재조합 아데노바이러스 제작 kit version up!

Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)

TaKaRa Code 6170 5회용

재조합 adenovirus를 저렴하게 제작할 수 있게 되었다!!

Adenovirus 벡터는 유전자 도입효율 및 발현능력이 높으며, 증식세포 뿐만 아니라 정지기 세포에도 유전자를 도입할 수 있어 배양세포는 물론이며 동물 개체에서의 발현 벡터로서 다양한 기능해석에 이용되고 있다.
당사에서는 COS-TPC법[1]을 기본으로 하여 재조합 adenovirus를 효율적으로 만들 수 있는 Adenovirus Expression Vector Kit (TaKaRa Code 6150)를 판매하여 호평을 얻고 있다. 이번에 COS-TPC법 뿐 아니라, full-length DNA 도입법[2]으로 재조합 adenovirus 제작이 가능한 Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)가 출시되었다.

특징

1) Cosmid 벡터만으로 재조합 adenovirus를 만들 수 있어 간편하며 저렴하다.
2) Cosmid 벡터에 직접 cloning이 가능하므로 shuttle 벡터에 cloning할 필요가 없다.
3) Cosmid 벡터 pAxCAwtit는 강력한 CAG promoter[3]를 가지며, 목적 유전자를 downstream에 cloning하여 높은 발현을 유도한다.
4) 별도로 판매하는 Adenovirus genome DNA-TPC (TaKaRa Code 6171)를 이용함으로써 COS-TPC법을 이용한 고효율 바이러스를 만들 수 있다 (본 kit의 cosmid 벡터는 full-length DNA 도입법이나 COS-TPC법에서 모두 사용 가능하지만, 후자가 바이러스 제작효율이 높다)
5) 본 kit를 이용하여 만든 재조합 adenovirus는 기존의 제품과 동일하며 다음과 같은 잇점이 있다.

- 고역가의 virus를 얻을 수 있고 (10^8 ~ 10^9pfu/ml 정도; 10^{11}pfu/ml 정도까지 농축 가능), 접착성 세포에서는 100%정도로 세포에 유전자를 도입할 수 있다.
- 다양한 동물종에 이용할 수 있다.
- 증식세포 뿐 아니라 정지기 세포에도 도입 · 발현되므로 신경계를 포함한 다수의 분화 · 미분화 동물 배양세포에도 사용할 수 있다.
- 동물 개체에 직접 주입 또는 투여가 가능하므로 유전자 도입 · 발현이 가능하다.

Kit의 내용 (5회용)

Cosmid Vector pAxcwit*1 (0.3 μg/μl)	25 μl
Cosmid Vector pAxCAwtit*2 (0.3 μg/μl)	25 μl
제한효소 *Smi* I (*Swa* I)(10 U/μl)	20 μl
10×H Buffer	100 μl
제한효소 *Bsp*T104 I (10 U/μl)	30 μl
10×L Buffer	100 μl
DNA Dissolution Buffer	50 μl
Ligation Solution	50 μl
10×TNE	1 ml×2
Proteinase K (20 mg/ml)	200 μl
10% SDS	200 μl
Control Cosmid pAxCAiLacZit*3 (0.3 μg/μl)	50 μl

*1: Promoter 없음
*2: CAG promoter 포함
*3: pAxCAwtit에 β-gal 유전자 삽입

기존의 kit에 포함되어 있는 제한효소 처리한 DNA-TPC와 Adenovirus genome DNA-TPC는 별도판매.

본 kit로 제작한 adenovirus 벡터

본 kit의 cosmid 벡터에는 E1 및 E3 유전자를 결손시킨 adenovirus 5형 게놈이 도입되어 있다. E1 유전자가 결손되어 일반적인 세포 내에서는 복제 증식이 불가능하며, E1 유전자를 발현하는 293 세포내에 transfection 하였을 때만 바이러스가 생성된다. 또한 생성한 adenovirus도 293 세포 내에서만 복제 증식하며, 일반적인 세포에서는 감염되어도 증식하지 않는다.

