



다양한 생물의 RNAi protocol을 알아!-2 초파리의 RNAi protocol (유도형 RNAi)

서론

RNAi (RNA interference) 현상은 선충에서 발견되었다¹⁾. 이를 계기로 RNAi를 이용하여 유전자 기능을 해석하는 시도는 순식간에 여러 생물종으로 퍼져, 초파리에서도 이미 일반적인 것으로 보급되고 있다. 선충과 마찬가지로 초파리에서의 RNAi 연구도 *in vitro*에서 합성한 double strand RNA를 microinjection하여 체내 (초기배아)에 도입함으로써 시작되었다²⁾. 그러나 지금은 체내에서 hairpin형 double strand RNA를 생산하는 “유도형”으로 주류가 옮겨지고 있다^{3),4)}. RNAi의 성질, 원리 등에 대해서는 다른 문헌을 참조하기로 하고⁵⁾, 본 고에서는 유도형 RNAi법의 protocol에 대해 소개한다.

원리

유도형 RNAi에서는 hairpin형 RNA를 생산하기 위한 construct를 초파리 염색체에 도입한다 (그림 1A). 이 construct는 목적유전자의 단편을 역방향 반복서열의 형태로 promoter downstream에 삽입한 것이다. RNAi는 우성변이를 가져오기 때문에 promoter로는 heat shock 단백질 (Hsp70) 유전자의 promoter 그 발현을 인위적으로 제어할 수 있는 것이 좋다.

본 고에서는 GAL4-UAS 유전자 강제발현계를 이용한 유도형 RNAi법을 소개한다. 이 시스템은 2종류의 파리를 사용한다 (그림 1B). 한쪽은 효모 전사 조절인자 GAL4 단백질을 발현하는 파리 (GAL4 driver라고 부른다)이며, 다른 한쪽은 GAL4 인식배열인 UAS 서열 downstream에 역방향 반복서열을 연결한 UAS-IR transgene을 지닌 파리이다. GAL4 driver에는,

- ① Hsp70 promoter 및 Act5C promoter처럼 특정 유전자의 promoter를 GAL4 단백질 발현에 이용한 것,
- ② GAL4 enhancer trap법으로 제조한 것.

의 2종류가 있다. ②에서는 게놈 DNA의 enhancer를 모니터링해서 GAL4를 발현하기 위한 transgene이 염색체에 삽입되어 있다. 염색체 상의 위치에 따라 (모니터링하는 enhancer의 종류에 따라) GAL4는 각각 조직/세포 또는 발생시기에 특이적 발현을 나타낸다. 이들 2종류의 파리를 교배해서 얻은 자손 (F1) 파리에서는 2종류의 transgene이 공존하며, GAL4가 발현하는 세포에서만 hairpin형 RNA가 생산되며, RNAi에 의한 유전자 기능저해가 일어난다.

이처럼 유도형 RNAi는 소위 말하는 조건변이를 유도하는 것이다. 예를 들면 안원기 (眼原基) 세포에서만 GAL4를 발현하는 GMR-GAL4 driver를 이용하면, 가령 목적하는 유전자가 배아의 형태형성에도 중요한 역할을 한다고 해도, 눈의 형성이라고 하는 signal 전달을 해석하는데 좋은 시기에 그 유전자 기능을 자세히 살펴볼 수 있다 (그림 2).

유도형 RNAi의 특징을 정리하면 다음과 같다.

- ① 다면적으로 발현하는 (pleiotropic) 유전자의 기능해석에 유리하다.
- ② 교배를 통해 수많은 안정된 변이개체를 만들 수 있어 생화학적, 분자생물학적 해석에 적용이 가능하다.
- ③ Transgene을 사용하므로 해석해야 하는 유전자의 염색체상 위치에 의존하지 않는다. 즉 다중변이체 제작 등의 유전학적 해석이 용이하다.

