Lentiviral delivery system을 위한 total solution

Lenti-X™ Expression System

■ 고효율의 Lentiviral Packaging System

- 다른 어떤 packaging system보다 2배 이상 높은 titer 생산
- 48 시간 내에 VSV-G pseudotype의 lentivirus 형성
- 독특한 packaging 구조로 설계되어 자가 복제를 억제한 바이러스 생산
- 바이러스 상등액 10㎕만으로도 plate 내의 target 세포를 충분히 감염시킴

재조합 lentivirus는 primary culture, non-dividing cell 및 stem cell 등을 포함한 거의 모든 종류의 포유류 세포에 유전자를 도입시킬 수 있는 대표적인 바이러스이다. Clontech의 Lenti-X™ system vector와 Lenti-X™ HT Packaging System을 함께 사용하면 기존의 어떤 lentivirus 시스템보다도 더 높은 titer의 바이러스를 생산할 수 있다. 특히, packaging system은 기존의 다른 lentivirus 시스템보다 최고 50배까지 더 높은 효율을 나타내며, 그 예로 비 농축 상등액 1ml 당 $5x10^8$ IFU (infectious unit)까지 생산할 수 있다.

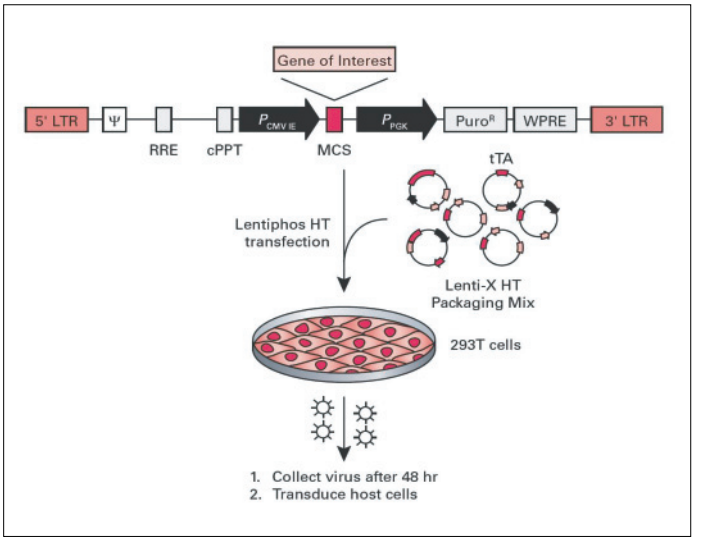


그림 1. The Lenti-X HT Packaging System. A lentiviral vector (e.g. pLVX-Puro) and the Lenti-X HT Packaging Mix are cotransfected into 293T cells using the highly efficient Lentiphos HT transfection system. High titer supernatants are ready for use 48 hr after transfection.

■ 구성 성분 간의 시너지 효과에 의한 최고 성능 실현

Lenti-X™ HT Packaging System의 뛰어난 바이러스 생산 능력은 최적화된 시스템 구성 성분들 간의 시너지 효과에 의한 것이다 (그림 1).

첫째, Clontech의 새로운 **Lenti-X™ HT Packaging Mix**는 Gag-Pro, Tat, Rev, RT, IN과 VSV-G protein을 고발현하도록 설계된 vector에 의해 lentiviral packaging에 필수적인 구성 요소를 완벽하게 제공[1] 할 뿐만 아니라, 이상적인 비율의 plasmid 배합을 통하여 바이러스의 생산성을 극대화시켰다. 이와 함께 여러 단백질들이 분리된 유전자로부터 발현됨으로써 바이러스 안전성도 강화되었다.

둘째, titer를 더 높이기 위하여 Tet-Off transactivator (tTA)를 발현하는 vector를 포함시킴으로써 tetracycline에 반응하는 강력한 promoter의 작용으로 아주 중요한 viral protein이 고발현 되도록 유도하였다.

