

Lentiviral delivery system에 관한 모든 것은 클론텍에서 Lenti-X™ Expression System

[1] 클론텍의 Viral Gene Delivery Systems

클론텍은 어떤 세포에도 적용할 수 있는 모든 바이러스 시스템을 갖추고 있다.

- Lentiviral 이나 retroviral 또는 adenoviral systems 중에서 선택 가능
- 모든 시스템이 고발현 구조를 갖고 있으며 inducible 시스템은 옵션
- 바이러스 생산이나 형질전환 유전자의 발현을 형광이나 선별 마커로 추적 가능
- 바이러스 titration kit나 adenovirus purification kit

[2] 고효율의 Lentiviral Packaging System

Lenti-X HT Packaging System은 다른 렌티바이러스 벡터와 병행하여도 높은 바이러스 titer를 생산할 수 있다.

- 다른 어떤 패키징 시스템보다도 25~50배 이상의 높은 titer
- 48시간내에 VSV-G pseudotype의 렌티바이러스를 형성
- 독특한 패키징 구조로 설계되어 자가 복제를 억제하기 때문에 안전한 바이러스를 생산
- 바이러스 상청액 10 ul 만으로도 플레이트내의 타겟 세포를 충분히 감염

재조합 렌티바이러스는 primary cultures나 비분열세포, 줄기세포 등을 포함한 거의 모든 종류의 포유류 세포에 유전자를 도입시킬 수 있는 대표적인 바이러스 벡터이다. 클론텍의 Lenti-X system vector와 Lenti-X HT Packaging System을 함께 사용하면 다른 어떤 렌티바이러스 시스템보다도 더 높은 titer의 바이러스를 생산할 수 있으며, 특히 packaging system은 기존의 다른 렌티바이러스 시스템보다 최고 50배 이상의 효율을 나타낸다. 그 예로, 비농축 상청액 1 ml 당 5×10^8 IFU (infectious units)까지 생산할 수 있다.

■ 시너지효과에 의한 최고의 성능 실현

Lenti-X HT Packaging System의 뛰어난 바이러

표 1. 클론텍의 Viral Gene Delivery Systems

	Lenti-X	Retro-X	Adeno-X
Target Cells			
Cell Lines (Dividing)	o	o	o
Primary Cultures (Dividing)	o	o	o
Primary Cultures (Nondividing)	o		o
Neurons	o		o
Stem Cells	o	o	o
Transgene Expression			
Stable	o	o	1
Transient			o
Constitutive	o	o	o
Inducible	o	o	o
Bicistronic/Dual Expression	o	o	
Expression Levels	oo	oo	ooo
Fluorescent Fusion Proteins	o	o	
Fluorescent Marker Virus	o	o	o
shRNA/RNAi	o	o	o
System Features			
High Titers	oo	oo	ooo
Safe, Replication-Incompetent	o	o	o
Broadly Tropic	o	o	o
Titration Kits	o	o	o
Purification Kits			o
Custom Services			o
Long-Term Stability/Storage			o

1 Stable in nondividing cells

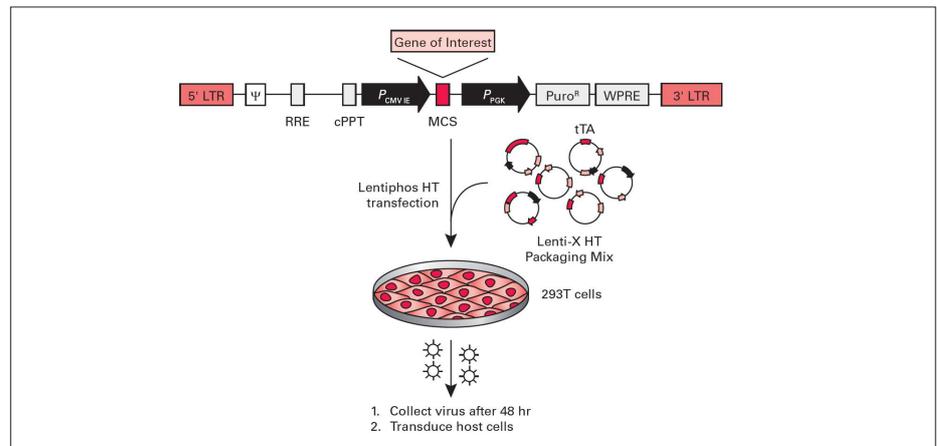


그림 1. The Lenti-X HT Packaging System. A lentiviral vector (e.g. pLVX-Puro) and the Lenti-X HT Packaging Mix are cotransfected into 293T cells using the highly efficient Lentiphos HT transfection system. High titer supernatants are ready for use 48 hr after transfection.

continued...