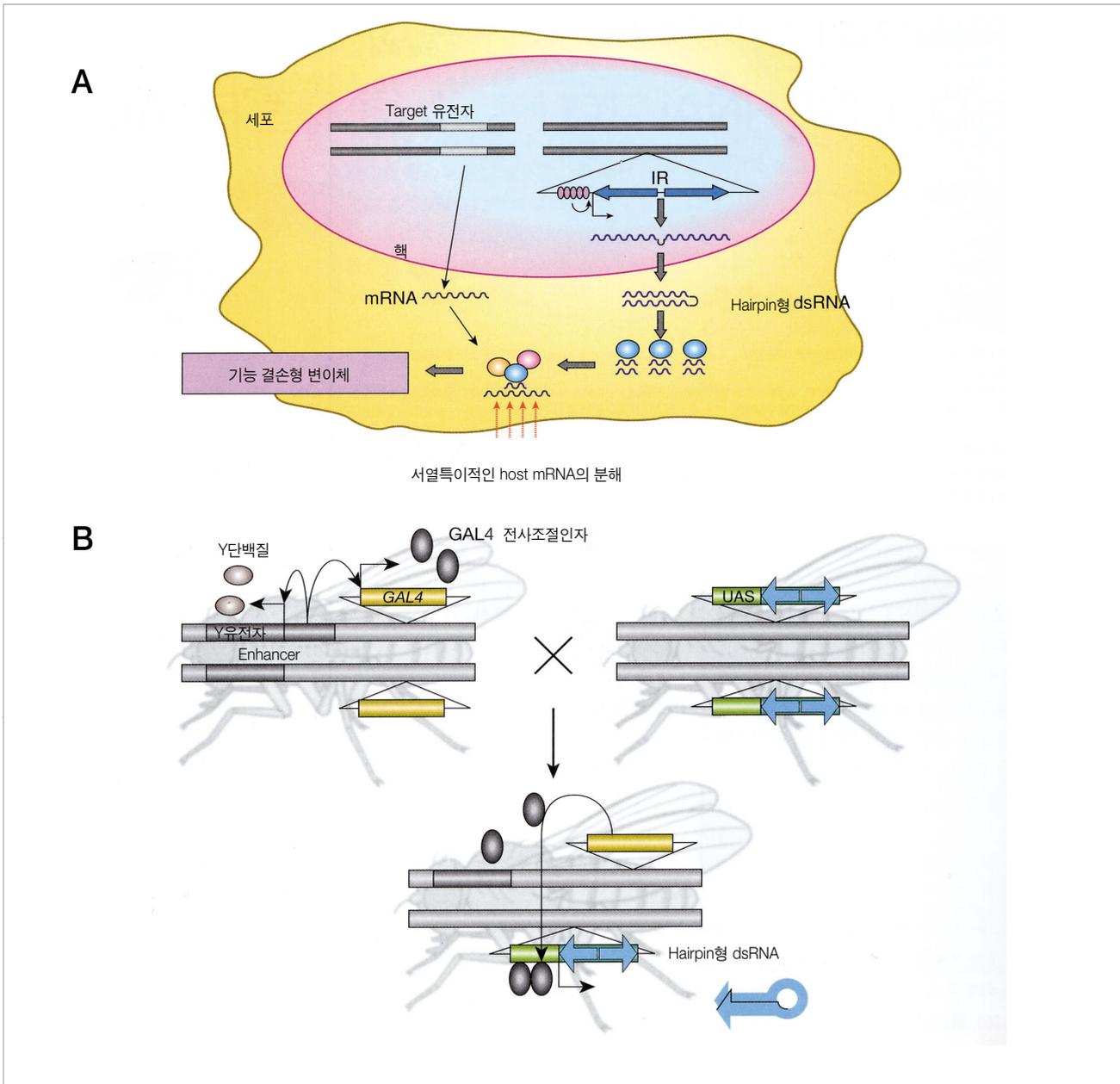


그림1. 초파리의 유도형 RNAi

A: 유전자 단편의 역방향 반복서열 (IR)을 강제 전사하면 hairpin형 RNA가 생산되며 21 nt로 절단된 후 host의 mRNA를 서열특이적으로 분해한다. 이 세포에서는 target 유전자의 기능이 저해되어 기능결손형 (loss-of-function) 변이가 유도된다.

B: GAL4 enhancer trap driver를 이용한 IR 발현. Driver의 파리 (좌상)에서는 GAL4 transgene이 염색체의 enhancer 서열 제어 하에서 조직/시기 특이적으로 GAL4 전사 조절인자를 발현한다. UAS promoter 하에 IR을 연결한 transgene을 도입한 파리 (우상)를 driver 파리와 교배하면 차세대 파리에서는 IR이 조직/시기 특이적으로 발현하여 그 세포에서만 RNAi가 유도된다.

