Lentivirus Systems & Tools

Lentivirus Systems

- 최대 ~10⁸ IFU/ml의 매우 높은 역가의 렌티바이러스 조제 가능
- 48 시간 이내에 VSV-G pseudotype의 lentivirus 획득
- 5 개의 vector로 분리된 packaging mix를 이용하여 바이러스 감염에 대한 안정성 확보

Clontech의 Lenti-X Expression System (Code 632164)은 광범위한 세 포에 높은 역가로 적용할 수 있으며 발현효율을 높일 수 있도록 한 단계 더 발전된 렌티바이러스 시스템이다. RNA 바이러스 계열의 재조합 레 트로 바이러스 중 하나인 렌티바이러스는 비분열 세포와 줄기세포, 뇌, 간, 근육과 같은 *in vivo* 조직 등 거의 모든 포유류 세포를 감염 및 형질 전환하여 목적 단백질을 안정적으로 발현시킨다.

최적화된 Lenti-X Vector

Lenti-X vector는 렌티바이러스의 생산과 복제에 필요한 LTRs과 패키 징 서열을 가지고 있을 뿐만 아니라 이식유전자transgene의 발현과 역가 를 향상시킬 수 있는 요소를 포함하고 있다. WPRE 서열은 293T cell 에서의 바이러스 패키징을 향상시켜 역가를 증가시키고 성숙한 mRNA 의 생산을 촉진함으로써 목적 세포에서의 cDNA transgene의 발현을 높인다. cPPT element는 바이러스 게놈을 핵안으로 삽입시키는 과정 의 효율을 증가시켜 형질전환 효과를 향상시킨다. Lenti-X system은 항시발현하는 pCMV기반의 발현(Lenti-X Expression System)이지 만 Tet-On/Off 발현의 유도발현 시스템(Lenti-X Tet-On/Tet-Off Expression System) 또는 형광단백질과 융합한 재조합 단백질 발현 시 스템(AcGFP1 또는 DsRed-Monomer)과 같이 다양한 발현에 적용할 수 있다.



케너 나이어 ㅋㅗ

그립 1. 4th generation lentiviral packaging system. A lentiviral vector and the Lenti-X HTX Packaging Mix are cotransfected into 293T cells. High titer lentiviral supernatants are ready for use 48 hr after transfection.

최고의 성능을 갖는 패키징 시스템

시스템에 최적화된 구성 성분들 간의 시너지 효과에 의해 Lenti-X HTX Packaging System은 뛰어난 바이러스 생산 능력을 갖는다(그림 1).

첫째, Lenti-X HTX Packaging Mix는 렌티바이러스의 패키징에 필수 적인 구성유전자가 최적의 비율로 포함되어 있어 바이러스를 고효율로 생산 가능하다. 또한 이 구성요소들이 각각의 vector로 분리되어 있어 바이러스의 자가 복제를 억제할 수 있으므로 실험자의 감염 가능성을 현 저히 줄일 수 있다.

둘째, Tet-off 전사촉진에 의한 Tetracycline-responsive promoter elements(TREs) 조절로 렌티바이러스 패키징의 핵심 구성요소가 고발 현되어 높은 역가의 바이러스를 획득 가능하다.

셋째, Clontech의 렌티바이러스 시스템에 최적화된 나노입자 기반의 트 랜스펙션 시약인 Xfect는 효과적으로 유전자를 도입시켜 고효율의 렌 티바이러스를 생산한다. Xfect를 Lenti-X 293T 세포에 적용 시, 최대 95% 이상의 트랜스펙션 효율을 확인하였다.

렌티바이러스 관련 모든 제품군 보유

Lenti-X system은 거의 모든 세포에 적용할 수 있으며 특히 형질 도 입이 어려운 세포에 유전자를 도입하여 stable cell line이나 유도 발 현 시스템을 구축할 때 매우 유용하다. 추가로 Lenti-X 시스템에 포함 된 Lenti-X GoStix을 이용하면 30 초 ~ 10 분 이내에 렌티바이러스 의 감염 역가가 충분한지, 아닌지 확인할 수 있으며 만약 역가가 충분 하지 않다면 Lenti-X Concentrator를 이용하여 농축할 수 있다. 그 외 Clontech에서는 렌티바이러스를 정제하는 Lenti-X Maxi Purification Kit나 역가를 측정하기 위한 Lenti-X qRT-PCR Titration Kit, provirus의 역가를 측정하는 Lenti-X Provirus Quantitation Kit과 같 은 제품을 통해 효과적으로 유전자 도입이 가능하게 지원하고 있다.



