

RetroNectin®을 이용한 유전자 도입의 최적화

RetroNectin®은 human fibronectin의 세포접착 도메인, 헤파린 결합 도메인, CS-1 서열의 3가지 기능 도메인으로 구성된 poly peptide로, 레트로 바이러스 벡터를 이용한 유전자 도입에 이용되고 있다(그림 1). RetroNectin®을 이용함으로써 레트로바이러스 벡터에서 유전자 도입이 힘들었던 조혈모세포 등의 목적 세포로 유전자 도입을 고효율로 할 수 있게 되었다^{1,2)}.

그러나 RetroNectin®으로 coating한 plate에 바이러스 벡터와 목적 세포를 동시에 첨가하는 방법(Supernatant infection : SN법)에서는 바이러스 액 중에 포함되어 있는 생산 세포 유래 물질의 영향으로 감염이 저해됨이 밝혀졌다.

지금은 바이러스 벡터를 RetroNectin®으로 coating한 용기에 첨가하고, 일정시간 반응을 통해 바이러스 벡터만 RetroNectin®에 결합시켜, 감염 저해물질을 포함한 상층액을 제거한 후 목적 세포를 첨가하는 방법(RetroNectin® bound virus infection : RBV법)을 추천하고 있다³⁾(그림 2) 본 고에서는 RBV법으로 유전자 도입시 첨가하는 바이러스액의 양, 반응 시간, 감염시의 세포 밀도에 대한 최적 조건에 대해 소개하고자 한다.

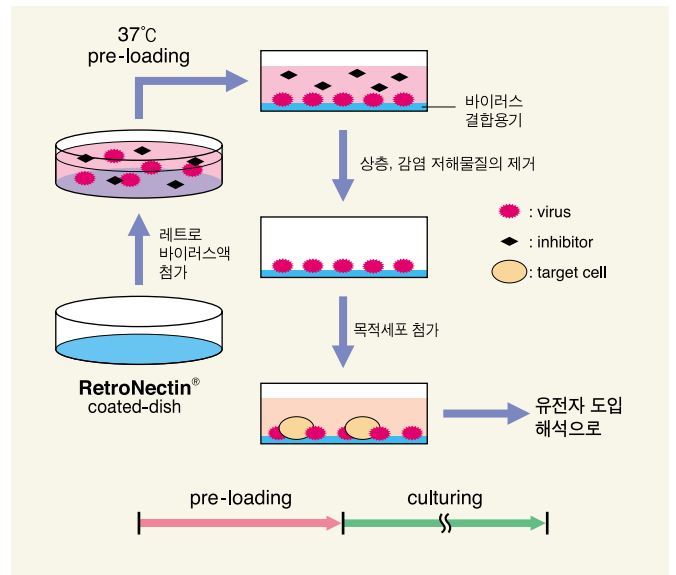


그림 2 RBV법 모식도

바이러스액을 먼저 RetroNectin®으로 coating한 용기에 넣고 37°C, CO₂ incubator에서 반응시킨 후, 상층액을 제거하고 PBS로 용기를 세정한다(바이러스액 중의 감염 저해물질을 제거하고, 유전자 도입효율을 높이기 위함이다. 상층액을 제거할 때 용기가 건조되지 않도록 주의한다). 마지막으로 목적 세포를 신속히 첨가한다.

RetroNectin® coated-dish에 첨가하는 바이러스액량의 검토 [방법]

24 well RetroNectin® coated-dish(면적은 2 cm²/well)에 GFP를 마커로 하는 레트로바이러스 벡터(envelope는 GALV와 Amphi의 2종류)를 포함하는 용액을 125 μl, 250 μl, 500 μl 첨가하고 37°C에서 4시간 반응시킨다. 상층액을 제거한 후 K562 세포, TF-1 세포, HL-60 세포를 첨가해 배양하고 3일 후에 Flow cytometry로 GFP 양성세포율을 측정하여 유전자 도입 효율을 산출하였다.

[결과]

그림 3과 같이 GALV와 Amphi에서 첨가량이 250 μl/well 이상이면 도입 효율에는 변화가 없음을 알 수 있었다. 즉, RBV법에서 필요한 최저 바이러스 액은 1 cm²당 125 μl이다. 그림 4와 같이 SN법에서는 바이러스 원액 및 2배 희석액을 이용하면 감염 저해가 일어나 RBV법보다 감염 효율이 낮아진다. RBV법에서는 유전자 도입 효율과 바이러스 희석비율이 직선적인 관계를 나타내며, 목적하는 도입 효율을 얻기 위해서 바이러스액 희석비율을 예측할 수 있다.