스 생산은 최적화된 시스템 구성요소들간의 시너지효과에 의한 것이다 (그림 1).

첫째, 클론텍의 새로운 **Lenti-X HT Packaging Mix**는 Gag-Pro, Tat, Rev, RT, IN과 VSV-G proteins을 높은 레벨로 발현하는 벡터에 의해 필수적인 렌티바이러스 패키징 구성요소를 완벽하게 제공한다¹⁾. 이처럼 여러 단백질들이 분리된 유전자로부터 발현됨으로써 바이러스의 안전성을 강화시키고, 또한 플라스미드가 이상적인 비율로 배합되어 있어 바이러스 생산성을 극대화 시킨다.

둘째, titer를 더 높이기 위해 Tet-Off transactivator (tTA)를 발현하는 벡터를 포함시켰다. 이 벡터는 테트라사이클린에 반응하는 프로모터가 있어 중요한 바이러스 단백질이 고발현되도록 유도한다.

셋째, 클론텍의 **Lentiphos HT** transfection system은 목적 렌티바이러스 벡터와 함께 혼합된 Lenti-X HT Packaging Mix의 플라스미드가 고효율로 293T cells에 도입되도록 한다.

이와 같이, Lenti-X HT Packaging System의 진보된 구성요소의 탁월한 조합으로 클론텍의 Lenti-X System 벡터와 병행 사용시 293T cells에서 고효율의 안전한 렌티바이러스를 생산할 뿐만 아니라, 다른 어떤 렌티바이러스 벡터와 사용시에도 고효율의 렌티바이러스를 생산하도록 설계되었다.

■ Lenti-X vectors

뛰어난 발현능과 도입효율을 지닌 바이러스를 최상의 titer로 생산하기 위해선 클론텍의 Lenti-X System 벡터를 사용해야 한다(pLVX-Puro; 그림 1). 이 벡터는 바이러스 게놈 프로세싱 서열 (viral genome processing sequences)을 모두 포함할 뿐만 아니라 벡터의 기능과 발현을 향상시킬 수 있는 구성요소를 가지고 있다. RNA processing과 핵외로 내보내도록 활성화시키는 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)는 titer를 높이도록 바이러스 게놈 전사체의 패키징을 향상시킬 뿐만 아니라 도입된 유전자(transgene)

