



다양한 생물의 RNAi protocol을 알자!-4

# 애기장대의 RNAi protocol

## 서론

유전자 발현억제(gene silencing)는 식물에서 도입한 외래 유전자가 제대로 발현하지 않고 그 유전자와 유사한 내재성 유전자 발현까지 억제하는 co-suppression이라는 현상으로 처음 보고 되었다. 이 현상은 전사 후에 mRNA가 분해되어 발생하는 유전자 발현억제로 알려져 있다. 한편 식물의 바이러스 감염 예방법으로서 병원성을 약화시킨 바이러스를 미리 접종해 둬으로써 그것과 서로 같은 바이러스에 대한 내성을 식물에 부여하는 교차반응 실험(cross-protection test) 방법이 있는데, 이 방어기구 중 전사후형 유전자 발현억제가 작용하고 있다는 것도 밝혀지고 있다. 이런 현상은 처음에 식물 특유의 현상으로 여겨졌지만, 최근 선충 등에서 발견된 RNAi(RNA interference)도 동일한 기작으로 발생한다는 것이 밝혀졌다. 그리고 식물에 있어서도 선충 등과 마찬가지로 dsRNA(double strand RNA)를 식물세포 내에서 발현시키는 RNAi법으로 안티센스와 같은 기존 방법에 비해 보다 효율적으로 유전자기능 억제 효과를 얻을 수 있다는 것이 잇따라 보고 되었다<sup>2)-4)</sup>.

식물의 RNAi법으로는 hairpin 구조로 된 RNA를 식물세포 내에서 발현시킨 후 RNAi를 발생시키는 방법<sup>2),3)</sup>, 또는 목적서열을 도입한 바이러스 vector를 식물에 도입하여 바이러스의 RNA 의존형 RNA polymerase에 의해 dsRNA를 형성시키는 방법<sup>4)</sup> 등이 있다. 본 고에서는 애기장대에서 폭넓게 이용되고 있는 방법을 소개하고자 한다.

## 원리

전이유전자(trans-gene)의 기본구조는 중앙의 linker를 사이에 두고 목적서열을 대조방향으로 연결한 것이다(그림 1). 이것을 도입하여 식물세포 내에서 전사된 mRNA는 목적서열 부분에서 ds를 형성하고, RNAi에 의한 유전자 발현억제가 발생한다.

이와 같은 dsRNA를 발현시키는 vector는 아래 사이트에서 구매할 수 있다.

[http://www.pi.csiro.au/tech\\_licensing\\_biol/GeneSilencingVectors.htm](http://www.pi.csiro.au/tech_licensing_biol/GeneSilencingVectors.htm)

(pHANNIBAL, pKANNIBAL, pHELLSGATE)

<http://ag.arizona.edu/chromatin/vector.html>

(pFGC5941, pGSA1252, pGSA1204 and pGSA1285 등)

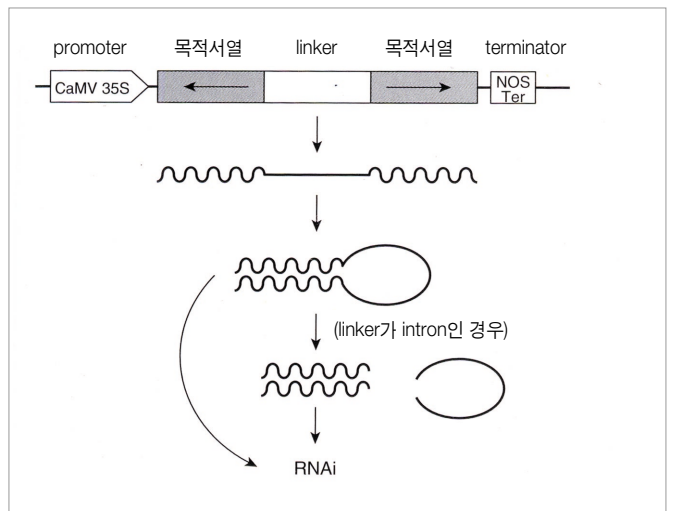


그림 1. Hairpin형 RNA를 형성하는 전이유전자(trans-gene)를 이용한 RNAi

MEMO

Promoter로 CaMV 35S와 같은 강한 promoter를 사용하면 높은 유전자 억제효과를 얻을 수 있다. 그러나 발현억제로 목적 유전자가 치사 되는 경우는 부위특이적 promoter나 유도계 promoter를 검토하는 것이 좋다.

