



다양한 생물의 RNAi protocol을 알아!-3

포유류 배양세포에서의 siRNA에 의한 RNAi protocol

서론

기존의 유전자 기능 해석은 돌연변이체 해석에서 시작되었다. 먼저 형태나 발생 이상이 확인되는 돌연변이체가 분리되었으며, 그 표현형에 관한 유전자가 cloning 되었다. 즉, 유전자 기능이 밝혀지고, 나중에 유전자 서열이 결정되었다. 그러나 지금은 human을 비롯한 많은 생물종의 전체 genome 서열이 결정되어, 유전자 기능과 염기서열 관찰 순서가 반대가 되고 있다. 즉 유전자의 염기서열만 알면 그 기능을 해석할 수 있는 역유전학 방법이 post genome 시대에 있어서의 유전자 기능해석법으로 주목 받고 있다.

염기서열을 알고 있는 특정 유전자의 기능을 억제하는 방법으로는 상동 전환 유전자 knock-out법, antisense법, ribozyme법 등을 들 수 있는데 RNAi법은 기존의 유전자 knock-out법에 비해 간편하며 저렴하고 단시간에 유전자 기능을 해석할 수 있어 종합적인 유전자 기능해석법으로서 매우 유용한 방법이다¹⁾²⁾.

원리

RNAi (RNA interference)는 기능을 저해하고자 하는 유전자의 특정 영역과 상동성이 있는 sense RNA와 antisense RNA로 이루어진 double stranded RNA (dsRNA)가 target 유전자의 전사 산물인 mRNA의 상동부분을 간섭하여 파괴하는 현상으로 1998년 선충을 이용한 실험에 의해 최초로 발표되었다³⁾.

RNAi가 발견된 당시, 포유류에서는 약 30염기쌍 이상의 긴 dsRNA를 세포에 도입하면 interferon response가 유도되어 세포가 apoptosis에 의해 죽기 때문에 포유류 세포에서 RNAi법을 이용하는 것은 어렵다는 인식이 있었다. 그러나 mouse 초기배⁴⁾⁵⁾나 포유류 배양세포⁶⁾에서도 RNAi가 일어날 수 있다고 밝혀져, RNAi의 유도기구 자체는 포유류 세포에도 존재하는 것으로 알게 되었다. 이 밖에 현재는 매우 짧은 (21 ~ 23염기쌍) dsRNA (short interfering RNA: siRNA)가 포유류 조직세포계에서도 세포 독성을 나타내지 않고 RNAi를 유도하는 것으로 나타나⁷⁾, 포유류의 genome 기능 해석도 비약적으로 진전될 것으로 생각된다. 본 고에서는 합성 RNA로 siRNA를 만들어 포유류 배양세포계에서 RNAi를 유도하는 방법에 대해 알아본다.

준비

- Human block (ITTEC, Dry ThermoUnit DTU)

시약

- Target 유전자와 상동성이 있는 21~23염기의 합성 RNA¹⁾: sense strand와 antisense strand는 annealing 되었을 때 3'에 2염기 overhang하는 것으로 설계한다²⁾.
- 40 mM NaCl/20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)
- 250 mM CaCl₂
- 2×HBS [10 g HEPES, 16 g NaCl, 2 g Na₂HPO₄/1,000 ml (pH 7.1)] 또는 2×HEBS [16 g NaCl, 0.7 g KCl, 0.36 g Na₂HPO₄, 2 g dextrose, 12 g HEPES/1,000 ml (pH 7.1)]

*1 dsRNA는 single stranded RNA의 합성으로 제작하며, double strand로 annealing 하여 합성한다. 또한 T7 RNA polymerase 조합부위의 downstream에 19염기의 target 유전자 서열을 가지는 합성 oligonucleotide로부터 *in vitro* transcription에 의해 siRNA를 합성하는 방법도 보고되어 있다.

*2 3'에 2염기 overhang 되어 있는 siRNA는 RNAi 합성방법의 성공률이 가장 높다 (그림 1).

