

Mirus Technical Report

Nucleic Acid Labeling and Delivery Tools for Neurobiology

A.G.Loomis 외/ Mirus Bio사

Mirus Bio는 최근 활발히 진행되고 있는 신경과학분야를 응용하기 위하여 다양한 핵산 표식 및 transfection에 적합한 시약을 개발하였다.

TransIT-Neural[®] Transfection Reagent는 세포의 생존 능력을 유지한 상태에서 광범위한 신경세포주에 plasmid DNA를 고효율로 transfection시키기 위한 시약이다.

TransIT-TKO[®] Transfection Reagent는 유전자의 발현을 knock down시키는 siRNA를 여러 포유류 세포(Neural Cell 포함)에 효율적으로 도입하기 위한 시약이다.

LabelIT[®] Tracker[™] 시리즈 및 *LabelIT*[®] siRNA[™] 시리즈는 핵산 표식 시약과 transfection 시약을 포함한 Kit이다. 전자는 plasmid DNA 용, 후자는 siRNA 용으로 표식의 종류에 따라 6종류의 kit가 준비되어 있다. 표식에 따라 핵산 기능이 손상되지 않으므로 포유류 세포에 도입 효율 및 도입된 핵산의 세포내 위치를 알아보는 데 적합하다.

본 고에서는 이를 이용한 신경생물학 실험에 대하여 소개하고자 한다.

Neural Cell로의 고효율 transfection

TransIT-Neural Transfection Reagent는 plasmid DNA를 다양한 포유류 세포주(C6, Daoy, DBTRG-05MG, DI-TNC1, HCN-1A, Neuro-2a, PC-12, SK-N-MC, SVGp12, human astrocyte 등)에 효율적으로 도입할 수 있도록 디자인된 transfection 시약이다.

본 시약을 이용해 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein) 발현 plasmid DNA를 Neuro-2a 세포(Neuoblastoma의 세포주)에 도입한 후, 48시간에 세포를 고정하고 형광현미경으로 관찰한 결과를 그림 1에 나타내고 있다. Neuro-2a 세포는 적어도 75% 생존능이 유지된 상태에서 plasmid DNA가 도입되고 EGFP가 발현됨을 알 수 있다.

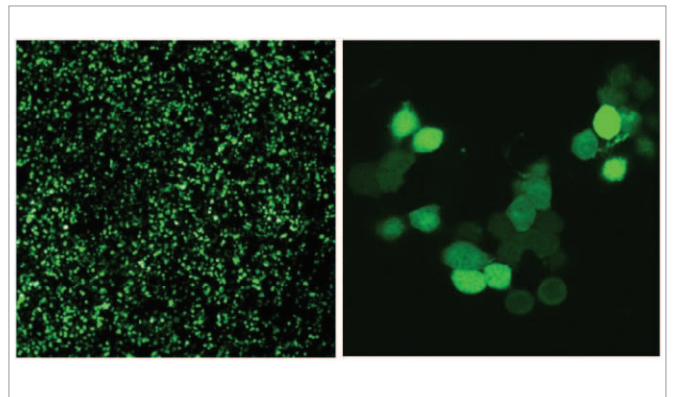


그림 1 Neuro-2a 세포에서의 pEGFP 발현
완전배지를 포함한 6 well plate에 배양 세포(50~70% 융합) 1 well당 4 μ l의 *TransIT-Neural*[®] Transfection Reagent와 2 μ g의 pEGFP(Clontech사)를 넣고 transfection시켜 배양하였다. 좌측은 transfection 48 시간 후에 Zeiss Axiocam으로 촬영한 형광현미경 사진. 우측은 transfection 48시간 후에 Zeiss LSM 510 레이저 주사현미경으로 촬영한 사진.

Neural Cell에서의 plasmid DNA의 transfection과 발현

LabelIT[®] Tracker[™] Cy[™]5 Reagent로 EGFP 발현 plasmid DNA를 Cy[™]5 표식하고, *TransIT-Neural*[®] Transfection Reagent를 이용해 표식 plasmid DNA를 astrocyte에 도입하고 24시간 후에 plasmid DNA의 tracking과 발현을 조사한 결과 그림 2에 나타내었다. 세포내에서의 EGFP 발현 plasmid DNA의 존재와 EGFP 발현이 동시에 관찰되었다.

