



다양한 생물의 RNAi protocol을 알아!-1

멍게의 RNAi protocol

서론

멍게의 올챙이형 유생은 척추동물 체제의 원형을 나타내며, 척색이나 등쪽에 위치하는 관상 중추신경계 등 척추동물과의 공통점을 여러 곳에서 찾아볼 수 있다. 한편 멍게의 유전자수는 1만 5천정도 (사람의 2분의1 이하)로 보고 있다. 척추동물에서는 기능이 중복되는 유전자가 2개 이상인 경우가 많아 1개의 유전자 기능을 억제해도 다른 유전자 기능이 그것을 보충하는 경우가 많다. 이에 반해 멍게는 유전자 중복이 거의 없어 1개의 유전자 기능을 저해했을 때 그에 따른 표현형을 얻을 가능성이 높다. 최근 멍게에서는 대규모 cDNA 해석과 게놈 해석이 급속한 진전을 보여, 발견된 많은 유전자 기능해석이 풀어야 할 과제로 남아 있다.

RNAi (RNA interference)는 부분적인 cDNA 서열정보만 있으면 유전자 기능을 저해할 수 있어 대규모 cDNA 해석 프로젝트와 함께 추진하는 유전자 기능해석법으로서 유망하다. 멍게를 이용한 RNAi 기술로는 *in vitro*에서 합성한 double strand RNA를 electroporation이나 microinjection으로 배(胚)에 도입하거나 cDNA를 promoter의 downstream에 연결하여 배세포에 hairpin RNA를 발현시키는 방법 등이 시도되어 왔다 (Harafuji N and Levine M; 私信). 멍게에서는 RNAi의 성공한 예는 매우 적으며, 아직 안정적인 방법으로서 확립되어 있지 않다. 본 고의 protocol은 아직 완벽하진 않지만 좀더 세련된 기술 개발에 초석이 될 수 있으므로 참고하기를 바란다.

Electroporation법

Electroporation에 의한 멍게의 배(胚)의 유전자 도입은 이미 확립되어 있는 방법이다³⁾. 히드라에서는 electroporation에 의한 RNAi 성공예가 있다⁴⁾. Electroporation은 microinjection에 비해 다량의 double strand RNA를 필요로 하지만 조작이 쉽고 한번에 다수의 배에 도입이 가능하다.

준비

기구

- Thermal cycler
- 유전자 도입장치 (Bio-Rad Gene Pulser II, Capacitance Extender 첨부)
- Petri-dish
- 24 well plate

시약

- cDNA (pBluescript II에 재조합되어 있는 것이 좋다)
- PCR primer (M13F[5' -GRAAAACGGCCAGT-3']과 M13R[5' -AACAGCTATGACCATG-3'])
- Taq DNA polymerase (TaKaRa)¹⁾
- T3 RNA polymerase (Promega)¹⁾
- T7 RNA polymerase (TaKaRa)¹⁾
- NTP mix (GIBCO BRL)
- RNase inhibitor
- DNase I
- DEPC 처리수
- 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-citrate, pH7.0; DEPC 처리)
- RNase A
- RNase T1
- Agarose (0.9% SeaKem agarose 준비)
- Actinase E

- Sodium thioglycolate (분말은 -20℃ 보관)
- 1,54 M Mannitol

*1 일반적인 시약을 사용해도 된다

MEMO

초기의 몇몇 논문을 비교해보면 cDNA가 길수록 효과는 크지만 비특이적인 영향이 나오기 쉽다^{5)*6)}. 본 고에서는 많은 단백질에 보존되어 있는 기능 domain를 coding하는 영역을 피하고, 300 ~ 800 bp 정도의 cDNA 단편을 주형으로 하고 있다. pBluescript II의 multicloning site 양쪽에는 T3 promoter와 T7 promoter가 있다. M13F와 M13R을 이용해 PCR을 실시하면 양 promoter를 포함한 cDNA를 증폭할 수 있다. Negative control로는 초파리의 게놈 DNA 단편 (유전자 enhancer 영역으로 전사되지 않는 서열)의 double strand RNA를 이용하고 있다.

방법

1. 주형 cDNA 증폭

1) 반응액 준비.

Template	약 5 ng
10×PCR buffer (TaKaRa Taq 첨부 Mg ²⁺ -free)	5 μl
25 mM MgCl ₂	3 μl
2,5 mM dNTP mix	4 μl
Primer (M13F와 M13R)	각각 0.5 pmol/μl
5 units/μl Taq DNA polymerase	0.25 μl
Total	50 μl

2) PCR 반응.

