

# {Q&A}

Q\_1...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO Transfection Reagent (TaKaRa Code V2150)를 이용한 siRNA의 transfection은 어떤 세포를 이용하고 있나?

A\_1...

Mirus사에서 제공하는 A549, C6, CHO-K1, COS-7, DI-TNC1, HEK 293, HeLa, Hepa1c1c7, HepG2, MCF-7, NIH 3T3, Neuro-2a, SK-N-MC 세포주를 이용하고 있다. Firefly · luciferase 유전자를 미리 도입한 세포주에 대해서 *TransIT*<sup>®</sup>-TKO와 5 nM의 anti-firefly · luciferase siRNA를 이용해 transfection을 한 모든 세포주에서 firefly · luciferase의 발현이 80% 이상 knock-out 된 것을 확인하였다.

Q\_2...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO는 어떤 조성으로 되어 있나?

A\_2...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO는 독자적인 polymer와 지방질이 주성분인 시약이며 liposome은 아니다. 무균 상태를 유지하기 위해서 에탄올에 용해한다.

Q\_3...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO는 부유 세포의 transfection에도 사용할 수 있나?

A\_3...

할 수 있다. 접착 세포의 경우에는 *TransIT*<sup>®</sup>-TKO protocol과 동일한 방법으로 사용한다. 그리고 세포의 assay가 필요하다면 원심분리하여 세포를 회수한다. 도입 효율은 세포 밀도에 따라 다르므로 주의하여야 하며 transfection시에는 400,000 cells/ml (transfection 전에는 200,000 cells/ml)의 세포밀도로 테스트 하실 것을 권장한다.

Q\_4...

siRNA (dsRNA)의 annealing 방법은?

A\_4...

siRNA를 annealing buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris pH7.5, RNase-free water)로 90°C, 1분간 가열한 후, 37°C에서 1시간 동안 반응한다. siRNA의 희석도 위의 buffer를 이용한다.

Q\_5...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO와 siRNA의 복합체를 세포에 첨가할 경우, 혈청 함유 배지 (완전 배지) 안의 세포에 첨가하는 것이 좋은지 무혈청 배지의 세포에 첨가하는 것이 좋은지?

A\_5..

지금까지 테스트한 모든 세포에서는 혈청을 함유한 배지 안의 세포에서 복합체를 첨가했을 때 높은 도입 효율을 얻었다. 그러나 *TransIT*<sup>®</sup>-TKO와 siRNA의 복합체를 형성시키는 경우, 혈청이 복합체의 형성을 저해하기 때문에 무혈청 배지에서 수행해야 한다.

Q\_6...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO/siRNA 복합체를 transfection한 후, 배지 교환이나 배지 첨가를 해도 괜찮은지?

A\_6..

배지 교환이나 새로운 배지의 첨가가 필요한 경우는 transfection하고 24시간 후에 수행한다. 그 이전에도 배지 교환은 가능합니다. 만, siRNA의 transfection 효율이 저하될 수 있다.

Q\_7...

DNA와 siRNA를 동시에 transfection 할 수 있나?

A\_7..

할 수 있다. DNA를 *TransIT*<sup>®</sup>-LT1 (TaKaRa Code V2304T/V2300)로 transfection 하고 나서 4시간 후에 siRNA를 *TransIT*<sup>®</sup>-TKO로 transfection할 경우와 DNA와 siRNA를 동시에 *TransIT*<sup>®</sup>-LT1와 *TransIT*<sup>®</sup>-TKO를 이용해 transfection할 경우에도 도입 효율을 비교하였더니 차이는 없었다.

동시 transfection을 하는 경우 *TransIT*<sup>®</sup>-LT1, DNA, *TransIT*<sup>®</sup>-TKO, siRNA의 순서로 첨가하여 복합체를 제조하는 것이 중요하다.

Q\_8...

*TransIT*<sup>®</sup>-TKO를 이용해 2종류의 siRNA를 동시에 transfection 할 수 있나?

A\_8..

할 수 있다. *TransIT*<sup>®</sup>-TKO의 양을 바꾸지 않고 2종류의 siRNA를 동시에 transfection 하는 것이 가능하다.