

# RNAi의 기초와 응용

RNAi 기술은 유전자 기능 해석 등의 기초연구에서 유전자 치료연구에 이르기까지 광범위한 영역에서 유효한 tool로서 주목받고 있다. 이번 특집에서는 최적의 RNAi 실험을 위한 안내, RNAi 관련 신제품 및 서비스 등에 대해 소개한다.

## RNAi란 무엇인가?

RNAi (RNA interference)란 siRNA (short interfering RNA)라고 불리는 12 ~ 21 mer의 dsRNA에 의해 서열특이적으로 유전자 발현이 억제되는 현상이다.

1998년에 Fire<sup>1)</sup> 연구그룹이 선충에서 ds RNA가 서열특이적으로 유전자의 silencing을 일으키는 것을 발견한 이후, 21 ~ 23 mer로 processing 된 dsRNA가 mRNA를 절단하는 기구<sup>2)</sup> 및 RISC (RNA-induced silencing complex)의 존재<sup>3)</sup>, Dicer의 클로닝<sup>4)</sup>을 거쳐 2001년에 Elbashir<sup>5)</sup>에 의해 포유류 세포에서도 siRNA에 의한 서열특이적인 발현억제가 가능하다는 것이 증명되어, RNAi 기술을 이용한 연구가 활기를 띠게 되었다.

그림1은 선충에서의 RNAi 경로를 그림 1에 나타내었다. 포유류 세포에서는 21 ~ 23 mer의 ds RNA가 세포질 내에 존재 함으로써, RISC 활성화 이후 반응이 일어난다고 한다.

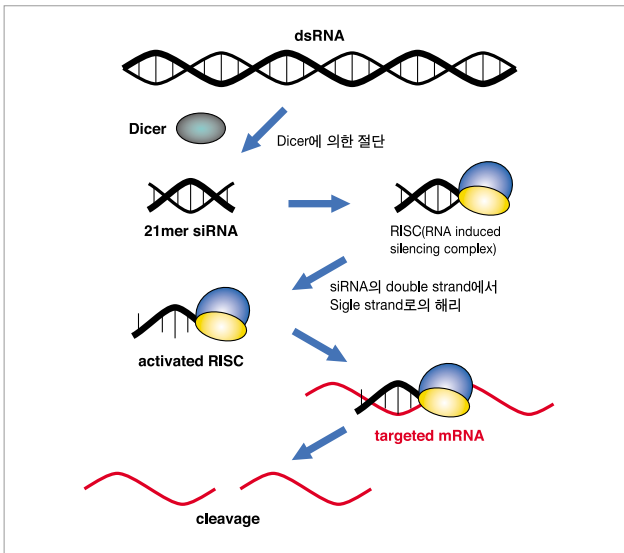


그림 1 RNAi 경로

세포 내의 ds RNA는 RNaseIII superfamily에 속하는 Dicer에 의해 3' 말단에 2염기의 overhang을 지닌 21염기의 siRNA에 processing 된다. siRNA는 RISC에 포함되어 single strand가 되며, 그로 인해 활성화된 RISC는 서열특이적으로 mRNA를 절단한다.

## RNAi에 관한 실험방법

RNAi 실험에서는 siRNA가 세포 내에 존재하도록 하는 조작이 필요하다. 그 방법으로 크게 다음과 같은 2가지 방법이 있다.

- ① siRNA를 미리 만들어두고, 그것을 세포 안으로 transfection한다.
- ② siRNA 발현 벡터를 구축하고 그것을 세포 안으로 transfection하여, 세포 안에서 siRNA가 발현되도록 한다.

①의 방법으로는 siRNA를 화학적으로 합성하는 방법과 미생물 유래의 RNaseIII나 사람 유래의 Dicer를 이용해 긴 dsRNA를 절단하여 siRNA 혼합물을 제조하는 방법 등이 있다. ②의 방법에서는 목적에 따라 plasmid 벡터나 바이러스 벡터 등이 이용된다.

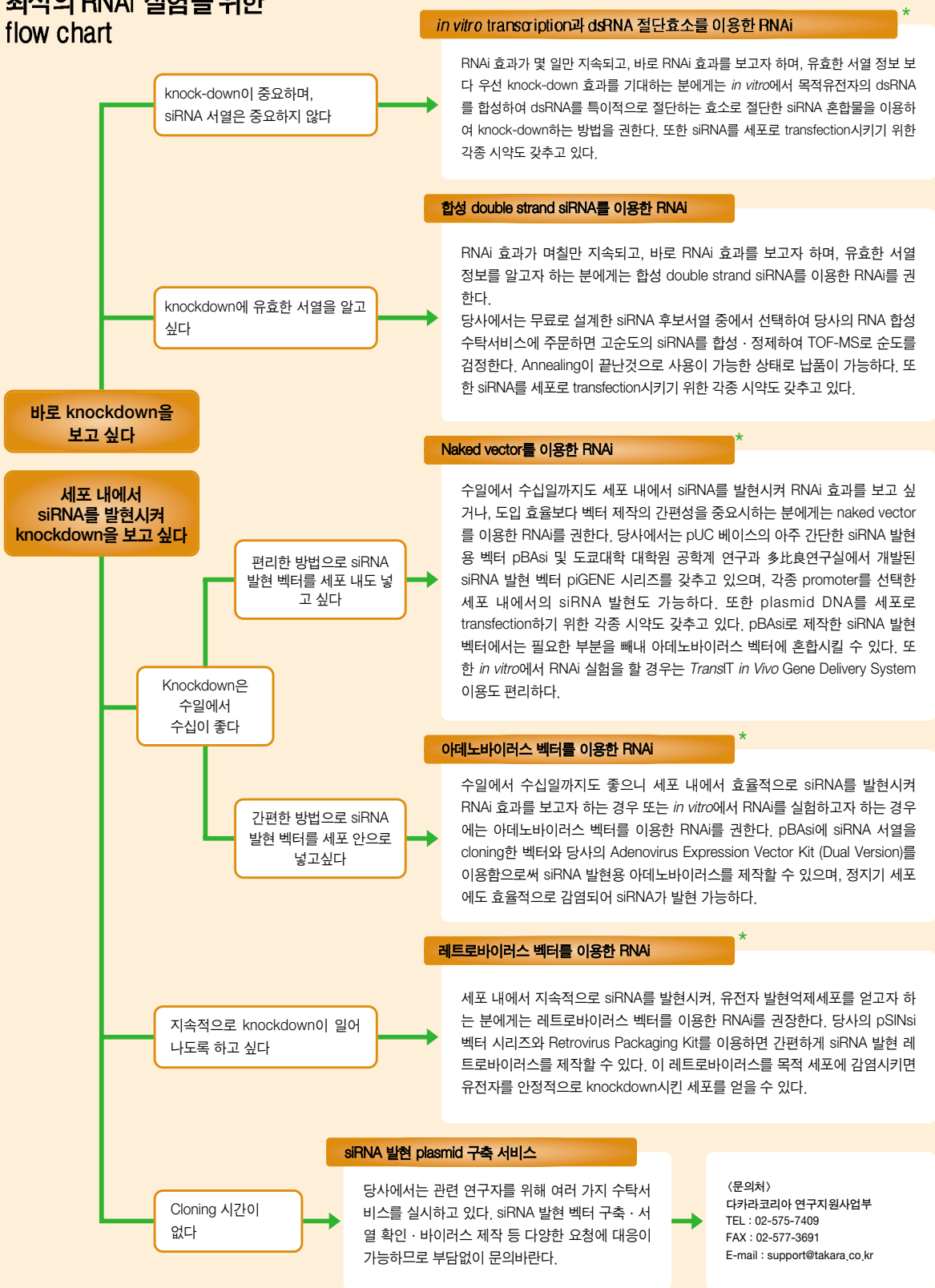
## 최적의 RNAi 실험을 위한 flow chart

RNAi 실험에 대한 주요 방법을 간단히 설명하였지만, 최근 몇 년간 여러 가지 방법과 know how가 논문에 게재되어 오고있다. 실험을 시작하려고 하는 연구자에게 있어 어떤 방법이 자신의 연구에 최적인가를 판단하는 것은 의외로 힘들다. 그림 2는 최적의 RNAi 실험을 위한 flow chart 이다. 이 flow chart는 아래의 관점에서 최적이라고 생각되는 방법을 선택할 수 있도록 되어 있으므로 활용하기 바란다.