94℃, 1분 → 94℃, 30초 → 53℃, 60초 → 72℃, 90초×30 cycle → 72℃, 5분

3) PCR 산물 정제.

일반적으로 phenol/chloroform 추출, ethanol 침전을 수행한 후 DEPC 처리 H₂O로 정량하여 50 μg으로 만든다.

2. Double strand RNA의 합성

1) 반응액 조제

정제한 PCR 산물	50 μg
10×Transcription buffer	50 μl
10 mM NTP mix	80 μl
100 mM DTT	50 μl
RNase inhibitor	50 μl
T3 RNA polymerase 또는 T7 RNA polymerase	200~500 units ²⁾
Total	500 μl

*2 500 μl 반응액에 10 μl 비율로 첨가

2) 37℃, 3시간동안 incubation.

3) 반응액에 직접 10 units/μl DNase I 을 10 μl 첨가하고 37℃, 30분 동안 incubation.

4) Phenol/chloroform 추출과 ethanol 침전을 수행 한 후, RNA를 DEPC

처리수 120 μl에 용해. 일부 전기영동용 시료로 따로 보관.

5) 65℃, 5분간 incubation하여 RNA를 변성.

6) 상보적인 RNA를 혼합 (total 240 μl)하고, 65℃, 15분 incubation.

7) 20×SSC를 첨가하고 65℃, 10분 incubation한 후 실온에 두어 천천히 식힘.

8) 0.01 μg/μl의 RNase A와 RNase T1³⁾을 첨가하고 실온에서 1시간 incubation.
*3 Double strand RNA 말단에 17 염기 이상의 overhang이 있으면 RNAi 현상의 처음 단계인 double strand RNA 단편화가 일어나지 않는다는 보고가 있다³⁾. 본 실험에서는 RNase A와 RNase T1을 이용하여 annealing 후의 double strand RNA 말단이 평할 말단에 근접하도록 하였다. 또한 RNase 처리 후에 전기영동으로 band가 확인되면 double strand RNA가 생긴 것이다.

9) Phenol/chloroform 추출, ethanol 침전 후 RNA를 멸균수에 용해하여 정량.⁴⁾

*4 DEPC가 남아 있으면 배발생에 영향이 있을 위험성이 있다.

10) 합성 직후의 single strand RNA와 annealing 후의 RNA를 나란히 agarose 전기영동을 행하고, double strand RNA가 있는지 확인 (그림 1). Double strand RNA는 동일한 길이의 single strand RNA에 비하여 이동도가 작음.

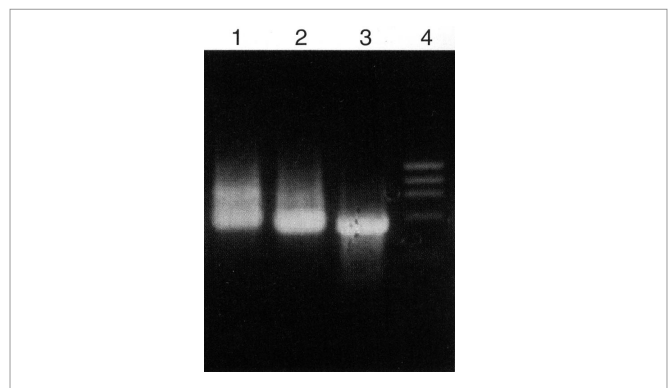


그림 1 Double strand RNA의 조제

합성한 RNA의 agarose gel 전기영동의 결과, 각 lane의 시료는 다음과 같다.

1. T3 promoter로 합성한 RNA (single strand).
2. T7 promoter로 합성한 RNA (single strand).
3. Annealing 후의 double strand RNA. Double strand RNA는 같은 길이의 single strand RNA에 비해 이동도가 작지만, 이 전기영동 사진에서는 RNase A와 RNase T1 처리에 의해 양 끝이 잘려 짧아진 분량만큼 상쇄해, band 위치는 거의 같다. Single strand RNA에 비해 band가 sharp하다.
4. Marker

3. Electroporation

1) Petri-dish⁵⁾에 0.9% agarose⁶⁾ coating.