LabelIT[®] Tracker[™] 시리즈에는 plasmid DNA용과 siRNA용이 있으며, 표식 종류(Cy[™]3, Cy[™]5, CX-Rhodamin, TM-Rhodamin, Fluorescein, Biotin)에 따라 6종류의 kit가 준비되어 있다. 각 kit에는 표식 시약(*LabelIT*[®] Tracker[™] Reagent)과 transfection 시약(*TransIT*[®]-LT1; siRNA용에서는 *TransIT-TKO*[®])이 포함되어 있다.

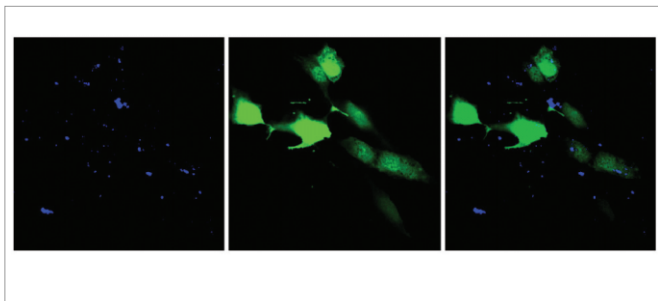


그림 2 DI-TNC1 세포에서의 plasmid DNA의 tracking과 발현
완전배지를 포함한 6 well plate에서 배양한 DI-TNC1 astrocyte(50~70% 융합)에 1 well당 1 μ l의 CyTM5 표식 pEGFP(LabelIT[®] TrackerTM CyTM5 Reagent를 이용해 표식)와 3 μ l의 TransIT-Neural[®] Transfection Reagent를 넣고 transfection시켜 배양을 계속하였다. 24시간 후에 Zeiss LSM 510 레이저 주사현미경으로 세포를 관찰하였다. 파란색은 CyTM5의 형광(plasmid DNA의 존재)을, 녹색은 EGFP의 발현을 나타낸다.

siRNA에 의한 표적 유전자의 발현 knock down

TransIT-TKO[®] Transfection Reagent를 이용해 siRNA를 세포에 도입하면 다른 유전자의 발현에 영향을 주지 않고 표적 유전자의 발현을 선택적으로 knock down 할 수 있다.

Firefly와 sea fancy의 luciferase를 발현하는 vector를 TransIT-Neural[®] Transfection Reagent로 여러 세포에 동시에 도입한 후, anti firefly luciferase siRNA와 TransIT-TKO[®] Transfection Reagent 복합체를 첨가하고, 24시간 후에 세포 중의 firefly 및 sea fancy luciferase 활성을 측정하였다.

그림 3과 같이 5~10 nM의 siRNA를 이용할 경우, 테스트한 모든 세포주에서 firefly · luciferase의 발현이 특이적으로 knock out되었으며, 상대 발현율은 15% 이하였다(knock out율 85% 이상).

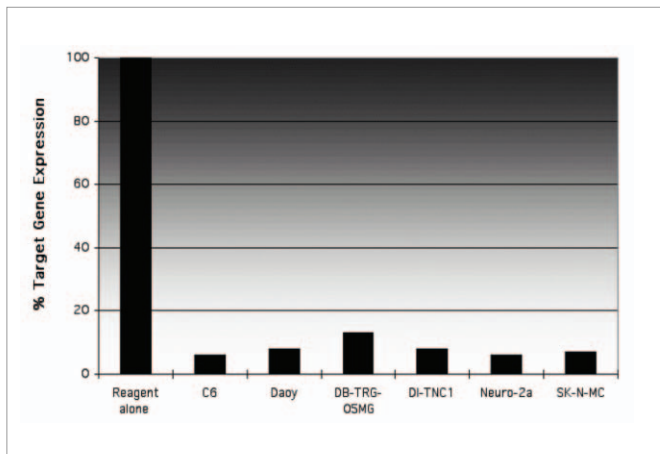


그림 3 다양한 Neural Cell주에서의 표적 유전자의 발현 knock out
Firefly와 sea fancy의 luciferase를 발현하는 plasmid를 도입한 여러 Neural Cell에 5~10 nM의 anti firefly luciferase siRNA(Dharmacon Research사)/TransIT-TKO[®] Transfection Reagent 복합체를 첨가하고, siRNA transfection을 실시하였다. 24시간 후에 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System(Promega사)을 이용하여 세포 lysate 중의 firefly 및 sea fancy의 luciferase 활성을 측정하여 firefly/sea fancy · luciferase의 활성비를 측정하였다. siRNA를 도입하지 않은 경우(Reagent alone)를 100%로 하고, siRNA를 도입한 각 세포에서의 firefly · luciferase의 상대활성을 그림에 나타내었다.

siRNA의 tracking

표식한 siRNA로 tracking해 도입된 siRNA의 세포내 분포를 조사한 실험 (tracking) 예를 아래에 나타내었다.