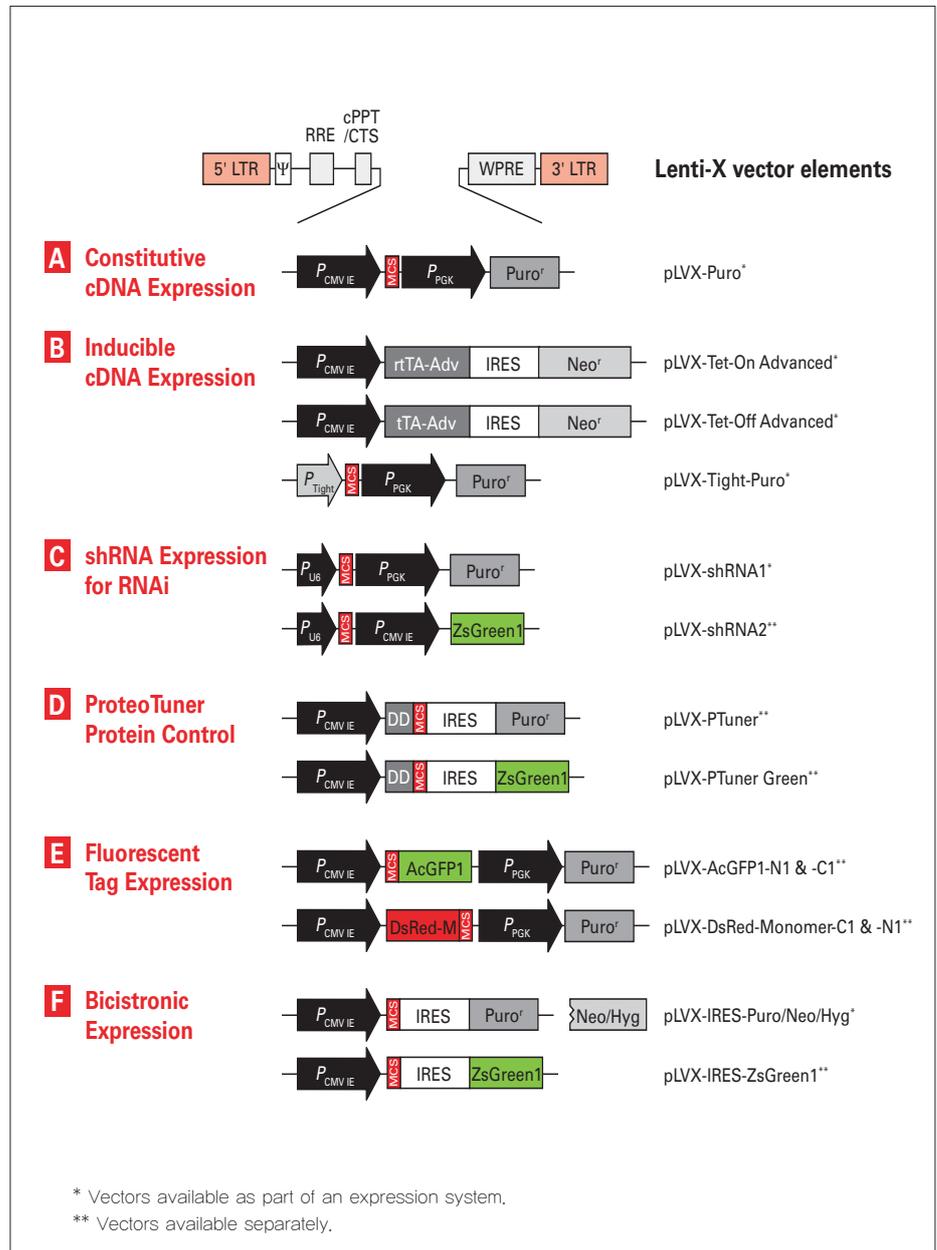


그림 2. **Lenti-X vectors for many applications.** Lenti-X vectors contain sequence elements that facilitate lenti-viral packaging, boost transgene expression, or both. Among them are the HIV-1 LTRs and packaging signal (Ψ), a Rev response element (RRE), the central polypurine tract/central termination sequence (cPPT/CTS), and the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE). All vectors are designed to be used with the Lenti-X HT Packaging System and the Lenti-X 293T Cell Line, which will produce high titers of VSV-G-pseudotyped lentivirus for transducing virtually any cell type. See article text for vector descriptions and applications.

Lentiviral delivery system에 관한 모든 것은 클론텍에서 Lenti-X™ Expression System

continued...

의 발현을 지원한다²⁾. Lenti-X vectors내 cPPT/CTS (central polypurine tract/central termination sequence)는 감염 후 바이러스 게놈의 핵내 도입을 증가시켜, 결과적으로 벡터의 융합(integration)과 도입효율을 높인다³⁾. 또한, 클론텍에서는 inducible 발현, shRNA 발현, 형광단백질 tag, Bicistronic 발현 등 다양한 응용실험이 가능한 Lenti-X 벡터들을 제공한다 (그림 2).

■ 안전하고 풍부한 렌티바이러스 생산

렌티바이러스 발현시스템은 이전에는 실험이 어려웠던 세포나 조직에 유전자 도입을 가능하게 하고, 분리된 유전자 패키징 시스템을 통해 재조합을 통한 바이러스 게놈의 자가복제(self-replicating viral genomes)를 방지함으로써 안전성도 확보하였다. Lenti-X HT Packaging Mix는 모든 재조합 렌티바이러스 발현 벡터를 효과적으로 패키징할 수 있는 필수 발현 구성요소의 독특한 조합으로 되어 있다. 안전성을 강화하기 위해, 다른 상용화된 시스템과 달리 Gag-Pol 활성이 분리되어 있어 타겟 세포로부터 바이러스성 복제 기능이 전이되는 것을 철저히 방지하고 있다¹⁾. 그러므로 목적 재조합 바이러스로 감염된 타겟 세포는 새로운 바이러스를 만들기 위한 필수적인 복제 구성요소가 충족되지 않을 것이다.