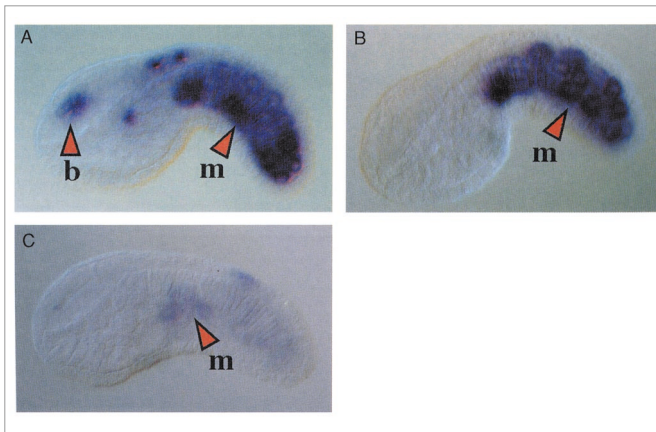
*5 Petri-dish는 폴리스틸렌제가 아니면 바닷물에 의해 agarose가 밑에서부터 벗겨진다.
*6 전자렌지에서 agarose를 녹여, 뜨거운 상태로 petri-dish에 넣는다. 여러 개의 petri-dish를 놓고 차례로 agarose 용액을 넣는다.

2) Double strand RNA 500 μg (250 μl에 용해)와 1,54 M Mannitol⁷⁾ 250 μl를 혼합하고 24 well plate에 넣음.

*7 1,54 M Mannitol은 실온에서 결정이 생기므로 사용할 때 따뜻하게 녹여 사용한다.

실험강좌 2 다양한 생물의 RNAi protocol을 알아!-1

- ↓
- 여러 번 카타유우레이밍게의 수란관과 수정관에서 알과 정자를 추출해 10분 동안 현탁한 후 혼합하여 수정시킴^{*8}.
 - 카타유우레이밍게는 자웅 동체이지만, 자가 수정을 하지 않으므로 몇 개 개체분의 난자와 정자를 혼합해야 한다.
 - 알의 외막을 제거하는 용액 조제 (Actinase E의 stock 용액 200 μ l와 0.1 g Sodium thioglycolate을 바닷물 10 ml에 용해하고, 10 N NaOH를 42 μ l 첨가하여 혼합).
 - 몇 분 후, 정자를 세정하고 알을 알 외막 제거액 (agarose coating한 petri-dish)에 옮김. 약 5분 동안 알의 외막을 용해
 - 여과한 바닷물을 넣은 agarose coating petri-dish를 6~7개 사용하여, 순서대로 배를 옮겨 알의 외막 제거액을 세정.
 - 배를 포함한 바닷물 100~200 μ l을 Pasteur pipette으로 취해 double strand RNA가 들어있는 24 well plate에 옮김. 재빠르게 혼합하여 cuvette에 옮기고, Gene Pulser II에서 신속하게 전기를 통함^{*9}.
 - 배를 agarose coating한 petri-dish로 옮기고, 적당한 단계까지 배양. 배는 *in situ* hybridization (그림 2)과 면역조직화학적 염색 등, 목적에 맞는 처리를 실시.
- ^{*9} Electroporation의 전기용량 (capacitance)은 1000 μ F, 전압은 50 V로 설정한다. Time constant는 15~25가 되는 것이 바람직하다. Pasteur pipette으로 배를 흡수할 때의 바닷물 양에 따라 정확히 조절할 수 있다.



- 그림 2 Double strand RNA 도입에 따른 mRNA의 분해 사진은 카타유우레이밍게의 미아배 (尾芽胚). 좌측이 앞쪽이며 위쪽이 등쪽.
- 초파리의 게놈 서열을 주형으로 합성한 double strand RNA를 도입한 대조실험. 카타유우레이밍게 *snail* 유전자는 초기 미아배 (尾芽胚)의 꼬리부분 근육 (m)과 뇌 (b)에서 발현한다.
 - snail*의 full-length cDNA (2 kb)를 주형으로 합성한 double strand RNA를 도입한 결과, 뇌에서는 mRNA가 검출되지 않았지만, 근육에서는 강하게 발현하였다.
 - 약 300 bp의 *snail* cDNA 단편을 주형으로 합성한 double strand RNA를 도입한 결과, 뇌나 근육에서 발현은 거의 보이지 않았으며, 꼬리부분 형태에 약간 이상이 보인다 (머리부분과의 구분이 확실하지 않다)

Microinjection

Microinjection은 mRNA나 antisense oligo, morpholino oligo 등의 도입

에 이용되며, 카타유우레이밍게 배에 유전자를 도입하는 일반적인 방법으로 이용되고 있다^{9),10)}. Electroporation법에 비해 카타유우레이밍게 배의 손상이 큰 점과 다소의 숙련이 필요한 등의 문제점은 있지만 도입량 조절이 가능하여 확실한 유전자 도입을 할 수 있다. 카타유우레이밍게알은 비교적 크기 때문에 실제 현미경에서 실행하는 경우가 많다.