셋째, Clontech의 최적화된 **Lentiphos™ HT** transfection system은 lentiviral vector와 혼합되는 plasmid인 Lenti-X™ HT Packaging Mix가 293T cell에 고효율로 도입될 수 있도록 하였다.
이와 함께, Lenti-X™ HT Packaging System의 진보된 구성 요소 간의 조합으로 Clontech의 Lenti-X™ System vector와 함께 사용하면 293T cell에서 고효율의 안전한 lentivirus를 생산할 뿐만 아니라, 다른 lentiviral vector와 사용 시에도 고효율의 lentivirus를 생산하도록 설계되었다.

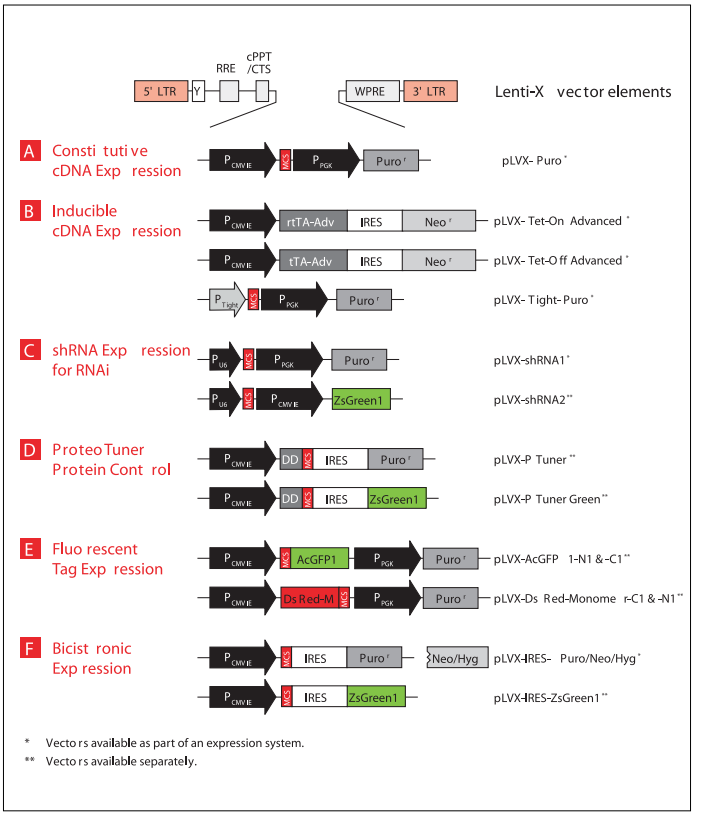


그림 2. Lenti-X vectors for many applications. Lenti-X vectors contain sequence elements that facilitate lentiviral packaging, boost transgene expression, or both. Among them are the HIV-1 LTRs and packaging signal (Y), a Rev response element (RRE), the central poly - purine tract/central termination sequence (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 system을 위한 total solution

Lenti-X™ Expression System

Continued…

■ Lenti-X™ Vector

뛰어난 발현과 도입 효율을 지닌 바이러스를 최상의 titer로 생산하기 위해서는 Clontech의 Lenti-X™ System vector를 사용하는 것이 좋다 (예: **pLVX-Puro**; 그림 1). 이 vector는 viral genome processing sequence를 모두 포함할 뿐만 아니라 vector의 기능과 발현을 향상시킬 수 있는 구성요소를 포함하고 있다. 특히, **WPRE** (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)는 RNA processing과 nuclear export 활성화를 통하여 viral genomic transcript의 packaging을 향상시켜 virus titer를 높이고, 도입된 transgene의 발현을 지원한다[2]. Lenti-X™ vector 내의 **cPPT/CTS** (central polypurine tract/central termination sequence)는 감염 후 viral genome의 nuclear import를 증가시켜, 결과적으로 vector integration과 도입 효율을 높인다[3]. 또한, Clontech에서는 inducible 발현, shRNA 발현, 형광단백질 tag, Bicistronic 발현 등 다양한 응용 실험이 가능한 Lenti-X™ vector를 제공한다 (그림 2).