- RNAi 효과를 바로 확인하고자 하는가? siRNA를 세포 내에서 발현시키고자 하는가?
- 특이적인 siRNA 서열을 결정하고 싶은가? 우선 RNAi 효과를 확인하고자 하는가?
- 일회성으로 RNAi 효과를 보는 것만으로 만족하는가? RNAi 효과를 지속시키고 싶은가?
- 간편한 방법으로 siRNA를 도입하고자 하는가? 효율적으로 도입하고자 하는가?

당사에서는 다양한 방법에 대응한 RNAi 관련 제품 및 그 주변 기술을 line up하고 있으며, flow chart 내에 당사 제품과 서비스를 등재하였다. 본 특집에서는 우선 *in vitro* transcription과 dsRNA 절단효소를 이용한 RNAi의 신제품에 대해 소개한다. 이것은 효과적인 siRNA 서열은 알지 못하지만, 우선 RNAi 효과를 확인하고자 하는 연구자에게 가장 좋은 방법이다.

### 최적의 RNAi 실험을 위한 flow chart



본 고에서는 \* 으로 관련 제품, 기술을 소개한다.

그림 2 최적의 RNAi 실험을 위한 flow chart

다음으로 siRNA 발현용 레트로바이러스 벡터 pSINsi 시리즈와 간단한 siRNA 발현 벡터 pBasi 시리즈를 소개한다. 세포 내에서 RNAi 효과를 지속시키고자 하는 연구자에게는 레트로바이러스 벡터 pSINsi를, 간단하게 발현 벡터를 구축하고자 하는 연구자나 아데노바이러스 벡터에 감염시켜 효율적으로 siRNA 발현 벡터를, 세포로 도입하고자 하는 연구자에게는 pBasi를 권한다.

참고문헌

- 1) Fire, A., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. (1998) *Nature*, **391**, 806-811.
- 2) Zamore, P. O., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. (2000) *Cell*, **101**, 25-33.
- 3) Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. (2000) *Nature*, **404**, 293-296.
- 4) Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. (2001) *Nature*, **409**, 363-366.
- 5) Elbadhir, S. M., et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. (2000) *Nature*, **411**, 494-498.

## Double strand RNA 절단효소: si-RNase III™ 및 ColdShock-DICER

앞에서 언급한대로 siRNA 제조법으로 긴 서열의 dsRNA를 dsRNA 절단 효소로 절단 후 siRNA 혼합물을 제작하는 방법이 있다. 여기에서는 *in vitro* transcription 반응에 의해 목적하는 DNA 서열에서 긴 서열의 dsRNA를 합성하고 그것을 double strand RNA 절단효소 (si-RNase III™ 또는 ColdShock-DICER)로 절단하여 siRNA 혼합물을 제작하는 방법 (그림 3)과 si-RNA 혼합물 제작에 사용하는 신제품 및 이 방법을 이용한 RNAi 실험 예를 소개한다.

### si-RNase III™ 와 ColdShock-DICER에 대하여

siRNA mixture 제작에는 double strand RNA 분해효소로 미생물 유래의 RNase III나 human 유래의 Dicer가 이용되고 있다. 미생물 유래 효소에서는 대장균의 RNase III를 이용하는 방법이 알려져 있는데, 긴 서열의 dsRNA를 절단할 때 RNAi에 효과가 낮은 10 mer 정도의 저분자 분해물이 잘 생기기 때문에, 부분 분해를 실시하여 약 21 mer의 분해산물을 분획할 필요가 있다.

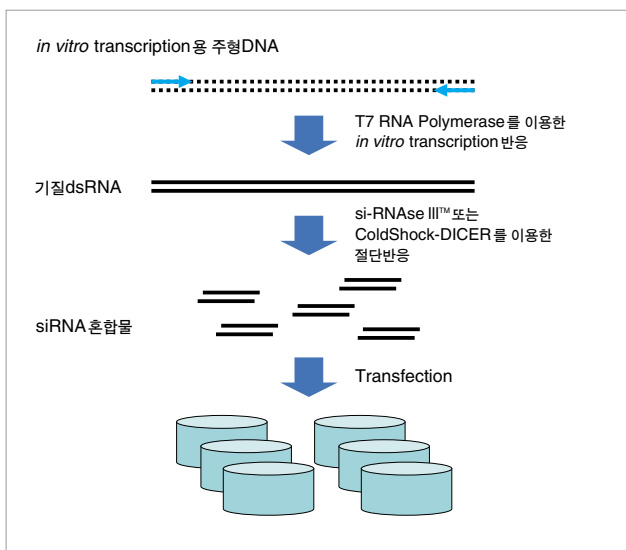


그림 3 si-RNase III™, ColdShock-DICER 분해물을 이용한 RNAi

당사가 개발한 si-RNase III™는 저온균 (*Shewanella* strain Ac.10) 유래의 RNase III로, 독자적인 ColdShock 발현계에 의해 발현, 정제된 것이다. 이 효소는 대장균 유래 RNase III와는 달리, 긴 서열의 dsRNA 분해가 완만하며 10 mer 정도의 저분자 siRNA 혼합물이 잘 생기지 않는다는 장점을 갖고 있다 (그림 4).

이 효소를 이용하여 300 ~ 1000 bp의 긴 서열의 dsRNA를 절단하면 RNAi 실험에 적합한 길이의 siRNA 혼합물이 효율적으로 생성된다. 따라서 절단산물의 분획 과정이 필요하다.

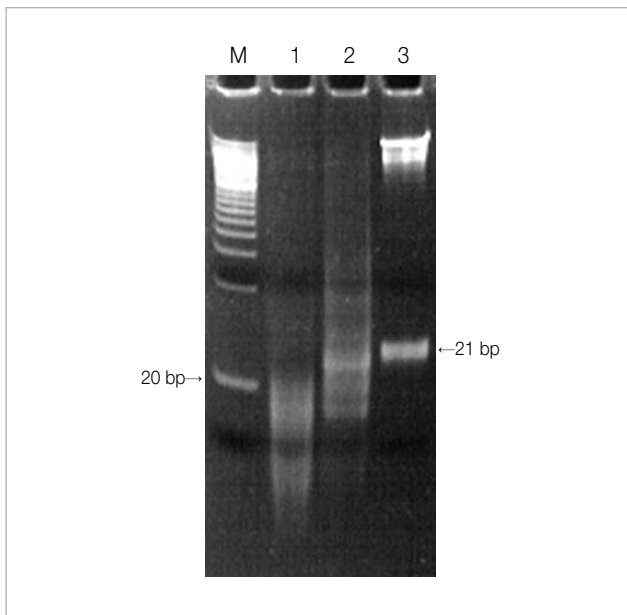


그림 4 si-RNase III™를 이용한 긴 서열의 dsRNA(약 700 bp)의 분해 결과  
 M: 20 bp DNA Ladder  
 1: A사 대장균 RNase III를 이용한 절단 (37°C, 30분)  
 2: si-RNase III™를 이용한 절단 (30°C, 1시간)  
 3: B사 Dicer를 이용한 분해 (37°C, 18시간)

한편 human 유래의 Dicer를 이용하여 긴 서열의 dsRNA를 절단, siRNA 혼합물을 얻을 수도 있다. 당사의 ColdShock-DICER는 ColdShock 발현계에 의해 발현·정제한 human 유래의 Dicer 단백질 변이체와 dsRNA 분해 활성을 높여주는 내열균 *Thermotoga maritima* 유래의 ColdShock 단백질 CspB (TmCspB)를 혼합한 제품으로, 효율적으로 siRNA 혼합물을 얻을 수 있다. 미생물의 경우 일반적으로 생육온도에서 저온환경으로 바꾸면 저온에 의한 손상을 막기 위해 ColdShock 단백질 발현이 증가하는데, 이 단백질은 RNA chaperon으로도 작용한다고 알려져 있다. ColdShock 단백질 중 하나인 TmCspB를 Dicer에 의한 dsRNA 분해반응계에 첨가함으로써 분해산물이 증가하는 것을 확인하였다. (그림 5).

