

Clontech Virus Expression System 소개

Adenovirus Expression System
Retrovirus Expression System

Adenovirus나 retrovirus를 이용한 유전자 도입법은 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 적용되는 고효율의 유전자 도입법으로 단백질의 고발현이 가능하다. 본 고에서는 재조합 adenovirus나 retrovirus를 제작하기 위한 Clontech의 각종 system과 관련제품을 소개하고자 한다.

■ Adenovirus Expression System

Adenovirus는 조혈모세포 이외의 human 유래 세포나 포유류 세포에서 분열 중인 세포나 비분열세포 모두에 감염시킬 수 있다. Adenovirus DNA는 genome에 재조합되어 세포내에 남아있기 때문에 도입된 유전자는 일시적(transient)으로 발현을 보인다. 또한 많은 copy의 DNA를 세포에 도입하기 때문에 높은 수준의 단백질을 발현할 수 있다.

■ Expression system

Adeno-X™ Expression System은, transcription 단위인 E1 및 E3 영역을 결손시켜 adenovirus genome의 E1 region에 삽입하여, 재조합 adenovirus를 제작하는 방법이다.

【Adeno-X™ Expression System 1】

제한효소 I- *Ceu* I, PI- *Sce* I로 digestion하고 간단한 ligation 법으로 단시간에 간편하게 재조합 adenoviral vector를 제작할 수 있으며 약 8.1 kb까지의 유전자를 삽입할 수 있다.

재조합 adenovirus를 제작하기 위해서는 목적유전자를 pShuttle2 vector에 cloning 한 후, 제한효소 I-*Ceu* I과 PI- *Sce* I로 double digestion 한 뒤, 그 단편을 그대로 Adeno-X™ Viral DNA(미리 I- *Ceu* I 와 PI- *Sce* I로 처리됨)에 ligation 한다.

이후 *E.coli*에 transformation하여 DNA를 회수한 후, 제한효소 *Pac* I로 digestion한 DNA를 E1 유전자를 발현하는 HEK 293 세포에 transfection하여 재조합 adenovirus를 얻는다. I-*Ceu* I과 PI-*Sce* I을 이용하여 adenovirus의 E1 결손 영역에 간편하게 목적유전자를 삽입할 수 있다. 본 방법은 homologous recombination이 아닌 ligation법을 이용하기 때문에, self-ligation이나 nonrecombinant adenoviral DNA의 출현 빈도가 매우 낮다. 이 시스템을 이용할 경우, 약 16 일만에 재조합 adenovirus를 얻을 수 있다.