■ 최상의 titer와 신경계의 형질도입

293T cells에서 이런 바이러스 구성성분들의 일시적인 고발현은 트랜스팩션 48~72시간 후 VSV-G pseudotype의 렌티바이러스가 높은 titer로 생산될 수 있게 한다.

상층액의 titer는 농축과정 없이도 목적세포에 감염시켜 사용할 수 있을 정도로 충분히 높다. 예로, 바이러스 상층액 10 ul 정도로 배양액 내 대부분의 HeLa cell에 형질도입시킬 수 있다 (그림 3). Lenti-X HT System으로 생산된 렌티바이러스는 광범위한 바이러스 친화성(적용성, tropism)을 유지할 뿐만 아니라 신경계에서 유래한 형질도입된 세포의 특성을 잘 보존하고 있다 (그림 4).

■ 최고 효율의 패키징 시스템

클론텍의 Lenti-X HT Packaging System의 가장 중요한 특징은 패키징 배양액내의 거의 모든 세포에 원하는 Lenti-X expression vector와 함께 패키징 벡터를 도입할 수 있는 고도로 최적화된 트랜스팩션 프로토콜이다. 결과적으로, 각 세포는 바이러스를 생산하는 공장이 된다. 매우 효율적인 Lentiphos HT transfection system은 99%에 가까운 293T cells에 도입 효율을 보이는데, 이는 10 cm 플레이트의 293T cell에 5 x 10⁸ IFU/ml 까지 감염시키는 것을 말한다.

덧붙여 클론텍의 독특한 트랜스팩션법은 293T cell에 최적화된 변형 calcium-phosphate법으로, lipid 기반의 트랜스팩션법보다 독성이 적어 패키징 과정 동안 293T cells의 생존력을 높여 더 많은 바이러스를 생산할 수 있도록 한다.

Lenti-X HT Packaging System은 어떤 렌티바이러스 발현 시스템에도 필수적인 구성요소이며, 거의 모든 렌티바이러스 벡터와 함께 사용될 수 있다. 실질적으로 감염 후 다음 단계의 실험에도 적합하도록 안전한 높은 titer의 렌티바이러스 상층액을 쉽게 생산한다.

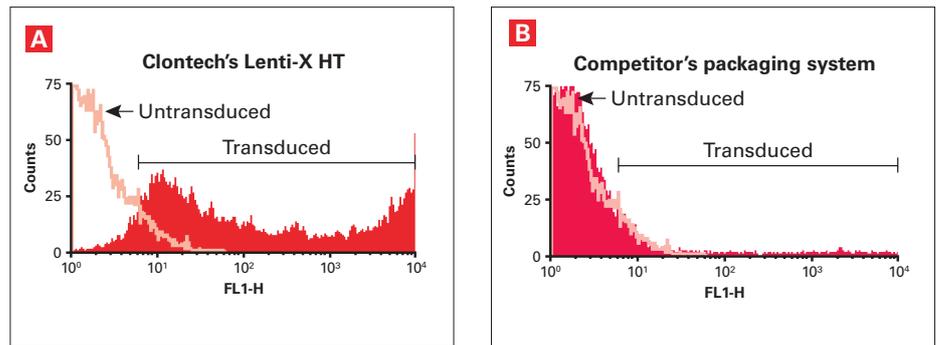


그림 3. High infectivity of supernatants produced by the Lenti-X HT Packaging System. The Lenti-X HT Packaging System (Panel A) and a packaging system from a competitor (Panel B) were each used to generate viral supernatants from their respective lentiviral system vector that was engineered to express the ZsGreen1 fluorescent protein. As little as 10 µl of supernatant from the Lenti-X HT Packaging System transduced the majority of these HeLa cells, whereas 10 µl of supernatant from the other system transduced only a small percentage of the cells. Transduced cells were quantified by flow cytometry