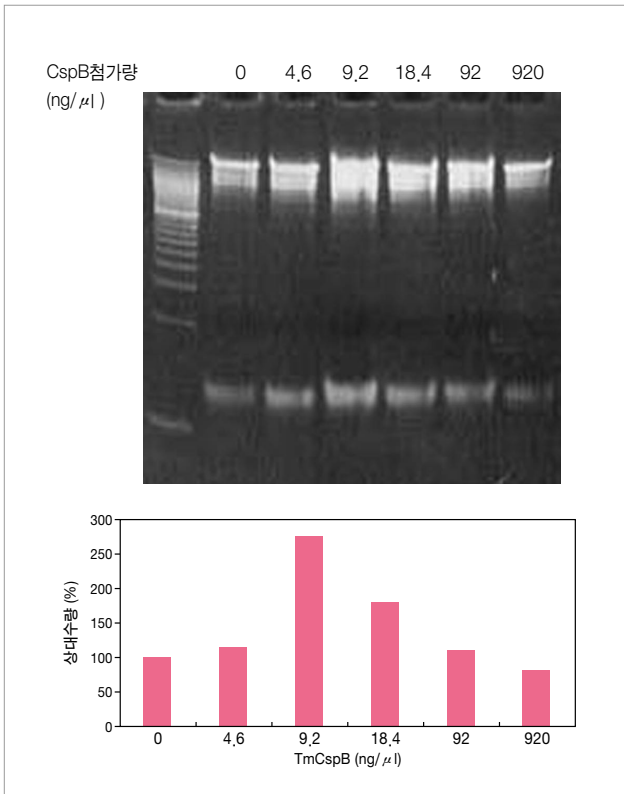


그림 5 ColdShock 단백질 TmCspB 첨가에 의한 dsRNA 분해산물의 증가 Human 유래 Dicer의 변이체 단백질을 이용해 siRNA mixture 제조시, TmCspB를 첨가하여 반응한 결과 2 ~ 3배 정도 분해산물이 증가하였다.

### 제품의 개요

Double strand RNA 절단효소의 효소 (반응 buffer 첨부)와 kit가 구비되어 있다.

#### [효소]

- si-RNaseIII™ (TaKaRa Code 2430A)
- ColdShock-DICER (TmCspB and fragment of h-Dicer) (TaKaRa Code 2440A)

#### [Kit]

- TaKaRa siRNA Cocktail Kit (si-RNaseIII™)(TaKaRa Code 6145)
- TaKaRa siRNA Cocktail Kit (ColdShock-DICER) (TaKaRa Code 6147)

Kit에는 T7 RNA Polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription 반응에 필요한 시약, si-RNaseIII™ 또는 ColdShock-DICER를 이용하여 절단반응에 필요한 시약 및 siRNA 혼합물 정제용 펠터가 포함되어 있다. 이 밖에 대조군 실험용 2종류의 DNA도 포함되어 있어, 그것을 이용하여 firefly luciferase에 대한 siRNA mixture를 조제할 수 있다.

### si-RNaseIII™로 만든 siRNA 혼합물에 의한 RNAi 효과 확인

#### 실험 예 1 : GFP 유전자의 경우

TaKaRa siRNA Cocktail Kit (si-RNaseIII™)를 이용해 GFP 유전자에 대한 siRNA mixture를 만들어, GFP 발현 벡터와 함께 293 세포에 감염시켜 Flowcytometry (FCM) 해석, 형광현미경 관찰 및 Real Time RT-PCR로 RNAi 효과를 조사하였다.

또한 비교실험으로써 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품)로 조제한 3종의 시료 (완전 분해물, 부분 분해물, 약 23 mer 영역의 gel 회수산물)와 합성 siRNA 시료를 이용해 동일한 실험을 실시하였다.

참고로 각 절단산물의 15% polyacrylamide gel 전기영동 결과를 그림 6에 나타내었다.

FCM 해석 결과 (그림 7-A) 및 형광현미경을 이용한 관찰결과 (그림 7-B)를 통해 si-RNaseIII™로 조제한 siRNA mixture는 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품)에 의한 dsRNA의 완전분해물, 부분분해물보다 뛰어난 GFP 발현 억제효과를 나타내었고, gel 회수산물과 거의 같은 정도로 나타났다. 이런 경향은 Real Time RT-PCR을 이용한 GFP mRNA 정량결과로 알 수 있었다 (그림 7-C).

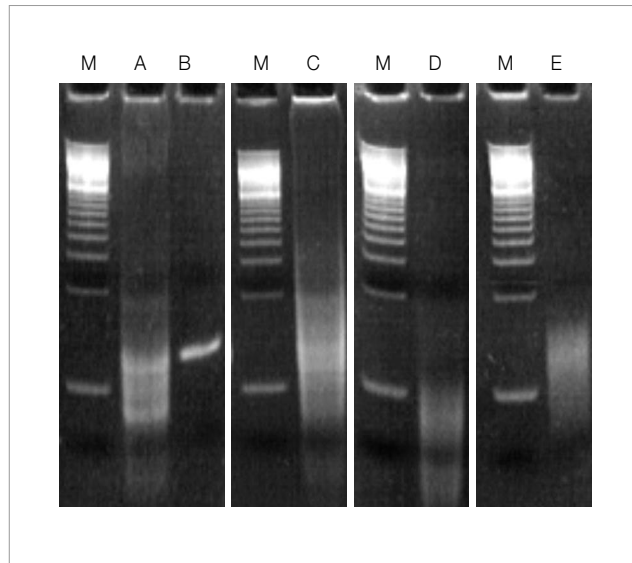


그림 6 GFP dsRNA 절단산물의 전기영동 사진

- M: 20 bp DNA Ladder
- A: si-RNaseIII™ 절단산물
- B: 합성 siRNA(21mer)
- C: 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품) 부분 분해산물
- D: 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품) 완전 분해산물
- E: 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품) 부분 분해산물에서 gel을 회수한 약 21 mer의 산물

