

Viral Expression Systems

Clontech의 다양한 바이러스 시스템 소개

- 다양한 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 시스템 제공
- 고효율 발현 시스템 뿐만 아니라 유도 발현 시스템도 선택 가능
- 형광단백질이나 선별마커로 바이러스 생산과 형질전환 유전자의 발현 추적 가능
- 다양한 바이러스 역가 측정이나, 농축과 정제 관련 제품 보유

Clontech은 거의 모든 포유류 세포에 유전자를 도입하여 발현시킬 수 있는 광범위한 재조합 바이러스 유전자 발현 시스템을 제공하고 있어, 실험 목적에 맞게 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 시스템을 선택하여 구축할 수 있으며 실험에 필요한 다양한 소모품도 제공하고 있다(표 1).

표 1. Features of Clontech's Viral Gene Delivery Systems

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

* Stable in nondividing cells

뛰어난 유전자 도입 효율과 안전성 제공

렌티바이러스나 레트로바이러스에 의한 형질전환은 목적유전자가 숙주의 게놈으로 삽입되어 세포가 분열을 해도 안정적으로 유전자 발현이 유지된다. HIV-1 기반의 렌티바이러스 시스템은 일반적인 MMLV 기반의 레트로바이러스로 형질전환시키기 어려운 줄기세포와 같이 비분열하는 세포에도 형질 도입할 수 있는 능력이 있다.

아데노바이러스 시스템은 광범위한 세포에 적용할 수 있으며 대량 바이러스 생산이 용이하다. 아데노바이러스는 숙주 게놈으로 목적유전자가 삽입되지 않으며, 많은 수의 세포를 효과적으로 감염시키고, 일시적이긴 하지만 결과적으로 매우 높은 유전자 발현과 재조합 단백질을 생산할 수 있다. 아데노바이러스를 이용한 유전자 발현은 세포 분열이 거의 없는 세포에서는 안정적으로 유지될 수 있다.

Clontech을 포함해 일반적으로 제품화되어 있는 바이러스 제작 시스템은 독성이나 복제에 요구되는 필수 유전자를 바이러스 vector에서 제거하고, 감염능력을 지닌 성숙한 바이러스(virion)는 복제를 위해 필수적인 요소를 패키징 세포로 특화하여 제한하였다. 그러므로 성숙한 바이러스내 유전자를 포함한 바이러스 게놈은 감염성을 갖지만, 목적 세포에서는 자가복제능력이 불완전하거나 제거되어 있다. 그러나 안전하게 재조합 바이러스를 다루기 위해 무엇보다 중요한 것은 각 나라에서 권장하는 Biosafety Level II 수준의 실험실 안전 사항을 준수하는 것이다.

유전자 카피수 조절의 장점

트랜스펙션 방법은 많은 양의 플라스미드 DNA를 세포로 도입하기 위한 방법으로, 발현시키거나 삽입시킬 플라스미드의 카피수를 조절하거나 예측할 수 없다. 반면 바이러스 시스템은 바이러스의 감염 양을 변경하여 타겟 세포로 들어가는 형질전환 유전자 수를 조절할 수 있다. 특히, Clontech의 바이러스 시스템은 매우 높은 역가로 구축할 수 있기 때문에 MOI(Multiplicity of Infection)를 조절하는 것이 가능하다. 더구나 레트로바이러스 vector는 세포 게놈으로 무작위로 삽입되기 때문에 트랜스펙션된 플라스미드가 특정 위치에 복수로 삽입될 수 있으며 트랜스제닉 유전자의 조절을 방해할 가능성도 있다. 따라서 바이러스 역가가 너무 높으면 희석 등의 방법으로 적절한 vector의 수를 포함한 세포로 조절할 수 있다. 반면 바이러스 카피수가 너무 적으면 유전자 도입 효율이 떨어져 충분한 효과를 얻기 어렵기 때문에 사전에 바이러스 역가를 측정하여 농축하거나 바이러스를 재생산해야 한다.

형질도입이 어려운 세포를 위한 렌티바이러스 시스템

높은 역가의 Lenti-X Expression System

Clontech에서는 광범위한 세포에 적용할 수 있는 렌티바이러스 시스템을 좀 더 높은 역가로 구축할 수 있고 유전자 발현 효율을 높일 수 있도록 한 단계 더 발전된 렌티바이러스 시스템인 Lenti-X Expression System(Code 632164)을 제공하고 있다. 렌티바이러스는 비분열하는 세포와 줄기세포를 포함해 뇌, 간이나 근육과 같은 *in vivo* 조직을 포함해 거의 모든 포유류 세포를 감염시키고 형질전환하며 안정적 발현을 가능하게 하는 RNA 바이러스계열의 다재다능한 재조합 레트로바이러스 중 하나이다.