또한 linker를 이용하면 이용하지 않은 경우 보다 강한 억제효과를 기대할 수 있다. Smith는 linker 부분에 intron을 이용함으로써 보다 강력한 유전자 억제효과를 얻을 수 있다고 보고하고 있다<sup>9)</sup>. 이에 반해 아리조나대학의 연구팀은 intron에는 특별한효과가 없다는 실험결과를 내놓고 있으며 (<http://ag.arizona.edu/chromatin/results.html> 참조), linker 효과는 그 자체를 분리하기 보다 오히려 전이유전자(trans-gene)를 안정적으로 발현시켜 dsRNA를 고효율로 형성시키는 것이 중요한 것으로 보고 있다.

RNAi의 효율에 대해서는 별도의 문헌<sup>9)</sup>에서도 자세하게 다루고 있으므로 함께 참고하기 바란다.

● 전이유전자(trans-gene)의 구축

본 고에서는 CSIRO(오스트레일리아 연방 과학 공업 연구기관)의 Waterhouse 팀이 개발한 pKANNIBAL<sup>9)</sup>을 이용한 방법을 소개한다.

〈준비〉

기기

- GeneAmp PCR system 9700/2400(Applied Biosystems)

시약

- EST / cDNA clone<sup>3)</sup>
- Cloning vector : pKANNIBAL(kanamycin 내성) 또는 pHANNIBAL(ampicillin 내성). 본 실험에는 pKANNIBAL을 사용하였다.
- Binary vector : pBE2113SF(pBE2113의 35S promoter 하류에 *Xho* I site를 첨가한 것)
- Forward primer A : (5'-*Kpn* I) xxxGGTACCxxxxxxxxxxxxxxxx
- Forward primer B : (5'-*Cla* I) xxxATCGATxxxxxxxxxxxxxxxx
- Reverse primer A : (3'-*Xho* I) xxxCTCGAGxxxxxxxxxxxxxxxx
- Reverse primer B : (3'-*Bam* H I) xxxGGATCCxxxxxxxxxxxxxxxx

