

AAV2 vector를 이용한 생쥐 뇌 선상체(線狀體)의 유전자 도입

[방법]

1. AAV2-ZsGreen1의 조제

AAVpro Helper Free System (AAV2) (Code 6230)에 포함되어 있는 pRC2-mi342와 pHelper 및 pAAV-ZsGreen1 (Code 6231)을 이용해 AAVpro Helper Free System (AAV2)의 프로토콜에 따라 AAV2-ZsGreen1 바이러스 벡터를 제작하였다.

- 1) 전날에 파종한 293T 세포(T-225 플라스크, 10개)에 calcium phosphate법을 이용, 플라스미드를 도입하였다.
- 2) 플라스미드 도입 6시간 후에 2% FBS를 포함한 DMEM 배지로 교환하였다(40 ml/T-225 플라스크).
- 3) 플라스미드 도입 48시간 후에 플라스크당 0.5 ml의 0.5 M EDTA (pH 8.0)를 첨가하여 10분 처리 후 세포를 분리시켰다.

2. AAV2-ZsGreen1바이러스의 추출, 정제

AAVpro Purification Kit (AAV2)(Code 6232)를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 AAV2-ZsGreen1 바이러스를 정제하였다.

- 1) 원심 회수된 cell pellet을 tapping으로 충분히 풀어, 10 ml의 AAV Extraction Solution A을 첨가하였다.
- 2) Vortex로 세포를 완전히 현탁한 후, 5분간 두었다.
- 3) 다시 vortex한 후에 원심분리하여, 상층액을 회수 후 AAV Extraction Solution B를 1 ml 첨가하였다.
- 4) SD solution을 1 ml 첨가하여 37°C, 30분간 반응 후, 원심분리하여 상층액을 정제 전의 AAV2-ZsGreen1 바이러스 용액으로 하였다.
- 5) Prepacked Column을 10 ml의 Equilibration Buffer로 equilibration 하여, 4)에서 얻은 AAV2-ZsGreen1 용액을 컬럼에 적용하였다.
- 6) 10 ml의 Washing Buffer로 컬럼을 세척하고 3 ml의 Elution Buffer로 AAV2-ZsGreen1 바이러스 용액을 추출하였다.
- 7) 정제한 AAV2-ZsGreen1 용액을 kit내에 포함된 Filter Device와 Collection Tube를 이용하여 농축, 탈염하여, 최종적으로 약 500 µl의 정제된 AAV2-ZsGreen1 바이러스 벡터를 얻었다.

3. AAV2-ZsGreen1 바이러스의 titer 측정

- 1) AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) (Code 6233)을 사용하여 표준 프로토콜에 따라 정제한 AAV2-ZsGreen1 바이러스의 titer를 측정하였다. 최종적으로 2.4×10^{12} vg/ml 의 정제된 AAV2-ZsGreen1 바이러스를 얻은 것을 확인하였다.

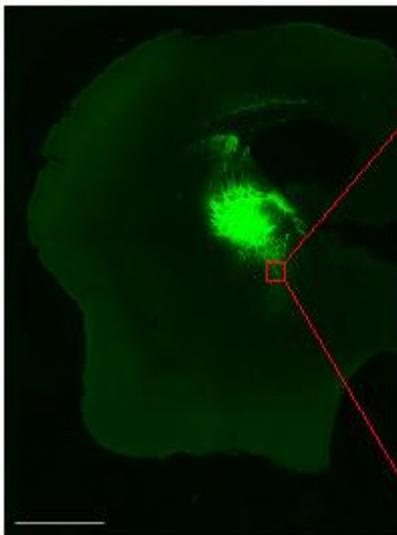
4. AAV2-ZsGreen1 바이러스 벡터의 생쥐 뇌 선상체에 투여

- 1) AAV2-ZsGreen1 바이러스를 1.86×10^{12} vg/ml 농도로 PBS에 희석해, 각각 5 μ l/point로 생쥐 뇌 선상체 (뇌의 일부) 좌우에 수술적인 방법으로 투여하였다.
- 2) 27일 후, 마취 하에 고정액 (4% 파라포름알데하이드를 포함한 용액)에 의해 수액 고정한 후 뇌를 적출하여 다시 4시간 동안 고정액에 처리하였다.
- 3) 동결 후 관상에서 절편을 제작하였다.

[결과]

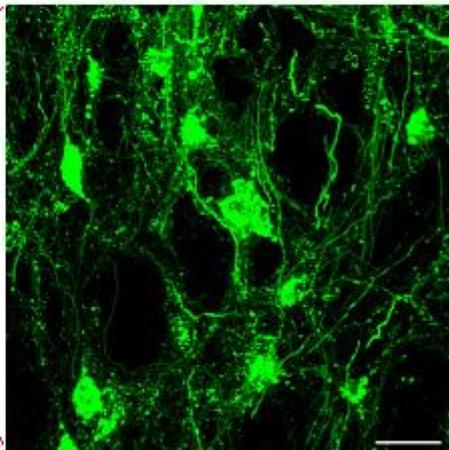
형광 현미경을 이용하여 선상체 전체에 걸쳐 ZsGreen1이 발현되어 강한 녹색 형광을 띄는 것을 확인하였다(그림 A: 뇌의 관상단면의 한부분을 나타냄). 또, 신경돌기를 따라 바이러스가 담창구*에 도달했고, 담창구의 신경 세포에서 ZsGreen1이 발현됨을 확인하였다(그림 B: 그림 A의 일부를 확대).

그림 A



Bar=1 mm

그림 B



Bar=30 μ m

* 담창구: 대뇌반구의 심부에 있는 회백질의 덩이