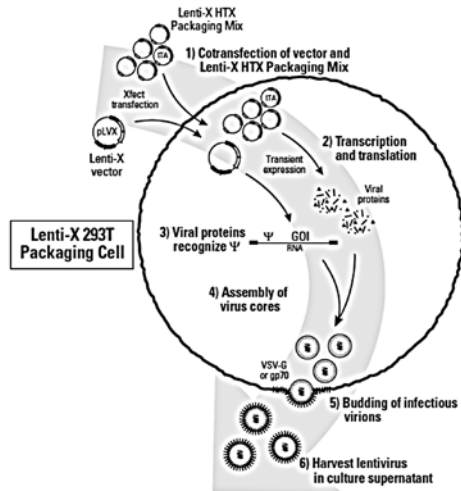


그림 1. Lentivirus production with the Lenti-X HTX Packaging System and Lenti-X 293T cells

(주) 바이러스는 감염성이 있지만 숙주세포에서 복제나 생산을 위해서는 여러 가지 중요한 유전자가 필요하다. 여러 개의 플라스미드를 사용해 바이러스 단백질을 발현하도록 하는 것은 바이러스 취급시 안정성을 확보하기 위한 것이다.

최적화된 Lenti-X Vector

Lenti-X vector는 렌티바이러스의 생산과 복제에 필요한 LTRs과 패키징 서열을 갖고 있을 뿐만 아니라 이식유전자transgene의 발현과 역가를 향상시킬 수 있는 요소element를 포함하고 있다. WPRE서열은 293T cell에서의 패키징을 향상시켜 바이러스 역가를 증가시키고 성숙한 mRNA의 생산을 촉진함으로써 목적 세포에서의 cDNA transgene의 발현을 높인다. cPPT element는 감염시키는 동안 바이러스 계놈의 핵안으로 삽입을 증가시키고 형질전환 효과를 향상시킨다. Lenti-X system은 항시발현하는 P_{CMV} 기반의 발현(Lenti-X Expression System)이나 Tet-On/Off 발현의 유도발현(Lenti-X Tet-On/Tet-Off Expression System) 또는 형광단백질과 융합한 재조합 단백질 발현(AcGFP1 또는 DsRed-Monomer)과 같이 다양한 발현에 적용할 수 있다. 렌티바이러스 생산 과정은 그림 1을 참고 바란다.

렌티바이러스 관련 모든 제품군 보유

Lenti-X system은 거의 모든 세포에 적용할 수 있으며 특히 형질 도입이 어려운 세포에 유전자를 도입하여 stable cell line을 구축하거나 유도 발현 시스템을 구축하고자 할 때 매우 유용하다. 추가로 Lenti-X 시스템에 포함된 Lenti-X GoStix을 이용하면 30초~10분 이내 렌티바이러스의 역가가 충분한지, 아닌지 확인할 수 있고 역가가 충분하지 않다면 Lenti-X Concentrator를 이용하여 농축할 수 있다. 그 외 Clontech

에서는 렌티바이러스를 정제하는 Lenti-X Maxi Purification Kit나 역가를 측정하는 Lenti-X qRT-PCR Titration Kit, provirus의 역가를 측정하는 Lenti-X Provirus Quantitation Kit과 같은 제품을 통해 효과적으로 유전자 도입이 가능하게 지원하고 있다.

Stable Cell Line 구축에 효과적인 레트로바이러스 시스템

레트로바이러스 발현

MLLV계열의 레트로바이러스 시스템은 유전자를 세포에 영구적으로 도입하는 가장 효과적인 방법 중 하나이다. 재조합 레트로바이러스는 시스템 구축이 쉽고 짧은 시간내에 생산이 가능하기 때문에, 분화하는 primary cell 배양이나 일반적으로 많이 사용되는 배양 세포에 stable cell line을 구축할 때 사용되고 있다. Clontech의 Retro-X Q System은 레트로바이러스 기반의 유전자 도입과 발현 시스템으로 분열하는 다양한 포유류세포에서 cDNA나 shRNA를 발현하는 레트로바이러스를 구축하는데 이용되고 있다.