LabelIT[®] TrackerTM CyTM5 Reagent로 siRNA를 CyTM3 표식하고, TransIT-TKO[®] Transfection Reagent를 이용해 표식된 siRNA를 human · astrocyte 및 C6 glioma cell에 도입하였다. Astrocyte의 경우는 24시간 후에(그림4), C6 glioma cell의 경우는 20시간 후(그림 5), CyTM3 표식 siRNA의 세포내 분포를 조사하였다.



그림 4 Human · astrocyte에서의 siRNA tracking
poly-D-lysine을 코팅한 coverslip을 24 well plate의 well 속에 넣고, 그 위에 human · astrocyte(Scientific Research Laboratories사)를 seeding하고 하룻밤 배양하였다. 1 μ l의 TransIT-TKO[®] Transfection Reagent에 50 μ l의 무혈청배지를 넣고 희석하고, 여기에 CyTM3 표식 siRNA(LabelIT[®] TrackerTM CyTM3을 이용해 표식)을 50 nM이 되도록 넣어 복합체를 형성하였다. 이 복합체를 완전생육 배지에서 배양한 astrocyte(30% 융합)에 넣고 siRNA를 도입하였다. 24시간 후에 Zeiss LSM 510 현미경으로 세포를 관찰하였다.

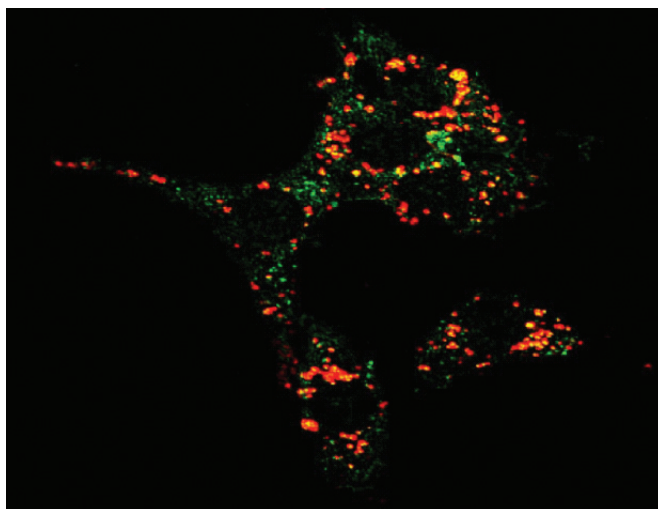


그림 5 Human C6 glioma cell에서의 siRNA tracking
poly-D-lysine을 코팅한 coverslip을 6 well plate의 well 속에 넣고, 그 위에 C6 glioma cell을 seeding하고 하룻밤 배양하였다. 8 μ l의 TransIT-TKO[®] Transfection Reagent에 200 μ l의 무혈청배지를 넣고 희석하고, 여기에 CyTM3 표식 siRNA(LabelIT[®] TrackerTM CyTM3을 이용해 표식)을 50 nM이 되도록 넣어 복합체를 형성하였다. 이 복합체를 완전생육 배지에서 배양한 C6 cell(45% 융합)에 넣고 siRNA를 도입하였다. 20시간 후에 Zeiss LSM 510 현미경으로 세포를 관찰하였다.

siRNA 대부분은 세포질에 존재하며, 확산상태 및 반점상태의 signal이 관찰되었다. 확산상태의 signal은 siRNA이 세포질 중에 유리하는 상태로 존재하는 것을, 반점상태의 signal은 siRNA가 endosome에 들어간 상태로 존재함을 암시한다.

맺음말

Mirus Bio사의 *TransIT*-Neural[®] 및 *TransIT*-TKO[®] Transfection Reagent는 각각 plasmid DNA, siRNA를 여러 Neural Cell에 효율적으로 도입할 수 있다. 혈청을 포함한 배지에서도 고효율로 핵산을 도입할 수 있으며 배지 교환이나 첨가가 필요없으며, 세포의 생존능은 매우 높게 유지된다.