준비 기

- 쌍안 실체 현미경 (Leica MZ12.5)
- Micro-manipulator (Narishige MN-151 죠이스틱 manipulator, Narishige MMO-220 유압 manipulator)
- manipulator (Satter P-97)
- 유리관 (DRUMMOND Microcaps; Sigmacote로 siliconising하고, 건조멸균 (180°C, 2시간) 해둔다)
- 유리막대 (병질, 직경 4mm; 알과 같은 정도의 두께 (직경 약 100 μ m)로 하여 L자형으로 구부려 알을 누르는 막대로 이용한다)
- 주사기 (20 ~ 50 ml: 용액 주입은 압력으로 한다. 주사기 안과 접촉 tube 안을 물로 채워둔다)

시약

- Sigmacote (SIGMA)
- Silicon oil
- FCF Fast green (Wako, 1 mg/ml의 농도로 멸균수에 용해하여 둔다)
- Double strand RNA (RNase free 멸균수에 1 μ g/ml~1 mg/ml가 되도록 용해한다. 시료에 가장 적합한 농도를 결정한다)

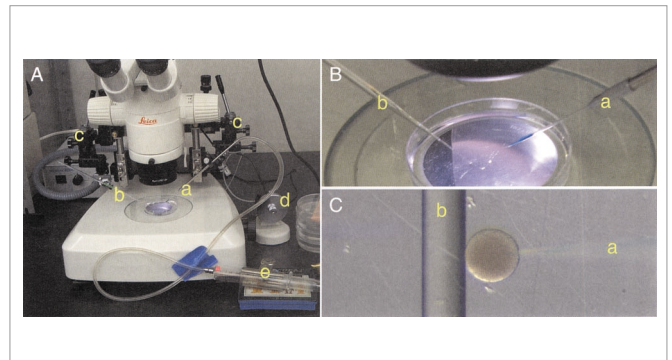


그림 3 Microinjection 장치

- 전체 외관. 쌍안 실체 현미경에 장착된 좌우의 죠이스틱 manipulator (c)와 유속에만 장착된 유압 manipulator (d). 주입을 위한 주사기 (e)
- Stage 부분 확대. 주입용 유리바늘 (a)와 L자형으로 가공된 알 누르기 (b)와 바닷물을 채운 petri-dish 덮개가 세팅되어 있다.
- 주입 중의 시야 그림. 비스듬하게 위에서 유리바늘을 알에 넣고 있다.

방법

1. Microinjection

- 유리 바늘에 double strand RNA 용액을 담고, silicon oil을 소량 넣음.
^{*10} Silicon oil을 넣지 않은 상태는 단기간 냉동 보존하는 것도 가능하다.

- Agarose coating한 petri-dish에서 알의 외막을 제거한 수정란을 준비^{*11}.
^{*11} 알에 주입하는 것은 제 1난황 직전까지 가능하지만, 알 안에서 퍼지기 전에 분열될 경우도 있으므로 적당한 시기에 종료한다. 미수정란에 대한 주입도 마찬가지이다.

3) Petri-dish의 뚜껑을 실체 현미경에 올려놓은 후 바닷물을 넣고, 알 누르게 세팅¹².

*12 바늘과 알 누르게가 비스듬하게 배치되어 있으므로, 얇은 용기가 좋으므로 덮개를 이용한다.



4) Double strand RNA가 들어있는 유리 바늘을 manipulator에 세팅하고, 알 누르기에 유리 바늘을 적당히 자르고 바늘 앞부분을 개봉¹³.

*13 바늘이 막힌 경우 등에는 다시 한번 바늘 끝을 구부리면 된다.



5) 10개 정도의 알을 눌러서 놓음¹⁴.

*14 알을 적당히 옮겨 petri-dish를 움직이면 알을 알 누르게 앞으로 가져올 수 있다.



6) 바늘 앞부분으로 알을 누른 후, 한번 음압 (대기보다 낮은 압력)을 가해 세포막 파괴. 주사기의 피스톤을 눌러 double strand RNA 용액 주입¹⁵.

*15 카타유우레이밍계 알은 굉장히 탄성이 크다. 바늘 끝이 알 중앙 부근까지 오도록 확실하게 밀어 넣는다.



7) 알의 주입량은 주입 후 용액이 투명하게 보이기 때문에 그 직경을 보고 측정하며, 알의 직경의 1/4~1/5 정도, 알 체적의 1/100 정도로 조절¹⁶.

*16 주입하는 double strand RNA 양은 용액 농도와 그 주입량으로 조절한다. 이 때 FCF Fast green 용액을 혼합하면 잘 보이지만, RNA와 같이 주의해서 취급해야 할 때는 연습할 때만 넣는 것이 좋다.



