

RetroNectin[®]에 높은 친화성을 나타내는 retrovirus 제작용 G3T-hi cell 등장!!

Retrovirus Constructive System Eco	1Set	TaKaRa Code 6164
Retrovirus Constructive System Ampho	1Set	TaKaRa Code 6165

- Retrovirus 제작용 G3T-hi cell과 Retrovirus Packaging Kit, RetroNectin[®]이 Set로 바이러스 제작에서 유전자 도입까지 한 번에 가능
- Transient transfection으로 단시간에 10⁵~10⁷ cfu/ml의 고역가 재조합 retrovirus 제작 가능
- GnT-III 고발현 G3T-hi cell을 조제하여 RetroNectin[®]에 높은 친화성을 나타내는 재조합 retrovirus 탄생
- 제작된 retrovirus는 RetroNectin[®]법으로 유전자 도입 효율이 두 배 이상 상승

• G3T-hi cell	2 × 10 ⁶ cells/vial
• RetroNectin [®]	0,5 mg
• Retrovirus Packaging Kit Eco	
pGP Vector (1 μg/μl)	50 μl
pE-eco Vector (1 μg/μl)	50 μl
Transfection Buffer	500 μl × 10개
2 M CaCl ₂	620 μl
25 mM Chloroquine	40 μl

Retrovirus vector는 목적 유전자를 표적 cell의 염색체에 주입하고, 장기간 안정적으로 목적 유전자를 발현시킬 수 있다. 이로 인하여 유전자 도입의 도구로서 유전자 치료뿐만 아니라 많은 연구 분야에서 널리 이용되고 있다.

당사에서는 지금까지 retrovirus vector plasmid pDON-AI DNA, siRNA 발현용 retrovirus vector plasmid pSINsi 시리즈, transient retrovirus 생산 시스템 Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho, retrovirus vector의 유전자 도입 효율을 비약적으로 상승시키는 RetroNectin[®] 등 다양한 retrovirus 관련 제품을 개발, 판매해 왔다.

금번 RetroNectin[®]에 높은 친화성을 가지는 재조합 retrovirus를 제작하기 위한 G3T-hi cell을 개발하여 본 cell과 Retrovirus Packaging Kit, RetroNectin[®]으로 구성된 retrovirus 제작용 Kit를 출시하였다. 목적 유전자를 도입한 재조합 retrovirus vector plasmid만 준비하면, 재조합 retrovirus 제작에서 혈구계 cell을 포함한 각종 표적 cell로의 고효율로 유전자 도입이 가능하다. Mouse, rat cell에 대한 유전자 도입용으로 Retrovirus Constructive System Eco, 포유동물 cell에 대한 유전자 도입용으로 Retrovirus Constructive System Ampho의 두 종류가 준비되어 있고, retrovirus 조제 cell(G3T-hi) 단품 구입도 가능하다.

제품의 내용

Retrovirus Constructive System Eco

Mouse, rat의 cell에 감염 가능한 ecotropic 바이러스의 제작용 시스템이다.

Retrovirus Constructive System Ampho

포유동물cell에 감염 가능한 amphotropic 바이러스 제작용 시스템이다.

• G3T-hi cell	2 × 10 ⁶ cells/vial
• RetroNectin [®]	0,5 mg
• Retrovirus Packaging Kit Ampho	
pGP Vector (1 μg/μl)	50 μl
pE-ampho Vector (1 μg/μl)	50 μl
Transfection Buffer	500 μl × 10개
2 M CaCl ₂	620 μl
25 mM Chloroquine	40 μl

G3T-hi cell의 특성

본 시스템에 포함되어 있는 G3T-hi cell은 transfection으로 재조합 retrovirus를 일시적으로 생산시키기 위해 개발한 cell이다. 본 cell은 293T cell에 human N-acetylglucosaminyltransferase III(GnT-III)를 도입한 GnT-III 고발현 cell line으로, 세포막 단백질 당쇄가 GnT-III에 의해 수식되어 있다.

한편, retrovirus vector가 host cell로부터 출아했을 때, host 세포막을 감싸는 형태로 출아하기 때문에 G3T-hi cell에서 얻어지는 재조합 retrovirus의 막인 단백질 당쇄는 GnT-III에 의한 수식을 받고 있다. 이 당쇄 수식으로 본 cell를 사용하여 제작한 재조합 retrovirus는 RetroNectin[®] (fibronectin의 cell 접착 domain과 heparin 결합 domain을 가진 재조합 fibronectin fragment)에 대한 친화성이 높아져 표적 cell에 대한 유전자

도입효율이 크게 향상된다. hematopoietic cell의 한 유전자 도입에도 매우 유효하다. 또한 G3T-hi cell에는 SV40의 T 항원유전자가 도입되어 있어 retrovirus의 RNA가 증폭되어 고역가 바이러스 액이 얻어진다. 본 제품을 사용하여 바이러스를 제작한 경우, 10⁵~10¹⁰ cfu/ml의 바이러스액을 얻을 수 있다.