- ④ RNAi의 일반적 특징으로서 염색체 상에서의 overlap된 유전자 해석이라는 점에서도 통상의 염색체 변이에 비해 유리하다.
- ⑤ 일반적으로 유전자 기능을 완전히 상실한 null mutation을 만드는 것이 어렵다 (대부분의 경우, hypomorphic mutation이다). 단, 유도조건을 조절함으로써 유전자 기능저해의 “정도”를 제어할 수 있다.

MEMO

여기에서 사용하는 초파리 계통은 일본국립유전학연구소 계통생물연구센터에서 입수가 가능하다 (<http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nighayashi.html>). GAL4 driver의 파리 계통은 Indiana stock center (<http://flybase.bio.indiana.edu/stocks/fbstock,hform>)에서 입수 가능하다.

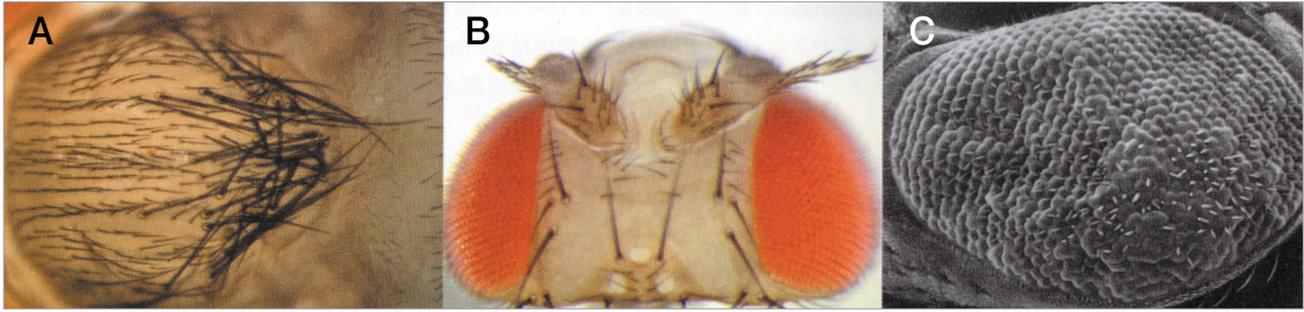


그림 2. 유도형 RNAi의 예
 이들 유전자는 완전히 유전자 활성이 없어지는 null 변이에서는 모두 배치사(胚致死)된다. 유도형 RNAi를 이용하면 성충조직에서의 유전자 기능을 조사할 수 있다.
 A: (extramachrochaetae emc), 유전자 RNA, dpp-GAL4 driver에서 성충의 SC 영역을 중심으로 emc 유전자를 knockdown했다. 감각모가 증가하고 있다.
 B: tango (tgo) 유전자 RNAi, dII-GAL4 driver를 사용해 부속 다리 끝에서 tgo 유전자를 knockdown, 안테나가 다리로 변환하고 있다.
 C: canoe(cno) 유전자 RNAi, GMR-GAL4 드라이버를 사용해 복안(複眼)에서만 cno 유전자를 knockdown 했다. Cone 세포 증가에 따라 rough eye 표현형이 유도되고 있다.

UAS-IR transgene 구축

준비

- PCR 기기

시약

- cDNA clone; *Drosophila melanogaster*의 EST (cDNA) clone, BDGP (Berkley *Drosophila* Genome Project)에서 입수가능.
- Transformation용 벡터 (pUASTCS1)는 도쿄대학의 西郷薫 교수와의 공동연구. 미발표.
- Primer 세트; *Sfi* IA3 (5'-AAATTTGGCCATATAGGCC + 목적으로 하는 cDNA의 3' 측 염기서열 26 bp-3'), *Sfi*B7 (5'-AAATTTGGCCTACATGGCC + 목적으로 하는 cDNA의 5' 측 염기서열 26 bp-3'), *Cpo* IB3 (5'-AAATTTGGTCCG + 목적으로 하는 cDNA의 3' 측 염기서열 26 bp-3'), *Cpo* IA7 (5'-AAATTTGGACCG + 목적으로 하는 cDNA의 5' 측 염기서열 26 bp-3').
- JM109 competent cell
- SURE competent cell
- TaKaRa Taq
- 2.5 mM dNTP mix
- *Cpo* I (TaKaRa), *Sfi* I
- 3 M sodium acetate (pH 5.2)
- dH₂O saturated phenol, chloroform (1:1)

방법

다음 방법에서는 많은 수의 시료를 처리하기 위해 시약의 양을 조절하고 있지만, 시료수가 적을 경우에는 사용하는 시약 양을 늘려도 관계없다.