그립 2. High infectivity of supernatants produced by Lenti-X. Lenti-X (Panel A) and a packaging system from a competitor (Panel B) were each used to generate virus containing a vector system for expressing the ZsGreen1 fluorescent protein. 10 µl of supernatant from each system was used to transduce HeLa cells. ZsGreen1-positive cells were quantified by flow cytometry Lenti-X transduced the majority of cells, whereas the other system transduced only a small percentage of the cells.

Lentivirus Transduction Tools

렌티바이러스 농축 시약

Lenti-X[™] Concentrator

- 짧고 간편한 프로토콜
- Ultracentrifugation 불필요
- 최대 100배 농축 가능, ~90% 회수율

단순한 프로토콜: mix, wait, spin

Lenti-X Concentrator를 이용하면 빠르고 쉽고 효과적으로 렌티바이 러스 농축이 가능하다. 이 프로토콜은 렌티바이러스 상층액에 Lenti-X Concentrator reagent를 첨가하고, 30 분 (~overnight) incubation 후에 일반 centrifuge를 이용하면(그림 3) ultracentrifugation 없이 1 시간 이내에 최대 100배까지 렌티바이러스 농축이 가능하다. Lenti-X Concentrator는 Clontech의 Lenti-X Systems을 포함한 대부분의 렌 티바이러스에 적용 가능하다.







그림 4. Efficient concentration with minimal loss. Lentiviral supernatant from a pLVX–ZsGreen1 vector was concentrated from 3 ml down to 30 µl using the Lenti–X Concentrator reagent, which reflected a 100–fold increase in viral titer. Measuring the total amount of virus contained in each sample indicated that the resuspended pellet captured 90% of the virus present in the original sample. Samples were titrated using HT1080 cells and analyzed by flow cytometry 48 hr post–transduction.

Ultracentrifugation 방법에 비해 간편함

Ultracentrifugation를 이용하여 렌티바이러스를 농축하는 것보다 Lenti-X Concentrator를 이용하는 것이 보다 빠르고 편리하며 효과적 이다(표1).

표1. Lenti-X Concentrator vs. Ultracentrifugation

Feature	Lenti-X Concentrator	Ultracentrifugation
Easily Scalable	Yes	No
Specialized Equipment	No	Yes
Time Required	~1 hr	4 hr to overnight
Ease-of-Use	++++	+
Yield	>90%	>90%

렌티바이러스 상층액 정제로 오염물질 제거 Lenti-X™ Maxi Purification Kit

- Gravity column 방식을 이용하여 렌티바이러스 입자 손상을 방지
- 세포 오염물질을 제거하여 transduction 효율 높임
- 최대 10배의 농축 효과와 60 ~ 80%의 회수율

Lenti-X Maxi Purification Kit를 이용하면 crude한 렌티바이러스 상 층액을 gravity column-base 방법을 이용하여 빠르고 간단하며 효과적 으로 렌티바이러스를 정제할 수 있다. Filter를 이용한 정제 방법은 렌티 바이러스 입자에 손상을 주거나 정제량을 감소시키는데 비하여 gravity column 방식은 실험 과정이 빠르고 간편하며 효과적이다. Gravity column은 세척 과정 동안 column을 통해 부착되지 않은 물질들이 통과 되고 상층액 내에 바이러스 입자들은 남아있게 되어, 정제된 바이러스는 온전한 형태와 기능을 잃지 않게 된다. 이 키트를 사용하여 바이러스를 정제하는 과정은 plasmid DNA를 정제하는 것만큼 간편하다.



그림 5. The Lenti-X Maxi Purification Kit allows you to generate high yields of purified lentivirus from crude packaging cell supernatants. The gravity column-based method (bind, wash, elute) is extremely simpleand effective, and preserves virus infectivity much better than filter-based methods.