LabelIT[®] Tracker[™] 시리즈 및 *LabelIT*[®] siRNA Tracker 시리즈는 각각 plasmid DNA, siRNA를 공유결합에 따라 직접 표식할 수 있다. 이러한 시약을 사용함으로써, 특정 Neural Cell에서의 도입효율 평가 및 도입된 핵산의 intracellular localization 연구가 가능하다.

이들 제품을 이용하여, Neural Cell에서의 유전자 도입, 발현 및 표적유전자의 발현 knock down을 재현성 높게 간단히 알 수 있다.

Mirus Bio사의 아래 웹사이트에서 RNAi News를 참조할 수 있다.

<http://www.Mirusbio.com/products/mai/index.asp>

본 고에서 소개한 제품

TransIT[®]-Neural[™] Transfection Reagent

제품명	용량	TaKaRa Code
<i>TransIT</i> [®] -Neural [™] Transfection Reagent	1 ml	V 2140
<i>TransIT</i> [®] -Neural [™] Transfection Reagent	0,4 ml	V 2144
<i>TransIT</i> [®] -Neural [™] Transfection Reagent	5 × 1 ml	V 2145
<i>TransIT</i> [®] -Neural [™] Transfection Reagent	10 × 1 ml	V 2146

TransIT-TKO[®] Transfection Reagent*¹

제품명	용량	TaKaRa Code
<i>TransIT</i> -TKO [®] Transfection Reagent	1 ml	V 2150
<i>TransIT</i> -TKO [®] Transfection Reagent	0,4 ml	V 2154
<i>TransIT</i> -TKO [®] Transfection Reagent	5 × 1 ml	V 2155
<i>TransIT</i> -TKO [®] Transfection Reagent	10 × 1 ml	V 2156

LabelIT[®] siRNA Tracker[™] Intracellular Localization Kits*²

제품명	용량	TaKaRa Code
<i>TransIT</i> [®] -siRNA Tracker [™] Cy [™] 3 Kit	1 kit	V 7200
<i>TransIT</i> [®] -siRNA Tracker [™] Cy [™] 5 Kit	1 kit	V 7201
<i>TransIT</i> [®] -siRNA Tracker [™] CX-Rhodamine Kit	1 kit	V 7202
<i>TransIT</i> [®] -siRNA Tracker [™] TM-Rhodamine Kit	1 kit	V 7203
<i>TransIT</i> [®] -siRNA Tracker [™] Fluorescein Kit	1 kit	V 7205
<i>TransIT</i> [®] -siRNA Tracker [™] Biotin Kit	1 kit	V 7204

TransIT[®]-Tracker[™] Intracellular Nucleic Acid Localization Kits*³

제품명	용량	TaKaRa Code
<i>TransIT</i> [®] -Tracker [™] Cy [™] 3 Kit	1 kit	V 7010
<i>TransIT</i> [®] -Tracker [™] Cy [™] 5 Kit	1 kit	V 7011
<i>TransIT</i> [®] -Tracker [™] CX-Rhodamine Kit	1 kit	V 7012
<i>TransIT</i> [®] -Tracker [™] TM-Rhodamine Kit	1 kit	V 7013
<i>TransIT</i> [®] -Tracker [™] Fluorescein Kit V	1 kit	7015
<i>TransIT</i> [®] -Tracker [™] Biotin Kit V	1 kit	7014

*1: *TransIT*-TKO[®], *TransIT*-Neural[®]에는 여러 가지 용량이 준비되어 있다(0,4 ml, 1 ml, 1 ml × 5, 1 ml × 10).

*2: *LabelIT*[®] siRNA Tracker 시리즈의 각 kit에는 siRNA 50 μg의 표식 시약(*LabelIT*[®] siRNA Tracker Reagent)과 500회분(24 well plates 사용시)의 transfection 시약(*TransIT*-TKO[®]) 이 포함되어 있다.

*3: *LabelIT*[®] Tracker[™] 시리즈의 각 kit에는 plasmid DNA 50~200 μg분의 표식 시약(*LabelIT*[®] Tracker[™] Reagent)과 50회분(35 mm dish 사용시)의 transfection 시약(*TransIT*[®]-LT1) 이 포함되어 있다.



Transfection Reagent

- Cell Line Specific Plasmid Transfection
: 293, 3T3, CHO, COS, HeLa, Insecta, Jurket, Keratinocyte...
- siRNA 전용 Transfection
- Oligonucleotide, Labeled DNA Transfection
- *In vivo* Delivery system
- DNA&RNA Labeling Kit
- RNA interference Technologies