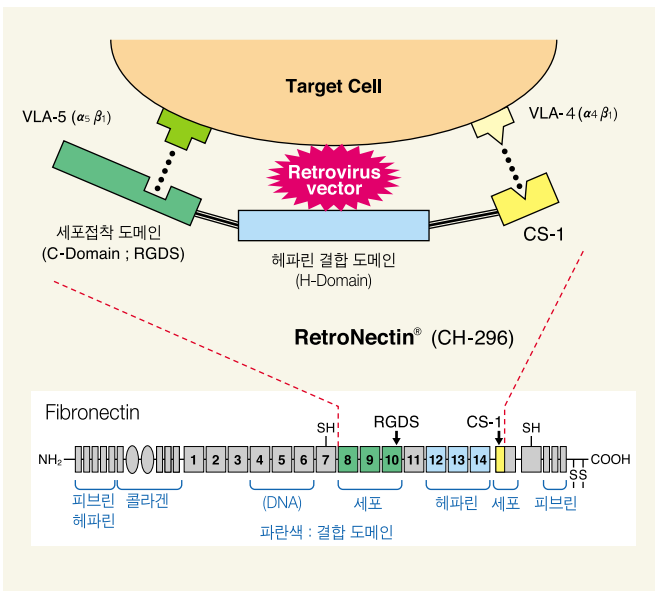


그림 1 Fibronectin의 도메인 구조, 모듈 구조와 RetroNectin®에 의한 유전자 도입 메커니즘

H 도메인에 레트로바이러스 벡터가 결합하고, C 도메인 또는 CS-1에 세포가 부착함에 따라 바이러스 감염이 이루어진다.

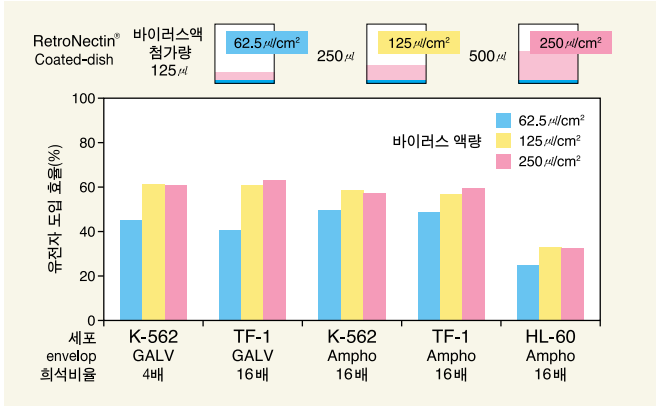


그림 3 바이러스액 첨가량 검토
바이러스 액량이 125 μl/cm² 이상이면 유전자 도입 효율에는 변화가 없다.

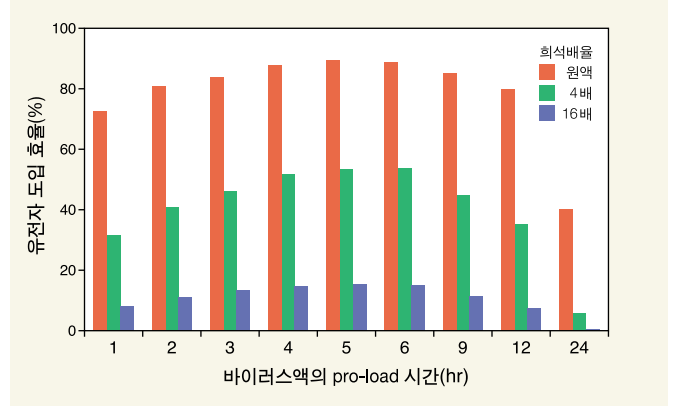


그림 5 바이러스액 반응시간 검토
RBV법에서 유전자 도입 효율은 4-6시간 반응 시에 최대가 된다.