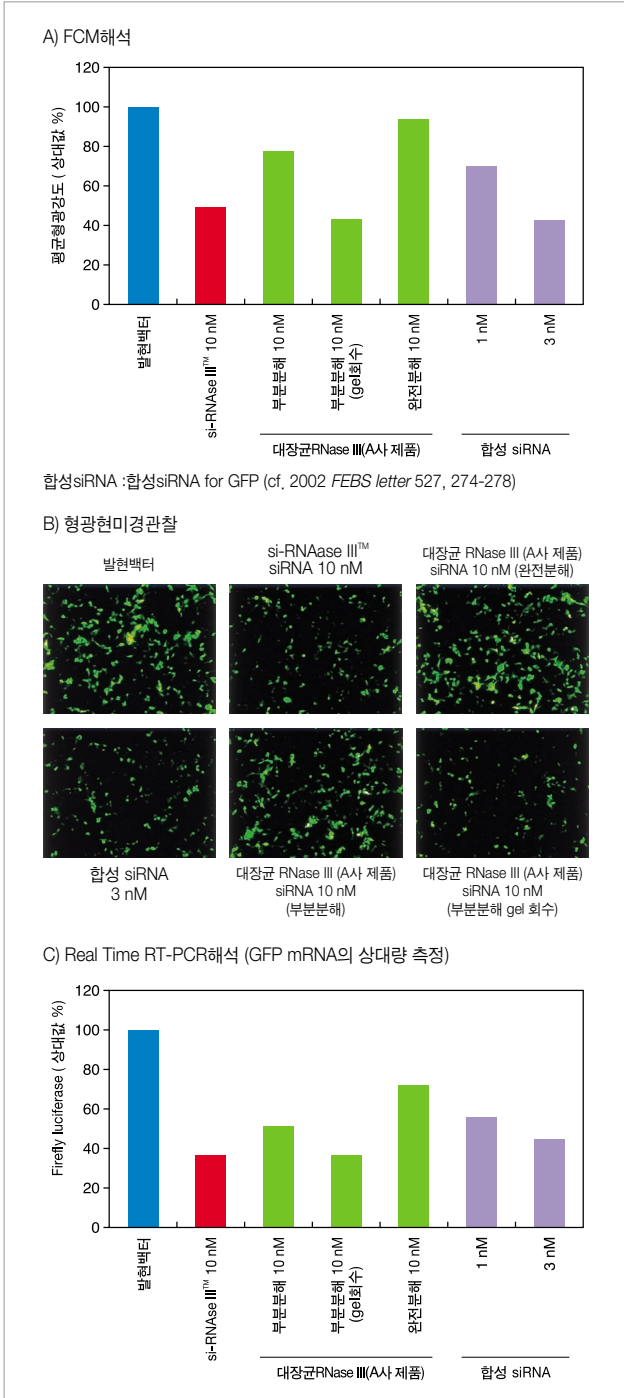


그림 7 si-RNaseIII™로 제작한 siRNA 혼합물에 의한 GFP의 발현 억제 본 kit을 이용하여 *in vitro* transcription 반응 및 si-RNaseIII™에 의한 절단반응을 수행해 GFP 유전자의 약 700 염기에 대한 siRNA mixture를 제작하였다. 비교대조로써 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품)로 dsRNA를 완전분해 또는 부분분해한 것과, 부분 분해물의 일부를 gel로 정제해 약 21 mer 영역을 회수한, 총 3종류의 시료를 제작하였다. 다음으로 GFP 발현 벡터와 각 siRNA 혼합물을 GeneJuice Transfection Reagent 및 RiboJuice™ siRNA Transfection Reagent를 이용해 293 세포에 transfection시켜, 24 시간 배양 후 FACS Vantage (BECTON DICKINSON)를 이용한 FCM 해석 (A), 형광 현미경 관찰 (B) 및 Smart CyclerII를 이용한 Real Time RT-PCR (C)에 각각 이용해 GFP에 대한 RNAi 효과를 측정했다. 이 밖에 각 시료의 농도는 siRNA를 세포에 첨가할 때의 마지막 농도이다 (siRNA 1분자=22 bp=MW15,884로 계산).

실험 예2: Firefly luciferase 유전자를 target으로 할 경우

실험 예1과 같은 방법으로 firefly luciferase 유전자에 대한 siRNA mixture를 만들어 RNAi 효과를 조사하였다 (그림 8). 비교대조로써 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품)로 조제한 3종의 시료를 이용하였다.

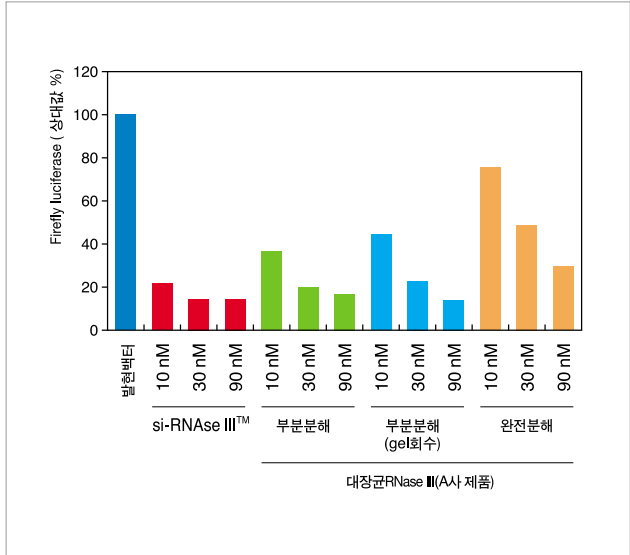


그림 8 si-RNaseIII™로 조제한 siRNA mixture에 의한 firefly luciferase 유전자의 발현 억제 본 kit을 이용해 *in vitro* transcription 반응으로 firefly luciferase 유전자의 500염기에 대한 dsRNA를 제작하여 si-RNaseIII™로 절단하였다. 비교대조로써 대장균 유래 RNaseIII (A사 제품)로 절단하여, 실험 예1과 마찬가지로 완전분해 시료, 부분 분해 시료 및 21 mer 영역의 gel 회수 시료 등 3종류를 제작하였다. 다음으로 firefly luciferase 발현 plasmid 및 renilla luciferase 발현 plasmid와 함께 firefly luciferase 유전자를 target으로 조제한 siRNA mixture를 GeneJuice® Transfection Reagent 및 RiboJuice™ siRNA Transfection Reagent를 이용하여 동시에 293 세포에 transfection시킨 후, 24시간 배양하여 세포 내에 발현된 firefly luciferase 발현량을 효소활성으로 측정하였다. 또한 plasmid의 세포내로의 도입 효율은 renilla luciferase 발현량으로 보정하였다. 각 시료 농도는 siRNA 혼합물을 세포에 첨가했을 때의 마지막 농도이다.

그림8의 결과에서 si-RNaseIII™로 조제한 siRNA mixture는 대장균 유래 RNaseIII로 조제한 때보다도 높은 효율로 firefly luciferase의 발현을 억제하고 있음이 확인되었다.

실험 예3: Dicer (B사 제품)와의 비교

Firefly luciferase 유전자에 대한 siRNA mixture를 si-RNaseIII™와 Dicer (B사 제품)를 이용하여 각각 조제한 후, 양쪽의 RNAi 효과를 비교하였다. 또한 합성 siRNA와도 동시에 비교하였다 (그림 9).

si-RNaseIII™로 조제한 siRNA mixture는 양을 늘리면 Dicer로 조제한 것과 거의 비슷하게 firefly luciferase의 발현이 억제되는 것을 확인하였다.

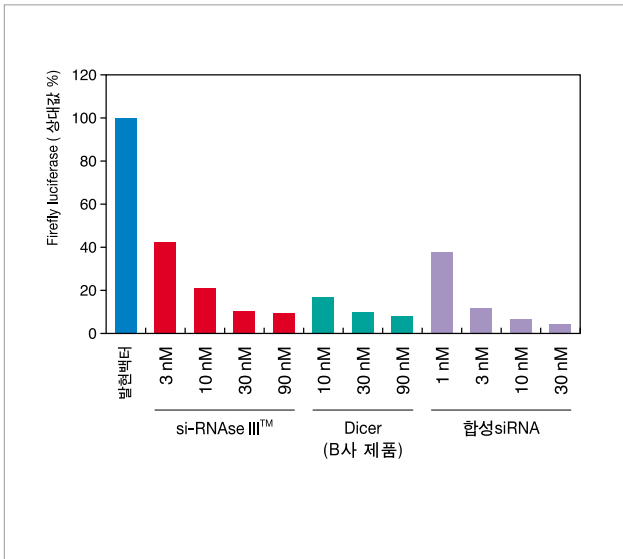


그림 9 여러 가지 방법으로 제작한 siRNA를 이용한 firefly luciferase 유전자의 발현 억제 효과 (si-RNaseIII™ 분해산물, B사 제품 Dicer 분해산물 및 합성 siRNA에 의한 RNAi 효과의 비교)

si-RNaseIII™를 이용해 제작한 firefly luciferase 유전자에 대한 siRNA mixture의 RNAi 효과를 Dicer (B사 제품)에 의한 분해물의 RNAi 효과와 비교하였다. Dicer에 의한 siRNA 조제는 제품 설명서를 참고하였다. 실험 예2와 마찬가지로 firefly 및 renilla luciferase 발현 벡터와 함께 siRNA 혼합물을 293 세포에 transfection하여 firefly luciferase의 발현량을 측정하였다. 비교대조군으로서 21 mer의 합성 siRNA도 이용하였다.

**【si-RNase III™의 장점】**

실험 예 1 ~ 3의 결과에서 si-RNaseIII™를 이용하여 RNAi 실험을 수행할 경우, 다음과 같은 장점이 있다.

- ① si-RNaseIII™의 경우, 대장균 RNaseIII에 비해 긴 dsRNA 분해가 완만하며, RNAi 효과가 낮은 수십 mer 정도의 짧은 siRNA mixture가 잘 생기지 않는다.
- ② si-RNaseIII™는 ①의 장점으로 인해 얻어진 절단산물 (siRNA 혼합물)을 gel로 분획하지 않고 세포에 transfection할 수 있다.
- ③ si-RNaseIII™로 만든 siRNA mixture는 뛰어난 RNAi 효과를 나타낸다.

본 효소를 포함한 kit를 이용함으로써 보다 간편하고 효율적인 RNAi 실험을 할 수 있다.

**ColdShock-DICER로 만든 siRNA 혼합물에 의한 RNAi 효과 확인**

**실험 예 4 : GFP 유전자의 경우**

TaKaRa siRNA Cocktail Kit (ColdShock-DICER)를 이용해 GFP 유전자에 대한 siRNA mixture를 만들어, 여러 가지 방법으로 RNAi 효과를 조사하였다 (그림 10).

FCM 해석 결과, ColdShock-DICER로 조제한 siRNA 혼합물은 B사 제품 Dicer와 같은 정도의 GFP 발현 억제효과를 나타내었으며, 대조군 (발현 plasmid만 도입)의 약 20%까지 발현이 억제되는 것을 확인하였다(그림 10-B). 이런 경향은 Real Time RT-PCR을 이용한 GFP mRNA 정량 결과에서도 확인하였다.

