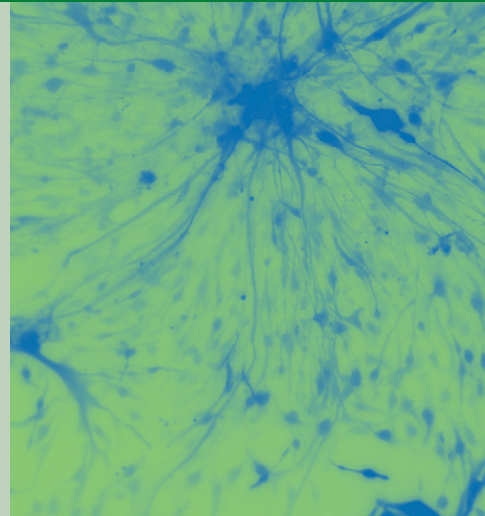


# Adeno-X™ Viral Expression System

Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit  
 Adeno-X™ AcGFP1 Marker Virus  
 Adeno-X Expression System 2  
 Adeno-X Promoterless Expression System 2

Clontech Code 632248  
 Clontech Code 632504  
 Clontech Code 631524  
 Clontech Code 631525



## ▶ 30분 이내에 최대 10<sup>10</sup> IFU까지 정제 Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit

TaKaRa Code 632248 6 preps  
 TaKaRa Code 632249 24 preps

- 여러 개의 adenovirus stock을 동시에 정제 및 스크리닝
- 간단한 조작
- 30분 이내에 고순도의 재조합 adenovirus 정제

지금까지 adenovirus를 정제하는 것은 아주 번거로운 일이었다. Clontech의 Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit는 소량의 재조합 adenovirus를 정제하여 농축할 수 있는 이상적인 방법이다. Adenovirus를 Clontech spin column chromatography법을 이용하면 불과 30분에 정제할 수 있다. Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit는 6 검체용과 24 검체용이 있다.

### 신속한 정제

지금까지의 방법으로는 1종류의 재조합 adenovirus를 조제하기 위해 대량 배양을 한 후 CsCl 밀도구배법에 의해 adenovirus 입자를 분리하는 방법을 사용해 왔다. 이러한 과정은 많은 시간뿐 아니라 노동력이 필요하고 또 대량의 세포 배양액이 필요하기 때문에, 여러 개의 재조합 adenovirus를 동시에 준비한다는 것에는 한계가 있다.

Clontech의 Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit는 기존 방법의 단점을 모두 개선했다. 이 kit에는 특수한 표면 특성을 가진 특수한 막(membrane)이 adenovirus 입자를 선택적으로 흡착하는 원리를 이용하여 신속하고 일관성 있게 adenovirus를 정제할 수 있는 시스템을 채용하였다.

증폭한 adenovirus 입자를 세포 침전에서 회수하여 일반적인 마이크로 원심 튜브를 이용하여 불순물을 제거한 후 전처리를 마친 column에 loading 한다. 이어서 필터에 부착된 adenovirus 입자를 세정하여 용출시킨다. 정제된 adenovirus를 얻을 때까지 전 과정은 약 30분이 소요된다(그림 1 참조).

Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit는 적은 세포 배양액만으로도 충분히 정제가 가능하고 정제가 간단하며, 동시에 여러 개의 정제가 가능하다(그림 2).