고역가의 Retro-X Packaging

Clontech의 프리미엄 Retro-X Universal Packaging System(Code 631530)은 최대 3×10^7 IFU/ml까지 매우 높은 바이러스 역가를 지닌 바이러스를 생산할 수 있다. MMLV계열의 레트로바이러스 vector와 함께 사용할 수 있고 특정 타겟 세포에 적합한 패키징 바이러스를 쉽게 만들 수 있다. 레트로바이러스 발현 vector와 4개의 env gene vector 중 하나를 cotransfection시킴으로써 amphotropic, ecotropic, dualtropic 또는 pantropic (VSV-G) pseudotyped retrovirus로 패키징할 수 있다. Clontech에서 제공하는 여러 종류의 Retroviral Packaging Cell Lines을 이용하면 원하는 종류의 cellular tropisms을 가진 안정적인 레트로 바이러스를 간편하게 생산할 수 있다.

레트로바이러스의 역가 측정

일관성 있는 해석 결과를 얻고, 정해진 MOI로 목적세포를 감염시키고자 한다면 Retro-X qRT-PCR Titration Kit으로 레트로바이러스의 역가를 측정하는게 필요하다. 이 키트는 SYBR GreenI을 이용한 qRT-PCR 방법으로 신속하게 바이러스 계놈의 역가를 계산할 수 있다. 이 키트를 이용하면 4시간 이내 역가 측정이 가능하므로 바이러스 농축과 세포 감염을 하루만에 진행할 수 있다.

Retro-X Q Systems

Retro-X Q Vector Set를 이용하면 목적 유전자와 여러 선별 마커 중 하나를 IRES를 포함한 bicistronic transcript로 공발현 시킬 수 있다. 이러한 공발현 방법은 마커 내성을 지닌 클론의 대부분이 원하는 형질전환 유전자를 함께 발현하는 클론이라고 확인한다.

두 개의 유전자를 동시에 발현시키기 위해 IRES에 의해 분리된 2개의 MCS를 갖고 있는 pQCXIX Vector를 사용한다. 다양한 형광단백질을 발현하는 retroviral vector는 목적 단백질을 형광단백질과 융합하여 발현시키거나 IRES로 연결된 형광단백질 마커와 동시에 발현시키는데 이용할 수 있다. Retro-X Tet-On/Tet-Off Advanced Inducible Expression Systems을 이용하면 Retro-X Q Vector내 transgene의 발현을 유도할 수 있다. 이외의 다른 시스템을 이용하면 항시 발현을 하거나, 또는 RNAi를 통해 유전자 knockdown (Knockout RNAi Ready pSIREN-RetroQ Vectors and Knockout Tet RNAi Systems H and P)을 유도할 수도 있다.

고발현이 가능한 아데노바이러스 시스템

재조합 아데노바이러스를 이용한 발현

Clontech의 아데노바이러스 시스템은 목적 세포에 형질전환유전자를 도입하고 발현시키기 위한 바이러스 시스템으로 많은 장점을 갖고 있다. 이 시스템은 숙주계놈으로 목적유전자가 삽입되지 않아 도입유전자가 일시적(transient)으로 발현되지만 바이러스를 다량 생산할 수 있고 다양한 세포에 감염시킬 수 있는 능력이 있기 때문에 매우 높은 형질전환 유전자 발현과 단백질 발현을 가능하게 한다. 레트로바이러스와 달리, 아데노바이러스는 안정적이고 장기간 동결상태로 보관이 가능하다. 재조합 단백질을 최대한 발현시키기 위해, 여러 번 바이러스를 패키징 세포(HEK 293 cells)에 감염시키고, Adeno-X Virus Maxi Purification Kit으로 간편하게 대량의 바이러스를 정제함으로써 고역가의 아데노바이러스를 생산할 수 있다. 고역가의 바이러스를 이용해 감염시키면 감염된 세포가 많은 수의 virion을 포함하고 목적 재조합 단백질을 최대한 발현시킬 수 있다고 확신한다. 재현성 있는 결과를 얻기 위해서는 아데노바이러스의 역가를 정확하게 측정해야 하는데 이때 Clontech의 항체기반의 Adeno-X Rapid Titer Kit을 이용하면 E1이 제거되었거나 또는 wild type의 아데노바이러스 모두의 역가를 보통 3~4일 이내 측정할 수 있기 때문에 일반적인 plaque assay 방법보다 매우 빠르고 간편하다. 또한 4시간 이내 역가를 검출할 수 있는 Adeno-X qPCR Titration Kit와 바이러스 양이 충분한지 아닌지 2~20분만에 간편하게 확인할 수 있는 간편한 Adeno-X GoStix 제품도 출시되었다.