■ 최상의 titer와 Neural Transduction

293T cell에서 이런 virus components의 일시적인 고발현은 transfection 48~72시간 후 높은 titer의 VSV-G pseudotype의 lentivirus가 생산될 수 있도록 하여, 상등액을 농축하지 않아도 목적 세포에 감염시켜 사용할 수 있을 정도로 충분히 높은 titer를 형성되게 한다. 예로, 바이러스 상등액 10 ㎕로 배양액 내 대부분의 HeLa cell에 형질도입 시킬 수 있다 (그림 3). 또한, Lenti-X™ HT System으로 생산된 lentivirus는 본래의 광범위한 종류의 세포에 쉽게 감염되는 성질을 그대로 가지고 있어, 신경계에서 유래한 세포에도 쉽게 형질도입이 가능하다 (그림 4).

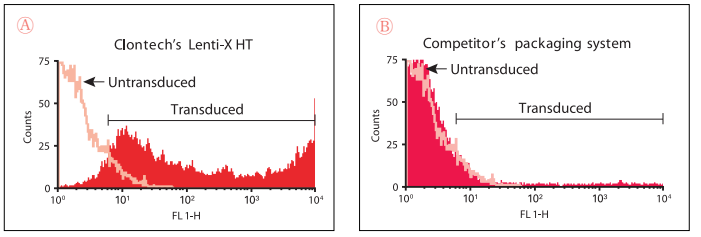


그림 3. High infectivity of supernatants produced by the Lenti-X HT Packaging System. The Lenti-X HT Packaging System (Panel A) and a packaging system from a competitor (Panel B) were each used to generate viral supernatants from their respective lentiviral system vector that was engineered to express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

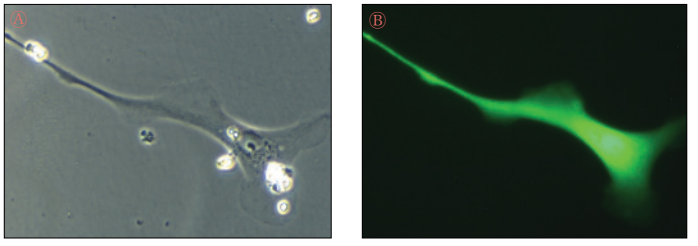


그림 4. Transduction of neural progenitor cells by Lenti-X Lentivirus. Recombinant lentivirus for expressing ZsGreen1 was produced from the Lenti-X HT Packaging System and used to transduce normal human neural progenitor cells. A single transduced cell is shown under phase contrast microscopy (Panel A)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

■ 최고 효율의 Packaging Cell Transfection

Clontech의 Lenti-X™ HT Packaging System의 가장 중요한 특징은 packaging 배양액 내의 거의 모든 세포에 원하는 Lenti-X™ expression vector와 함께 packaging vector를 도입할 수 있는 고도로 최적화된 transfection protocol이다. Lentiphos™ HT transfection system은 99%에 가까운 효율로 vectors를 293T cell로 도입할 만큼 충분한 효율을 보이는데, 이는 10 cm plate의 293T cell에 5 x 10^8 IFU/ml 까지의 virus를 생산할 수 있는 수준이다. 게다가 293T cell에 최적화하여 변형된 형태의 새로운 trnasfection 기술인 calcium-phosphate법은 lipid 기반의 transfection 법보다 독성이 적어 packaging 과정 동안 293T cell의 생존력을 높여 더 많은 virus particle를 생산할 수 있도록 한다.

Lenti-X™ HT Packaging System은 어떤 lentiviral expression system에도 필수적인 구성요소이며, 거의 모든 lentiviral vector와 함께 사용될 수 있다. 실질적으로 감염 후 다음 단계의 실험에도 적합하도록 높은 titer의 안전한 lentiviral supernatant을 쉽게 생산한다.

■ Constitutive Expression

Clontech의 기본적인 **Lenti-X™ Expression System**은 목적 세포에서 관심있는 cDNA를 지속적으로 고발현 시킨다. **pLVX-Puro Vector**는 transgene expression을 위한 CMV promoter와 puromycin selectable marker를 사용하고 있다 (그림 2).

