

가장 쉽고 빠른 아데노바이러스 시스템 구축

Adeno-X™ Adenoviral System 3

- 플라스미드(plasmid)에 클로닝하는 것만큼 쉽고 빠르게 아데노바이러스 Vector로 클로닝 가능
- Shuttle vector 없이 pAdenoX vector로 곧바로 클로닝
- 분열세포와 비분열세포 모두에 형질도입 가능
- 광범위한 숙주에 적용 가능하며 높은 역가와 높은 발현 가능

왜 유전자 도입에 아데노바이러스를 이용하는가?

아데노바이러스를 이용한 유전자 도입은 포유류 세포로 유전자를 도입하는 가장 신뢰할 만한 방법 중 하나이다. 아데노바이러스 감염은 세포주기에 의존하지 않기 때문에 형질전환된 세포주만큼 primary cell에도 유전자를 도입할 수 있다.

많은 세포가 재조합 계능의 복수 카피를 받아 들인 후, 목적유전자가 일시적으로 고발현하기 때문에 아데노바이러스는 포유류세포에서 단백질 발현을 위한 이상적인 툴이다. 추가적으로 아데노바이러스는 분열, 비분열에 상관없이 다양한 동물 세포(인간, 인간 외 영장류, 돼지, 설치류, 마우스, 토끼 등)에 감염시킬 수 있다.

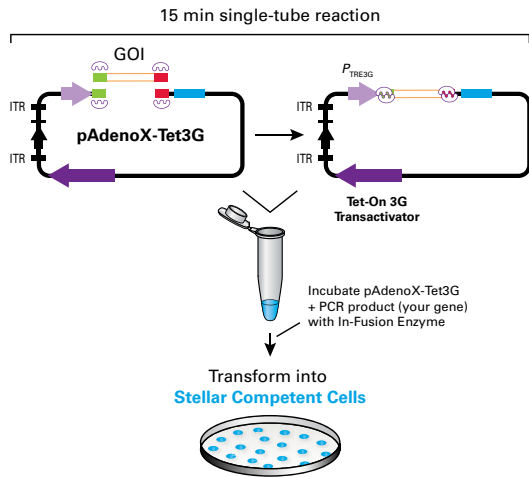


그림 1. Adeno-X Adenoviral System 3는 상용화된 아데노바이러스 유전자 도입 시스템 중 가장 진보된 제품으로 재조합 아데노바이러스 vector를 구축하는 가장 심플하고 빠른 효과적인 방법을 제공한다.

다른 플라스미드처럼 아데노바이러스 vector로 곧바로 클로닝

지금까지 상용화된 아데노바이러스 vector 시스템의 가장 큰 단점은 큰 플라스미드(~34 kb)로 클로닝하기 위해 복잡한 클로닝 과정을 필요로 한다는 것이다. Shuttle vector로 클로닝했다가 여러 *E. coli* 균주를 이용해 subcloning을 진행해야 했다. 이러한 과정은 실험과정을 증가시키고 실험과정상의 실수 가능성을 높여 왔다. Clontech의 바이러스 연구자들은 다른 플라스미드처럼 아데노바이러스용 플라스미드로 곧바로 클로닝할 수 있다면 실험과정을 혁신적으로 단축시킬 수 있지 않을까 생각했다. 그리고 그들은 In-Fusion HD cloning 기술을 적용하여 이를 가능하게 하였다.

가장 심플한 아데노바이러스 시스템

Adeno-X Adenoviral System 3를 사용한 재조합 아데노바이러스 제작

과정의 개요를 그림 2에 나타냈다.

이 시스템은 2개의 선형화된 DNA 사이의 15bp 상동 부위를 인지해서 융합시키는 In-Fusion HD 효소의 특성을 활용한 것이다. 미리 선형화된 pAdenoX vector와 상동 서열을 만들기 위해선 목적 유전자의 PCR primer에 vector의 15bp를 첨가하여 증폭하면 된다. Vector와 insert, 그리고 In-Fusion HD enzyme을 넣고 15분 동안 반응한 후 Stellar Competent Cells에 형질전환시킨다. 클로닝은 항상 방향성을 갖게 되며 클론의 90% 이상이 insert가 정확하게 삽입되어 있다. 이 제품은 클로닝 실험의 컨트롤 단편과 colony PCR에 사용할 수 있는 프라이머, 그리고 트랜스펙션에 적용할 수 있도록 플라스미드를 정제할 수 있는 NucleoBond Xtra kit을 포함하고 있다.