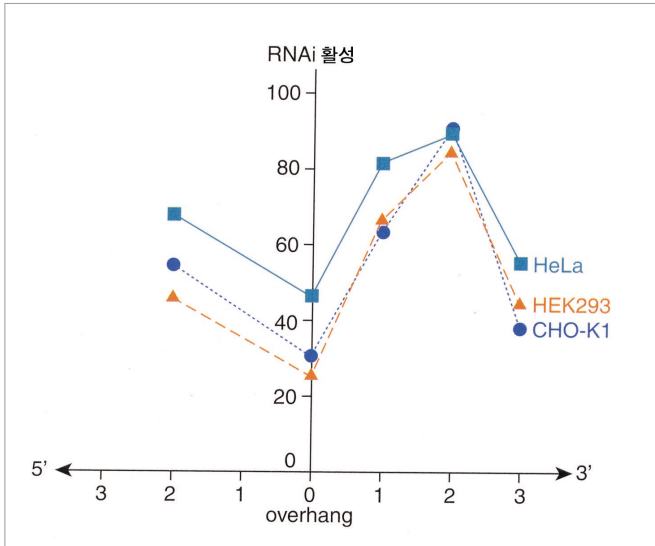


그림 1 Firefly luciferase 유전자의 siRNA (sense strand가 38 ~ 58염기에 상당한다)를 이용한 5' 또는 3' overhang의 영향
Chinese hamster CHO-K1 세포, human HeLa 세포 및 HEK293 세포에서의 RNAi 효과. Firefly luciferase 유전자 발현 벡터 (pGL3-Control) internal control로서 sea pansy luciferase 유전자 발현 벡터 (pRL-TK)를 siRNA와 동시에 감염시켜, RNAi 활성을 측정하였다. 3'에 2염기 overhang한 siRNA가 RNAi 활성이 가장 높다.

방법

1. Single stranded RNA annealing

- 다음과 같이 시약을 혼합한다.

Sense strand RNA (100 uM)	$\times \mu\text{l}^{*3}$
Antisense strand RNA (100 uM)	$\times \mu\text{l}$
40 mM NaCl/20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)	$2 \times \mu\text{l}$
$4 \times \mu\text{l}$	

*3 $\times \mu\text{l}$ 는 10~100 μl 정도

- 95°C, 5분 → 37°C, 30분 → 25°C, 30분
- 2 μl 을 TBE buffer의 전기영동으로 확인한다.
- 80°C에서 보존.

2. siRNA의 배양세포로의 co-transfection

- 배양세포를 약 0.1 ~ 0.3 $\times 10^6$ cells/ml의 농도로, 1 ml/well씩 24 well plate로 나눠 하루동안 배양한다.
- 인산 칼슘법을 이용한 co-transfection
다음과 같은 순서로 혼합하여 실온에서 15 ~ 30분 방치한다.

CaCl ₂ (250 ml)	75 μl
Transfection 하는 siRNA	0.1 ~ 100nM
2 \times HBS 또는 2 \times HEBS ⁵	75 μl