1. Insert DNA의 증폭

반응액 조제	
EST clone (plasmid)	5 ng
10× buffer	5 μl
2.5 mM dNTP mix	4 μl

TaKaRa Taq	1.25 units
Forward primer (<i>Sfi</i> B7 또는 <i>Cpo</i> IA7)	10 pmol
Reverse primer (<i>Sfi</i> A3 또는 <i>Cpo</i> B3)	10 pmol
dH ₂ O	
<hr/>	
	50 μl

2. PCR 반응과 PCR 산물의 정제

- 1) PCR 반응
 98℃, 2분 → [98℃, 30초 → 50℃, 30초 → 72℃, 2분] × 25 cycle → 72℃, 2분 → store 4℃
 ↓

- 2) PCR 산물 정제
 PCR 산물 50 μl를 Microcon-PCR로 정제 (phenol/chloroform 처리, ethanol 침전에 의한 정제로도 가능)

3. PCR 산물 및 cloning 벡터 pUASTCS1의 제한 효소에 의한 절단 (PCR 산물의 *Sfi*I 부위로의 삽입)

- 1) PCR 산물의 제한효소 처리
 반응액 조제

위의 PCR 산물	5 μl
10×M buffer	1 μl
<i>Sfi</i> I	5 units
dH ₂ O	
<hr/>	
	10 μl

 ↓

- 2) Cloning 벡터 pUASTCS1의 제한효소 처리
 반응액 조제

pUASTCS1 벡터	100 ng
10×M buffer	1 μl
<i>Sfi</i> I	5 units
dH ₂ O	
<hr/>	
	10 μl

 ↓

50℃에서 2시간 반응



3) 제한효소 반응 종료 후, PCR 산물 과 pUASTCS1 벡터 반응액을 섞어 phenol/chloroform 처리 및 ethanol 침전을 실시한다.

4) Ethanol 침전 후 건조시켜 1.5 μ l의 dH₂O에 용해

4. Ligation 반응

1) 반응액 조제	
pUASTCS1 벡터 + PCR 산물	1.5 μ l
TaKaRa Ligation Kit ver.2,1	1.5 μ l
	3 μ l

2) 16°C 에서 2시간 반응

5. Transformation 및 plasmid DNA 회수

1) 반응액 조제	
Ligation 반응 용액	3 μ l
TaKaRa JM109 competent cell	15 μ l
	18 μ l

2) TaKaRa의 protocol에 따라 transformation 실시

3) LB/Amp plate에 plating

4) 37°C 에서 하루밤 배양

5) Colony를 몇 개 선택하여 37°C 에서 하루밤 배양

6) Plasmid를 회수하여 *Sfi* I로 절단하고 삽입된 목적 단편을 전기영동으로 확인

6. PCR 산물 및 cloning 벡터 pUASTCS1 의 제한효소에 의한 절단 (PCR 산물의 *Cpo* I 부위에 대한 삽입)

5.에서 확인한 *Sfi* I 부위에 PCR 산물이 삽입된 벡터와 PCR 산물을 *Cpo* I로 절단.

1) PCR 산물의 제한효소 처리

반응액 조제	
2.에서 증폭한 PCR 산물	5 μ l
10×K buffer	1 μ l
<i>Cpo</i> I	5 units
dH ₂ O	
	10 μ l

2) Cloning 벡터 pUASTCS1의 제한효소 처리

반응액 조제	
pUASTCS1 벡터	
(<i>Sfi</i> I site에 PCR 산물이 삽입된 것)	100 ng
10×K buffer	1 μ l
<i>Cpo</i> I	5 units
dH ₂ O	
	10 μ l

↓
30°C 에서 2시간 반응

3) Cloning 벡터 pUASTCS1의 탈인산화 처리
반응액 조제

pUASTCS1 벡터 (<i>Cpo</i> I site를 제한효소로 절단한 것)	10 μ l
10× buffer	5 μ l
CIAP	3 units
dH ₂ O	
	50 μ l

50°C 에서 30분 반응

4) 제한효소 처리한 PCR 산물과 탈인산화 처리한 pUASTCS1 벡터를 혼합한 후, phenol/chloroform 처리 및 ethanol 침전을 실시한다.