Dual cosmid에 대하여

기존의 kit는 도쿄대학 의과학 연구소 사이토박사가 개발한 COS-TPC법에 의해 재조합 adenovirus를 만드는 kit로 제작효율이 매우 높은 것이 특징이다. 이 kit에서는 adenovirus DNA의 양쪽 말단을 결실시킨 cosmid 벡터를 이용하였기 때문에, cosmid 벡터만 가지고 바이러스를 생성할 수는 없었다. 이것을 가능하게 하기 위해 E1, E3 유전자를 결실시킨 adenovirus 게놈 full-length를 포함한 cosmid 벡터로 개선하여 dual cosmid로 하였다. 이것으로서 Adenovirus genome DNA-TPC와 cosmid

벡터를 병용하는 COS-TPC법 뿐 아니라 cosmid 벡터만 이용하는 full-length DNA 도입법으로도 재조합 adenovirus를 만들 수 있게 되었다. Version up된 kit에는 개선한 dual cosmid로 2종류 포함되어 있다 (그림 1). 목적 유전자를 고발현 할 경우, 유전자를 pAxCAwtit에 삽입하면 CAG promoter에 의해 여러 세포에서 강력히 발현된다. 조직특이적 promoter 등의 특수한 promoter를 사용할 경우에는 promoter와 유전자를 pAxcwit에 삽입한다.

Full-length DNA 도입법과 COS-TPC법

Adenovirus의 full-length DNA를 포함한 plasmid를 293 세포에 도입하는 실험으로 바이러스 DNA의 양말단 바깥쪽을 제한효소로 절단한 plasmid만 바이러스를 생성한다고 보고되어 있다[4]. Full-length DNA 도입법은 이 원리를 이용한 방법으로, 목적 유전자를 삽입한 dual cosmid를 제한효소 처리하여 full-length adenovirus DNA를 분리하여 그것을 293 세포에 transfection하여 재조합 adenovirus를 만든다 (그림 2). Cosmid 만으로 바이러스를 만들 수 있어 간편하며 저렴하다.

그러나 full-length DNA 도입법에서는 바이러스를 제작하기 어려운 경우가 있다. 이 경우에는 동일한 재조합 cosmid와 adenovirus genome DNA-TPC를 이용하여 COS-TPC법을 실행한다 (그림 2). COS-TPC법은 목적 유전자를 삽입한 cosmid와 adenovirus genome DNA-TPC를 293 세포에 동시에 transfection하여 그 세포 내에서 상동 재조합을 일으켜 재조합 adenovirus를 만드는 방법으로, 바이러스 제작 효율을 높일 수 있다.

Full-length DNA 도입법이나 COS-TPC법에서 만들어진 바이러스 구조는 동일하므로 바이러스 성질에는 차이가 없다.

맺음말

Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)는 full-length DNA 도입법과 COS-TPC법에 사용할 수 있는 재조합 adenovirus 제작 kit이다. Full-length DNA 도입법을 이용하면 재조합 adenovirus를 간편하고 저렴하게 만들 수 있다. 이 방법으로 바이러스가 잘 제작되지 않는 경우는 COS-TPC법으로 전환하여 바이러스 제작 효율을 높일 수 있다. 본 kit를 이용하여 두 가지 방법을 구분하여 사용하면 다양한 재조합 adenovirus를 효과적으로 만들 수 있다.

참고문헌

1) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Takamori, K, Tokuda, C. and Saito, I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **93**, 1320

2) 寺島美保, 近藤小貴, 鐘ヶ江裕美, 齊藤泉 (2003) 實驗醫學 **21 (7)**, 931

3) Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) *Gene* **108,** 193

4) Berkner, K. L. and Sharp P. A. (1983) *Nucl. Acids Res.* **11** 6003.