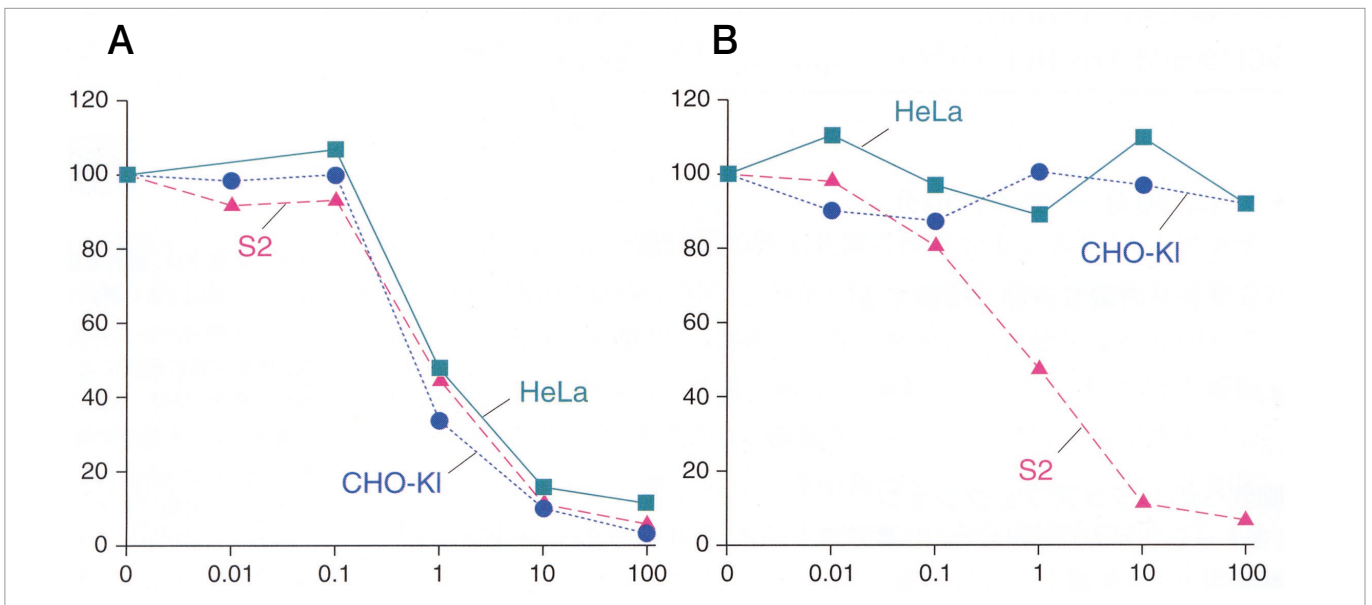


그림 2 Firefly luciferase 유전자에 대한 siRNA를 이용한 RNAi 효과를 초파리 배양세포와 포유류 배양세포에서의 비교
Firefly luciferase 유전자 발현 벡터 (pGL3-Control)와 internal control로서 sea pansy luciferase 유전자 발현 벡터 (pRL-TK)를 siRNA와 동시에 감염시켜, sea pansy luciferase 활성에 대한 firefly luciferase 활성을 측정한다.
A: 초파리와 포유류 세포에서 RNAi 효과를 나타내는 siRNA (sense strand가 firefly luciferase 유전자의 38 ~ 58염기 정도이며, 3'에 2염기 overhang한 siRNA)에 의한 RNAi 효과. 초파리 S2 세포, chinese hamster CHO-K1 세포, human HeLa 세포에서 거의 비슷한 정도의 RNAi 효과를 나타내며, firefly luciferase 활성이 저하되었다.
B: 포유류 세포에서는 RNAi 효과의 서열특이성으로 초파리 S2세포에서 뚜렷한 RNAi 효과를 나타내는 siRNA (sense strand가 firefly luciferase 유전자의 14 ~ 34염기 정도이며, 3'에 2염기 overhang한 siRNA)에서도 포유류 세포에서는 전혀 효과를 나타내지 않았다.

3) 24 well plate 중의 배양액을 aspiration으로 제거하고, 위의 혼합액을 전량 첨가한다.



4) 4시간 후에 배양액을 1 ml 씩 첨가한다.



5) 1 ~ 3일 후, RNAi 효과를 조사한다.

하루씩 효과를 조사할 경우는 감염 1일 후에 배양액을 1 ml 의 새로운 배양액과 교환한다*

*4 분 고에서는 저렴한 인산 칼슘법을 이용한 일반적인 방법을 나타내었다. 인산 칼슘법을 이용할 경우, 배양세포의 종류에 따라 적절한 조건 (세포의 밀도, HBS 또는 HEBS의 농도 등)을 설정함으로써 안정적인 감염 효율을 얻을 수 있다. 또한 인산 칼슘법 이외의 방법으로 감염과정을 실시하는 것도 가능하다.

*5 예를 들면 chinese hamster CHO-K1 세포에서는 2×HEBS, human HeLa 세포에서는 6 ~ 12배 희석한 2×HBS를 이용함으로써 고효율(≥70%)로 감염시킬 수 있다.

*6 일시적인 발현에 의한 RNAi 효과는 적어도 4 ~ 5일간은 관찰된다.

