세포내 바이러스 도입효율을 획기적으로 높이는 시약!

RetroNectin® Reagent

- · Recombinant fibronectin molecule
- 감염이 어려운 세포나 줄기세포의 유전자 도입효율을 높임
- 세포-바이러스간 접촉을 최대화하여 transduction 효율 극대화
- Lenti-X, Retro-X Expression System에 적합

Retroviral과 lentiviral vector를 이용하면 많은 종류의 세포에 안정적이고 효율적으로 유전자를 도입할 수 있다. 그러나 줄기세포, 부유세포 등 몇몇 세포 타입에서는 일반적인 방법을 사용한 transduction이 어려운 경우가 있다. 이러한 retrovirus 매개 유전자 도입에 다카라의 RetroNectin Reagent를 사용하면 retrovirus와 lentivirus의 도입효율을 획기적으로 높일 수 있다 (특히 부유상태로 자라는 세포(예; lymphocytes) 나 조혈모세포(hematopoietic stem cells)에 효과적임)^{1,2)}. RetroNectin Reagent는 0.5 mg, 2.5 mg 형태와 RetroNectin Precoated Dishes (35 mm) 형태로 되어 있다.

■ RetroNectin 이란?

Fibronectins (FN)은 plasma나 extracellular matrix (ECM)에 존재하는 여러가지 기능을 수행하는 점착성 당단백질 그룹으로 구성된다. 이와 같이 널리 존재하는 단백질은 세포 표면의 integrin 단백질과 다양하게 결합하여 세포가 ECM에 부착될 수 있도록 한다. 뿐만 아니라 세포의 이동, 증식, 분화에 중요한 역할을 담당한다.

RetroNectin (CH-296)은 각각 바이러스 또는 세포 표면 단백질에 결합하는 몇몇 FN 단편에서 유래한 재조합 펩타이드이다. RetroNectin은 세포표면의 integrin receptor VLA-5와 결합하는 세포 점착성 영역을 가진 RGDS motif, 다양한 바이러스 입자와 결합하는 헤파린 결합 영역, VLA-4 integrin receptor와 결합하는 CS-1 서열등 세가지 기능적 영역을 가진다(그림 1).

■ RetroNectin의 작용 메커니즘

RetroNectin의 다원적 특성은 세포와 바이러스가 동시에 결합하여 물리적으로 가깝게 만든다 (그림 1). 바이러스와 세포의 colocalization을 촉진하여 결과적으로 안정적인 유전자 도입의 기회를 높인다.

班 1. RetroNectin Supports High-Efficiency Gene Transfer¹

Cell Type	Efficiency of Gene Transfer (%)	
Human CD34 ⁺ CD38 ⁻ BMC ²	95.5	
Human PBMC ³	91.2	
TF-1	97.9	
SupT1	97.3	
Jurkat	80.1	
K-562	90.4	
HL-60	86.1	
Monkey CD34 ⁺ BMC	72.0	
Monkey CD4 ⁺ T-cell	85.0	

¹ Transductions were performed using the RetroNectin-Bound Virus (RBV) Method of transduction

■ Retroviral transduction을 향상시키기 위한 방법

RetroNectin-coated plate에 바이러스를 먼저 넣은 후 타겟 세포를 첨가하는 RetroNectin-Bound Virus (RBV) 유전자 도입방법에 RetroNectin을 효과적으로 사용할 수 있다. 세포는 RetroNectin과 바이러스가 코팅된 바닥에 부착하면서 바이러스에 감염된다. RBV 방법은 모든 타입의 타겟 세포에 적용될 수 있고, 특히 유전자도입이 어려운 세포나 다량의 바이러스 stock을 이용해 감염시켜야 하는 세포에 효과적이다.

■ 유전자 도입시 저해물질을 제거하고 세포의 생존력을 높임

Packaging 세포 상층액에 포함되어 있는 저해물 질들은 유전자도입 효율을 현저하게 저하시킬 수 있고, 뿐만 아니라 다른 불순물이 존재하거나 과량의 바이러스 처리로 인해 민감한 세포의 생존능력에 영향을 미칠 수 있다³. RBV 방법을 이용한 유전자 도입에서 RetroNectin이 코팅된 플레이트에 바이러스를 결합시킨 후, 세포를 참가하여 감염시키기 전에 결합되지 않은 바이러스 입자나 기타 수용성 저해물질을 씻어낸다. 그 결

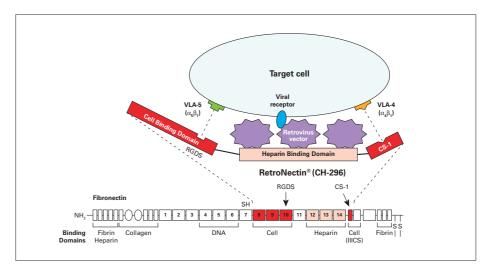


그림 1. RetroNectin greatly enhances virus-mediated gene transduction, RetroNectin is a chimeric recombinant peptide consisting of 3 functional domains derived from human fibronectin, that bind either cell surface proteins or virus. The enhancement is likely due to the colocalization of virus and cells on RetroNectin molecules, RetroNectin is most effective when viruses are first allowed to bind to RetroNectin-coated plates (or other cell growth substrates), followed by the addition of target cells,

² Bone marrow cells

³ Peripheral blood mononuclear cells.

continued...