렌티바이러스를 정제해야 하는 이유

렌티바이러스의 정제는 실험에 영향을 미칠 수 있는 세포 오염물질을 제거할 수 있다. 정제되지 않은 렌티바이러스 상층액은 잔존 plasmid DNA, 알려지지 않은 형질 도입 저해제, 세포 내 단백질과 혈청 단백질, 고도의 면역성 바이러스 단백질, 핵산, 바이러스 단편 등을 포함하고 있

다. 민감한 목적 세포 또는 *in vivo* 적용을 위해서는 렌티바이러스를 사용하기 전에 정제하여 오염물질을 제거하는 과정이 필요하다. 정제된 바이러스를 사용하면 'pseudo-transduction' 도 방지할 수 있다.

간단한 프로토콜

Lenti-X Maxi Column은 사용하기 편리하도록 구성되어 있다. 상층액 (9 ~ 45 ml)에 10 x binding buffer를 첨가한 후 column에 넣으면 중력 에 의해 시료와 buffer가 통과하고, 2 회 column 세척 과정 동안 불순물 들은 제거 후, 3 ml의 elution buffer로 정제된 렌티바이러스를 회수한다.

Filter system보다 뛰어난 회수력과 순도

바이러스 정제의 핵심은 바이러스의 감염력을 유지하고 뛰어난 바이러 스 회수능력을 발휘하는 것이다. 일반적으로 Lenti-X column은 시료 로부터 60% 이상의 감염력을 지닌 바이러스가 정제된다(그림 6). Anion exchange-based membrane system은 Lenti-X column 보다 낮은 회 수능력을 보이며 종종 20% 이하의 감염력을 지닌 바이러스가 정제되는 경우도 있다. Lenti-X column은 filter system보다 높은 바이러스 순도 와 매우 적은 단백질 검출을 보인다. Filter 정제 방식은 바이러스와 함께 정제된 외부 단백질을 다량 포함하고 있다(그림 7).



그림 6. Lenti-X Maxi Purification Kit yields are far higherthan the yields of filter-based methods. Panel A. Virus contentin the indicated Lenti-X column fractions was tracked using either Lenti-X qRT-PCR (RNA copies) or flow cytometry/fluorescence (IFU) titration. The mean values from seven experiments are shown. Panel B. In a headto-head comparison, Lenti-X column purification recovers more virus than a filter-based method.far fewer contaminating proteins at equivalent IFU than either sample prepared from the filter-based systems



그립 7. The Lenti-X Maxi Purification Kit yields highly purified lentivirus. Equivalent amounts of purified virus (1 x 10⁵ IFU) prepared using either the Lenti-X Maxi Purification Kit (Lenti-X) or a filter-based system (Vendor M & Vendor S) were subjected to SDS-PAGE and silver-stained. The Lenti-X sample clearly contained far fewer contaminating proteins at equivalent IFU than either sample prepared from the filter-based systems.

Instantly Test for Lentivirus Lenti–X™ GoStix™

- 30 초 ~ 10 분 이내에 렌티바이러스의 역가 판단
- 바이러스 회수 최적 타이밍 판단

Lenti-X GoStix으로 측정한 민감도 범위

Clontech의 pLVX vector중 ZsGreen1 형광 단백질을 발현하는 렌티바 이러스 벡터와 Lenti-X HTX Packaging System, Lenti-X 293T Cells 을 이용하여 렌티바이러스를 제작 후 Lenti-X GoStix으로 바이러스의 역가를 측정하였다. 붉은색 밴드가 선명하게 나타나는 경우의 역가는 ~5 x 10⁵ IFU/ml* 이다.

* 역가측정은 HT-1080 cell을 렌티바이러스를 형질도입 후 flow cytometry 이용하여 측정 하였다.

* 실험의 민감도는 사용하는 역가 측정 방법이나 렌티바이러스 패키징 시스템에 따라서 달 라질 수 있다.



Real Time PCR 방법을 활용한 역가 측정 Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit

- 4 시간 만에 렌티바이러스의 역가(RNA 역가) 측정 가능
- 정확한 역가 측정을 통해 재현성있는 바이러스 감염 실험 가능

Lenti-X qRT-PCR Titration Kit을 이용하면 RNA를 정제 후, SYBR Green I법을 이용한 One-Step qRT-PCR로 4시간만에 렌티바이러스의 역가를 측정 할 수 있다. 표준곡선 작성에 필요한 control RNA는 제품에 포함되어 있다. 또한 FACS나 콜로니 선별 등을 통해 바이러스의 생물학 적 역가(IFU/ml)와 RNA 역가(copies/ml)와의 상관관계(copies/IFU)를 미리 계산해 두면, 측정된 RNA의 역가를 통해 2시간 만에 생물학적 역 가를 추정하여 MOI(Multiplicity of Infection)를 결정할 수 있다.