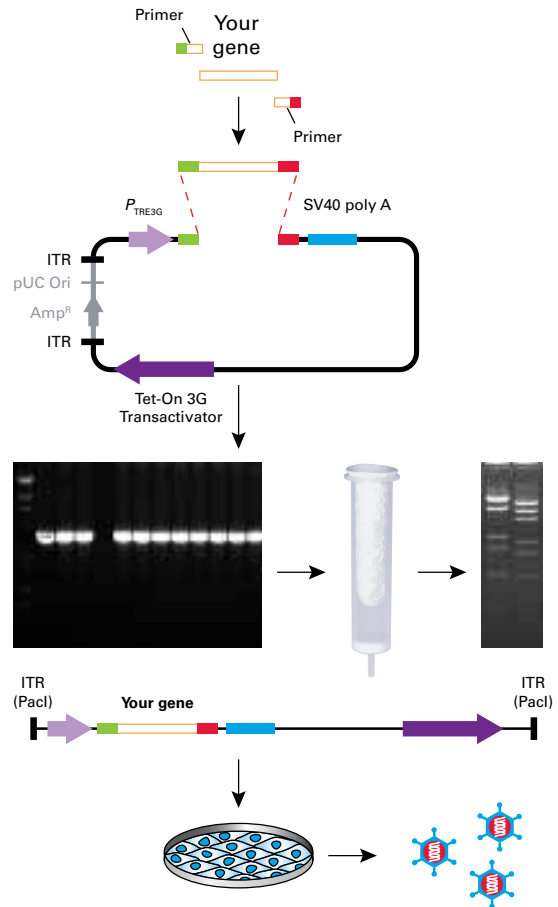


그림 2. Constructing recombinant adenovirus with In-Fusion technology. DNA sequences can be rapidly transferred as PCR products to any pAdenoX vector using the In-Fusion cloning method. In this example, your gene of interest is amplified with 15 bp extensions that are homologous to the ends of the linearized adenoviral vector. The PCR product is then purified and mixed with the linearized adenoviral vector of choice in the In-Fusion reaction. Following the reaction, a portion of the mixture is transformed into Stellar Competent Cells and screened. Once a PCR-positive clone is identified, the recombinant pAdenoX vector is amplified, purified, and subsequently linearized with the restriction enzyme PaclI, then transfected into HEK 293 cells for viral rescue and amplification.

다양한 종류의 제품 선택 가능

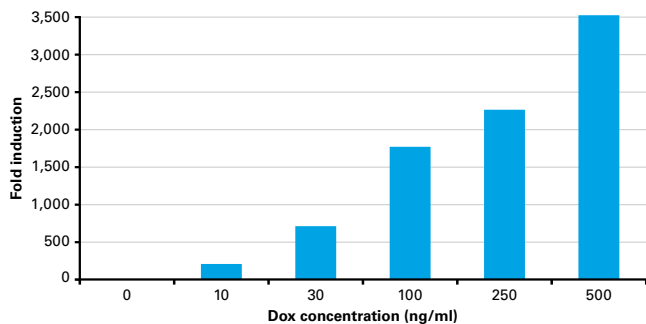
Adeno-X Adenoviral System 3는 7가지 형태가 있으며, 테트라 사이클린 유도발현 시스템이나 형광단백질 발현 유전자를 포함한

발현 시스템, 또는 연구자가 원하는 발현 카세트를 넣어 사용할 수 있는 universal systems도 판매되고 있다(표 1).

표 1 : Adeno-X Adenoviral System 3 Formats

Code	Product	Description	Vector Map
631180	Adeno-X Adenoviral System 3 (Tet-On 3G Inducible)	<ul style="list-style-type: none"> Tightly-controlled, doxycycline-inducible expression system 	<p>Tet-On 3G Transactivator</p>
632269	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV)	<ul style="list-style-type: none"> Constitutive expression from a CMV promoter 	
632268	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV, Red)	<ul style="list-style-type: none"> Constitutive expression from a CMV promoter Red fluorescent protein to easily monitor transfection and transduction 	<p>DsRed-Express</p>
632267	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV, Green)	<ul style="list-style-type: none"> Constitutive expression from a CMV promoter Green fluorescent protein to easily monitor transfection and transduction 	<p>ZsGreen1</p>
632266	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal)	<ul style="list-style-type: none"> Use any promoter and any polyA sequence Ideal for tissue-specific expression or expression of shRNA or miRNA 	
632265	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal, Red)	<ul style="list-style-type: none"> Use any promoter and any polyA sequence Ideal for tissue-specific expression or expression of shRNA or miRNA Red fluorescent protein to easily monitor transfection and transduction 	<p>DsRed-Express</p>
632264	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal, Green)	<ul style="list-style-type: none"> Use any promoter and any polyA sequence Ideal for tissue-specific expression or expression of shRNA or miRNA Green fluorescent protein to easily monitor transfection and transduction 	<p>ZsGreen1</p>

테트라사이클린 유도발현 시스템



pAdenoX-Tet3G에 목적유전자를 클로닝하면 유전자의 발현을 매우 민감하고 강력하게 조절할 수 있다. Tet-On 3G transactivator 단백질과 목적유전자를 조절하는 P_{TRE3G}가 동일한 아데노바이러스 vector에 포함되어 있기 때문에, 엄밀하게 조절되는 독시사이클린Doxycycline에 의한 발현도 쉽게 진행할 수 있다. 이 시스템을 사용하면 최대 3000배까지 발현 유도 시킬 수 있다(그림 3).