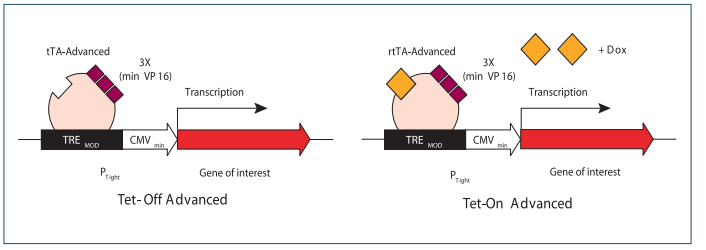


그림 5. Induced expression in the Tet-Off Advanced and Tet-On Advanced Systems. The Tet-controlled transactivators are fusion proteins that contain a DNA-binding TetR domain joined to three minimal transcription activation domains from HSV VP16. Each transactivator has been optimized for expression in 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 PTight.

Lentiviral delivery system을 위한 total solution

Lenti-X™ Expression System

Continued…

■ Inducible Expression

Clontech은 **Lenti-X™ Tet-On®과 Tet-Off® Advanced Inducible Expression System**의 2 종류의 lentivirus 기반 inducible expression system을 제공한다. 각 시스템은 Clontech의 tetracycline-regulated gene expression 기술을 기반으로 하고 있으며, doxycycline으로 tetracycline-inducible promoter인 pTight에 대한 Tet-On과 Tet-Off Advanced transcriptional activator의 결합을 조절하여, 목적 유전자의 고발현을 유도한다 (그림 5).

■ Lenti-X™ shRNA Delivery

RNAi 실험을 위해 높은 titer와 광범위한 host cell에 적용을 고려한다면 Clontech의 Lenti-X™ shRNA vector는 최적의 vector이다 (그림 2). Polyclonal cell population에 RNAi 실험 진행할 때, 높은 titer는 고효율의 transduction efficiency를 가능하게 할 것이다. **Lenti-X™ shRNA Expression System**은 목적 shRNA를 발현하고 puromycin selectable marker를 발현하는 pLVS-shRNA1 Vector를 제공한다. pLVX-shRNA2 Vector는 목적 shRNA나 fluorescent protein인 ZsGreen1을 함께 발현시킨다.

■ ProteoTuner™로 target protein의 발현 레벨 조절

Lenti-X™ ProteoTuner™ System (그림 3)은 목적 protein의 intracellular level을 신속하게 조절할 수 있다. 목적 protein과 융합한 destabilization domain (DD)은 proteasome에 의해 분해되지만, DD-binding ligand (Shield1)를 배양 배지에 넣어주면 protein이 분해되지 않도록 안정화되어 정상적인 기능을 할 수 있다. 따라서 Protein level을 Shield1의 첨가 또는 제거에 따라 신속하게 조절할 수 있다.

■ Fluorescent Protein Coexpression & Tag

Living Colors® Fluorescent Protein은 형질도입이나 발현의 사용되거나, protein localization을 모니터하고 추적하는 fusion tag으로 사용할 수 있는 강력한 도구이다. Clontech의 여러 종류의 Lenti-X™ vector는 internal ribosome entry site (IRES)를 포함한 bicstronic transcript로부터 또는 2 차 internal promoter로부터 ZsGreen1과 co-expression 할 수 있다 (그림 3). Clontech은 N-말단이나 C-말단 또는 green (AcGFP1)이나 red (DsRed-Monomer)로 목적 단백질과 융합하여 발현하는 4 종류의 Lenti-X™ vector 시리즈를 제공하고 있다 (그림 3).

■ Bicistronic Expression Vector

Clontech은 seletble marker와 동시에 co-expression하는 3 종류의 Lenti-X™ Bicistronic Expression System이 있다(그림 3). 이들 vector는 antibiotics resistance를 가진 transduced cell이 목적 protein을 고발현 하는지 확인 할 수 있게 한다. **pLVX-IRES-ZsGreen1 Vector**는 co-expression된 fluorescent protein, ZsGreen1을 통해 transduced cell을 시각적으로 확인하고 구분할 수 있도록 하였다.

어떤 cell이든지 stable genetic material을 도입하는 방법을 고려한다면 높은 titer와 다용도 expression이 가능한 Clontech의 Lenti-X™ system은 이상적인 실험 결과를 가져다 줄 것이다.