ELISA법을 활용한 역가 측정 Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit

• 간단하고 빠른 ELISA기반의 역가 측정 방법

Lenti-X p24 Rapid Titer Kit는 ELISA 방법을 이용하여 HIV-1 기반 의 렌티바이러스 상층액에서 역가를 측정한다. 바이러스 상층액에 존재 하는 p24 capsid 단백질의 잔존량을 측정하며, 이 때 p24의 양은 바이러 스 역가와 직접적인 상관관계가 있다. 렌티바이러스 상층액를 anti-p24 capture antibody로 코팅된 96-well plate(12 개의 8-well strip으로 분 리 가능)에 넣고, 세척 후 결합된 p24는 biotinylated anti-p24 2차 항 체와 streptavidin-HRP, 발색 시약을 첨가하여 측정한다. p24 control 을 이용하여 표준 곡선을 만들고, p24를 동량으로 조정하여 상층액의 역 가를 산출한다.

p24는 무엇인가?

재조합 렌티바이러스를 연구 목적으로 제작할 경우, 3세대 또는 4세대 패키징 방법을 이용한다. 재조합 렌티바이러스의 구조 단백질은 VSV-G 또는 ecotropic envelope 단백질, 매트릭스 단백질과 바이러스 코어단 백질로 구성되어 있다(그림 8). Gag 유전자는 바이러스 capsid 단백질 (p24)과 nucleocapsid 단백질(p6과 p7), 매트릭스 단백질(p17)을 코딩하 고 있다. 이 구조단백질 중, Lenti-X p24 Rapid Titer Kit는 바이러스 상층액에 포함되어 있는 p24 단백질의 양을 측정한다.



그림 8. p24 is located in the lentiviral capsid and is one of 4 proteins encoded by the HIV-1 gag gene.

삽입된 렌티바이러스의 카피수를 측정 Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit

- Transduction된 세포로부터 integrated lentivirus(provirus)의 카피 수를 측정
- 실험 조건이나 세포 종류가 달라져도 형질전환시의 감염력을 일정하 게 유지하기 위해 사용

렌티바이러스를 감염시킨 세포의 genomic DNA 내에 삽입된 렌티바이 러스(provirus)의 카피수를 신속하게 측정하기 위한 제품이다. 프로바이 러스 카피수 측정을 통해 바이러스의 실제 유효한 역가(예: 효과적인 역 가)를 확인하고 정확한 MOI(multiplicity of infection)로 타겟 세포에 감 염이 가능해진다.

예측 가능하고 재현성 있는 유전자 발현

렌티바이러스를 이용하여 타겟세포에 목적 유전자를 도입할 때, 바이러 스의 MOI가 증가하면 유전자의 발현 레벨이 증가한다. 이는 보다 많은 렌티바이러스 카피수가 세포의 genomic DNA로 삽입되기 때문이다(그 림 9). 효과적인 렌티바이러스 MOI는 각각의 cell line에 따라서 달라질 수 있다(그림 10). Lenti-X Provirus Quantitation Kit를 이용하면 유 전자 레벨, cell line의 종류, 실험 시기와 상관없이 형질도입 효율을 평 가할 수 있다



그립 9. Higher proviral content is associated with higher expression levels. Provirus content in the genomic DNAs of HT1080 cells transduced at either high or low MOI were determined using the Lenti–X Provirus Quantitation Kit. AcGFP1 expression levels (MFI) were determined using flow cytometry. The figure represents data pooled from two groups having either low-copynumber ($\langle 3; n = 8 \rangle$ or high-copy-number ($\rangle 9; n = 7$) proviruses.



그립 10. Equivalent MOI in different cell types can result in different provirus copy numbers. HT1080, HeLa, and HEK 293 cell cultures were transduced at equivalent MOIs using a single lentiviral stock (100 µl). The provirus copy numbers in the genomic DNAs of the transduced cell populations were determined using the Lenti-X[™] Provirus Quantitation Kit.