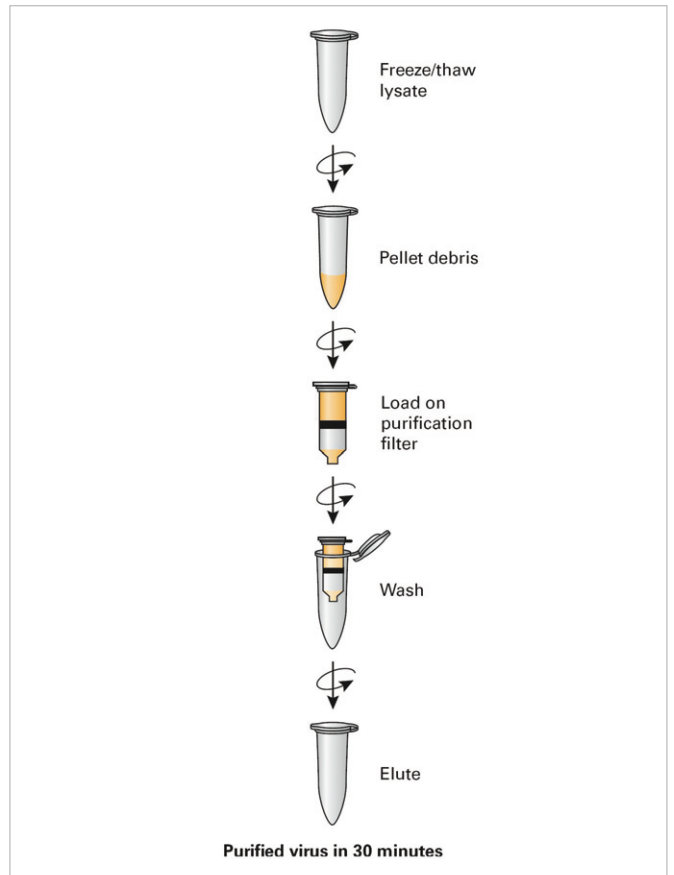


그림 1 Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit의 protocol 개요

### 간단한 스크리닝

Scale up 하기 전에 재조합 adenovirus의 효율적인 screening, 여러 개의 shRNA 벡터의 screening 및 대규모 바이오 프로세스의 모니터링을 단시간에 할 수 있다. 이 kit를 활용하면 정제 과정에 필요한 양을 확보하기 위해 세포 배양을 늘릴 필요 없이 각 실험에 필요한 양의 바이러스를 정제할 수 있다.

Clontech은 Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit의 출시하여 adenovirus 정제의 회수량 및 순도를 모두 만족시킬 수 있게 되었다.

Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit는 최대 10<sup>10</sup> IFU까지 정제할 수 있지만 Adeno-X™ Standard Purification Kit 및 Mega Kit는 10~100배나 많은 감염 단위까지 정제할 수 있다.

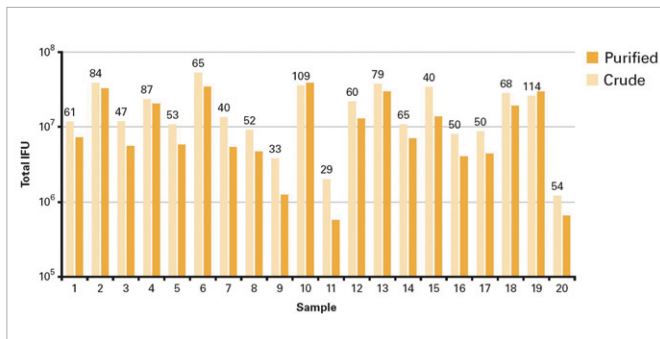


그림 2. 여러 개의 재조합 adenovirus를 동시에, 또한 간단하게 정제 재조합 adenovirus를 6 well plate에서 배양한 20종류를 초기 증폭한 배양액으로부터 재조합 adenovirus를 정제하였다. 정제한 바이러스 및 미정제 바이러스의 용해물에서 adenovirus의 회수량을 Adeno-X™ Rapid Titer Kit(Clontech Code 631028)를 이용해 정량하였다. 데이터는 각 바이러스 샘플의 총 감염 단위(IFU) 및 회수율(평균 62%)을 나타낸다.