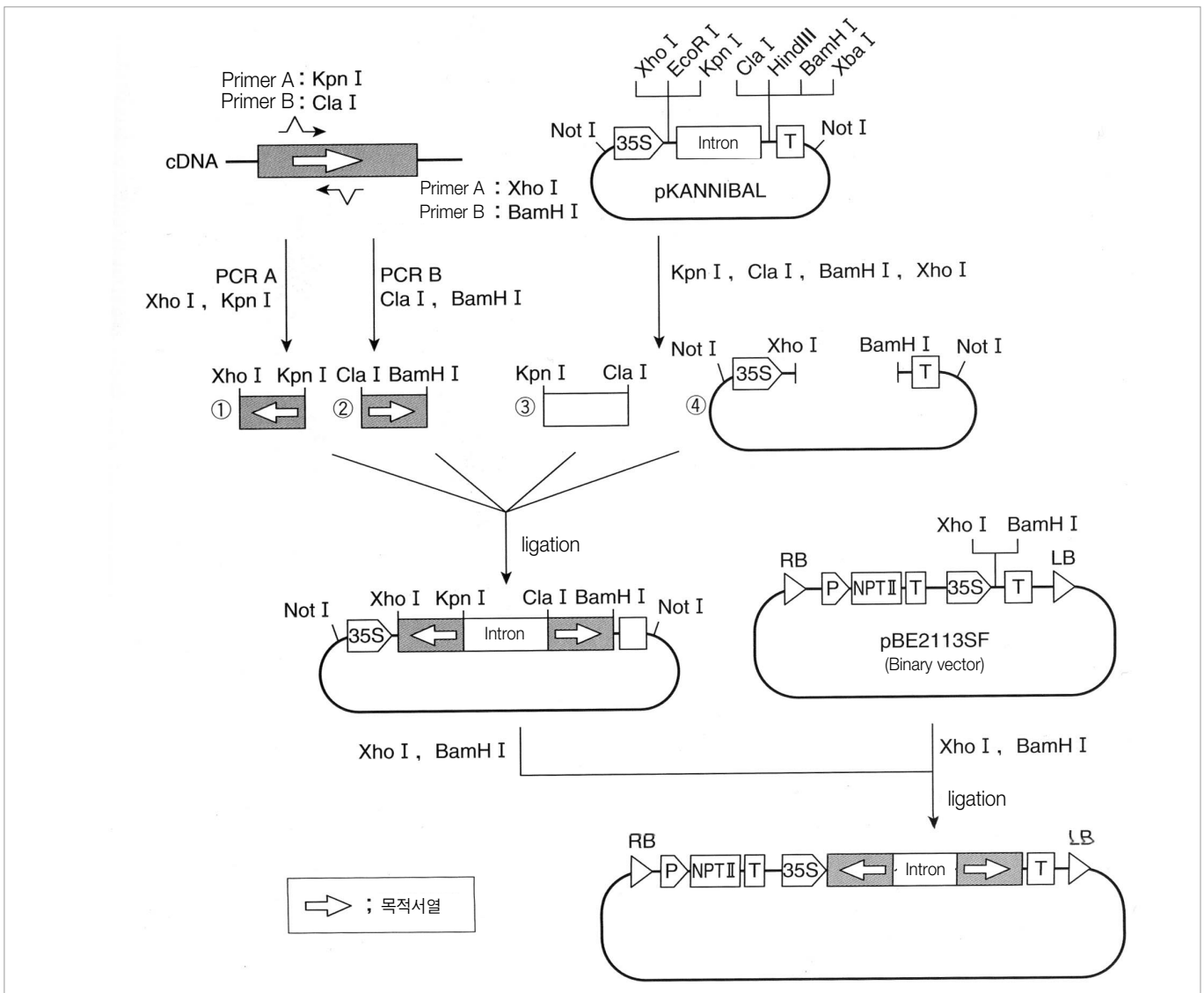


그림 2. pKANNIBAL을 이용한 RNAi vector construction

pKANNIBAL을 사용하지 않을 경우는 적당한 intron의 5' 끝에 *Eco*R I, 3' 끝에 *Cla* I site를 넣어 construction 한다. ①~④의 4개 단편을 한 번에 ligation하여 클로닝 단계를 한 단계 줄일 수 있다. 원래 자료<sup>9)</sup>에서는 ⑤의 *Not* I 단편을, binary vector pART27(pKANNIBAL과 함께 얻을 수 있다)의 *Not* I site에 도입하고 있지만, 여기에서는 방향확인을 위하여 pBE2113SF를 사용하였다.

- TaKaRa Taq DNA polymerase (2mM dNTP mix, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10 × buffer 첨부)
- Kpn I, BamH I, Xho I, Cla I (TaKaRa)
- TaKaRa T4 DNA ligase (10 × buffer 첨부)
- DH5 α competent cell (TaKaRa)
- TE saturated Phenol/Chloroform
- Chloroform/Isoamylalcohol
- 3M NaOAC pH5.2

● 목적서열의 결정

길이 : pKANNIBAL/pHANNIBAL는 약 750b의 intron linker에 대해 목적서열은 400-800b 정도가 안정된 억제효과를 나타낸다<sup>9)</sup>.  
 위치 : ORF뿐 아니라 비번역 영역을 사용해도 효과가 있으므로 하나의 유전자를 특이적으로 목적유전자로 하고 싶은 경우에 효과적이다.  
 방향 : 목적서열의 방향은 ← Intron → 이든 → Intron ← 이든 효율에 차이가 없다.  
 <주의> 클로닝에 사용하는 제한효소 서열을 포함하지 않는 것이 중요하다.

<방법>

1. Insert DNA의 증폭 및 제한효소 처리

1) 아래의 시약을 혼합한다.

cDNA (EST) clone	5 ng
10 × buffer	5 μl
2.0mM dNTP mix	5 μl
2.5mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 μl
TaKaRa Taq DNA polymerase	2.5 U
Forward primer A(또는 B)	25 pmol
Reverse primer A(또는 B)	25 pmol
dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
	50 μl

2) PCR 반응

94℃, 5분 → 94℃, 30초 → 55℃, 15초 → 74℃, 30초/kb] × 25~30 cycle  
 → 74℃, 10분 → store 10℃

3) PCR 산물의 정제

PCR 산물 A, B를 Phenol/Chloroform 처리, Chloroform 처리, 에탄올 침전으로 정제한다.

4) 아래의 시약을 혼합한다.

① PCR 산물

(primer A pair를 사용한 것) 전량	
Xho I	10U
Kpn I	10U
10 × M buffer	3 μl
dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
	30 μl

② PCR 산물

(primer B pair를 사용한 것) 전량

BamH I	10U
Cla I	10U
10 × K buffer	3 μl
dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
	30 μl

5) 37℃, 3시간 반응.

6) 전기영동 후 목적 밴드를 잘라 QIAquick Gel extraction kit 등으로 정제한다.

2. 클로닝 vector의 제한효소 처리

1) 아래의 시약을 혼합한다.

pKANNIBAL	3 μg
Xho I	10U
Kpn I	10U
Cla I	10U
10 × M buffer	3 μl
dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
	30 μl

2) 37℃, 3시간 반응.

3) Phenol/Chloroform 처리, Chloroform 처리, 에탄올 침전.

4) 아래의 시약을 혼합한다.