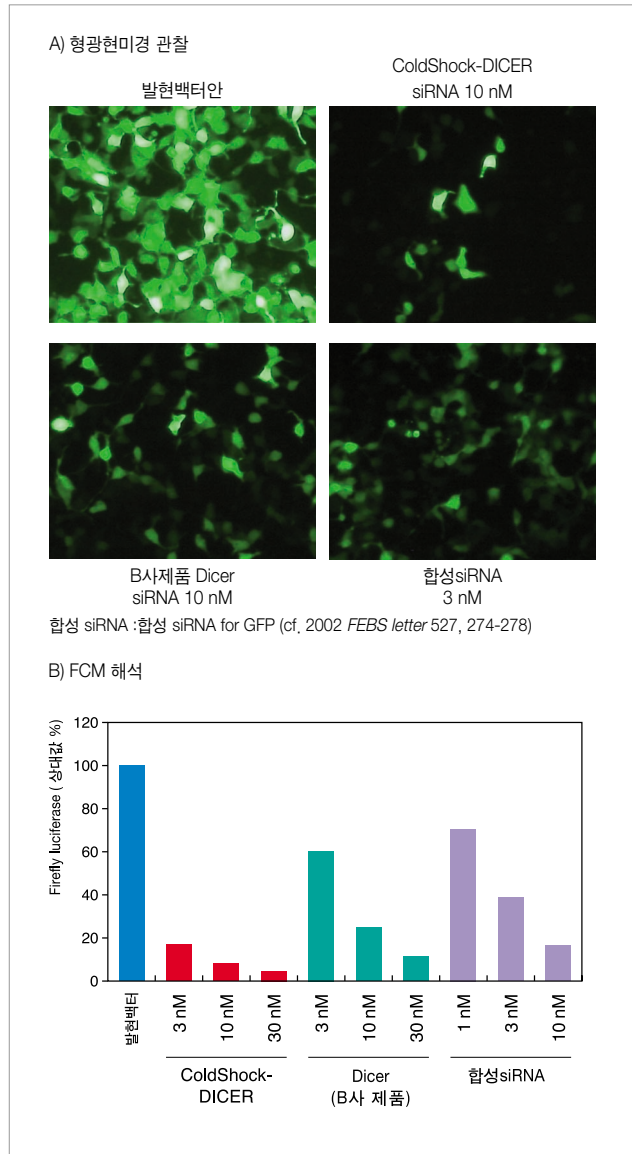


그림 10 ColdShock-DICER로 조제한 siRNA에 의한 GFP의 발현 억제. 본 kit를 이용해 *in vitro* transcription 반응과 ColdShock-DICER에 의한 절단반응을 수행하여, GFP 유전자의 약 700 염기에 대한 siRNA mixture를 제작하였다. 다음으로 siRNA mixture와 GFP 발현 벡터를 293 세포에 도입하여, 실험 예 1과 마찬가지로 RNAi 효과를 조사하였다 (A, B). 비교대조로서 B사 제품 Dicer로 조제한 siRNA 혼합물 및 합성 siRNA를 사용하였다.

**실험 예 5: Firefly luciferase 유전자의 경우**

Firefly luciferase 유전자에 대한 siRNA 혼합물을 TaKaRa siRNA Cocktail Kit (ColdShock-DICER)와 Dicer (B사 제품)를 이용해 각각 조제하여, RNAi 효과를 비교하였다 (그림 11). 또한 합성 siRNA와도 동시에 비교하였다.

ColdShock-DICER로 조제한 siRNA mixture는 B사 제품 Dicer와 거의 같은 효율로 firefly luciferase의 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

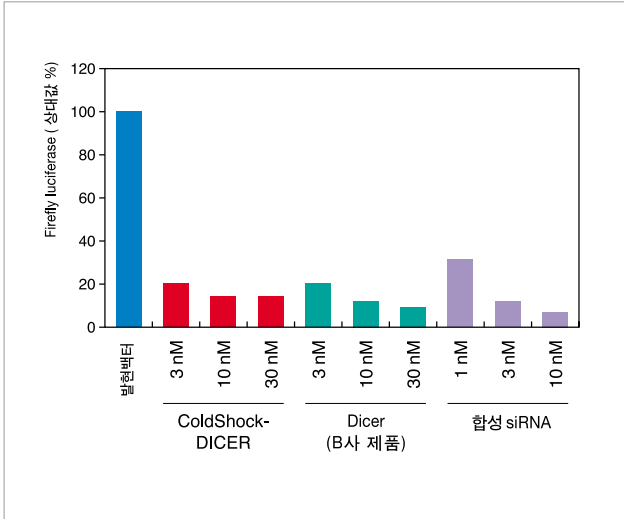


그림 11 ColdShock-DICER로 조절된 siRNA에 의한 firefly luciferase 유전자의 발현 억제 실험 예4와 마찬가지로 *in vitro* transcription 반응으로 firefly luciferase 유전자의 500 염기에 대한 dsRNA를 제작해 ColdShock-DICER에 의한 절단반응을 수행하였다. 얻어진 siRNA mixture를 luciferase 발현 벡터와 함께 293 세포에 직접 도입하였다. B사 제품의 Dicer를 이용한 siRNA 조절은 제품 설명서를 참고하였다. 실험 예2와 마찬가지로, firefly luciferase 유전자에 대한 RNAi 효과를 평가하였다. 또한 각 시료의 농도는 siRNA mixture를 세포에 첨가했을 때의 마지막 농도이다.

실험 예 4, 5의 결과에서도 명확히 알 수 있듯이, ColdShock-DICER (사람 유래 Dicer 변이체 및 TmCspB의 mixture)로 효율적인 siRNA를 제작할 수 있으며, 이 siRNA mixture를 사용함으로써 효과적인 RNAi 실험을 할 수 있다.

## siRNA 발현 벡터: pSINsi 시리즈 및 pBAsi 시리즈

RNAi 실험방법 중 하나로 siRNA 발현 벡터를 세포 내에 도입하여 세포 내에서 siRNA를 조절하는 방법이 있다. 이 방법은 siRNA를 직접 세포에 도입하는 방법보다 RNAi 효과가 길게 지속된다는 장점이 있다. 또한 이용하는 벡터에 따라서도 기대되는 RNAi 효과가 달라진다. RNAi 효과를 장시간 지속하고자 할 경우에는 retrovirus 벡터, siRNA를 고효율로 도입하고자 할 경우에는 adenovirus 벡터가 적합하다.

여기에서는 당사가 새로 개발한 siRNA 발현 재조합 retrovirus 제작용 pSINsi 벡터 시리즈와 siRNA 발현 재조합 adenovirus제작용 pBAsi 벡터 시리즈에 대해 소개한다. 각각의 시리즈에는 서로 다른 RNA polymerase III (PolIII)계 promoter (human U6, human H1 또는 mouse U6)를 사용한 3종류의 벡터가 구비되어 있다.

### 바이러스 벡터에 대하여

유전자 도입 벡터로서 바이러스 성질을 가지고 있는 바이러스 벡터가 개발되었다. 가장 일반화되어 있는 것으로 retrovirus 벡터와 adenovirus 벡터이며, 두 벡터 모두 유전적으로 복제능력이 결실되어 있으므로 안전하게 다룰 수 있다.

Retrovirus 벡터는 숙주 염색체 내로 안정하게 삽입되는 특성이 있어 지속적인 발현에 매우 유용하다. Adenovirus 벡터는 역가가 높고 감염 영역이 폭넓은 특징이 있어, 고효율의 유전자 도입이나 *in vitro*에서의 도입이 유용하다. 이 밖에 재조합 바이러스 제작이나 취급은 재조합 DNA 실험 지침을 참고 하십시오.

### pSINsi 벡터에 대하여

pSINsi 벡터는 자기불활성형 retrovirus 벡터 plasmid를 기본골격으로 하며, polIII계 promoter에 의해 hairpin형 RNA를 발현시키는 벡터이다 (그

림 12). 구축된 siRNA 발현 retrovirus 벡터에서 Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho와 293 세포 또는 packaging 세포를 이용하여 siRNA 발현 재조합 retrovirus를 조절할 수 있다.