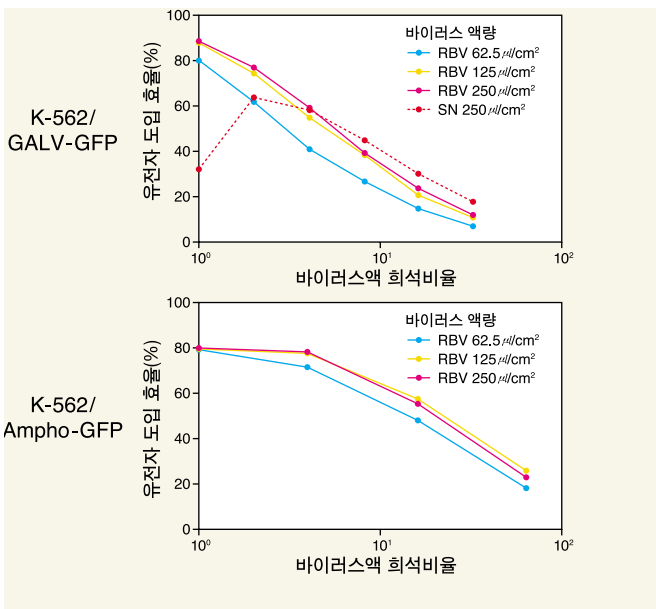


그림 4 바이러스액의 희석비율과 유전자 도입 효율의 관계
세포와 바이러스를 동시에 RetroNectin[®] coated-dish에 첨가하는 SN법에서는 바이러스 원액 과 2배 희석액을 사용할 경우 감염률이 감소한다. RBV법에서는 유전자 도입 효율과 희석 비율은 비례관계에 있다. 본 실험에서는 K-562 세포를 이용하였다.

RetroNectin[®] coated-dish에서 반응시키는 시간

【방법】

24 well RetroNectin[®] coated-dish(면적은 2 cm²/well)에 GFP를 마커로 하는 레트로바이러스 벡터(envelope는 GALV)를 250 μl 첨가하고 37℃에서 1~24시간 반응시킨다. 상층액을 제거한 후, K562 세포를 첨가해 배양하고 3일 후에 Flow cytometry로 GFP 양성 세포율을 측정해 최적의 반응 시간을 검토하였다.

【결과】

그림 5과 같이 RBV법으로 37℃에서 4~6시간 반응시킬 때에 유전자 도입 효율이 최대임을 알 수 있다. 단시간 반응시에는 바이러스와 RetroNectin[®]의 결합이 불충분하며, 6시간 이상 반응 시에는 바이러스 실험로 유전자 도입 효율이 저하됨을 알 수 있다.

감염시의 세포 밀도 검토

【방법】

24 well RetroNectin[®] coated-dish(면적은 2 cm²/well)에 GFP를 마커로 하는 레트로바이러스 벡터(envelope는 GALV와 Ampho의 2종류)를 포함하는 용액을 250 μl 첨가하고 37℃에서 4시간 반응시킨다. 상층액을 제거한 후, K562, TF-1, HL-60, CEM, human CD34 양성 조혈모세포를 다양한 세포 수로 첨가하여 배양하고, 3일 후에 Flow cytometry로 GFP 양성 세포율을 측정하여 유전자 도입 효율을 조사하였다.

【결과】

그림 6과 같이 각 세포에서 일정한 도입 효율을 얻는 세포 수의 범위가 있고, 세포가 바닥에 부착되지 않을 정도로 세포 수가 많으면 도입 효율은 저하되었다. 더 많은 유전자 도입 세포를 얻고자 할 경우는 dish에 부착 가능한 범위 내에서 최대한 많은 세포를 사용하는 것이 좋다. 감염 후 얼마 동안 동일 용기에서 배양하고자 할 경우는 목적하는 날에 용합되도록 감염시의 세포 밀도를 낮게 하면 가능하다. 이 경우 유전자 도입 효율은 일정하기 때문에 한번 예비실험을 하면 그 다음 실험시 유전자 도입 효율을 예측할 수 있다.

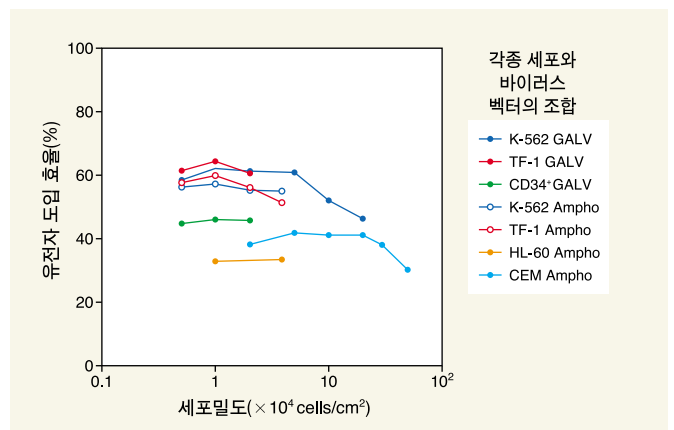


그림 6 세포밀도와 유전자 도입 효율의 관계
각종 바이러스 벡터를 RetroNectin[®] coated-dish에 부착시킨 후, 각 세포를 다양한 밀도로 첨가했을 때 유전자 도입 효율을 나타낸다. RetroNectin[®] coated-dish에 부착한 세포밀도의 범위에서 유전자 도입 효율은 일정함을 알 수 있다.