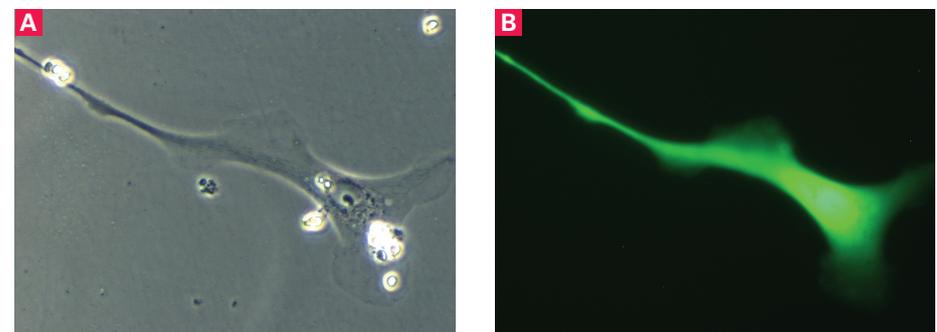


그림 4. Transduction of neural progenitor cells by Lenti-X lentivirus. Recombinant lentivirus for expressing ZsGreen1 was produced from the Lenti-X HT Packaging System and used to transduce normal human neural progenitor cells. A single transduced cell is shown under phase contrast microscopy (Panel A) and fluorescence microscopy (Panel B).

continued...

[3] Lenti-X Tet-On & Tet-Off Advanced Inducible Expression Systems

- Tet-Advanced inducible system을 적용하여 어떤 세포형태에서도 고효율의 렌티바이러스 형질 도입이 가능
- 높은 titer를 위해 Lenti-X HT Packaging System 포함
- 뛰어난 유도발현 조절과 매우 낮은 백그라운드

Lenti-X Tet On & Tet Off Advanced Inducible Expression system은 다양한 세포에 적용 가능한 강력한 렌티바이러스 유전자 도입 기술과 테트라사이클린에 의해 조절되는 유전자 발현 시스템의 범용성이 결합되었다(그림 5). 렌티바이러스 벡터는 간, 뇌, 근육이나 줄기 세포 등과 같은 다양한 조직에서 유래한 세포의 분열여부에 상관없이 모든 세포에 클론텍의 inducible 발현 시스템을 적용할 수 있다. 각 시스템은 두 개의 렌티바이러스 벡터로 구성되어 있다. Tet-On Advanced (rtTA-Advanced) 또는 Tet-Off Advanced (tTA-Advanced) transcriptional activator를 안정적으로 발현시키는 조절벡터와 목적유전자의 발현을 조절하는 반응벡터(pLVX-Tight-Puro)로 구성되어 있다.

또한 luciferase를 발현하는 반응벡터의 대조군과 클론텍의 Lenti-X HT Packaging System을 포함하고 있다.

■ Lenti-X Tet-Advanced Lentivirus의 높은 titer 생산

클론텍의 Lenti-X HT Packaging System의 Lenti-X Tet-Advanced System Vectors는 자가 복제되지 않는 안전하고 매우 높은 titer의 렌티바이러스를 생산한다. 이렇게 높은 수준의 바이러스가 생산될 수 있는 것은 클론텍의 Lenti-X HT Packaging Mix와 병용하여 사용되는 최적화된 Lentiphos HT transfection system 때문이다. Lenti-X HT Packaging Mix는 렌티바이러스 패키징 단백질과 복제 단백질을 고발현을 위한 최적화된 바이러스와 비바이러스성 발현 구조의 독특한 혼합물로 되어 있다.

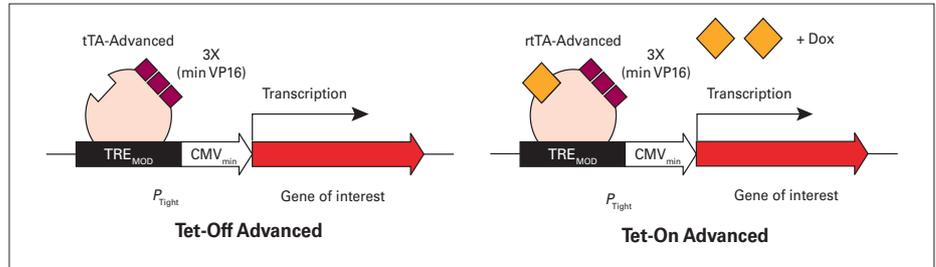


그림 5. Induced expression in the Tet-Off Advanced and Tet-On Advanced Systems. The Tet-controlled transactivators are fusion proteins that contain a DNA-binding TetR domain joined to three minimal transcription activation domains from HSV VP16. Each transactivator has been optimized for expression in mammalian cells. In Tet-Off Advanced Systems, the basal state is maintained in the presence of doxycycline (Dox), and induced by its withdrawal. Tet-On Advanced Systems are activated in the presence of Dox. System induction produces high-level transcription of your gene from P_{Tight} .