8) 알이 부서지는 것을 주의하여 조심히 바늘을 제거.



9) Pipette으로 알을 흡입하여 새로운 agarose coating한 petri-dish에 이동.



10) Incubater에 넣고, 발생 모양을 관찰하며, 적당한 단계에서 항체 염색이나 *in situ* hybridization을 이용하여 고정.

맺음말

멍게 배 발생은 매우 빠르다. 카타유우레이밍계의 경우, 18℃에서 18시간에 걸쳐 유영(遊泳) 유생이 된다. RNAi 효과가 나타나려면 어느 정도의 시간이 걸린다고 하며¹⁰, 발생단계 초기 배에 영향이 잘 나타나지 않는 것이 우려된다. 실제로 지금까지의 경험으로는 뇌배기까지의 유전자 발현에 대해 RNAi의 효과가 약한 것으로 나타나고 있다. Antisense oligo나 morpholino oligo를 이용한 실험결과와 신중히 비교하여 유용하게 이 방법을 활용하기 바란다.

참고문헌

- 1) Makabe KW, et al: *Development* (2001) **128**: 2555-2567
- 2) Satou Y, et al: *Gene* (2002) **287**: 83-96
- 3) Corbo JC, et al: *Development* (1997) **124**: 589-602
- 4) Lohmann JU, et al: *Dev Biol* (1999) **214**: 211-214
- 5) Li YX, et al: *Dev Biol* (2000) **217**: 394-405
- 6) Oates AC, et al: *Dev Biol* (2000) **224**: 20-28
- 7) Zhao Z, et al: *Dev Biol* (2001) **229**: 215-223
- 8) Elbashir SM, et al: *Genes Dev* (2000) **15**: 188-200
- 9) Satou Y, et al: *Dev Biol* (1999) **211**: 198-207
- 10) Nishida H and Sawada K: *Nature* (2001) **409**: 724-729
- 11) 小倉顯一: *세포공학* (2002) **21**: 624-628

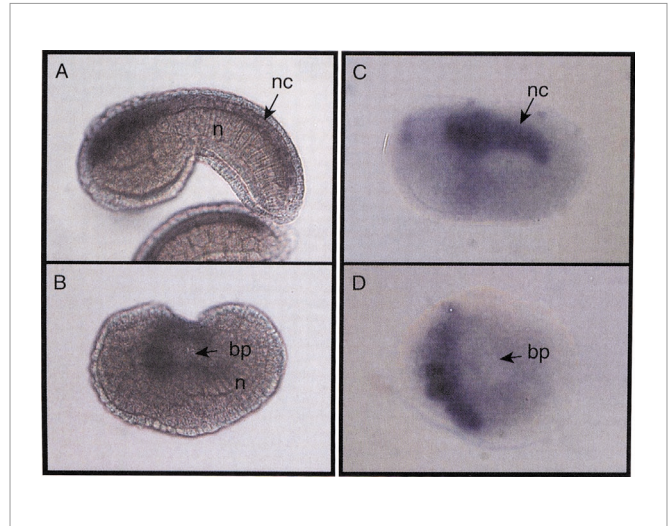


그림 4 Double strand RNA 또는 morpholino oligo를 도입한 배

Double strand RNA 또는 morpholino oligo를 microinjection 하면 카타유우레이밍계 *musashi* 유전자 기능이 저해하였다. *musashi*는 포유류 등에서 신경분화에 중요한 RNA 결합 단백질 유전자이다. A,C는 각각 아무것도 도입하지 않은 미아배와 신경배이며 각각 B,D의 대조실험이다. B는 double strand RNA (0.01 mg/ml)를 도입한 배. D는 morpholino oligo를 도입한 배. 모두 카타유우레이밍계의 신경관 특이적 유전자 *CiNut* 유전자 발현을 *in situ* hybridization 의해 검출했다. 신경색 (nc)은 뇌세포에 이어진 신경관 후방부분이며, 신경배 기간 이후의 형태형성운동에 의해 착색 (n) 등쪽을 따라 꼬리 끝까지 이른다. Double strand RNA 도입 배 (B), morpholino oligo 도입 배 (D)와 함께 *CiNut* 발현세포는 예전에 할구 (割球)가 존재하던 원구 (原口) (bp) 앞쪽에 존재하며, 후방으로의 이동이 일어나지 않는다. Double strand RNA 도입 배와 morpholino oligo 도입 배에서 같은 형질을 나타내어 *musashi* 유전자의 기능 저해가 신경관의 형태 형성 운동을 저해한 것으로 생각된다.