클로닝이 간편해진 Adeno-X Adenoviral Systems 3 출시

전통적인 바이러스 재조합 방법이나 HEK 293 기반의 재조합 방법과 비교해 최근에 출시된 Clontech의 Adeno-X Adenoviral Systems 3는 재조합 바이러스 생산을 매우 간편하게 만들었다. Clontech의 아데노바이러스 구축 시스템에는 ligase를 이용해 cloning하는 system 1과 In-Fusion cloning 방법을 이용하는 system 3으로 구성되어 있다. Adeno-X Adenoviral System 3는 긴 플라스미드를 클로닝하기 위해 shuttle vector에 클로닝 했다가 바이러스 vector로 subcloning해야 하는 복잡한 클로닝 과정 없이 곧바로 아데노바이러스용 플라스미드로 클로닝할 수 있도록 In-Fusion HD cloning 기술을 적용하여 재조합 바이러스 생산 과정을 혁신적으로 단축시켰다. 또한 CMV promoter를 통해 항시 강력하게 발현시키는 Adeno-X 시스템 뿐만 아니라 원하는 promoter를 삽입하여 구축할 수 있는 universal system, 형광단백질 발현을 통해 패키징 세포의 트랜스펙션 효율을 모니터링할 수 있는 시스템, 그리고 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 Tet-On 3G Inducible 시스템 등을 실험 목적에 맞게 선택할 수 있다.

결론

(1) 형질 도입이 어려운 세포를 이용하거나 (2) 일관성 있는 유전자 형질 도입이 필요하거나 또는 (3) 많은 양의 재조합 단백질이 필요할 때는 실험에 적합한 최적의 바이러스 시스템을 사용하면 목적 세포로 가장 효과적인 형질 도입과 유전자 발현이 가능하다. 실험목적에 적합한 바이러스 시스템을 선택하는 것이 실험의 성공을 위해서는 필요하다. Clontech의 바이러스 시스템은 성공적인 유전자 도입과 발현을 위해 최상의 바이러스 도입 시스템과 실험 과정에 필요로 하는 역가측정 키트, 정제와 농축 키트와 같은 관련 제품들을 잘 갖추고 연구자들의 실험을 지원하고 있다.

References

1. Zufferey, R. et al. (1999) *J. Virol.* 73(4):2886-2892.
2. Zennou, V. et al. (2000) *Cell* 101(2):173-185.
3. Retroviral Expression Systems (April 2007) *Clontechiques* XXII(2):46.
4. Retro-X™ Universal Packaging System (July 2007) *Clontechiques* XXII(3):1.
5. Inducible Retroviral Gene Expression Systems (July 2007) *Clontechiques* XXII(3):2-3.
8. Adenovirus Purification Kit (July 2007) *Clontechiques* XXII(3):6-7.
9. Adeno-X™ Virus Purification and Titration Kits (January 2007) *Clontechiques* XXII(1):8-9.

Code	제품명	용량
Lentiviral Vector Systems		
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 ml
631231	Lenti-X Concentrator	100 ml
631233	Lenti-X Maxi Purification Kit	2 preps
631243	Lenti-X GoStix	2 회
631235	Lenti-X qRT-PCR Titration Kit	200 회
Retroviral Vector Systems		
631508	Retro-X System	each
631512	Pantropic Retroviral Expression System	each
631530	Retro-X Universal Packaging System	each
631510	RetroPack PT67 Cell Line	1 ml
631505	AmphoPack-293 Cell Line	1 ml
631507	EcoPack 2-293 Cell Line	1 ml
631453	Retro-X qRT-PCR Titration Kit	200 회
631455	Retro-X Concentrator	100 ml
Adenoviral Systems		
631180	Adeno-X Adenoviral System 3 (Tet-On 3G Inducible)	each
632269	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV)	each
632266	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal)	each
631532	Adeno-X Maxi Purification Kit	2 Preps
632270	Adeno-X GoStix	20 회
632250	Adeno-X Rapid Titer Kit	120 회
632252	Adeno-X qPCR Titration Kit	each

License Notice

[K2, K3, K11, K13, K19, K20, K21, K22, K25, K26, K27, K29, K31, K37, K38, K39, K40, K45, K47, K62, K69, K72, K74, K89]