과 타켓 세포에 적은 바이러스로 효율적으로 유 전자를 도입하고 세포 생존능력도 높일 수 있다.

■ 유전자 도입효율을 높이는 RetroNectin 다카라의 연구결과, RetroNectin을 이용한 방법이 다양한 세포타입에서 유전자 도입효율을 매우 높이는 것을 확인하였다. RetroNectin을 이용한 유전자 도입효율은 다음과 같았다; human CD34⁺ bone marrow cell 90%; human, nonhuman primate CD4⁺ T lymphocytes 70% 이상; K562, Jurkat을 포함한 human T lymphocyte cell line 80% 이상; HT1080 cell 90%. 다른 세포주에 대한 유전자 도입효율은 표 1과 같다.

■ Polybrene 없이 줄기세포와 Jurkat 세포의 유전자 도입효율을 높임

RetroNectin을 이용한 방법은 polybrene 또는 protamine에 의존하던 기존의 방법보다 훨씬더 효율적으로 인간 줄기세포에 유전자를 도입할 수 있다. 3가지 다른 타입의 인간 줄기세포에 각각 Pit-1 (GaLV Env protein의 receptor; 표 2)를 발현시켰을 때, RBV 방법을 이용하면약 50~75%의 유전자도입효율을 보였다. 반면 protamine 또는 polybrene을 이용한 일반적인유전자도입 방법을 사용하였을 때는 도입효율이 매우 낮았다.

유전자 도입이 어려운 Jurkat T-cell line에 RBV 방법을 사용할 경우 역시 높은 효율을 나타냈다. 그림 3에서 나타나듯 Jurkat 세포에서 retroviral vector와 lentiviral vector 모두 효과적으로 도입 됨을 알 수 있었다. Infection 후 유전자가 도입 되어 ZsGreen1을 발현하는 세포가 전체 세포의 75~95%를 차지하였다.

■ RetroNectin Reagent와 precoated culture dish의 사용

RetroNectin Reagent는 $4\sim20~\mu g/cm^2$ 의 비율로 플레이트를 덮을 수 있도록 $20\sim100~\mu g/m$ l의 농도로 플레이트에 코팅한다. 1 vial에 2.5 mg이 포함되어 있으며, 이는 $10\sim60~dish$ 를 코팅하기 충분한 양이다 (지름 3.5 cm, 표면적 $10~cm^2$). RetroNectin Precoated Dishes는 지름 3.5 cm dish에 $40~\mu g/m$ l이 코팅되어 있다.

班 2: Surface Protein Phenotypes of Some Human Stem Cells

Gene	hCD34 ⁺	hMSC	hADSC
VLA-4 ¹	+	_	+
VLA-5 ¹	+	+	+
Pit-1 ²	0.36	1	0.31

¹ VLA-4 and VLA-5 are integrins that bind Ret-roNectin,

² Pit-1 is the cellular receptor for the GaLV Env protein. These values represent Pit-1 expression relative to that of hMSC.

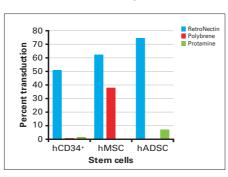


그림 2. RetroNectin-mediated transduction outperforms standard methods of transduction. A GaLV-pseudotyped retrovirus carrying a fluorescent protein marker was used to transduce human hematopoietic (hCD34⁺), mesenchymal (hMSC), and adipose (hAD-SC) stem cells, all of which express different levels of Pit-1 (the GaLV receptor) (see Table II). In each case, the RBV method transduced the stem cells more efficiently than either the polybrene- or the protamine-based method.

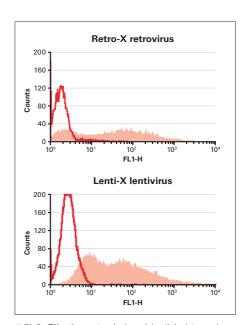


그림 3 Effective retroviral and lentiviral transduction of Jurkat cells on RetroNectin-coated plates. Jurkat cells were transduced with either retrovirus (Panel A) or lentivirus(Panel B) by using serial RBVbased transductions, Each VSV-G pseudotyped viruswas engineered to express ZsGreen1. Viruses were bound to RetroNectin-coated plates for 4 hr followed by incubation with the cells for 24 hr Following the first infection, the cells were collected and added to a second RetroNectin plate containing freshly bound virus. At 96 or 72 hr after the second round of retroviral or lentiviral infection, respectively, the cells were analyzed for fluorescent protein expression using flow cytometry. The transduced cells shownin Panel A were 75.5% positive with an MFI of 138; those shown in Panel B were 94.8% positive with an MFI of 120

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
RetroNectin Reagent	0.5 mg	T100A
	2.5 mg	T100B
RetroNectin Precoated Dishes	10 dishes	T110A

■ 참고문헌

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

^{*} License Notice: [16]