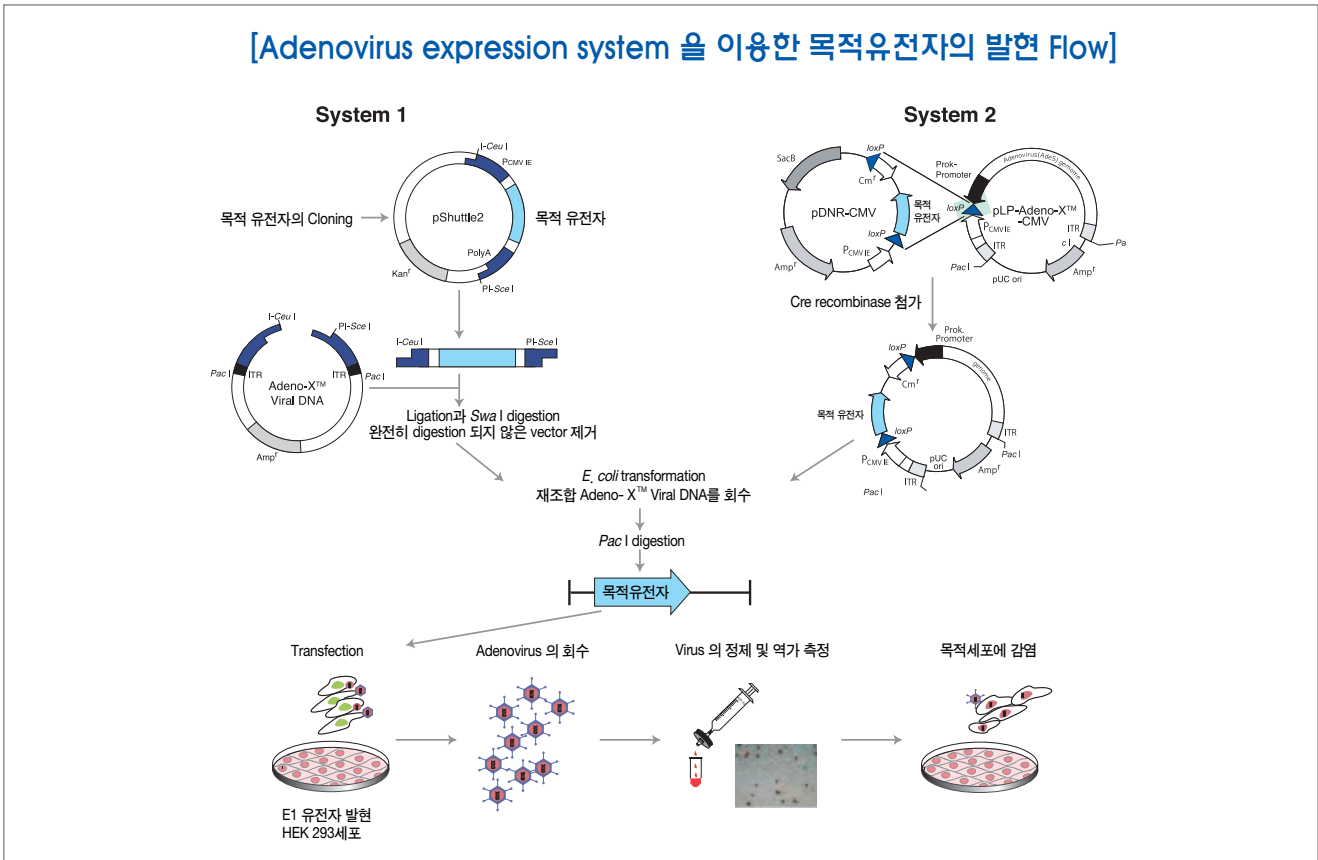


그림 1. Adenovirus Expression System을 이용한 목적유전자의 발현 flow

【Adeno-X™ Expression System 2】

Clontech의 Creator™ cloning 기술을 이용하여 더욱 간편하고 단시간에 재조합 adenoviral vector를 제작할 수 있으며 약 7 kb까지의 유전자를 삽입할 수 있다. 본 system은 pDNR-CMV vector에 cloning된 목적유전자를 Cre recombinase 반응으로 loxP 부분을 pLP-Adeno-X™-CMV vector의 loxP 부위로 옮겨 재조합하며, 이 반응은 불과 15분 밖에 소요되지 않는다. 이후의 실험방법은 Adeno-X™ Expression System 1 과 같다. 임의의 promoter를 삽입할 수 있는 promoter vector도 있다.

【Adeno-X™ Tet-On® & Adeno-X™ Tet-Off® Expression System】

목적 유전자의 발현은 tetracycline(또는 doxycycline) 첨가량에 따라 발현량을 조절할 수 있으며, 가역적으로 제어할 수 있는 inducible expression system이다. 이 시스템은 독성 유전자의 발현에도 적합하다. Tetracycline에 의해 조절되는 목적유전자 발현용 재조합 adenovirus를 Adeno-X™ Expression System 1이나 System 2 방법으로 제작하고, 목적 세포에 tetracycline 조절 능력을 지닌 Adeno-X™ Tet-On 또는 Tet-Off 바이러스와 co-infection하면, tetracycline 농도에 따라 일시적(transient)으로 목적유전자의 발현을 제어할 수 있다.