■ 관련제품

제 품 명	용 량	TaKaRa Code
Lenti-X™ Expression System	each	632164
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
Shield1	60 μl	631037
	200 μl	631038
	500 μl	632189
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
Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo)	each	632181
Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Hyg)	each	632182
Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Puro)	each	632183
pLVX-IRES-ZsGreen1	20 μl	632187
Lenti-X™ shRNA Expression System	each	632177
pLVX-shRNA2 Vector	10 μg	632179
Lenti-X™ HT Packaging System	20 회	632160
	40 회	632161
Lenti-X™ 293T Cell Line	1 ml	632180
Lentiphos™ HT	20 회	632151
Lenti-X™ Maxi Purification Kit	2 회	631233
	5 회	631234
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	200 회	631235
Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	96 회	632200
Retro-X™ qRT-PCR Titration Kit	200 회	631453
Adeno-X™ qPCR Titration Kit	200 회	632252
Adeno-X™ Rapid Titer Kit	120 회	632250

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

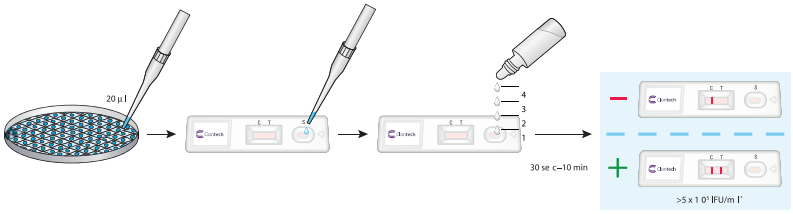
■ 참고문헌

1. Zennou, V. *et al.* (2000) *Cell* **101**(2):173-185.
2. Zufferey, R. *et al.* (1999) *J.Virol.* **73**(4): 2886-2892.
3. higashimoto, T. *et al.* (2007) *Gene Ther.* **14**(17):1298-1304.

* License Notice : [7, 8,9,10,11,12,13,14,15]

단, 30초만에 Lentivirus가 충분한지, 아닌지 알 수 있다!
Lenti-X™ GoStix™ - now you can!

- 단, 30초만에 lentivirus titer가 실험에 충분한지, 불충분한지 선별
- Lentivirus의 5 x 10^5 IFU/ml 이상 검출



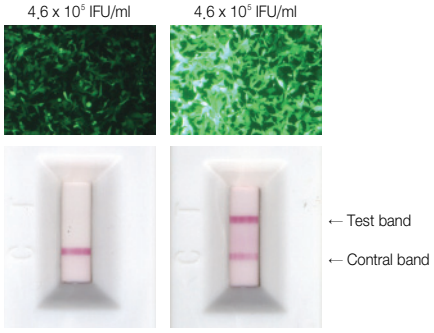
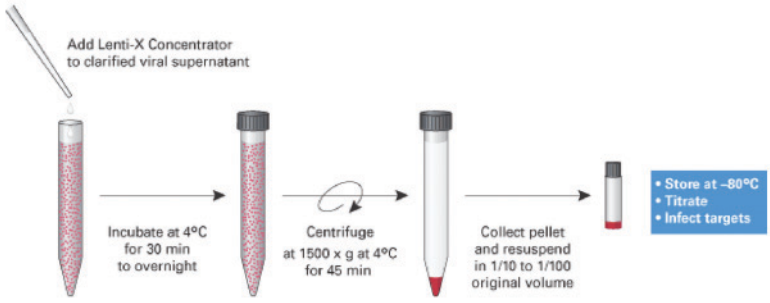


Figure 1. The Lenti-X GoStix protocol takes only 30 seconds.

최대 100배까지 Lentiviral supernantant 농축
Lenti-X™ Concentrator

- 농축으로 Lentivirus의 titer를 최대 100배까지 높임
- Ultracentrifugation 불필요, 매우 간편한 protocol: mix, wait & spin

TaKaRa Code	가 격
631213	324,000 원



제 품 명	용 량	TaKaRa Code
Lenti-X GoStix (20)	20 회	631243
Lenti-X GoStix (50)	50 회	631244
Lenti-X GoStix (200)	200 회	631241
Lenti-X Concentrator	100 ml	631231
Lenti-X Concentrator	500 ml	631232