관련제품

제품명	TaKaRa Code	용량
Adenovirus genome DNA-TPC	6171	50 μl (50회용)
재조합 Adenovirus 제작 Set (Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version) & Adenovirus genome DNA-TPC)	6172	1 set
Adenovirus Cre/loxP Kit (Dual Version)	6173	

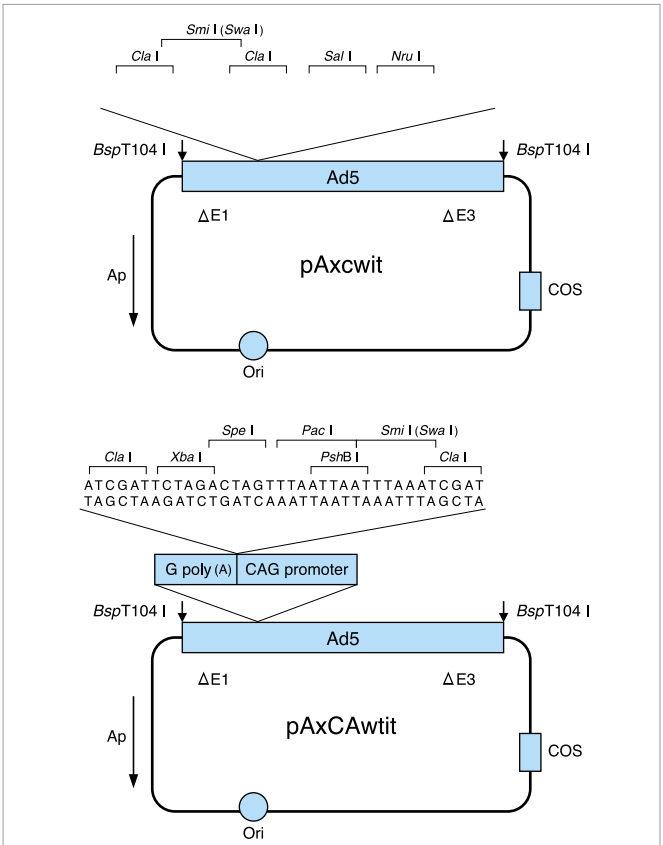

그림 1 Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)에 포함하는 dual cosmid (pAxcwit 및 pAxCAwtit)의 구조

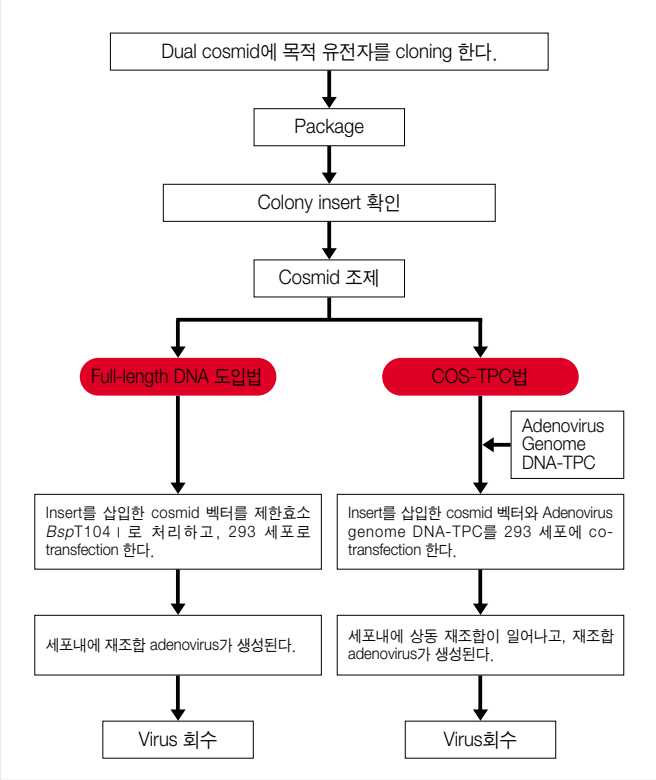

그림 2 실험 방법의 개요

Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)을 사용하여 「Full-length DNA 도입법」, Adenovirus genome DNA-TPC를 함께 사용한 「COS-TPC법」에 의한 재조합 adenovirus의 제작 순서