【Adeno-X™ ViraTrak Expression System】

Adeno-X™ expression system 2와 같이 Creator 기술을 이용하여 원하는 유전자를 Cre-loxP recombination에 의해 adenoviral acceptor vector로 효과적으로 옮길 수 있어 재조합 adenovirus stock을 만드는 시간과 노력을 감소시킬 수 있다. 또한 DsRed-express 또는 ZsGreen1 유전자를 포함하고 있어 virus-producing cell의 모니터링이 간단하다. CMV promoter/enhancer를 포함하고 있는 제품군과 promoterless 제품군으로 다양화되어 있어 사용 목적에 따라 적합한 제품을 선택할 수 있다.

■ 정제 Kit

【Adeno-X™ Virus Purification Kit】

간편하게 고역가의 adenovirus를 정제할 수 있는 affinity chromatography에 기초한 membrane cartridge이다. 회수한 supernatant와 세포를 여과 후 Benzonase®를 처리하여 카트리지에 흡착시킨 후, wash buffer로 세정하고, elution buffer로 용출하여 adenovirus를 정제한다. 2~3 시간 이내에 CsCl density gradient법과 동등 이상의 바이러스를 얻을 수 있다. 30분내 소량의 많은 샘플 정제에 적합한 spin column type의 Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit도 있다.

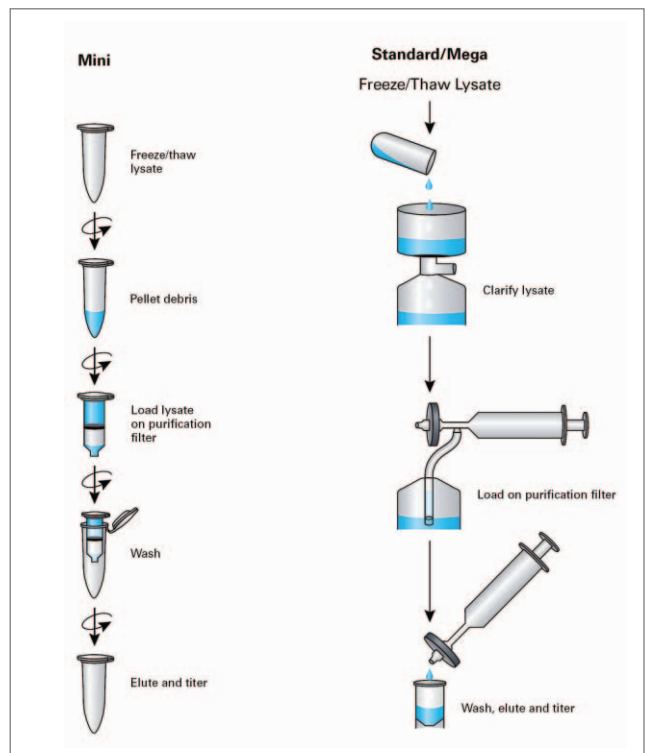


그림 3. Mini and standard/mega Adeno-X virus purification protocols.

