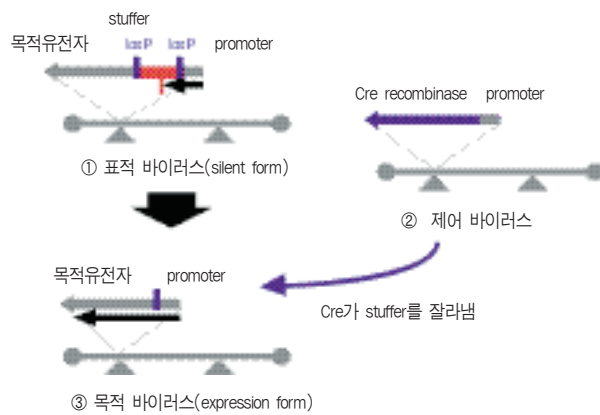


그림 4 Cre/loxP 발현 제어시스템

표적 바이러스의 promoter와 목적유전자 사이에는 stuffer 영역을 삽입하였다. Stuffer 내에는 poly A 신호가 존재하므로 이 상태(silent form)(①)에서 목적 유전자는 발현하지 않는다. 표적세포에 감염할 때에는 이 silent form 바이러스와 Cre recombinase를 암호하는 제어 바이러스(②)와 함께 감염시킨다. Stuffer 양단에는 poly A 서열이 존재하므로 Cre recombinase가 잘라낸다. 그 결과 표적 virus는 expression form(③)으로 변환되어 목적유전자가 발현한다.

liposome의 종류에 따라서 독성이 나타나서 세포가 사멸하므로 목적 세포에 적합한 liposome을 선택하기 위하여 조건을 검토해야 한다. TaKaRa에서는 종래의 liposome보다 세포독성이 낮은 Trans IT[®]-LT1(TaKaRa Code V2304T/V2300), -LT2(TaKaRa Code V2404/V2400), 및 곤충세포용 Trans IT[®]-Insecta(TaKaRa Code V2204/V2200) 등 3종류를 공급하고 있다. Trans IT[®]-LT1, LT2, LT100을 sample pack으로 준비한 조건 검토용 Trans IT[®]-PanPak도 있으므로 각 세포에 맞는 제품을 선택한다.

또한 mouse 생체내 유전자 도입시약을 위하여 Trans IT[®] In Vivo Gene Delivery System (TaKaRa Code V5125)도 판매하고 있다.

【참고문헌】

- 1) *BIO VIEW* 27, 7-9.
- 2) *Life Science & Biotechnology* 13, 6-8.
- 3) *Life Science & Biotechnology* 15, 10-12.
- 4) *BIO VIEW* 21, 2-4.
- 5) *BIO VIEW* 22, 2-4.
- 6) *BIO VIEW* 23, 2-4.
- 7) *Life Science & Biotechnology* 14, 2-4.