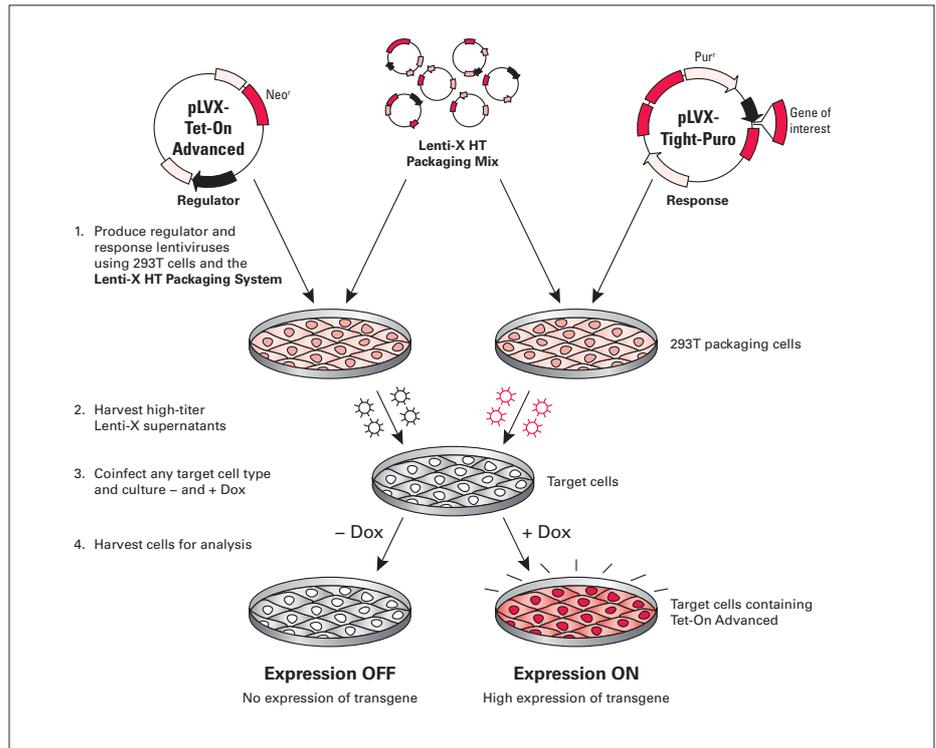


그림 6. Establishing an inducible gene expression system with Lenti-X Tet-On Advanced. Use the Lenti-X HT Packaging System and 293T cells to generate high-titer lentiviral supernatants from the pLVX-Tet-On Advanced Vector, and from the pLVX-Tight-Puro Vector containing your gene of interest. Simultaneously coinfect cultures of your target cells with the two lentiviruses (~8 hr). Then, after culturing for an additional 48-72 hr (+ and-Dox), harvest the cells for analysis. These same procedures also apply to the Lenti-X Tet-Off Advanced System, but the effects of Dox are reversed.

Lentiviral delivery system에 관한 모든 것은 클론텍에서 Lenti-X™ Expression System

continued...