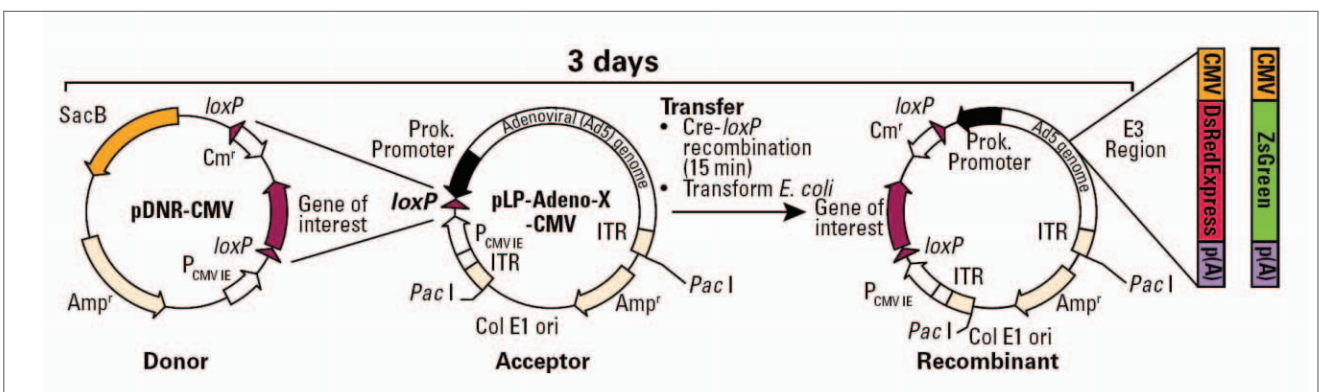


그림 2. The Adeno-X ViraTrak Expression System 2 greatly reduces the timeline for constructing recombinant adenovirus vectors. The standard CMV expression systems generate recombinant adenoviral constructs in which gene expression is regulated by the CMV major immediate early promoter/enhancer. Our promoterless expression systems feature adenoviral acceptor vectors (pDNR-1r & pSIREN-DNR) appropriate for use with promoter-specific or RNAi applications, respectively.

■ Titer Kit

【Adeno-X™ Rapid Titer Kit】

불과 3일 만에 Antibody based assay로 adenovirus의 titer를 측정할 수 있는 kit이다. E1 유전자를 보완하는 HEK 293 세포에 재조합 adenovirus가 감염되면, 바이러스의 증식에 필요한 hexon 단백질이 발현된다. 이 hexon을 항체와 반응시켜, HRP가 labeling된 2차 항체를 DAB substrate로 검출한다. 세포 조제후 감염하고 2 일 후, labeling, 염색, 감염된 세포 수를 측정한다. 소요시간은 3 시간이다.