그림 3. The Adeno-X Tet-On 3G Systems generate very highfold induction, with up to 3000-fold difference between induced and uninduced states. Using equal amounts of high-titer supernatants, HeLa cells cultured at the indicated concentrations of Dox were infected with Adeno-X Tet-On 3G Luciferase virus. Cultures were harvested and assayed for luciferase activity.

어떤 발현 카세트(expression cassette)라도 universal vector에 클로닝 가능

Clontech에서는 CMV 프로모터를 포함한 제품 뿐만 아니라 프로모터와 polyA signal이 결핍된 vector가 포함된 universal system을 판매하고 있다. 프로모터부터 polyA까지 포함한 완벽한 발현 카세트(entire expression cassette)를 증폭한 후 In-Fusion HD를 이용하면 간편하게 클로닝할 수 있다(그림 4, Panel A). Universal systems은 연구자의 타겟 세포에 적합한 조직 특이적 프로모터를 삽입하여 발현시키는데 사용하거나 기존 플라스미드로부터 shRNA나 miRNA 발현 카세트를 universal pAdenoX vector에 삽입하여 고효율의 RNAi delivery system을 만들 수도 있다. 만약 발현 카세트가 없다면 일부 클로닝 효율의 감소는 있으나(표 2) 복수의 단편을 클로닝하여 원하는 발현 카세트를 만들 수도 있다(그림 4, Panel B).

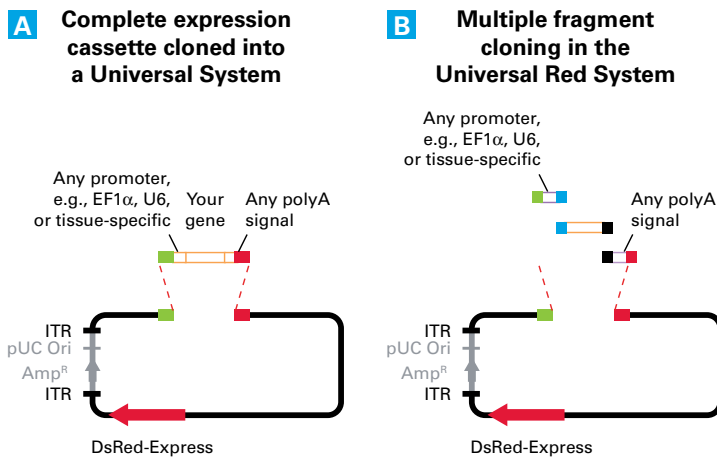


그림 4. The Universal Adeno-X Expression Systems contain vectors that lack a promoter and polyA signal in the cloning site. You can either clone an expression cassette from a preexisting construct into the vector (Panel A) or create a new one using multiple fragment In-Fusion HD cloning (Panel B).

고역가, 쉬운 증폭 그리고 높은 안정성

Adeno-X와 같은 재조합 아데노바이러스는 필수 E1 단백질을 제공하는 HEK 293과 같은 패키징 세포에서만 용해시킨다. 이 용해 기작(lytic mechanism)으로 인하여 하나의 세포에서 생산된 바이러스 입자가 인접한 패키징 세포를 재감염시키고 궁극적으로는 렌티바이러스에서 얻을 수 있는 것보다 더 높은 역가(>10⁹ IFU/ml)를 얻을 수 있다(표 3). 이와같이 아데노바이러스는 쉽게 바이러스를 생산할 수 있을 뿐만 아니라 매우 간편하게 증폭할 수 있다. 렌티바이러스 생산과 달리 트랜스펙션 조건 최적화가 필요하지 않고, 더 많은 바이러스를 생산하려면 기존의 아데노바이러스를 준비하여 HEK 293 세포에 감염시킨 후 기다리기만 하면 된다. 고역가의 아데노바이러스를 분주해서 얼려 놓으면 장기간 보관도 가능하다.

표 2 : Multiple Fragment Cloning Efficiency with the Adeno-X System 3

	Number of colonies (1/10th plated)	% correct
pAdenoX + 1 insert	200-300	90
pAdenoX + 2 inserts	200-300	60
pAdenoX + 3 inserts	25-40	25

표 3 : Adenoviral Gene Delivery vs. Lentiviral Gene Delivery

	Lentivirus	Adenovirus
Infects many different human cell types	Yes	Yes
Infects both dividing and non-dividing cells	Yes	Yes
Non-integrating virus	No	Yes
High level of protein expression (up to 10-20% total protein)	No	Yes
Ability to accommodate long inserts (up to 8 kb)	No	Yes
Easy to scale-up/amplify	No	Yes
Easy to get titers >10 ⁹ IFU/ml	No	Yes
Easy to get a multiplicity of infection >25 copies per cell	No	Yes

관련제품

Code	제품명	용량
631180	Adeno-X Adenoviral System 3 (Tet-On 3G Inducible)	Set
632269	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV)	Set
632268	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV, Red)	Set
632267	Adeno-X Adenoviral System 3 (CMV, Green)	Set
632266	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal)	Set
632265	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal, Red)	Set
632264	Adeno-X Adenoviral System 3 (Universal, Green)	Set

License Notice [K2, K20, K45]