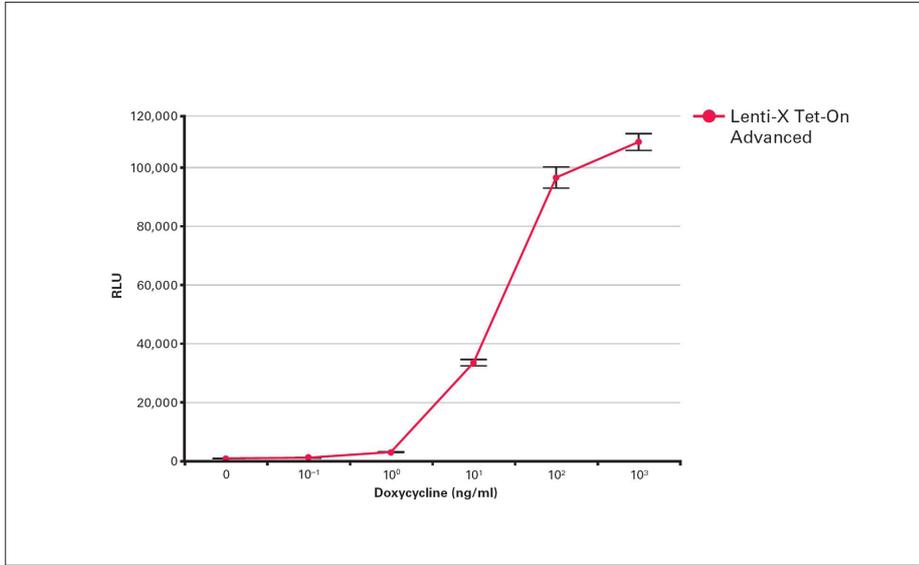


그림 7. **The Lenti-X Tet-Advanced Systems are highly inducible.** Using equal amounts of high-titer supernatants, HeLa cells cultured at the indicated concentrations of Dox were cotransduced for 8 hr with a LVX-Tight-Puro-Luc lentivirus and a LVX-Tet-On Advanced lentivirus. Cultures were harvested after 48 hr and assayed for luciferase activity. Luciferase was expressed at very high levels, while the basal/uninduced expression level was very low.

Lenti-X Packaging Mix와 함께 사용되는 Lenti-X Tet-Advanced System Vector는 293T packaging cells로 거의 100% 코트랜스펙션 된다. 이 결과 매우 높은 viral titer를 가진 상층액을 만들 수 있어, 별도의 농축 과정 없이 상층액을 곧바로 실험에 사용할 수 있다. 이는 높은 도입 효율 뿐만 아니라 inducible 시스템 셋업을 위한 시간과 노력을 절약할 수 있게 한다. 클론텍에서는 농축하지 않은 Lenti-X HT 상층액 10 ul 만으로도 6-웰 플레이트의 대부분의 HeLa cell 에 형질도입할 수 있었다(그림 3, 그림 6).

■ Tet-Systems Overview

클론텍의 Tet-Advanced System은 Gossen & Bujard⁴⁾의 inducible 발현법의 상위버전으로 Urlinger, *et al.*⁵⁻⁷⁾ (그림 5)에 의해 기술된 여러가지 중요한 개선점을 포함하고 있다. Inducible 시스템을 셋업하기 위해선 타겟 세포의 형질 도입에 pLVX-Tet Advanced Vector (Tet-On 또는 Tet-Off)와 pLVX-Tight-Puro Vector로부터 생산된 목적유전자를 포함하고 있는 높은 titer의

렌티바이러스 상층액을 이용한다(그림 6). 높은 바이러스 titer는 동시감염(coinfection) 동안 두 바이러스를 모두 가진 목적 세포에 높은 효율로 충분히 트랜스펙션(형질도입) 시킬 수 있을 것이다. 이런 높은 효율로 인해 안정적인 형질도입주를 선별하지 않고도 곧바로 유전자 유도발현 실험을 진행할 수도 있다. 또는 G418과 puromycin 으로 형질전환된 세포를 선별할 수도 있다. Tet-On Advanced System으로 형질전환된 세포는 Dox 처리시 목적유전자의 전사를 빠르게 개시할 것이다. 반면, Tet-Off Advanced System은 Dox가 없을 때 높은 수준의 유전자 발현을 가능하게 할 것이다.

■ 뛰어난 시스템 성능

강력한 유도 성능을 확인하기 위해 HeLa cell 에서 luciferase를 발현할수 있도록 Lenti-X Tet-On Advanced System을 만들었다. 먼저 조절백터와 luciferase 유전자(cDNA)를 발현하는 pLVX-Tight-Puro 반응백터(LVX-Tight-Puro-Luc)를 포함한 높은 titer의 렌티바이러스

상층액이 만들었다. LVX-Tet-On Advanced 상층액과 동량으로 LVX-Tight-Puro-Luc 상층액을 섞은 후, Dox가 농도별로 존재하는 HeLa Cell에 감염시켰다. 낮은 백그라운드와 inducible luciferase의 고발현을 통해 Lenti-X Tet 시스템의 우수한 성능을 확인할 수 있다(그림 7).

■ 동시감염법

클론텍은 Retro-X Tet-Advanced Inducible Expression Systems에서의 기술을 기반으로 inducible Lenti-X system을 최적화 시켰다. 반응백터(LVX-tight-Puro)가 조절백터(LVX-Tet-On 또는 Tet-Off Advanced)보다 많은 비율의 바이러스 상층액으로 타겟 세포에 감염시키면 목적 유전자를 최대로 발현 시킬 수 있다. 반면 조절백터의 비율이 많은 상층액의 경우 매우 낮은 백그라운드와 최대의 발현 유도율을 이룰 수 있다⁸⁾.