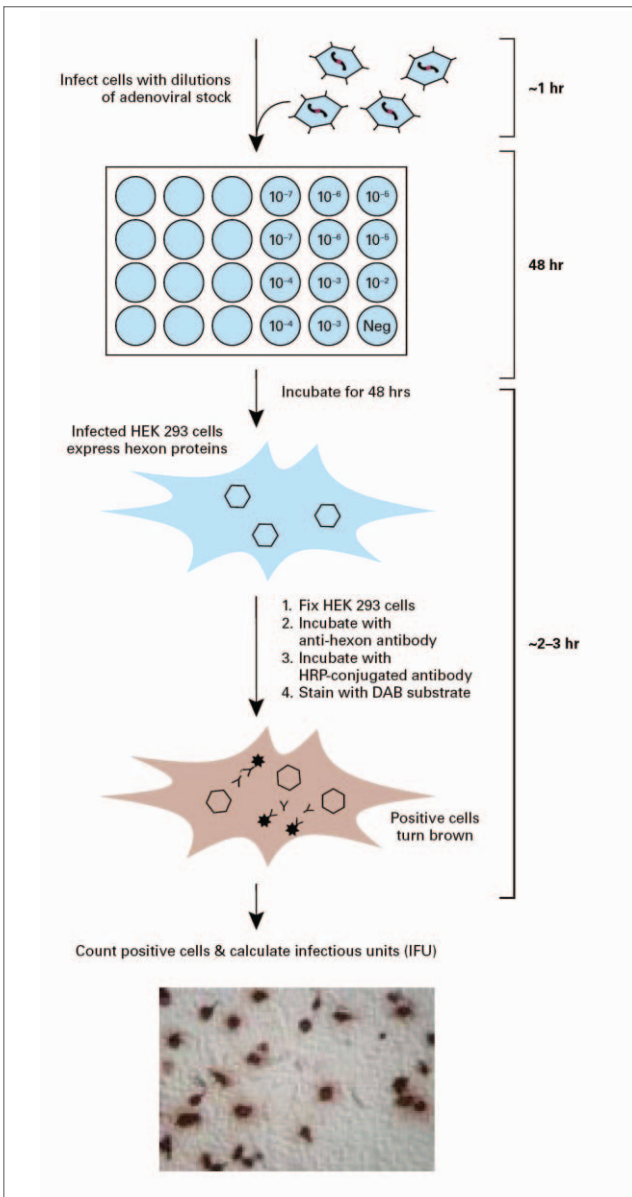


그림 4. Adeno-X Rapid Titer Kit protocol

■ Marker Viruses

【Adeno-X™ Marker Viruses】

재조합 adenovirus 감염의 positive control 또는 negative control로서 사용할 수 있다. 또한 녹색 형광 단백질(AcGFP1), 적색 형광 단백질(DsRed2) 또는 β-galactosidase(LacZ)를 발현하는 marker virus 및 재조합 유전자를 포함하지 않는 null virus가 있다.

■ 관련제품

Product	Clontech Code	Size
발현시스템		
Adeno-X™ Expression System 1	631513	1 Set
Adeno-X™ Expression System 2	631524	5 회
Adeno-X™ Tet-Off® Expression System 1	631022	1 Set
Adeno-X™ Tet-On® Expression System 1	631050	1 Set
Adeno-X™ Tet-Off® Expression System 2	631058	5 회
Adeno-X™ Promoterless Expression System 2	631525	5 회
정제, 측정 kit		
Adeno-X™ Virus Mini Purification Kit	632249	24 회
Adeno-X™ Virus Purification Kit	631533	5 회
Adeno-X™ Virus Mega Purification Kit	631534	1 회
Adeno-X™ Rapid Titer Kit	631028	1 Set
Adeno-X™ ViraTrak DsRed-Express Expression System 2	632516	10rxns
Adeno-X™ ViraTrak ZsGreen 1 Expression System 2	632517	10rxns
Adeno-X™ ViraTrak DsRed-Express Promoterless Expression System 2	632518	10rxns
Adeno-X™ ViraTrak ZsGreen1 Promoterless Expression System 2	632519	10rxns

■ Retrovirus Expression System

분열하는 거의 모든 세포의 genome에 목적유전자를 안정적으로 도입시킬 수 있다. 항생제 selection에 의해 유전자 안정 발현주(stable cell line)를 쉽게 만들 수 있다.

【Retro-X System】

MMLV에서 유래한 3 종류의 retroviral 발현 벡터와 RetroPack PT67 packaging cell line이 set로 되어 있다. PT67 cell로 packaging한 virus는 amphotropic retrovirus receptor와 GALV receptor의 2 종류의 receptor를 이용하여 보다 광범위한 mammalian cell에 유전자를 도입할 수 있다. AcGFP1 및 DsRed 융합 발현 벡터도 line-up 되었다.

【Retro-X Q Vector】

고역가, 고발현 retrovirus의 제작이 가능한 자기 비활성화(self-inactivating) retroviral vector이다. 5' LTR이 변경된 CMV/MSV hybrid promoter에 의해 virus genome이 되는 mRNA의 transcription 효율 증가로 고역가의 재조합 virus를 얻을 수 있다. 또한 3' LTR이 결여된 자기 비활성화(self-inactivating) retroviral vector이기 때문에 염색체에 끼어들어 간 후에는 5' LTR promoter가 불활성화되어 내부의 CMV IE promoter에 의해 MCS에 삽입된 유전자의 transcription이 일어난다. 이때 IRES를 통해 목적 유전자와 함께 항생제 내성 marker(Hyg, Pur, Neo)도 발현된다.

【Retroviral Packaging Cell Line】

Retro-X Universal Packaging System은 envelope 단백질을 선택할 수 있는 GP2-293 packaging cell line을 이용한다. 그 외 amphotropic retrovirus receptor(Ram-1)와 GALV receptor를 인식하는 envelope 단백질을 발현하는 RetroPack PT67 cell line과 EcoPack envelope 단백질을 발현하는 EcoPack 2-293 cell line, amphotropic virus envelope을 발현하는 AmphoPack-293 cell line을 제공하고 있다.