유전자 도입 효율 향상을 위한 RetroNectin®의 바이러스 벡터 결합 증강법

RetroNectin®와 바이러스 벡터의 결합률은 반응 도중에 용기를 진탕하거나 원심력을 가함으로써 유전자 도입 효율의 향상을 기대할 수 있다. 이 경우에도 바이러스액과 RetroNectin® 반응시간은 4~6시간이 바람직하며, 진탕의 경우는 가끔 반응액을 살며시 섞어주거나 CO₂ incubator 내에 진탕기를 넣고 계속 진탕하면 결합 효율이 높아져 유전자 도입 효율이 향상된다(그림 7).

원심력을 가할 경우에는 tube(polystylen 재질로 둥근 바닥) 밑면에 RetroNectin®을 coating하고 바이러스 벡터 solution을 넣어주고 32℃, 2900×g로 4시간 원심분리 하면, RetroNectin®에 대한 바이러스 벡터의 결합이 증강된다. 상층액을 제거하고 목적 세포를 첨가해 tube 내에서 유전자를 도입한다. 특히 바이러스 농도가 엷을 경우에는 원심 RBV법이 유효하다(그림 8).

맺음말

RetroNectin®을 이용한 유전자 도입법 중 RBV법에서는 유전자 도입 효율과 바이러스 희석 비율은 직선적인 관계를 나타내므로, 직선회귀분석법에 따라 목적하는 도입 효율을 얻기 위해서 바이러스액을 몇 배 희석하면 좋을 것인가를 예측할 수 있다. 또한 첨가해주는 바이러스 액의 양은 125~250 μl/cm²로 충분하다. 용기 진탕 및 원심력 부하에 따라 바이러스 벡터의 RetroNectin®에 대한 결합량이 커지며, 그에 따라 유전자 도입 효율이 향상된다. 높은 도입 효율을 얻고자 할 경우에는 이러한 방법이 유효하다.

참고문헌

- 1) Hanenberg, H, et al. (1996) *Nat. Med.*, **2**, 876-882.
- 2) Hanenberg, H, et al. (1997) *Hum. Gene Ther.*, **8**, 2193-2206.
- 3) Chono, H, et al. (2001) *J. Biochem.*, **130**, 331-334.

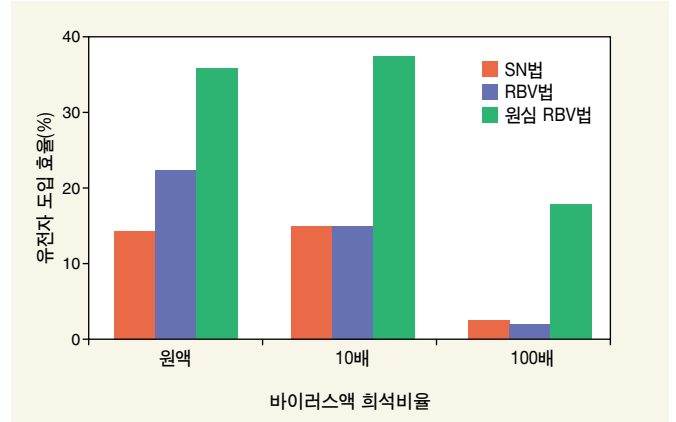


그림 7 진탕에 의한 RetroNectin®에 대한 바이러스 벡터의 결합 증강
바이러스를 첨가한 RetroNectin® coated tube를 진탕함으로써 바이러스 벡터의 결합력이 증가하며, 유전자 도입 효율이 향상된다. 본 실험에서는 K-562 세포를 이용하였다.