제한효소 처리한 pKANNIBAL	전량
BamH I	10U
10 × K buffer	3 μl
dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
	30 μl

5) 37℃, 3시간 반응.

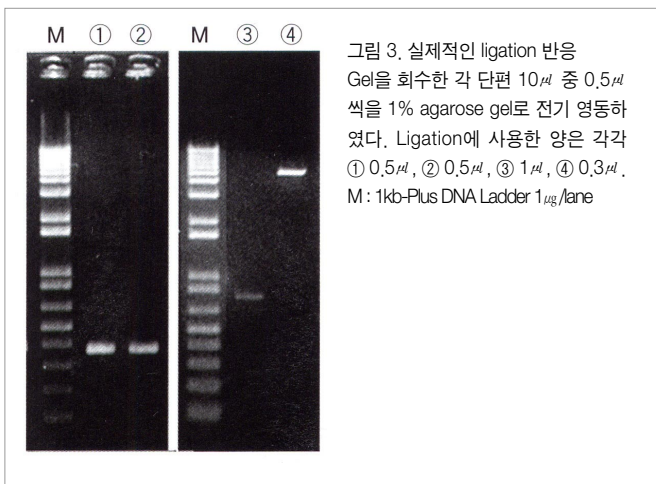
6) ③ 0.75 kb insert, ④ 5.2 kb vector와의 밴드를 각각 절단한 후 QIAGEN gel extraction kit 등으로 정제한다.

3. Ligation 반응<sup>10)</sup>

1) 아래의 시약을 혼합한다.

①~④ 각 단편	그림 3 참조
T4 DNA ligase <sup>3)</sup>	1 μl (400U)
10 × buffer	2 μl
dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
	20 μl

- 2) 16°C, 24시간 반응.
- ↓
- 3) DH5 α competent cell로 형질 전환.
- ↓
- 4) LB-Kan plate에 도말한다..
- ↓
- 5) 37°C에서 하룻밤 배양.
- ↓
- 6) 여러 개의 콜로니를 선택하여 37°C에서 하룻밤 배양.
- ↓
- 7) Plasmid를 회수하고 intron과 vector의 primer 세트를 이용하여 PCR하거나, BamH I와 Xho I로 절단하여 목적 단편이 들어갔는지 전기영동으로 확인한다.<sup>4,5</sup>



#### 4. 역방향 반복서열의 binary vector로의 도입

- 1) 위에서 확인한 세 개의 단편이 들어간 pKANNIBAL vector를 BamH I와 Xho I로 절단한다.

pKANNIBAL(역방향 반복서열이 삽입된 것)	3μg
BamH I	5U
Xho I	5U
10× K buffer	2μl
dH <sub>2</sub> O	
20μl	

- 2) 37°C, 3시간 반응.
- ↓
- 3) 전기영동 후, 목적 밴드를 절단하고 QIAquick Gel extraction kit 등으로 정제한 후 10μl DW에 현탁한다.

#### 5. Binary vector pBE2113SF의 제한효소 처리

- 1) 아래의 시약을 혼합한다.
- |           |     |
|-----------|-----|
| pBE2113SF | 3μg |
| BamH I    | 5U  |
| Xho I     | 5U  |

10×K buffer	2μl
dH <sub>2</sub> O	
20μl	

- 2) 37°C, 3시간 반응.
- ↓
- 3) 제한효소 처리한 pBE2113SF를 Phenol/Chloroform 처리, Chloroform 처리, 에탄올 침전으로 정제한 후 10μl DW에 현탁한다.

#### 6. Ligation반응

- 1) 아래의 시약을 혼합한다.
- |                     |            |
|---------------------|------------|
| Vector, insert 각 단편 | 0.5μl 씩    |
| T4 DNA ligase       | 1μl (400U) |
| 10× buffer          | 2μl        |
| dH <sub>2</sub> O   |            |
| 20μl                |            |

- 2) 16°C, O/N 반응.
- ↓
- 3) LB-Kan plate에 도말한다.
- ↓
- 4) 37°C에서 하룻밤 배양.
- ↓
- 5) 여러 개의 콜로니를 선택하여 37°C에서 하룻밤 배양.
- ↓
- 6) Plasmid를 회수하고 제한효소를 처리하여 목적 단편이 들어갔는지 확인한다.

pKANNIBAL을 이용하지 않고 적당한 intron을 사용하여 동일한 구성을 해도 된다. 이 경우 linker가 되는 intron은 ds부분보다 긴 것이 안정적이다(Waterhouse). 또한 대량 유전자 해석에는 보다 간편한 클로닝을 할 수 있는 Gateway system(Invitrogen)을 이용한 pHELLSGATE 계열(그림 4)이 개발되어 이용할 수 있게 되어 있다.