G3T-hi cell을 사용한 재조합 retrovirus의 생산

G3T-hi cell를 사용하여 transfection으로 재조합 retrovirus를 일시적으로 생산하기 위해서는, Retrovirus Packaging Kit Eco 또는 Amphi를 사용한다. Kit로는 바이러스 입자 형성에 필요한 gag-pol 또는 env의 각 발현 vector plasmid와 transfection에 필요한 시약을 포함되어 있다. gag-pol 또는 env 발현 vector와 목적 유전자를 삽입한 재조합 retrovirus vector plasmid를 본 cell에 도입하여 transfection 48시간 후에는 일시적으로 고역가의 재조합 바이러스 입자를 얻을 수 있다(그림 1A).

실험 예 : G3T-hi cell 또는 293T cell을 사용하여 제작한 재조합 retrovirus의 각종 표적 cell에 대한 유전자 도입 효율을 비교

[방법]

GFP 유전자를 pDON-AI DNA에 삽입한 재조합 retrovirus vector plasmid pDON-AI-GFP를 Retrovirus Packaging Kit Eco를 사용하여 G3T-hi cell와 293T cell에 도입하고 일시적으로 바이러스 액을 조제한다. 역가는 NIH/3T3 cell를 사용하여 polybrene법으로 측정하였다. M.O.I(multiplicity of infection)=0.2의 조건으로 MKN-1 cell, HT1080 cell, 293 cell, NIH/3T3 cell, MDA-MB-435S cell, A375M cell, hematopoietic cell인 K-562 cell, TF-1 cell에 RetroNectin[®]을 사용한 Supernatant infection(SN)법으로 감염시켰다(그림 1B). 3일 후 Flow cytometry로 GFP 양성 cell을 측정하고 유전자 도입효율을 산출하였다.

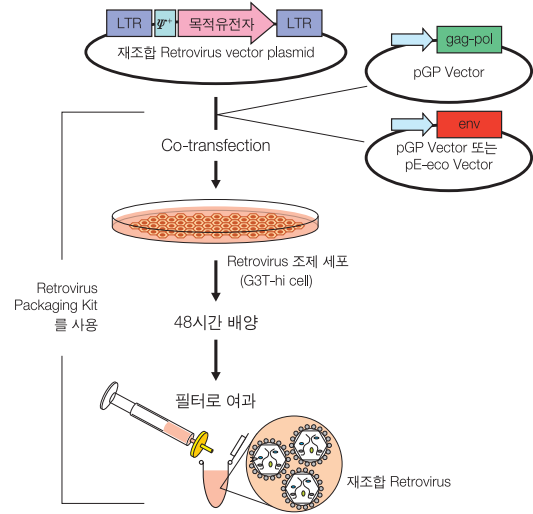
[결과]

각종 표적 cell에 대한 유전자 도입 효율 결과를 그림 2에 표시하였다. G3T-hi cell를 사용하여 제작한 바이러스의 경우, 293T cell을 사용하여 제작한 바이러스에 비해 RetroNectin[®]을 사용한 유전자 도입 효율이 약 2 배인 것으로 나타났다(그림 2). Polybrene법으로 바이러스 입자수를 확인하고, 감염을 한다는 점에서 도입 효율의 상승은 바이러스막 표면이 GnT-III에 의한 당쇄 수식으로 RetroNectin[®]에 대한 친화성이 향상되었기 때문이라고 생각할 수 있다.

또한, 본 원고에서는 SN법을 소개했으나 감염에 재조합 retrovirus 원액을 사용한 경우에는 RetroNectin[®] coated plate에 바이러스를 우선 preload 하여 바이러스 용액 중에 포함된 감염 저해물질을 제거한 후 표적 cell를 추가하는 방법(RetroNectin[®] bound virus infection : RBV법)을 추천하고 있다.

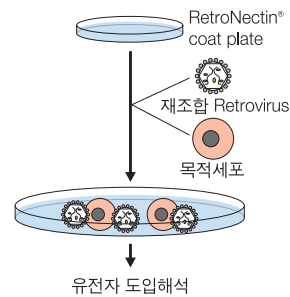
(A) 재조합 Retrovirus 제작법(Retrovirus Packing Kit를 이용한 방법)

Retrovirus Packing Kit를 이용



- ① Transfection 전날에 G3T-hi cell를 준비한다.
- ② 목적 유전자를 삽입한 재조합 Retrovirus vector plasmid와 kit에 첨부된 Retrovirus gag-pol 및 env 발현 vector를 첨부 시약을 이용해 인산 칼슘법으로 co-transfection한다.
- ③ Transfection 24시간 후에 배지를 교환하고, 24시간 후 배양상청을 채취하여 0.45 μm 필터로 여과 한다.
- ④ 여과액을 바이러스 용액으로서 회수하여 -80℃에 보존한다.