5) Ethanol 침전 후 건조시켜 1.5 μ l의 dH₂O에 용해

7. Ligation 반응

1) 반응액 조제	
pUASTCS1 벡터 + PCR 산물	1.5 μ l
TaKaRa Ligation Kit ver.2,1	1.5 μ l
	3 μ l

2) 16°C 에서 2시간 반응

8. Transformation 및 plasmid DNA 회수

1) 반응액 조제	
Ligation 반응 용액	3 μ l
Stratagene SURE competent cell	15 μ l
	18 μ l

2) Stratagene의 protocol에 따라 transformation 실시

3) LB/Amp plate에 plating

4) 37°C 에서 하루밤 배양

5) Colony를 몇 개 선택하여 37°C 에서 하루밤 배양

6) Plasmid를 회수하여*1 *Cpo* I로 절단하고, 삽입된 목적 단편을 전기영동으로 확인

*1 여기에서는 정제된 plasmid DNA를 직접 infection용 시료로 사용하기 때문에 spin column 등을 이용해 정제할 것을 권한다.

9. Injection용 시료 조제

반응액 조제	
pUASTCS1 벡터 (<i>Sfi</i> I, <i>Cpo</i> I의 2가지 fragment를 포함한 것)	3 μ g
phs π (helper DNA)	1 μ g

실험강좌 2 다양한 생물의 RNAi protocol을 알아!-2

10 × injection buffer [50 mM KCl, 1 mM NaPB (pH 6.8)]² 1 μ l
dH₂O 10 μ l

- Pipette
- 35 mm 플라스틱 petri-dish와 두께 5 mm 정도로 slice한 스폰지 마개

² Injection시에 막힘을 방지하기 위해 미리 filtrate한 것을 이용한다.

파리의 형질 전환과 계통 수립

준비

- 기구 및 시약

① 알 채취

Graph plate 제작

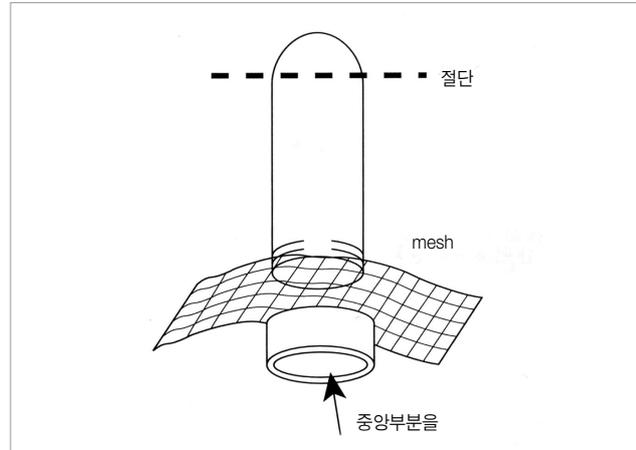
다음의 것을 혼합해 잘 녹여준다.

Agar powder	22 g
Glucose	87 g
Dry Yeast	18 g
웰치 포도주스	455 ml
물	543 ml

↓

1.25 N NaOH를 22 ml 넣고 60℃ 정도까지 식힌다. Acid MixA를 11 ml 넣고 pipette 등으로 slide glass 위에 균한다. 상기 양으로 200 ~ 300매 가능하다. Paper towel 등으로 적신 상자에서 4℃ 보존.

- Acid MixA (100% Propionic Acid 418 ml, 85% Phosphoric Acid 11.5 ml)
- Slide glass가 들어가는 유리 vial과 스폰지 마개 (채란용)
200 페이지의 나일론 그물 모양의 것 (우측그림).
- 유리제 염색항아리 (50 ml)
- NaClO 용액 (4% 원액을 2배 희석)



② Microinjection (그림3 좌측 참조)

- 도립 현미경 (Carl Zeiss Axiovert200 등)
- Micro manipulator (Narishige MMO-202N, 조동용 MMN-1, 설치 adaptor NZ-19)
- Injector (Eppendorf FemtoJet)
- 유리바늘. Eppendorf Femtotips II
- 실체현미경 (알을 나열하기 위해. Leica MZ95 등)
- 알을 나열하기 위한 slide glass, 실리콘 오일이 새어나가지 않도록 틀을 만든다. Slide glass에 비닐테이프 (밀리온 비닐테이프 19 mm폭)를 1매 겹쳐서 붙인 후, 안을 가위로 잘라내어 틀을 만든다. 그 가운데 양면테