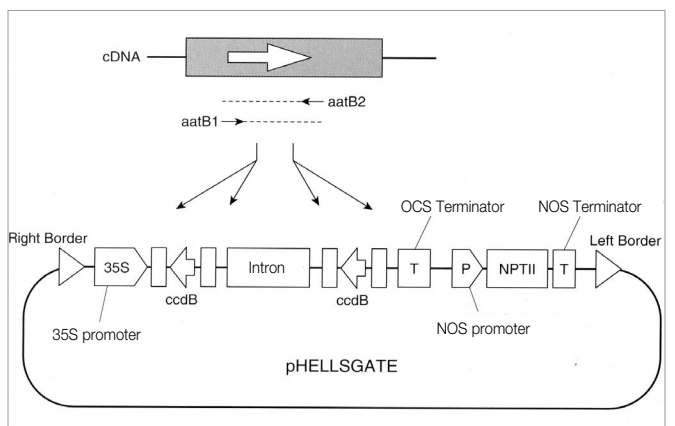


그림 4. Gateway system을 이용한 RNAi construction vector  
목적서열의 양 끝에 aatB1과 aatB2 서열을 도입한 PCR 산물을 사용하여 Gateway의 상동성 재조합 시스템을 이용하여 역방향 반복서열을 지닌 construct을 제작할 수 있다. Wesley SV, et al : Plant J(2001) 27 : 581-590 참조.

## ● 아그로박테리움(Agrobacterium)으로의 plasmid 도입

PEG법<sup>7)</sup> 또는 electrophoration으로 아그로박테리움에 plasmid를 도입한다.

## ● 식물의 형질 전환

여기에서는 감압침윤법에 의한 예기장대 형질전환법에 대하여 간단히 소개하고자 한다. 자세한 내용은 PROTOCOL<sup>®</sup>을 참고하기 바란다.

### <준비>

#### 기기

- 진공펌프
- 밸브 장착 데시케이터

#### 시약

- Murashige-Skoog(MS)염
- Gamborg B5 비타민
- 조직배양용 한천
- Benzylaminopurine(BAP)
- NUC 실리콘 L-77<sup>6)</sup>
- 식물선택용 항생물질(Kanamycin, Hygromycin 등)
- 크라포란(Aventis pharmaceuticals)
- Hyponex(Hyponex korea)

#### ① 침윤용 현탁배지 제작

1/2×MS염, 1/2× Gamborg B5 비타민, 5% 자당, 0.5g/l MES를 혼합하여 1N KOH에서 pH5.7로 조제 후 1 l로 만들고 멸균한다. 사용 직전에 1mg/ml BAP를 1 l 당 10 $\mu$ l, NUC 실리콘 L-77을 200 $\mu$ l 첨가한다.

#### ② 선택배지 제작<sup>7)</sup>

MS염, Gamborg B5 비타민, 1% 자당, 0.5g/l MES를 혼합하여 1N KOH에서 pH5.7로 조제 후 0.8% 한천을 첨가하여 1 l로 만든다. 멸균한 후 선택용 항생물질, 크라포란(최종농도 200mg/l)을 첨가한다.

### <방법>

#### 1. 식물의 육성

- 1) 화분에 적당한 양의 흙을 넣고 탈수용 망으로 덮는다.  
↓
- 2) 6cm 지름의 화분을 사용할 경우, 동일한 간격으로 약 다섯군대에 여러 알씩 파종한다.  
↓
- 3) 22℃, 일조조건(16시간 명, 8시간 암)에서 기른다. 발아 후 1~2주일 후에 솟아 내고 5 그루의 식물을 남긴다.  
↓
- 4) 약 1개월 후, 식물이 자라기 시작하면 줄기 길이 수 cm가 된 시점에서 꽃줄기의 뿌리를 자른다.  
↓
- 5) 수일~1주일 동안(새로 성장한 가지 위의 첫 꽃이 개화, 결실을 맺기까지) 키운다.