■ Single- & Double-Stable Cell Lines

안정적인 세포주를 생산하기 위해 Lenti-X Tet-Advanced System 내의 조절 렌티바이러스와 반응 렌티바이러스는 독립적으로 또는 순차적으로 사용된다. Lenti-X Tet-On 또는 Tet-Off Advanced virus로 형질 도입된 세포들은 다목적 single-stable Tet-Advanced host cell line을 생성하기 위해 G418로 선별되어진다. 이 세포주는 다른 P_{Tight}-controlled gene constructs의 수용체로서 작용한다. LVX-Tight-Puro lentivirus를 가진 single-stable Tet-responsive host cell line의 형질도입과 puromycin으로의 순차적인 선별에 의해 각 시스템으로부터의 구성요소를 모두 포함한 double-stable inducible cell line를 생산한다.

■ 렌티바이러스의 장점

다양한 형질도입이 가능한 렌티바이러스가 클론텍의 강력한 Tet-Advanced Inducible Expression Systems과 결합되어, 연구자들은 레트로바이러스 감염이나 일반적인 유전자 전달 기술로 사용하기 힘들었던 분화하는 primary cell과 줄기세포와 같은 세포나 조직에서의 inducible 발현 시스템을 적용할 수 있다. 렌티바이러스를 이용한 유전자 도입은 목적

continued...

백터가 숙주세포의 게놈에 효과적으로 삽입되는 기능성 형질도입주를 높은 빈도로 만들 수 있다. 높은 titer의 감염된 바이러스를 사용하면 형질 도입된 세포는 최대가 될 것이고 항생제 선별을 통해 안정적인 형질전환주를 선별하는 단계가 필요하지 않을 것이다.

Primary cell cultures나 형질도입이 쉽지 않은 세포에 inducible 시스템을 적용하려 하거나 효과적인 렌티바이러스 유전자 전달법을 이용하려고 한다면, 클론텍의 Lenti-X Tet-Advanced Gene Expression Systems을 추천한다.

■ 제품구성

Lenti-X HT Packaging System

- Lenti-X HT Packaging Mix
- Lentiphos HT

Lenti-X Tet-On or Tet-Off Advanced Inducible Expression System

- pLVX-Tet-On Advanced Vector 또는 pLVX-Tet-Off Advanced Vector
- pLVX-Tight-Puro Vector
- pLVX-Tight-Puro-Luc Control Vector
- Lenti-X HT Packaging Mix
- Lentiphos HT
- Tet System Approved FBS

■ 참고문헌

1. Wu, X. *et al.* (2000) *Mol. Ther.* 2(1):47-55
2. Zufferey, R. *et al.* (1999) *J. Virol.* 73 (4):2886-2892.
3. Zennou, V. *et al.* (2000) *Cell* 101(2):173-185.
4. Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(12):5547-5551.
5. Urlinger, S., *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14):7963-7968.
6. Inducible Gene Expression Systems (January 2007) *Clontechiques* XXII (1):1-2.
7. Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System (July 2006) *Clontechiques* XXI(2):1-3.
8. Inducible Retroviral Gene Expression Systems (July 2007) *Clontechiques* XXII (3):2-3.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
Lenti-X HT Packaging System	20 rxn	632160
	40 rxn	632161
Lentiphos HT	20 rxn	632151
Lenti-X Expression System	each	632164
Lenti-X Bicistronic Expression System (Neo)	each	632181
Lenti-X Bicistronic Expression System (Hyg)	each	632182
Lenti-X Bicistronic Expression System (Puro)	each	632183
Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System	each	632162
Lenti-X Tet-Off Advanced Inducible Expression System	each	632163
Lenti-X ProteoTuner System	each	632173
Lenti-X ProteoTuner Green System	each	632175
pLVX-DsRed-Monomer-N1 Vector	10 µg	632152
pLVX-DsRed-Monomer-C1 Vector	10 µg	632153
pLVX-AcGFP1-N1 Vector	10 µg	632154
pLVX-AcGFP1-C1 Vector	10 µg	632155
pLVX-IRES-ZsGreen1	20 µl	632187
Lenti-X shRNA Expression System	each	632177
pLVX-shRNA2 Vector	10 µg	632179
Lenti-X 293T Cell Line	1 ml	632180
Lenti-X qRT-PCR Titration Kit	100 rxns	632165

* License Notice: [1], [2], [3], [4], [5], [7], [8], [9]