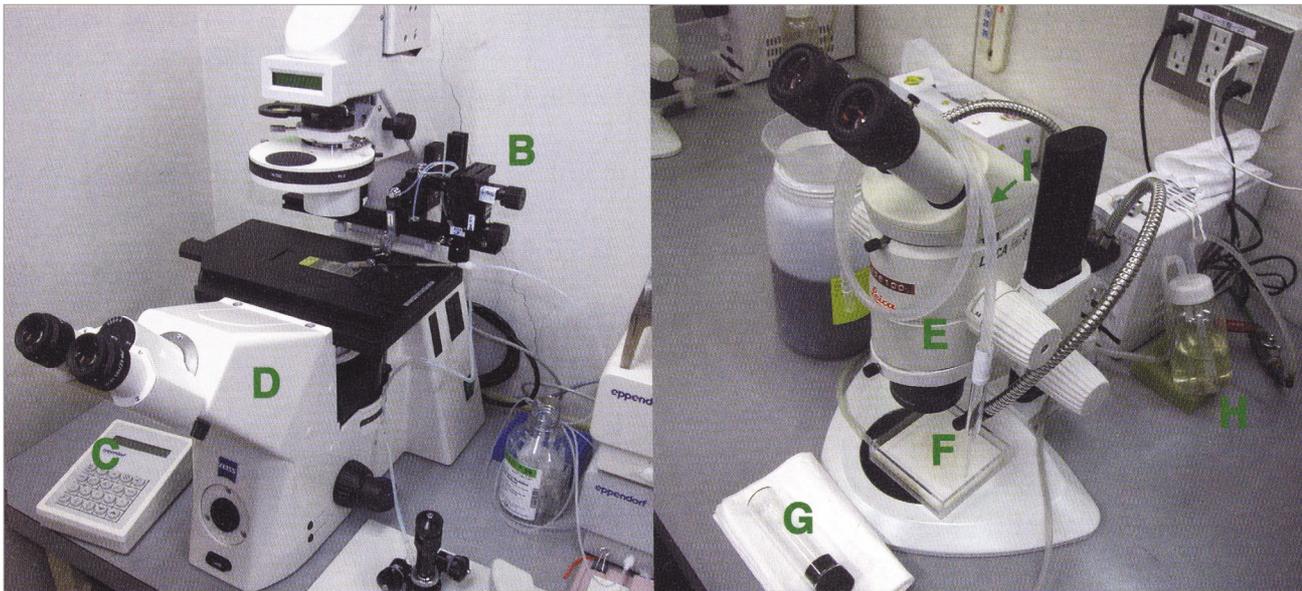


그림 3 장치

좌: Microinjection 장치. A: Manipulator (Narishige MMO-202N, 3차원 미동용) B: Manipulator (Narishige MMN-1; 3차원 조동용). C: 전동공기압 injector (Transjector5246). 현재는 모델을 교체하여 사용이 더 간편해졌을 것이다. D: 도립 현미경 (Zeiss Axiovert200), Narishige의 manipulator adaptor가 적합하다면 어느 기종이라도 상관없다. 단, stage의 핸들을 왼손으로 조작할 수 있는 것. 밝은시아에서의 검경 (檢鏡)으로 충분. 대물렌즈 배율은 ×10.

우: 초파리 교배용 현미경 세트. E: 실체현미경 (Leica MZ-8). 이 기종은 현재 MZ95로 모델을 교체하였다. F: 탄산가스 마취장치, 아크릴 상자에 5 μ m pore size의 나일론 그물을 펼친 다공질의 플라스틱판을 넣었다. 전면에서 CO₂가 새어나온다. G: 미리 유리 vial에 CO₂가스를 도입해두면 순간적으로 마취되므로 작업할 수 있다. H: 가스 세정병, CO₂가스는 일단 물이 빠지도록 한다. I: 흡충관 (만드는 방법: <http://fly.nibb.ac.jp/html/movie/movie.html>).

이프 (스카치#665-1-12)를 붙인다.