#### 2. 아그로박테리움 배양

- 1) 전 배양(5ml)을 한다.  
↓
- 2) 감염을 시행하기 전 적당한 항생물질을 함유한 200ml의 LB배지에 전 배양균을 접종한다.  
↓
- 3) 28℃에서 약 하루 동안 배양한다.  
↓
- 4) 실온에서 집균한 후 침윤용 현탁배지 250ml에 현탁한다. (O.D.<sub>600</sub>이 1.2~1.5가 되도록)

#### 3. 감압침윤에 의한 감염

- 1) 침윤을 할 식물 중에서 이미 개화, 결실을 맺은 꽃을 제거한다.  
↓
- 2) 비닐봉지에 배양포트를 넣고 아그로박테리움 현탁액을 포트에 옮긴 후 식물의 꽃눈이 완전히 액에 잠기도록 넣는다.  
↓
- 3) 화분이 담긴 포트를 데시케이터에 넣고 약 76cmHg까지 감압한 후 뚜껑을 닫고 8~10분 동안 방치한다.  
↓
- 4) 서서히 음압을 빼서 식물을 아그로박테리움 현탁액에서 꺼낸다.  
↓
- 5) Paper towel 위에서 식물을 가볍게 흔들어 식물 위에 남은 현탁액을 떨어뜨린다.  
↓
- 6) 용기에 화분을 넣고 투명필름으로 주위를 감싼 후 상부를 랩으로 덮는다.  
↓
- 7) 3~4일 후, 랩을 벗기고 1,000배로 희석한 Hyponex를 첨가한다.  
↓
- 8) Hyponex가 없어진 후(1주일~10일 후), 1, 2회 물을 주고 3주째(물이 없어진 무렵) 제거한다. 1화분의 식물(5그루)을 하나로 합쳐 통기성이 좋은 봉지에서 건조시킨다.  
↓
- 9) 수확한 종자는 오물을 제거한 후 건조한 장소에 보관한다.

#### 4. 형질전환체 선택

- 1) 50ml 튜브에 종자(1.2ml 정도)를 옮기고 70% 에탄올을 30ml 첨가한 후 가볍게 썬는다.  
↓
- 2) 원심분리(3,000rpm, 1분)  
↓
- 3) 상층을 제거한 후 2.5% HOCl 0.02% Tween 20 용액 30ml를 첨가하여 12~15분간 썬는다.  
↓
- 4) 원심분리(3,000rpm, 1분)  
↓
- 5) 상층을 버리고 멸균수 30ml를 첨가하여 원심분리(3,000rpm, 1분) 후 상층을 버린다(5회 반복).  
↓

- 6) 멸균된 종자에 0.12% 아가로스를 40ml 첨가하고 5ml씩 8장의 15cm plate에 일정하게 펼친다.
- ↓
- 7) 약 1~2주일 후, 항생물질 내성식물을 새 plate로 옮긴다.
- ↓
- 8) 본 잎이 5~6장 피면 (파종 후 약 3주일) 내성식물을 흙으로 옮긴다.
- ↓
- 9) 2~3일, 적당한 덮개를 씌운다.
- ↓
- 10) 각각의 식물로부터 종자를 수확한다. 억제하는 유전자에 따라 이 세대에서 표현형이 나타나는 경우도 있다 (예 : 그림 5).

