

탁월한 Adenovirus 정제 Adenovirus Purification Kit



Cell pellet에서 adenovirus 분리를 1 시간 만에 완성!

- 기존 제품에 비해 prep 횟수 증가
- 효율적인 실험방법으로 사용하기 편리
- 10¹² 이상의 virus 입자 분리 가능
- CsCl 불필요

Adeno-X™ Maxi Purification Kit는 chromatography에 기초한 시스템으로 1 시간 30분만에 재조합 adenovirus를 정제할 수 있다. 작업은 매우 빠르고 간단하며, 어려움없이 샘플량을 늘리거나 줄일 수 있다.

Adeno-X™ Maxi Kit is Easy & Economical

Adeno-X™ Maxi Purification Kit에서는 cell pellet으로부터 대량의 adenovirus를 직접 정제할 수 있도록 개선된 protocol을 사용하고 있다. 세포변성효과(cytopathic effect)가 완전히 나타난 후에 세포로부터 간단히 virus를 정제할 수 있다. 또한, Maxi Purification kit는 2-, 6- prep 형태로 기존 제품에서 형태가 변경되어 보다 더 경제적으로 사용할 수 있다.

Simple Chromatographic Procedure

본 실험에는 초고속원심분리 과정이 필요 없다. 대신 선택적으로 adenovirus 입자와 결합할 수 있는 특수한 막을 이용한 크로마토그래피 방법으로 adenovirus를 분리한다. 막은 하나의 작은 카트리지에 포함되어 기본 사이즈의 BD Luer-Lok™ 주사기와 함께 사용하기 적합하다.

편리성을 더하기 위해 주사기와 필터가 미리 결합된 형태로 제작되어 바로 사용할 수 있다. 본 장치는 one-way valve가 부착되어 있어 배양 배지를 제거하고 필터를 세척하는 과정에서 주사기를 분리하지 않고 실험 할 수 있는 장점이 있다. Adenovirus가 포함된 배지는 one-way valve를 통해 주사기내로 들어가며 정제용 필터 카트리지를 통해 나오게 되므로 이보다 더 간단한 정제 방법은 없다.

전체적인 실험 방법은 매우 간단하다. 세포변성효과 (cytopathic effect)가 완전히 나타난 다음, 세포를 용해시켜서 원심분리 한다. 상등액에 Benzonase® Nuclease를 처리하여 핵산을 분해시킨 다음, syringe-tip prefilter를 통과시킨다. 그런 다음 주사기를 이용하여 adenovirus 입자가 필터에 부착되도록 바이러스를 포함하는 추출물을 정제용 카트리지에 주입한다. 필터에 결합한 바이러스는 적은 양의 elution buffer를 이용하여 분리한다. 세포 회수에서 정제까지 전체 실험과정은 1~1.5 시간 정도면 가능하다(그림 1).

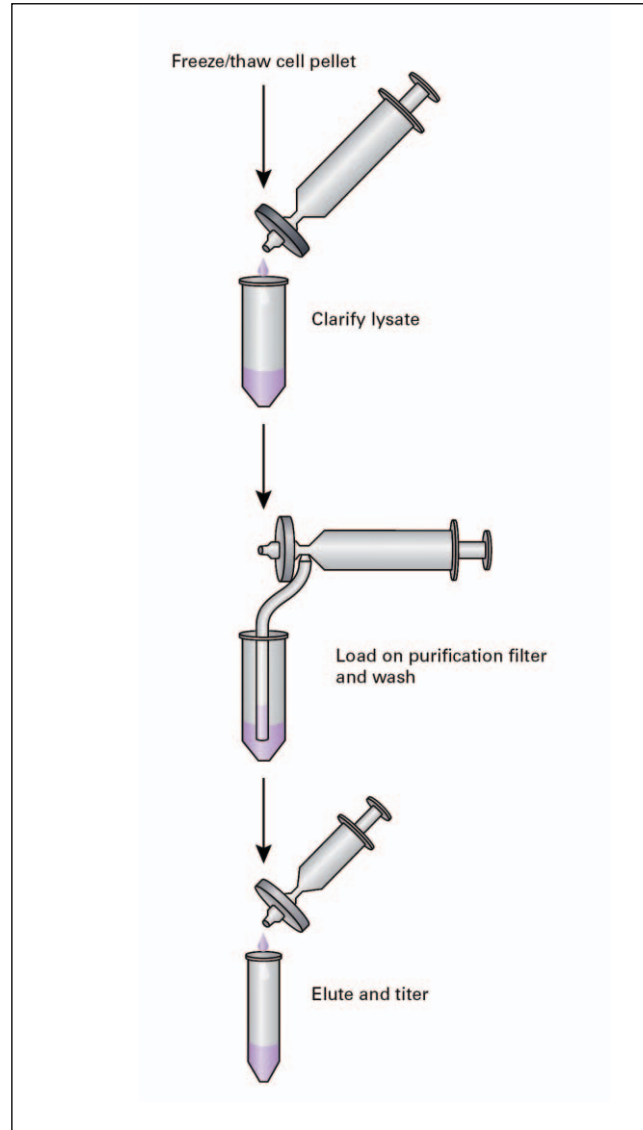


그림 1, Adeno-X™ Maxi Purification Protocol.

Achieve High Titer of High Quality Virus

본 고에서 소개한 새로운 실험법은 바이러스를 세포로부터 직접 분리한다. 감염 후 2일째를 시작으로 관찰한 결과, 바이러스의 대부분이 상등액이 아닌 세포 내에서 관찰되었다(그림 2). 따라서 세포 pellet과 상등액 모두에서 바이러스를 정제하는 방법은 특별한 이점이 없는 것으로 생각된다.