(B) 재조합 Retrovirus 감염법(SN법)



본 예시는 24 well plate에서 transfection한 예입니다

[RetroNectin[®] coat plate의 제작]

- ① 표면에 RetroNectin[®]을 처리하지 않은 24 well plate에, PBS 20 μg/ml 에 조제한 RetroNectin[®](RetroNectin[®]/PBS) 용액을 1 well 당 500 μl 첨가하고(5 μg/cm²), 4℃에 하룻동안 방치한다.
- ② RetroNectin[®]/PBS 용액을 제거하고, 2% BSA/PBS를 1 well 당 500 μl 첨가하고 실온에서 30분간 blocking 한다.
- ③ Blocking 용액을 제거하고 1 well 당 500 μl의 PBS로 1회 세정하고, PBS를 제거한 상태로 보존한다. 이와 같은 조작으로 RetroNectin[®] coat plate가 완료되었으며, 필요에 따라 제작한다.

[SN법]

- ① 목적 세포를 바이러스 희석액으로 현탁 한다.
- ② RetroNectin[®] coat plate의 1 well에 ①의 세포 현탁액을 첨가한다.
- ③ 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양한다.

그림 1 G3T-hi cell을 이용한 재조합 Retrovirus 제작법과 감염법

주목의 신상품 1 RetroNectin®에 높은 친화성을 나타내는 retrovirus 제작용 G3T-hi cell 등장!!