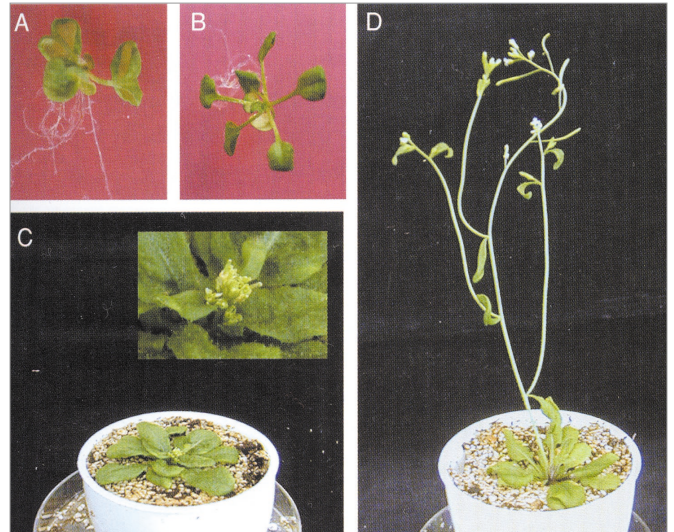
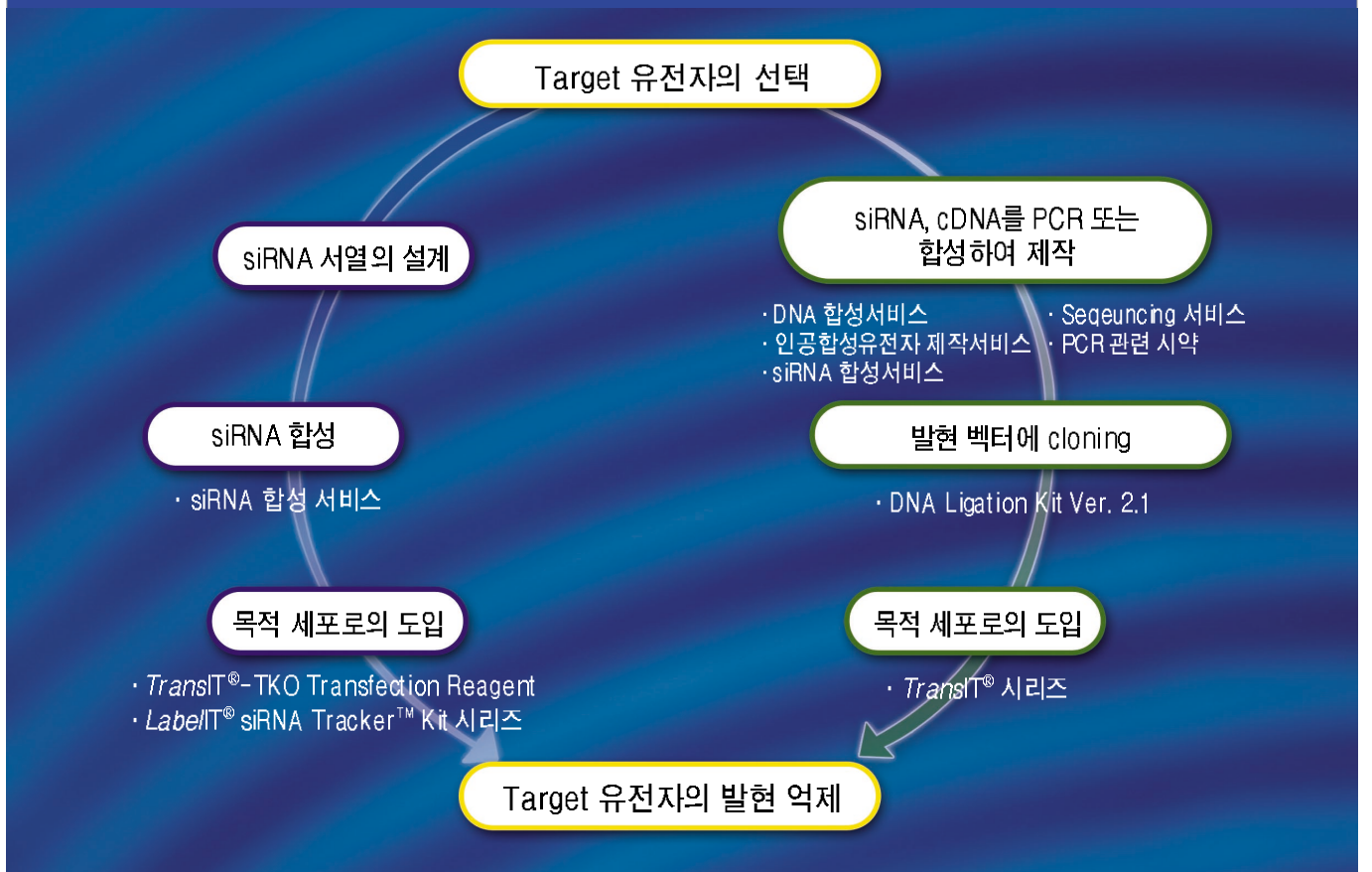


그림 5. Pyrroline 합성효소(P5CS:Pyrrroline-5-Caboxylate Synthesis) 유전자의 RNAi 식물 GM배지에서 3주일 동안 키운 P5CS-RNAi(A) 및 야생형(B)와 흙으로 이식한 후 약 3주일 동안 키운 P5CS-RNAi(C) 및 야생형(D). P5CS-RNAi는 P5CS 안티센스 식물과 마찬가지로 잎자루가 짧고, 잎몸부분은 등골게 감긴 형태를 하고 있다. 흙으로 이식하여 키우면 꽃눈은 생기지만 꽃줄기가 거의 성장하지 않는다.

Hot issue로 떠오르는 RNAi, 다카라코리아의 강력한 Support!

# RNAi



Dynebio Nucleic Acid Purification Kits 제품 출시 기념!!

~~하나씩~~  
~~하나 더 받자!~~

200%만족!!