맺음말

포유류에서 sense strand와 antisense strand RNA를 동시에 또는 역방향 반복서열의 RNA를 발현하는 DNA 벡터를 도입해 RNAi를 유도할 때도 합성한 dsRNA를 도입할 때와 마찬가지로 30염기쌍 이하의 RNA를 이용할 필요가 있어, 최근 RNA polymerase III promoter를 이용한 방법이 개발되고 있다^{10,11)}.

RNAi는 서열을 알고 있는 유전자의 기능을 파괴하는 새로운 방법이다. 장점으로는 유전자 발현억제효과가 높으며, 매우 낮은 농도로 효과를 기대할 수 있다는 점, 서로 다른 복수의 유전자 기능을 동시에 억제할 수 있

는 점 등을 들 수 있다. 이 밖에 합성한 dsRNA에 의한 RNAi는 간편하며 신속할 뿐 아니라 mRNA를 파괴하여 유전자 기능을 억제하기 때문에 genome 유전자에는 전혀 영향을 주지 않는다. 따라서 유전자 성질은 유지되기 때문에 특히 사람에의 응용을 생각할 경우 유용하다. 이 밖에 효과를 나타내는 siRNA는 초파리와 비교해도 거의 비슷한 정도의 강한 작용을 나타낸다 (그림 2A). 그러나 포유류에서는 선충이나 초파리처럼 아무 영역이나 서열을 선택한다고 RNAi가 효율적으로 일어나는 것은 아니며, 무작위로 siRNA를 만들 경우 약 20 ~ 30%의 siRNA만 효과가 인정된다는 문제점이 있다 (그림 2B). 따라서 RNAi 메커니즘 해명에 따른 유효한 서열의 규칙성 확립 등이 앞으로의 과제 중 하나라 할 수 있겠다.

참고문헌

- 1) Barstead R: *Curr Opin Chem Biol* (2001) **5**: 63-66
- 2) Ueda R: *J Neurogenet* (2001) **15**: 193-204
- 3) Fire A, et al: *Nature* (1998) **391**: 806-811
- 4) Wianny F, et al: *Nat Cell Biol* (2000) **2**: 70-75
- 5) Svoboda P, et al: *Development* (2000) **127**: 4147-4156
- 6) Ui-Tei K, et al: *FEBS Lett* (2000) **479**: 79-82
- 7) Elbashir SM, et al: *Nature* (2001) **411**: 494-498
- 8) Donze O, et al: *Nucleic Acids Res* (2002) **30**: e46
- 9) Paddison PJ, et al: *Proc Nat Acad Sci USA* (2002) **5**: 1443-1444
- 10) Tuschl T: *Nature Biotech* (2002) **20**: 446-448
- 11) Miyagishi M, et al: *Nat Biotech* (2002) **19**: 497-500

믿을 수 있는 TaKaRa 합성 DNA

1. **고품질** - 귀하의 소중한 실험을 위해 TaKaRa 합성 DNA는 정품의 시약 및 컬럼만을 사용합니다.
2. **신속** - 전국 어디서나 빠르고 정확한 택배서비스로 납품하여 드립니다.
3. **다양한 서비스** - 50 nmol, 200 nmol, 대량합성, 수식합성 등 고객이 원하는 대로 합성합니다.
4. **편리한 주문** - 지역별 전문대리점, e-mail 또는 인터넷을 이용하여 온라인으로 주문할 수 있습니다.
5. **믿을 수 있는 기술지원 서비스** - 언제 어디서나 무엇이든 전문가가 상의하여 드립니다.

50 nmol(2 OD 보증) PCR Grade	
1~250 mer	→ 1,000원/base
251~2,000 mer	→ 800원/base
2,001 mer 이상	→ 600원/base

200 nmol(8 OD 보증) PCR Grade	
1~250 mer	→ 1,400원/base
251~2,000 mer	→ 1,300원/base
2,001 mer 이상	→ 1,200원/base

정제료(최종 1 OD 보증), SEQ Grade → 30,000원

온라인 주문 : www.takara.co.kr