### ▶ Ready-to-use의 고역가(high-titer) adenovirus control stock

## Adeno-X™ AcGFP1 Marker Virus

TaKaRa Code 632504

- 감염 효율을 시각적으로 측정
- 감염 조건을 최적화
- Control 바이러스로 사용 가능

Clontech의 Adeno-X™ AcGFP1 Marker Virus는 *Aequorea coerulea* 유래의 단량체(monomer) 녹색 형광 단백질 AcGFP1을 발현한다. 이 바이러스 stock은 Clontech의 Adeno-X™ Expression System 2를 이용하여 개발되었고, AcGFP1 cassette의 강력한 constitutive 발현에 cytomegalovirus의 immediate early promoter가 이용된다. 이 바이러스는 유전적 균일성을 정확히 하기 위해 plaque 정제를 하여 증폭시킨 후 Adeno-X™ Virus Purification Kit로 필터 정제를 한다. Adeno-X™ AcGFP1(~10<sup>9</sup> IFU/ml)은 1 tube(100 μl)로 여러 차례 예비실험 및 최초 증폭으로도 충분히 사용할 수 있다. Clontech의 Adeno-X™ AcGFP1 Marker Virus는 사용하는 세포의 adenovirus 감염 여부를 결정하고, 특정 세포에 대해 유전자 도입 매체로 기능을 하는 바이러스의 능력을 측정하는데 있어서 가장 적합하다. AcGFP1 단백질은 살아있는 세포내에서도 관찰할 수 있기 때문에(그림 3) 감염 효율 측정이 가능하고, 감염 protocol의 최적화를 손쉽게 할 수 있을 뿐 아니라 실험이 시작된 후 control로도 사용할 수 있다.

그 밖에도 이용 가능한 고역가의 Adeno-X™ Marker Virus에는 *LacZ*, *DsRed2*, 및 *Null Marker Virus*가 있다.

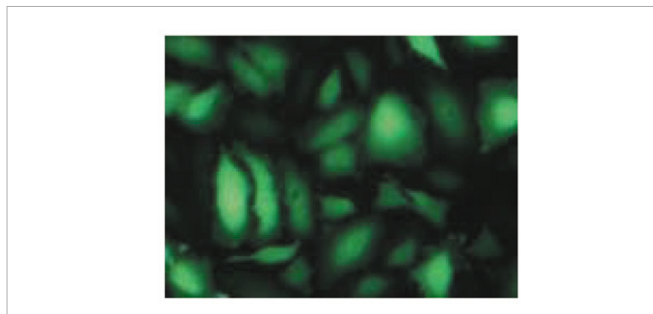


그림 3. Adeno-X™ AcGFP1 Marker Virus를 감염시킨 HeLa 세포. HeLa 세포를 MOI(multiplicity of infection)=10으로 감염시키고, 48시간 배양한 뒤 필터 세트(FITC/EGFP-specific)를 장착한 Zeiss사의 Axioskop를 이용한 형광현미경으로 관찰하였다.

### ▶ Creator™ 기술에 의한 adenovirus의 신속한 cloning

## Adeno-X Expression System 2

TaKaRa Code 632504

## Adeno-X Promoterless Expression System 2

TaKaRa Code 631525

- 간단하게 30분 내에 여러 개의 adenovirus 벡터를 생성
- 조작 시간 최소화
- CMV와 U6 등 임의의 promoter 도입 가능

Clontech의 Adeno-X™ Expression System 2는 강력하고 용도가 다양한 Adeno-X™ Expression Systems에 Creator™ 시스템의 신속성과 정확도를 적용한 것이다. 유전자 도입은 잘 알려진 *Cre-loxP* 재조합 반응을 토대로 하며, 정확하면서 방향성을 가진 cloning을 할 수 있다(그림 4). 완성한 재조합 adenovirus vector를 조제 및 증폭시키고, 영장류와 설치류를 포함한 광범위한 동물에 대한 효율적인 도입에 사용할 수 있다. Constitutive한 발현을 볼 것인지 아니면 inducible한 발현을 볼 것인지에 대한 선택도 가능하고, cDNA의 promoter에 특이적인 발현이나 shRNA의 constitutive 발현 등에도 적용 가능하다(1).



그림 4. Creator™ Cloning System을 이용한 재조합 adenovirus 생성 발현 cassette를 *Cre* recombinase를 이용하여 Adeno-X™ LP Promoterless Expression Vector안에 도입하였다. 재조합 adenovirus DNA를 *E. coli* EZ10(TaKaRa Code 636756) 안에서 증폭시켰다. 선택 배지 상의 10개의 colony를 임의로 선택해서 벡터 특유의 primer 및 Sprint™ Advantage 96 Plate(TaKaRa Code 639550)를 이용하여 PCR로 분석했다. 그 결과 10개의 colony 모두 DNA 삽입이 확인되었다. 서로 다른 13종의 유전자와 3종의 발현계 중에서 하나를 이용한 총 36회의 실험을 통해 87.7%의 cloning 효율이 나타났다. + : positive control, V : 벡터, M : λ174/Hae III 분자량 marker.

### 참고문헌

1. Adeno-X Expression System 2(January 2003) *Clontechniques* XVIII(1): 16-17