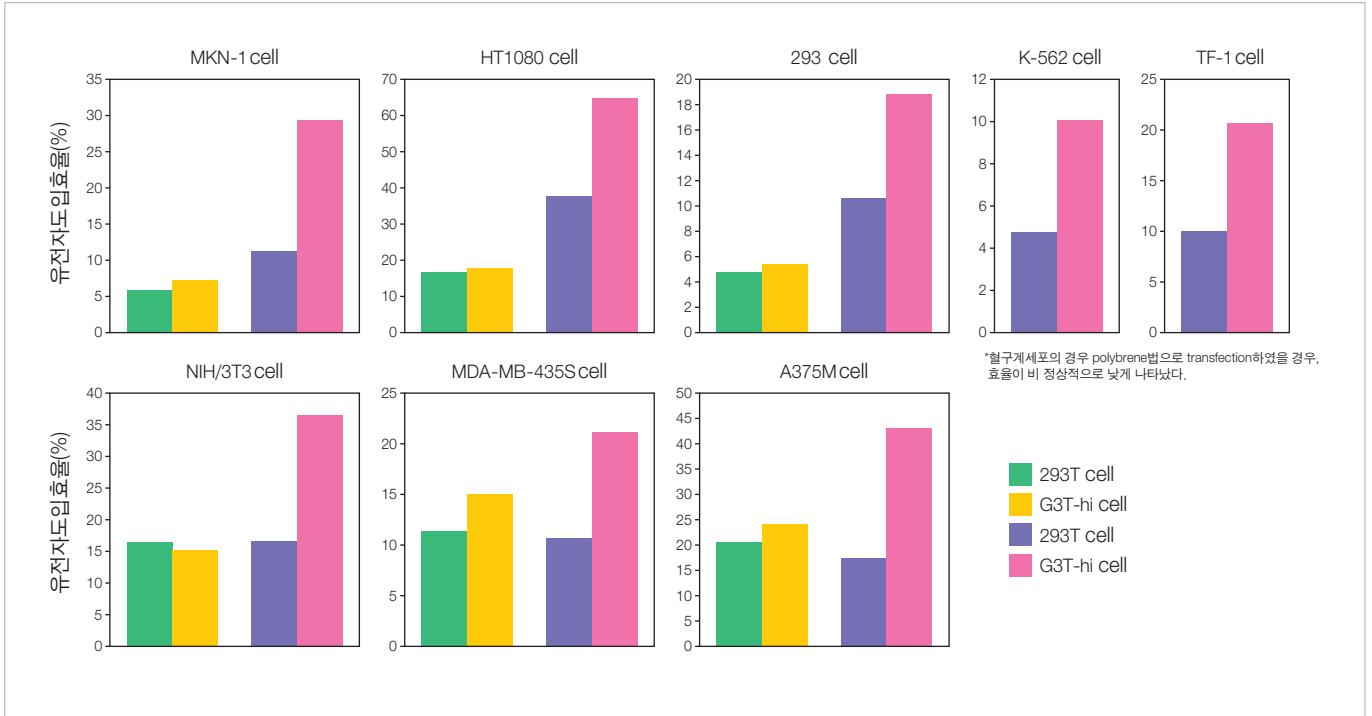


그림 2 G3T-hi cell 및 293 T cell을 이용하여 조제한 바이러스액의 각종 목적 세포로의 유전자 도입 효율 비교
 G3T-hi cell 혹은 293T cell을 이용하여 일시적인 재조합 Retrovirus를 제작하고 polybrene법 또는 RetroNectin®을 이용한 SN법으로 각종 목적 cell에 바이러스를 감염시켰다. G3T-hi cell을 이용하여 조제한 바이러스는, GnT-III에 의하여 바이러스 막표면에 당쇄수식을 받는 것으로, RetroNectin®의 친화성이 향상되어 표적 cell의 유전자 도입 효율이 상승하였다.

참고문헌

- 1) BIO VIEW 45호 8 ~ 11 page
- 2) BIO VIEW 36호 12 ~ 13 page
- 3) BIO VIEW 47호 13 ~ 15 page
- 4) Ihara, Y. et al. (1993) *J. Biochem.*, **113**, 692-698.
- 5) Chono, H. et al. (2001) *J. Biochem.*, **130**, 331-334.

관련제품

제품명	TaKaRa Code	Size
Retrovirus 제작용 cell G3T-hi cell	6163	2 × 10 ⁶ cells/ vial
재조합 Retrovirus 생산 시스템		
Retrovirus Packaging Kit Eco	6160	10회
Retrovirus Packaging Kit Amphi	6161	10회
Retrovirus vector를 이용한 고효율 유전자 도입에		
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	T100A	0.5 mg
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	T100B	2.5 mg
RetroNectin® Dish (RetroNectin® Pre-coated Dish, 35 mm Ø)	T110A	10 dishes
고효율 유전자 도입용 Retrovirus vector		
pDON-AI DNA	3650	20 µg
siRNA 발현용 Retrovirus vector		
pSINsi-hH1 DNA	3660	20 µg
pSINsi-hU6 DNA	3661	20 µg
pSINsi-mU6 DNA	3662	20 µg

Mirus®



It All Begins at the Bench

Transfection Reagent

■ Successfully Transfected cell lines

A549, BHK-21, BNL-CL2, BRL-3A, C2C12, C6 *, CHO-K1*, Clone 9, COS-1*, COS-7*, Daoy*, DB-TRG-05MG*, DI-TNC1*, DU 145*, HCN-1A*, HEK 293*, HeLa*, Hepa 1-6, Hepa1cLc7, HepG2, HLF-a, Huh-7, HUVEC, Jurkat*, K562, KB, KLN 205, LL/2 (LLC1), LNCaP*, MCF-7, MEL, Neuro-2a*, NIH3T3*, OVCAR3, PC12*, PC-3*, RAW 264.7, SK-N-MC*, SKOV3, SVG p12*, SW900, THP-1, Vero, WRL-68.

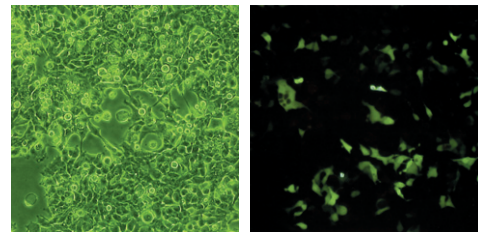
Primary cell types

Human astrocytes, human chondrocytes, keratinocytes, mouse and rat hepatocytes.*

* TransIT® Cell Line Specific Transfection Reagent 이용 가능

■ 293 cell의 도입효율비교

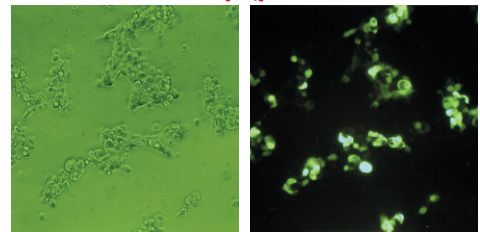
[TransIT®-LT1]



광학현미경

형광현미경

[A사]



광학현미경

형광현미경



Takara Technical Support Line

462-120 경기도 성남시 중원구 상대원동 66-2 생명공학커뮤니티 Bio21 TEL 031-739-3320 FAX 031-739-3321 E-mail support@takara.co.kr

[지역별 전문대리점] 다인바이오(주)(서울, 인천, 경기, 강원) 031-748-8166 (주)라인바이오(대전, 충청) 042-861-6602 (주)브니엘바이오(대구, 경북) 053-381-3611

대한과학(부산, 경남) 051-245-6582 SNT(진주) 055-759-2522 (주)삼화교역(전주, 전북) 063-227-3700 (주)진성에스엠알(광주, 전남) 062-672-7631 한라바이오랩(제주) 064-726-3251~4