3' LTR U3 영역의 promoter 활성이 결손 되어 있으므로, 역전사 후 염색체에 편입된 provirus 상태에서는 5' LTR의 promoter 활성이 소실된다. 그렇기 때문에 provirus 유래의 mRNA는 전사되지 않으며, polIII계 promoter로부터의 hairpin형 RNA와 SV40 promoter로부터의 neomycin 내성 유전자만 효율적으로 전사된다.

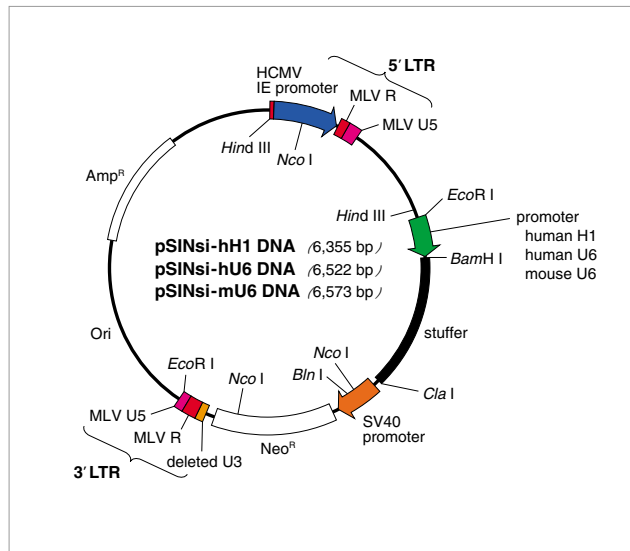


그림 12 pSINsi 벡터

**pBAsi 벡터에 대하여**

pBAsi 벡터는 매우 단순한 siRNA 발현용 벡터이다 (그림 13). PolIII계 promoter downstream에 hairpin형 RNA를 발현시키기 위한 합성 DNA 서열을 삽입함으로써 siRNA 발현 plasmid를 제작할 수 있다. 이 siRNA 발현 plasmid를 그대로 RNAi 실험에 이용할 수 있는 것 이외에, "promoter + hairpin형 RNA 서열"을 추출해 adenovirus 벡터에 용이하게 도입 할 수 있다. 재조합 adenovirus 제작 시에는 Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)의 사용을 권장한다.

**siRNA 발현 바이러스 벡터 제작법**

pSINsi와 Retrovirus Packaging Kit를 이용한 siRNA 발현 retrovirus 제작법은 그림 14와 같다. pBAsi 벡터와 Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)를 이용한 siRNA 발현 adenovirus 제작법은 그림 15와 같다. 목적서열 선택이나 hairpin형 RNA를 발현하기 위한 합성 oligo의 디자인은 당사로 문의(02-575-7409)하여 주십시오.

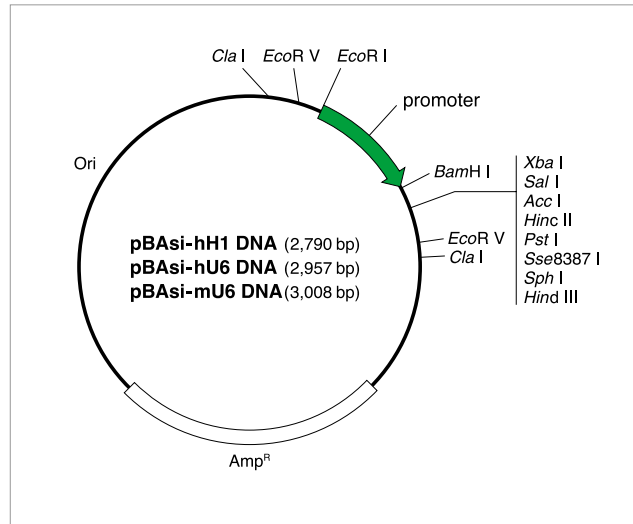


그림 13 pBAsi 벡터

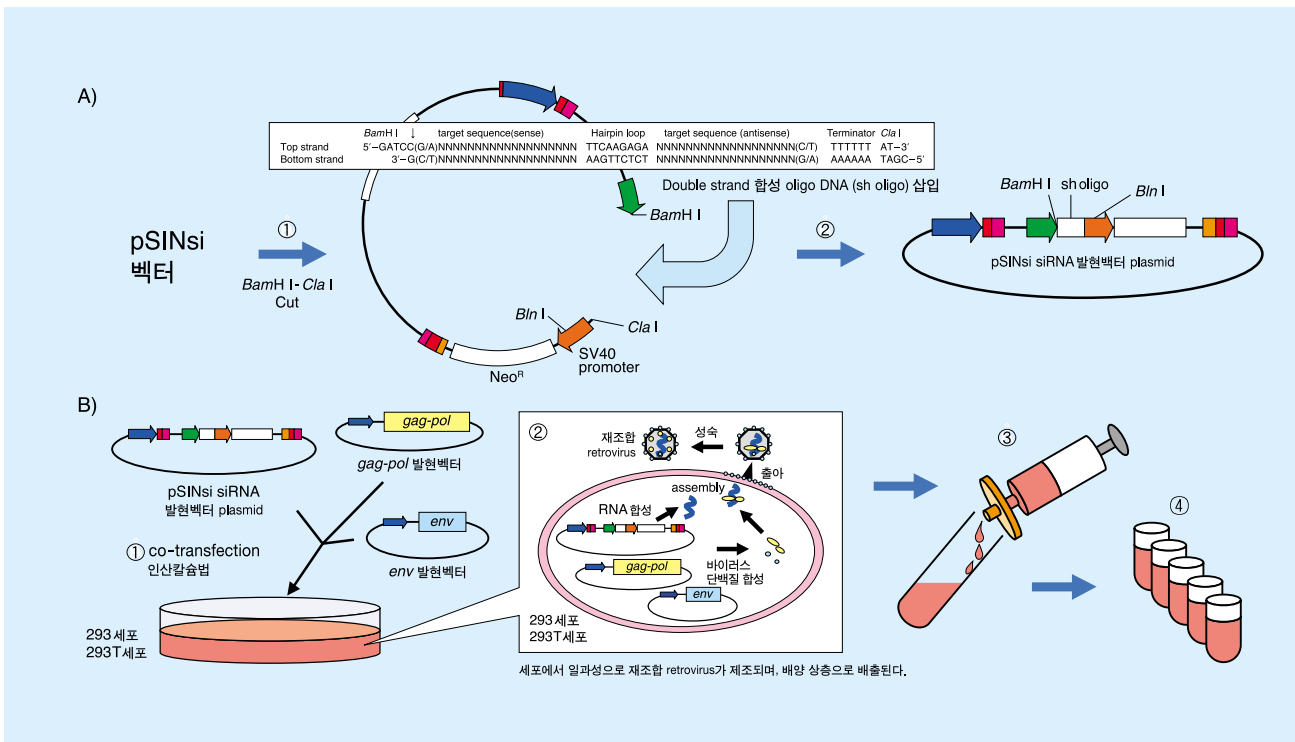


그림 14 pSINsi 벡터를 이용한 siRNA 발현 재조합 retrovirus 제작법

A: siRNA 발현 벡터 plasmid의 제작

- ① pSINsi vector를 BamHI과 ClaI으로 처리한 후, stuffer (920 bp)를 제거한다.
- ② Hairpin형 RNA 발현을 위해 double strand 합성 oligo DNA (sh oligo)를 BamHI-ClaI 부위를 이용하여 ligation 한다.
- ③ Insert 확인: BlnI과 BamHI으로 처리하여 agarose 전기영동에 의해 약 340 bp의 단편을 확인한다. 필요에 따라 삽입 단편의 염기서열을 확인한다.

B: siRNA 발현 재조합 retrovirus 제작 (Retrovirus Packaging Kit를 이용하는 방법)

- ①, ② 293 세포 또는 293T 세포에 A에서 제작한 siRNA 발현 벡터 plasmid, kit에 포함되어 있는 retrovirus gag-pol 발현 벡터 및 retrovirus env 발현 벡터를 인산칼슘법으로 동시에 transfection한다 (transfection 시약은 kit에 첨부되어 있다)
- ③ 배지를 교환하고 transfection 48시간 후에 배양 상층액을 0.45 μm 필터로 여과하여, 여과액 (virus액)을 회수한다.
- ④ 회수한 virus액을 소량으로 나누어 -80°C에서 보존한다 (동결용해의 반복은 피한다).