**(ONE+ONE)!!**



<Event 품목>

Plasmid Miniprep Kit...45,000 원

Power Gel Extraction Kit...60,000 원

Rapid Gel Extraction Kit...35,000 원

PCR Purification Kit...60,000 원

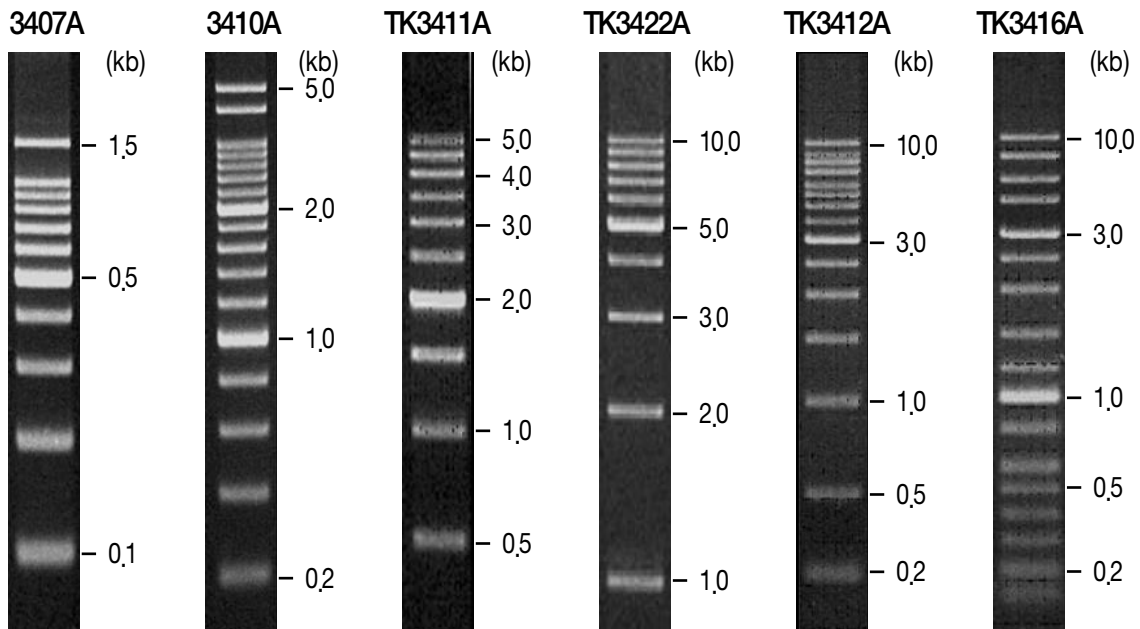
이벤트 기간 : 2004년 10월 14일 ~ 2004년 12월 31일



# TaKaRa DNA Ladder !!

100 bp 에서 10 kb 까지 원하는 대로 선택해서 쓴다.

## 가격대폭인하!



Code	제품명	단위	농도	용량	Band 수 (Size)
3407A	100 bp DNA Ladder	65 $\mu\text{g}$ (100회)	130 ng/ $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	11 (0.1 ~ 1.5 kb)
		0.1, 0.2, 0.3, 0.4, <b>0.5</b> , 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 kb			
3410A	200 bp DNA Ladder	50 $\mu\text{g}$ (100회)	200 ng/ $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	17 (0.2 ~ 5 kb)
		0.2, 0.4, 0.6, 0.8, <b>1.0</b> , 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, <b>2.0</b> , 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 4.0, 5.0 kb			
TK3411A	500 bp Simple DNA Ladder	30 $\mu\text{g}$ (100회)	120 ng/ $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	10 (0.5 ~ 5 kb)
		0.5, 1.0, 1.5, <b>2.0</b> , 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 kb			
TK3422A	1 kb Simple DNA Ladder	30 $\mu\text{g}$ (100회)	120 ng/ $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	10 (1 ~ 10 kb)
		1.0, 2.0, 3.0, 4.0, <b>5.0</b> , 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 kb			
TK3412A	1 kb Plus DNA Ladder (200 ~ 10,000 bp)	40 $\mu\text{g}$ (100회)	160 ng/ $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	15 (0.2 ~ 10 kb)
		0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, <b>3.0</b> , 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0 kb			
TK3416A	Wide-range DNA Ladder (100 ~ 10,000 bp)	50 $\mu\text{g}$ (100회)	200 ng/ $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	17 (0.1 ~ 10 kb)
		0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, <b>1.0</b> , 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, <b>3.0</b> , 4.0, 5.0, 7.0, 10.0 kb			

<지역별 전문대리점>

다인바이오(주) (서울, 인천, 경기, 강원) 031-748-8166 · (주)라인바이오 (대전, 충청) 042-861-6602 · 브니엘바이오 (대구, 경북) 053-381-3611 · (주)대한과학 (부산, 경남) 051-245-6582 · 에스엔티 (진주) 055-759-2522 · 삼화교역 (전주, 전북) 063-227-3700 · (주)진성에스엠알 (광주, 전남) 062-672-7631 · 제일하이텍 (제주) 064-742-7793-4 ·