Inverted PCR 분석으로 provirus 검출 확인

Lenti-X Provirus Quantitation Kit로 분석된 provirus의 카피수 의 결과를 확인하기 위해 proviral insertion junctions 부분을 invert PCR(iPCR)로 증폭했다(그림 11). 예상대로 low-copy-number 클론 에서는 단일 PCR 산물(~150 bp)이 생성되었으며, mixed polyclonal populations에서는 100 ~ 500bp 사이의 다양한 PCR 산물이 'smears' 하게 검출되었다. 이 결과는 proviral insertion이 많이 일어났음을 의 미한다. 두 종류의 실험 결과가 일치하였기 때문에, Lenti-X Provirus Quantitation 방법이 효용성이 있음을 확인하였다.



그립 11. Proviruses amplified by inverted PCR correspond to qPCR copy number. Provirus copy numbers were determined for genomic DNA purified from 106 stably transduced HT1080 cells representing either individual clones (Lanes 1-3) or polyclonal populations (Lanes 4 & 5). The DNA samples were also subjected to inverted PCR analysis to amplify individual provirus junction sequences using vector-specific primers (1). NTC = no template control.

Note: Not all proviruses can be amplified with this method.

Polybrene 없이 25분 이내에 magnetic bead를 이용하여 형질도입 Lenti-X™ Accelerator

- 렌티바이러스나 MMLV 레트로바이러스의 빠른 transduction 유도
- Stem cell과 같이 민감한 세포에 최적
- Starter Kit은 magnetic separator를 포함

Lenti-X Accelerator는 magnetic bead 기술을 기반으로 렌티바이러스 와 MSCV 레트로바이러스를 포함한 MMLV 레트로바이러스의 형질도입 을 촉진할 수 있도록 제작되었다. Polybrene을 이용할 경우, overnight 으로 노출시켜야 하기 때문에 시간이 오래 걸리고 독성을 나타내는 반면, Lenti-X Accelerator는 세포를 바이러스 상층액(viral supernatant)에 5분 만 노출시키면 되기 때문에 stem cell과 같은 민감한 세포 적용에 최 적이다.

빠르고 효과적인 형질 도입

Lenti-X vector를 이용하여 형질도입 효율을 비교해 보면 Lenti-X Accelerator는 polybrene을 이용한 것과 달리 불과 5분만에 높은 형질 도입 효율을 보인다 (그림 12).

Magnetic Separator





그림 12. Lenti-X Accelerator provides high transduction efficiency in a 25 min protocol. Lentiviral transduction of HT1080 cells was carried out for 5 min with Lenti-X™ Accelerator beads after a 20 min incubation to bind the beads to the virus—and for 5 min or overnight with Polybrene. After the cultures were grown for an additional 72 hr at 37°C, the number of transduced cells was determined by flow cytometry.



그림 13. A magnetic separator is included with the Starter Kit.

형질도입 방법을 변화하라 Viral Receptor Boosters

- 높은 형질도입 효율 일시적으로 목적 cell의 viral receptor 농도를 증가
- 간단한 프로토콜

타겟 세포에 효과적으로 바이러스를 도입하기 어려울 때가 있다. 실험실 에서 주로 사용되는 3 종류의 바이러스(레트로바이러스, 렌티바이러, 아 데노바이러스)는 세포 표면의 수용체 단백질을 통해서 세포 내로 도입된 다. 세포 표면에 수용체 단백질이 제한적으로 존재하면 형질도입 효율이 낮아진다. Clontech의 Viral Receptor Booster 기술은 쉽고 빠르게 타 겟 세포 표면에 수용체 단백질을 증가시켜 바이러스의 형질도입 효율을 증가시킬 수 있다.

Viral Receptor Boosters의 역할

Viral receptor booster는 exosome-like vesicles 또는 microvesicles형 태로 세포의 세포막에 viral receptor protein을 일시적으로 증가시킨다 (그림 14). 타겟 세포 표면에 바이러스 수용체 단백질이 증가함으로써 형 질도입 효율이 증가된다.



그림 14. The principle of Viral Receptor Booster technology.