【Pantropic Retroviral Expression System】

Vesicular stomatitis virus의 envelope glycoprotein인 VSV-G를 발현하는 벡터이다. 목적유전자 발현 retroviral vector와 HEK 293 세포 유래의 GP2-293 packaging cell line이 set로 되어 있다.

VSV-G는 세포 표면 receptor에 의존하지 않고 지방질 결합(lipid binding)과 세포막 융합(plasma membrane fusion)에 의해 세포내로 virus가 침투할 수 있도록 촉진한다. 이 때문에 포유류, 조류, 어류, 연체동물, 양서류, 곤충 등의 광범위한 동물세포에 유전자 도입이 가능하다. 또한, VSV-G enveloped 바이러스는 견고하기 때문에, ultracentrifuge로 virus를 농축하여 10⁹ cfu/ml의 높은 titer의 virus를 얻을 수 있다.

【MSCV Retroviral Expression System】

Murine이나 human의 조혈모세포(hematopoietic), embryonal stem(ES), embryonal carcinoma(EC) 등의 다분화능 세포주(pluripotent cell line)에 높은 효율로 유전자를 도입할 수 있다. 3종류의 항생제 내성 유전자를 갖고 있는 MSCV retrovirus 발현 vector와 RetroPack PT67 packaging cell line이 set로 되어 있다.

【RevTet-On™ & RevTet-Off™ Gene Expression System】

잘 알려져 있는 Tet system과 retrovirus에 의한 유전자 도입의 장점을 접목시켜, 특이성이 높은 유전자 발현 조절이 가능하다. TRE retrovirus 발현 벡터, Tet-On & Tet-Off retrovirus 및 RetroPack PT67 packaging cell line 이 set로 되어 있다. 가장 높은 수준의 발현 유도에 필요한 tetracycline 농도에서도 세포 독성이 없고, 연속 처리에도 세포 증식이나 동물의 성장에 영향이 없다.

■ 관련제품

Product	Clontech Code	Size
Expression system, Vector		
Retro-X System	631508	1 Set
MSCV Retroviral Expression System	634401	1 Set
RevTet-Off™ System	631020	1 Set
RevTet-On™ System	631021	1 Set
Retro-X Q Vector Set	631516	20ug × 4
Packaging Cell		
AmphoPack-293 Cell Line	631505	1 ml
EcoPack 2-293 Cell Line	631507	1 ml
RetroPack PT67 Cell Line	631510	1 ml
Retro-X Universal Packaging System	631530	1 Set

※ 라이선스 및 자세한 사항은 다카라코리아(02-2081-2510)로 문의해 주시기 바랍니다.

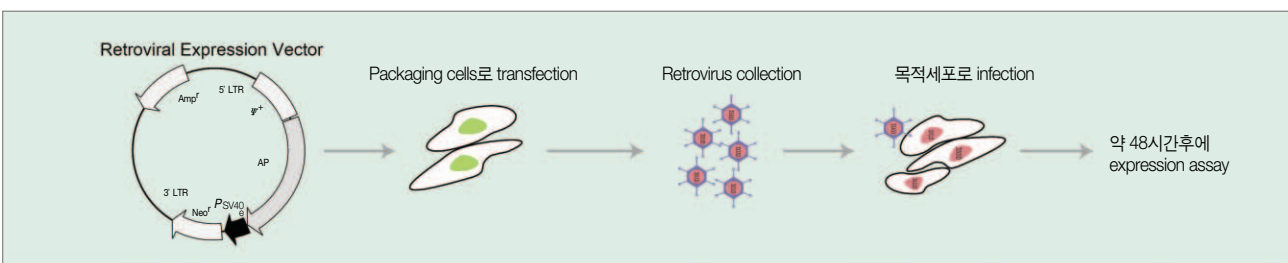


그림 5. Retrovirus Expression System을 이용한 retrovirus의 제조 flow