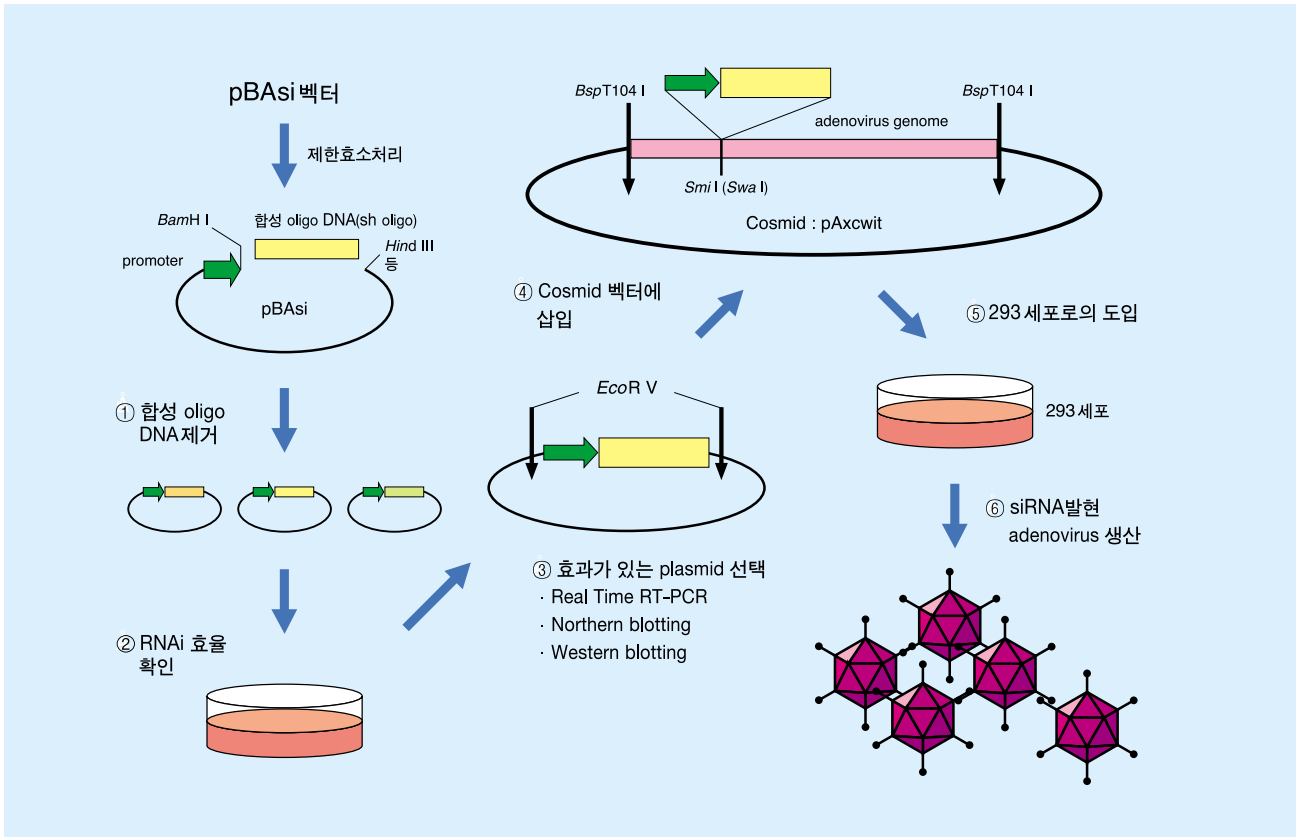


그림 15 pBAsi 벡터를 이용한 siRNA 발현 재조합 adenovirus 제작법

- ① “목적 서열 (sense)”, “loop 서열”, “목적 서열 (antisense)”, “terminator 서열”을 순서대로 갖는 oligo DNA를 합성하여 기본 plasmid 벡터 pBAsi의 cloning site에 삽입한다.
- ② 선택하는 목적 서열에 따라 RNAi 효과 (유전자 억제효과)가 다르기 때문에, 일반적으로 3 ~ 5종류의 목적 서열을 선택하며, 각각에 대해 발현 plasmid를 구축한다.
- ③ 제조된 siRNA 발현 plasmid를 세포에 도입하여, 적당한 방법 (Real Time RT-PCR, northern blotting, western blotting 등)으로 목적 유전자의 발현량을 조사해 RNAi 효과가 높은 plasmid를 선택한다.
- ④ 제한효소 *EcoRV*로 “promoter + hairpin형 RNA 서열”을 추출해, adenovirus 제작용 cosmid pAxcwit에 삽입한다.
- ⑤ Insert가 삽입된 cosmid에 제한효소를 처리하여 293 세포에 감염시킨다.
- ⑥ siRNA 발현 adenovirus 벡터를 얻을 수 있다.

실험 예 1: siRNA 발현 retrovirus에 의한 GFP의 knockdown

siRNA 발현 벡터 제작

그림 14의 방법에 따라 GFP의 target 서열 (GGAGTTGTCCCAATTCTTG)에 대한 hairpin형 RNA 발현에 주형이 되는 oligo DNA (그림 16)를 합성하여, 그것을 pSINsi-hH1, pSINsi-hU6, pSINsi-mU6 벡터의 *BamH I-Cla I* 부위에 각각 삽입하고, 3종류의 siRNA 발현 retrovirus 벡터 plasmid를 구축하였다. Negative 대조군으로서 target 서열에 대해 scramble 서열을 삽입한 plasmid도 구축하였다.

바이러스 생산과 역가 측정

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho를 이용해 293T 세포에서 일회성으로 바이러스를 생산하고 (그림 14-B), NIH/3T3 세포에서 역가를 측정하였다. 제조된 바이러스 역가는 아래와 같다.

	lot수	역가( $\times 10^6$ cfu/ml)
Eco SINsi	5	3.0 ~ 4.2
Ampho SINsi	5	0.5 ~ 2.1

Ecotropic virus의 역가는 높은 경향이 있었지만, promoter hH1, hU6, mU6 역가의 큰 차이는 없었다.

	<i>BamH I</i>	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator <i>Cla I</i>
Top strand	5'-GATCC	GGAGTTGTCCCAATTCTTG	TTCAAGAGA	CAAGAATTGGGACAACCTCC	TTTTTT AT-3'
Bottom strand	5'-G	CCTCAACAGGGTTAAGAAC	AAGTTCTCT	GTTCTTAACCCTGTTGAGG	AAAAAA TAGC-3'

**RNAi 효과 확인**

사전에 GFP 유전자를 도입해 GFP의 안정 발현을 확인한 NIH/3T3 세포 (쥐 유래) 및 HT1080 세포 (사람 유래)에 GFP 유전자에 대한 hairpin형 RNA를 발현하는 retrovirus 벡터 Amphi-SINsi-hH1-GFP, Amphi-SINsi-hU6-GFP, Amphi-SINsi-mU6-GFP 및 negative control 벡터 Amphi-SINsi-hU6-Nc를 MOI=0.1 이하의 조건에서 폴리블렌법으로 감염시켰다. G418 배지에서 2주간 배양하여 감염세포를 선택한 후, 각 세포에서 발현된 GFP 형광 강도를 flow cytometer로 측정해, GFP 안정 발현세포에 대한 상대평균값을 산출하였다. 그림 17에서 알 수 있듯이, siRNA 발현 retrovirus에 의한 RNAi 효과가 확인되었다.

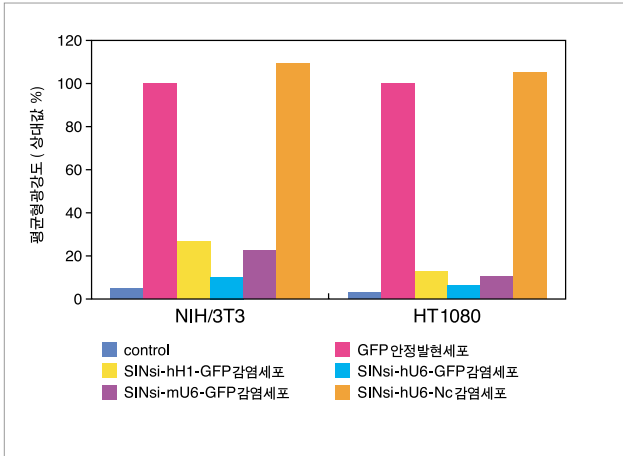


그림 17 siRNA 발현 retrovirus에 의한 GFP의 knock-down

**실험 예2: siRNA 발현 adenovirus에 의한 knock-down siRNA 발현 벡터 제작**

그림 15의 방법에 따라 GFP의 target 서열에 대한 siRNA를 발현하는 adenovirus를 제작하였다. 얻어진 바이러스 역가는  $6.8 \sim 9.0 \times 10^9$  pfu/ml (TCID50법에 의함)으로, 일반적인 재조합 adenovirus에 비해 손색이 없었다.