Viral Receptor Boosters are concentrated exosome-like vesicles that are applied to target cells prior to infection with virus. Booster treatment increases the cell surface density of the receptor recognized by the infecting virus, thus increasing transduction efficiency. Using this technology, for example, you can coat human cells with the ecotropic receptor (which is otherwise absent), enabling them to be transduced with ecotropic retrovirus or ecotropic lentivirus.

Ecotropic Receptor Booster — human 세포에 ecotropic pseudotyped 렌 티바이러스 또는 레트로바이러스 감염

Viral Receptor Boosters를 이용하면 이전에 감염이 어려웠던 세포에 서 바이러스의 형질 도입이 가능하다. 예를 들면, human 세포의 경 우 일반적으로 mCAT-1 receptor이 발현되지 않기 때문에 ecotropicpseudotyped 렌티바이러스 또는 레트로바이러스를 이용하여 형질 도입 이 어렵다. 하지만 human cell에 ecotropic pseudotyped 렌티바이러스 를 형질 도입 시키기 전에 Ecotropic Receptor Booster에 미리 처리를 하면 ecotropic lentivirus를 이용하여 human 세포에 형질도입이 가능 하다(그림 15, 그림 16).



그립 15. Viral transduction of human cells with ecotropic lentivirus following Ecotropic Receptor Booster treatment. HT1080 cells were seeded in 6-well plates 24 hr prior to transduction and incubated with 10 µl Ecotropic Receptor Booster for 2 hr. Cells were then transduced with Lenti-X ZsGreen1 lentivirus (MOI=~15) produced using Clontech's Lenti-X HTX Ecotropic Packaging System (Code 631251) and assayed 48 hr later for ZsGreen1 expression.



그립 16. Ecotropic Receptor Booster aides transduction of ecotropic lentivirus. Panel A. Usually, it is not possible to infect Jurkat cells, hMSCs, or NHNPs with ecotropic pseudotyped lentivirus. However, pre-treatment of these cell types with Ecotropic Receptor Booster allows for very efficient transduction. Panel B. A panel of human cell lines, normally resistant to transduction by ecotropicpseudotyped lentiviral vectors, were efficiently transduced after treatment with Ecotropic Receptor Booster.

Lenti-X[™] Integration Site Analysis Kit

- GenomeWalker를 기반으로 provirus의 게놈 삽입 부위를 식별
- 대부분의 렌티바이러스 벡터에 적용 가능

Lenti-X Integration Site Analysis Kit는 GenomeWalker 기술을 기 반으로 렌티바이러스 벡터가 host genome DNA에 provirus로 삽입된 부분을 정확하게 분석할 수 있다. 렌티바이러스는 RNA genome virus 로서 DNA로 역전사 되어 host genome에 삽입된다. provirus는 host genome에 무작위로 삽입되기 때문에 목적유전자 및 endogenous 유 전자 발현에 영향을 줄 수 있다. 따라서 provirus의 삽입부위의 식별은 host cell의 표현형 연구에 중요하다.



그림 17. Flow Chart of the Lenti-X Integratin Analysis protocol

제품 리스트

Code	제품명	용량
632164	Lenti–X Expression System	each
631253	Lenti–X Expression System (EF1alpha)	each
632181	Lenti–X Bicistronic Expression System (Neo)	each
631187	Lenti–X Tet–On 3G Inducible Expression System	each
631189	Lenti-X Tet-Express Inducible Expression System	each
632177	Lenti–X shRNA Expression System	each
631247	Lenti-X HTX Packaging System	20 회
631251	Lenti-X HTX Ecotropic Packaging System	20 회
631258	Lenti-X HTX Packaging System (Integrase Deficient)	20 회
632180	Lenti-X 293T Cell Line	1 mQ
631231	Lenti-X Concentrator	100 ml
631233	Lenti–X Maxi Purification Kit	2 preps
631243	Lenti–X GoStix	20 회
631235	Lenti–X qRT–PCR Titration Kit	200 회
631239	Lenti–X Provirus Quantitation Kit	200 회
632200	Lenti–X p24 Rapid Titer Ki	96 회
631471	Ecotropic Receptor Booster	20 회
631263	Lenti-X Integration Site Analysis Kit	each

License Notice [K11, K19, K21, K25, K27, K29, K31, K38, K40, K45, K47, K62, K69, K72]