- 핀셋, 장시간 작업의 피로를 줄이기 위해 빛이 가늘고 가볍고 반발력이 약한 것 (REGINE No.5 titan)
- 보습상자 (slide glass가 들어가는 플라스틱 상자. Paper towel을 넣어 물을 머금도록 한다)
- 멸균한 kimwipers 조각 (2×5 mm 정도). 먹이가 들어가 있는 작은 바이얼.

③ 계통 수립을 위한 교배 (그림 3 우측 참조)

- 실체현미경
- 탄산가스 마취장치
- *ω*118 계통
- Double balancer의 파리 계통. *ω*118; Sp/SM1, Cy; Pr/TM3, Sb Ser

방법

1. 알의 채취와 탈란 막처리

- 1) 3령 유충 시기에 밀도를 조절해 충분히 키운 *ω*118 파리 100마리 정도를 유리 vial에 넣고 graph plate를 넣고 스폰지 마개로 닫는다. 종이상자에 넣는 등 어두운 곳에서 채란한다. 25℃, 30분 간격. 최초 1매는 발생이 진행된 알이 많으므로 버린다.
 - ↓
- 2) NaClO 용액 (2%)을 넣은 염색항아리에 graph plate를 넣고 30초간 처리한 후 난막을 녹인다. 그 사이 pipette으로 용액을 plate면에 뿜어, 알을 액 속으로 씻어낸다.
 - ↓
- 3) 미리 물을 뿌려둔 알을 모으는 용도의 vial에 알이 뜬 NaClO 용액을 보내 알을 회수한다.
 - ↓
- 4) 수돗물을 천천히 vial 벽에 대고 씻어낸다. 마지막으로 세정 핀을 사용해 물을 뿌려 알을 mesh 중앙부에 모은다.
 - ↓
- 5) 스폰지를 넣은 플라스틱 petri-dish에 물을 넣고, 그 위에 mesh마다 알을 올려놓는다 (건조되지 않도록 하기 위해).

2. Microinjection

- 1) 실체현미경 하에서 slide glass에 붙인 양면테이프 위에 알을 나열한다. 알 전단을 좌측으로 하고, 테이프 좌측에 위에서 아래까지 30개 정도의 알을 나열한다. 건조함을 방지하고 알 내부를 관찰하기 쉽도록 실리콘 오일을 뿌린다.
 - ↓
- 2) 유리바늘에 DNA 용액을 전용 chip으로 충전
 - ↓
- 3) 알 말단에 바늘을 꽂고 DNA 용액을 주입한다.
 - ↓
- 4) 보습상자에 넣고 25℃에서 incubation 한다. 대략 24시간이면 유충이 부화되어 오일 속을 떠다닌다.
 - ↓
- 5) 핀셋으로 잡은 kimwipers 조각을 사용해 1마씩 회수하여 조각마다 vial 먹이 위에 올려놓는다. Vial 1개에 1마리. 25℃에서 incubation. 10일이면 성충이 우화(羽化)된다.

3. 계통 수립을 위한 교배

- 1) Injection 처리를 한 알에서 발생한 성충 (GO)의 암/수컷을 판별해 파트너 파리 (*ω*118 계통) 3마리를 같은 vial에 넣는다.
 - ↓
- 2) 차세대 (G1)에 붉은눈 개체 (transformant)를 선택. 1개의 vial로부터 수컷 1마리만 선택하고, double balancer 암컷 20마리와 교배. 새로운 작은 vial에 넣고, 먹이나 벽에 부딪히지 않도록 vial을 옆으로 놓고 3일간 알을 키운다. 그런 다음 큰 vial에 파리를 옮긴다.
 - ↓
- 3) 차세대 (G2) 붉은눈에서 Cy, Sb의 표현형을 지닌 암컷, 수컷을 선택해 그것들을 교배. 작은 vial로 1~2세대 늘린 후 큰 vial로 계대 배양한다.

참고문헌

- 1) Fire A, et al: *Nature* (1998) **391**: 806-811
- 2) Kennerdell JR, et al: *Cell* (1998) **95**: 1017-1026
- 3) Tavernarakis N, et al: *Nat Genet* (2000) **24**: 180-183
- 4) Fortier E, et al: *Genesis* (2000) **26**: 240-244
- 5) Ueda R: *J Neurogenet* (2001) **15**: 193-204