**RNAi 효과 확인**

사전에 GFP 유전자를 도입하여 GFP의 안정 발현을 확인한 HepG2 세포 (사람 간장 유래)에 재조합 adenovirus를 MOI=60으로 감염시켜, 5일 후에 flow cytometer로 형광 강도를 관찰하였다. 그림 18에서 알 수 있듯이, siRNA 발현 adenovirus에 의한 RNAi 효과가 확인되었다.

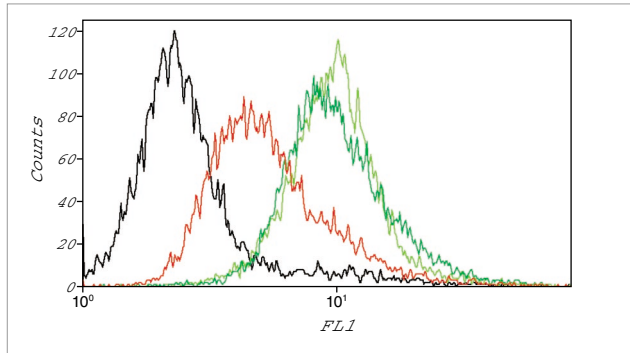


그림 18 siRNA 발현 adenovirus에 의한 GFP의 knock-down  
검정색: HepG2 세포; 녹색: GFP 발현 HepG2; 적색: GFP 유전자를 목적으로 하는 siRNA 발현 adenovirus를 감염시킨 GFP 발현 HepG2 세포; 황녹색: scramble (NC) siRNA 발현 adenovirus를 감염시킨 GFP 발현 HepG2 세포 (negative control)

**기타 RNAi 관련 제품 및 관련 서비스**

**in vitro transcription T7 Kit**

T7 RNA Polymerase를 이용한 *in vitro* transcription 반응에 의해, 대량의 single strand RNA를 합성하기 위한 kit이다. 전사 반응에 필요한 시약 외에, 반응 후에 주형 DNA를 제거하기 위한 RNase free DNase I 등을 포함한다.

T7 RNA Polymerase는 T7 promoter 서열을 포함한 double strand DNA (PCR 산물이나 linear plasmid)를 주형으로 promoter down stream 서열을 전사하여, 효율적으로 single strand RNA를 합성한다. 예를 들면 kit에 첨부된 Control Template 20 ng를 주형으로 약 2 kb의 RNA를 합성할 경우, 20 μl의 반응계에서 일반적으로 10 μg 정도의 RNA가 얻어진다 (실험에 참조). 또한 약 15 kb까지의 주형 DNA에 대응하는 transcript 합성을 확인할 수 있다.

RNAi 연구 등 대량의 RNA가 필요한 경우에 적합한 제품이며, 본 kit로 sense 및 antisense RNA를 합성해 annealing한 double strand RNA를 si-RNaseIII™나 ColdShock-DICER로 절단하여 siRNA mixture를 제작할 수도 있다.

또한 본 kit에는 single strand RNA의 구아닌산 잔기의 3' 측 phosphodiester 결합만을 특이적으로 절단하는 효소인 RNase T1이 포함되어 있다. 따라서 *in vitro* transcription 반응을 통해 siRNA를 제작할 수도 있다. 자세한 내용은 당사 온라인 카탈로그를 참고하기 바란다.

**실험 예: RNA 합성량 비교**

제품 protocol에 따라 20 μl 및 100 μl 반응계에서 주형 DNA 양을 바꿔 transcription 반응을 수행한 뒤 합성되는 RNA 양을 조사하였다. 주형 DNA로서 kit에 첨부되어 있는 Control Template를 사용하여 42℃에서 2시간 반응한 후, RNase free DNase I을 처리하였다.

DNase I 처리 후, 각 반응액의 0.2 μl를 전기영동으로 확인한 결과를 그림 19에 합성된 RNA 양을 표1에 나타내었다. 표1에서 1 μg의 주형 DNA에서 100 μg 이상의 RNA transcript가 합성됨을 알 수 있었다.

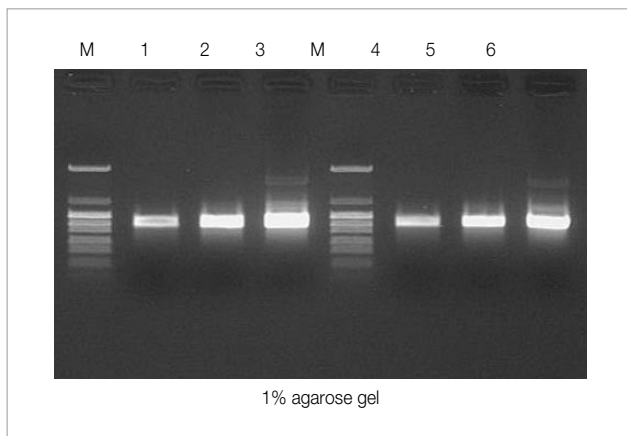


그림19 합성된 RNA의 agarose gel 전기영동 결과

M: pHY Marker

1: 20 µl volume template 20 ng

2: 20 µl volume template 200 ng

3: 20 µl volume template 1 µg

4: 100 µl volume template 20 ng

5: 100 µl volume template 200 ng

6: 100 µl volume template 1 µg

표1 RNA 합성량\*

반응 용량	주형량	RNA transcript (µg)
20 µl volume	template 20 ng	14.7
	template 200 ng	26.1
	template 1 µg	48.9
100 µl volume	template 20 ng	14.1
	template 200 ng	67.2
	template 1 µg	119.1

\* : 정제 후에 RNA transcript 용액의 OD<sub>260</sub> 값으로 산출하였다.

siRNA 및 plasmid 도입 시약

합성 siRNA나 siRNA mixture의 세포내 도입시에는 TransIT<sup>®</sup>-TKO Transfection Reagent 또는 RiboJuice<sup>™</sup> siRNA Reagent를 사용하십시오.

동시에 plasmid를 도입할 경우에는 TransIT<sup>®</sup> Transfection Reagent 시리즈 또는 GeneJuice<sup>®</sup> Transfection Reagent를 함께 사용하십시오. (제품에 대한 자세한 내용은 당사 온라인 카탈로그를 참조하십시오).

siRNA 합성 서비스

효율적인 target 유전자 발현억제 실험에 사용할 수 있도록 충분한 양을 고순도로 제공한다 (annealing이 끝난 double strand 또는 single strand pair로 납품한다).

【문의】

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구지원사업부 TEL: 02-575-7409

RNAi 관련 제품 리스트

Double strand RNA 절단효소에 의한 siRNA mixture 제작에!!

제품명	TaKaRa Code	용량
si-RNase III <sup>™</sup>	2430A	100 U
	2430B	500 U
ColdShock-DICER (TmCspB and fragment of h-Dicer)	2440A	50 U
	2440B	250 U
TaKaRa siRNA Cocktail Kit (si-RNaseIII <sup>™</sup> )	6145	20회
TaKaRa siRNA Cocktail Kit (ColdShock-DICER)	6147	10회
<i>in vitro</i> Transcription T7 Kit (for siRNA synthesis)	6140	50회

siRNA 발현 벡터 구축

제품명	TaKaRa Code	용량
pSINsi-hH1 DNA	3660	20 µg
pSINsi-hU6 DNA	3661	20 µg
pSINsi-mU6 DNA	3662	20 µg
pBAsi-hH1 DNA	3220	20 µg
pBAsi-hU6 DNA	3221	20 µg
pBAsi-mU6 DNA	3222	20 µg
Retrovirus Packaging Kit Eco	6160	10회
Retrovirus Packaging Kit Ampho	6161	10회
Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)	6170	1 Kit (5회용)

siRNA 및 plasmid 도입

제품명	TaKaRa Code	용량
TransIT <sup>®</sup> -TKO Transfection Reagent	V2150	1 ml
TransIT <sup>®</sup> Transfection Reagent 시리즈	V2300 등	