관련 제품

· RetroNectin®	T100A	0.5 mg
	T100B	2.5 mg
· RetroNectin® Dish(35 mm Ø)	T110A	10 dishes
· Retrovirus Packaging Kit Eco	6160	10회분
· Retrovirus Packaging Kit Ampho	6161	10회분
· Retrovirus Packaging Cell Ψ MP34	6162	2 × 10 ⁶ cells/vial

[레트로바이러스 벡터]

· pDON-AI DNA	3650	20 μg
· pSINsi-hH1 DNA	3660	20 μg
· pSINsi-hU6 DNA	3661	20 μg
· pSINsi-mU6 DNA	3662	20 μg

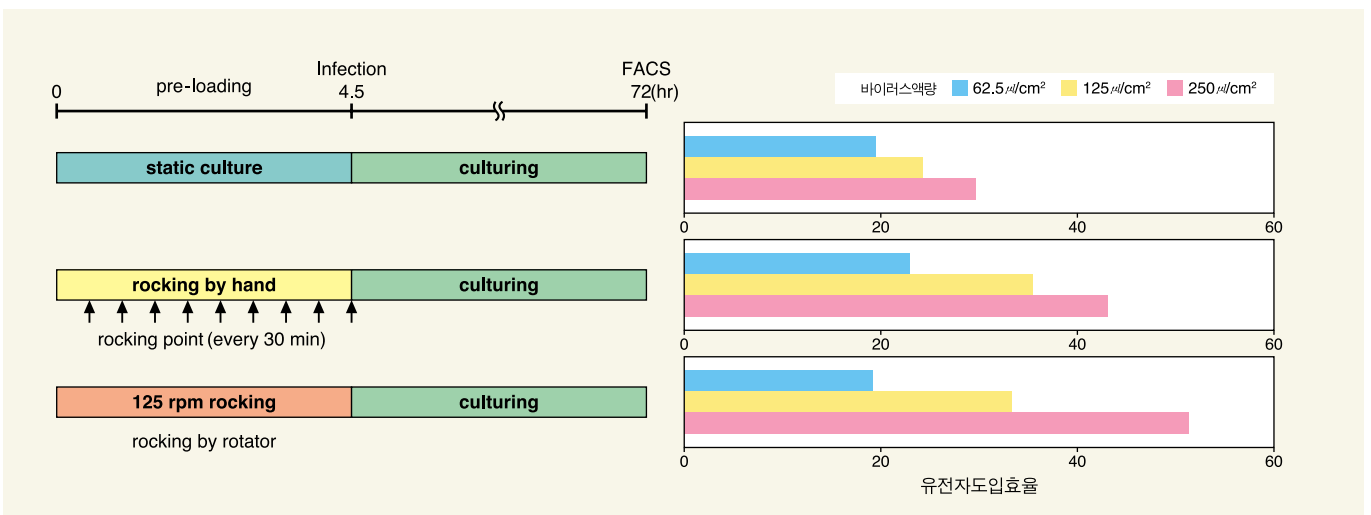


그림 8 원심력에 의한 RetroNectin®에 대한 바이러스 벡터의 결합 증강
바이러스를 pre-load한 RetroNectin® coated tube를 원심분리함으로써 바이러스 벡터의 결합이 증가하며, 유전자 도입 효율이 향상된다. 본 실험에서는 NIH/3T3 세포를 이용하였다.

PCR을 짝이는 친구!!

TaKaRa Gradient Thermal Cycler Dice



■ Specification

- 제품명 : TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice
- TaKaRa Code : TP 600
- 크기 : 260(W) x 345(D) x 260(H) mm
- Heated Lid : 110℃
- 온도제어 방식 : Peltier
- 온도조절 범위 : 4.0~99.9℃ (0.1℃ 단위)
- 온도제어 능력 : 가열속도(최대): 3.9℃/sec
냉각속도(최대): 3.5℃/sec
- 온도 균일성 : ±0.5℃
- Sample Block : 0.2 ml tube 또는 96 hole tube plate 대응
- Program 수 : 보존가능한 File 수 : 100 Files
- 디스플레이 표시 : Back light 부착 Graphic LCD (백색 문자, 청색 배경 또는 청색 문자, 백색 배경을 자유선택 가능)
- Gradient 기능 : 설정온도폭 6~20℃ 설정가능 온도 범위 45~75℃
- 인터페이스 : RS-232C, 설정 Program을 PC에 보존 가능
- 정격전원/전압 : AC100~240V 50/60Hz, 4.9A (100V일 경우)



* PCR Notice

TaKaRa PCR Related products are sold under licensing arrangements with Roche Molecular Systems and F. Hoffman-La Roche Ltd. And Applied Biosystem. The polymerase chain reaction (PCR) process is covered by patents licensed to Applied Biosystems. The TaKaRa BIO INC. Thermal Cycler is an Authorized Thermal Cycler and may be used for PCR only with Authorized Reagents under the limited licenses accompanying Authorized Reagents.