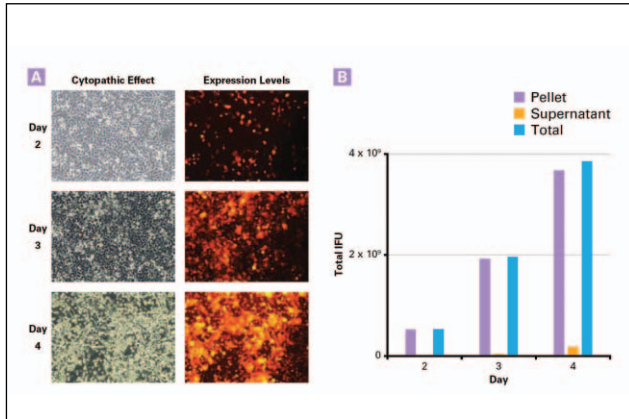


그림 2. Time course of adenoviral yields from cell pellets and supernatants, and the concomitant progression of the cytopathic effect. HEK-293 cells were seeded on a 6-well plate using 1x10⁵ cells/cm² and 0.28 ml/cm² medium, and incubated for 16 hr. They were then transduced with an Adeno-X Expression System 2 construct expressing DsRed-Express at a multiplicity of infection (MOI) of ~1-2, and incubated for 2-4 days. Panel A, The cytopathic effect was followed by examining the infected HEK 293 cells by phase contrast microscopy (left column) and expression was monitored by DsRed-Express fluorescence (right column) on days 2-4. It is clear that by day 4, the cytopathic effect was nearly complete. Panel B, On each of days 2-4, the cells were pelleted, and their pellets and supernatants collected. The pellets were resuspended in fresh medium, lysed by freeze-thawing three times to release the viral particles, and then centrifuged. The viral titer (total IFU) from each pellet and supernatant was determined by infecting fresh HEK-293 cells, and counting the cells under a fluorescence microscope 48 hr following infection. The adenoviral yields from each of the pellets and supernatants from days 2-4 were then compared. Most of the virus was found in the cell pellet regardless of when it was collected. Maximal amounts of virus were found in the cell pellet from day 4, at which time the supernatant contained only ~2% of that found in the pellet.

높은 역가의 바이러스를 정제할 수 있는 Adeno-XTM Purification kit는 CsCl 농도구배 원심분리법과 비교할 수 있다. CsCl을 이용한 기술과는 다르게 Clontech의 기술은 안전하고 전문적인 기술과 값비싼 실험장비를 필요로 하지 않는다. 단지 지속적으로 높은 역가의 adenovirus 정제를 위한 간단한 처리가 필요할 뿐이다. Adeno-XTM Maxi Purification Kit는 adenoviral backbone 또는 발현되는 목적단백질에 따라 10¹² 이상의 adenovirus 입자를 정제할 수 있다. 재조합 adenovirus를 이용하여 검증된 모든 Adeno-XTM Purification kit는 적은 viral particle/infectious unit (IFU) 비율에도 불구하고 높고 효과적인 회수율을 보이며, 고도로 깨끗하며 질 좋은 바이러스를 정제할 수 있는 특징을 가진다(그림 3).

새롭게 출시된 Adeno-XTM Maxi Purification Kit는 세포변성효과(cytopathic effect)가 완전히 나타난 다음 세포로부터 간단히 바이러스를 정제할 수 있는 kit이다. 이 kit는 최적의 가격에 최고로 뛰어난 바이러스 정제법을 제공한다.

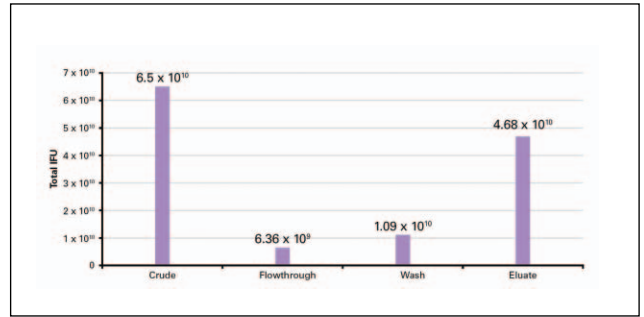


그림 3. Mass balance analysis of our new virus purification process. HEK-293 cells were seeded and infected with Adeno-XTM DsRed-Express as described in 그림 2, and harvested when the cytopathic effect was nearly complete. The resulting adenovirus was then purified according to the Adeno-XTM Maxi Purification Kit protocol. Total IFU was determined (as described in 그림 2) for each fraction (crude, flowthrough, wash, and eluate), and plotted. 72% of the starting material was recovered in the eluate as purified virus. The process was efficient and fast, allowing us to purify 4.68 x 10¹⁰ adenoviral particles in one hour.

Product	Size	TaKaRa Code
Adeno-X TM Maxi Purification Kit	2 preps	631532
	6 preps	631533
Adeno-X TM Expression System 2	5 rxns	631524
Adeno-X TM ViraTrak DsRed-Express Expression System 2	10 rxns	632516

Adeno-XTM Maxi Purification kit Components

- 1X Equilibration Buffer
- 1X Dilution Buffer
- 1X Wash Buffer
- 1X Elution Buffer
- Benzonase[®] Nuclease (25 U/ml)
- Syringe-Tip Prefilter
- Adeno-XTM Maxi Purification Assembly
- Syringes (5 and 20 ml)

■ 관련 제품

Product	Size	TaKaRa Code
Adeno-X TM ViraTrak DsRed-Express Expression System 2	10 rxns	632516-632519
Adeno-X TM Expression System 2	5 rxns	631524

※ 본문 중 제품에 해당하는 라이선스 확인사항은 [License Notice] 참조 (22), (23), (24), (27)