

다양한 생물의 RNAi protocol을 알아!-4

# Mammalian Cell

## siRNA 발현 vector의 제작과 transient RNAi

### 머리말

RNAi는 double strand RNA를 도입하여 대응하는 유전자를 knock down 시키는 현상으로 postgenomic 시대에 reverse genetics의 가장 강력한 도구로 주목을 끌고 있다. 1998년에 Fire 등에 의해 RNAi가 선충에서 발견된 후<sup>1)</sup>, 식물이나 파리, 이 외의 다양한 생물에서 보고되고 있다. 2001년에는 mammalian에서는 힘들다고 알려진 RNAi가 중간물질인 small interference RNA(siRNA)를 사용하면 가능한 것으로 보고되었다<sup>2)</sup>. 이 방법은 화학합성한 21 base의 RNA를 사용하고 있으며, mammalian 세포에서 double strand RNA에 의한 interferon 응답을 피하여 매우 높은 효율과 특이성으로 유전자를 knock down 할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

이들이 개발한 siRNA를 lipofection으로 직접 cell에 도입하는 방법의 효과의 지속성에 관한 문제(transient transfection), cell에 따라서 도입효율의 문제 등 몇 가지 단점이 있었지만, vector를 이용하여 cell 내에서 siRNA를 생성하고 RNAi를 발생시킬 수 있으면 해결할 수 있다. 또한 vector로 RNAi를 발생시킬 수 있으면 knock down mouse나 knock down cell line를 만들거나, mouse를 이용한 유전자 치료 등이 가능할 것으로 예상된다. Tuschli가 siRNA를 이용한 방법을 발견한 약 1년 후, 많은 연구실에서 vector로 siRNA를 발현하는 시스템 논문이 보고되었다<sup>3-10)</sup>. 본 고에서는 vector의 제작법<sup>11)</sup> 및 실험 예<sup>11)</sup>에 대하여 소개하고자 한다.

### 원리와 방법

siRNA의 전사는 U6RNA 또는 H1RNA의 전사체인 RNA Polymerase III (Pol III)계에 의해 일어난다. Pol III계열은 Pol II계열에 비해 전사량이 많고 짧은 RNA를 고 효율로 전사할 수 있어 지금까지 ribozyme이나 antisense RNA에 의한 knock down 연구에 이용되어 왔다. 특히 U6과 H1과 같은 III형에 속하는 Pol III계 promoter는 I형이나 II형과 같이 내부 promoter를 가지고 있지 않기 때문에, 임의의 서열을 전사하는데 적합하다.

siRNA를 발현하는 계는 주로 Pol III계를 이용하고 있는데, 크게 tandem형과 stem-loop형(또는 hairpin형)의 두 종류로 분류할 수 있다(그림 1). Tandem형은 2 개의 U6(H1) promoter를 지니며 각각 독립적으로 sense RNA와 antisense RNA를 전사한다. 전사된 sense 및 antisense RNA는 cell

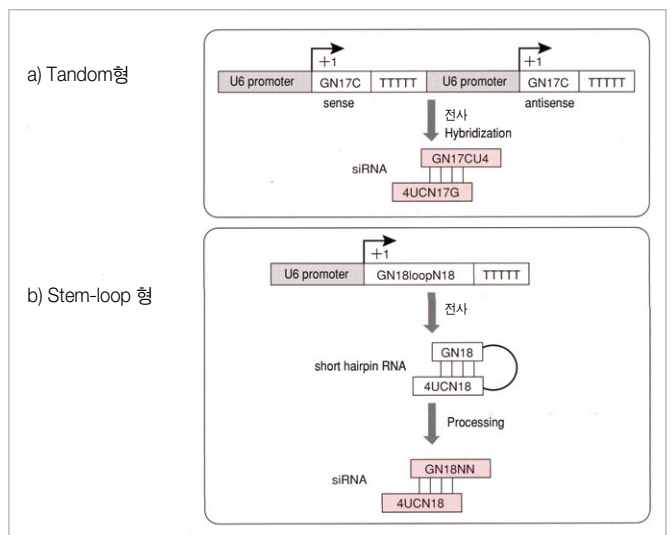


그림 1 siRNA 발현 vector

a) Tandem형 siRNA 발현 vector, 2 개의 U6 promoter에서 sense RNA, antisense RNA가 전사된다. b) Stem-loop형 siRNA 발현 vector, Short hairpin RNA가 전사되고 프로세싱을 받아 siRNA가 생성된다.

내에서 double strand RNA를 형성하고 siRNA로서 작용한다. Pol III계는 전사 종료 후 약 4 개의 U를 부가하기 때문에, 만들어진 siRNA는 3' 측에 4 개의 U를 가지게 된다. 2 개의 overhang(3' 측의 돌출)을 지닌 wild형 siRNA와는 cell 배양에서 활성의 차이가 거의 없는 것으로 알려졌다.<sup>6)</sup>

Stem-loop형은 한 개의 promoter를 지니며 그 하류에 sense 사슬과 antisense 사슬을 루프를 연결한 구조로 되어 있다. 이 stem-loop RNA 구조로 된 RNA(short hairpin RNA : shRNA)는 Dicer에 의해 프로세싱을 받아 siRNA가 생성된다. 이런 shRNA는 생체 내에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 프로세싱을 받아 microRNA로 불리는 single strand RNA가 된다. 이 경우에도 마찬가지로 Dicer에 의해 프로세싱을 받아 RISC에 도입되고 번역 억제(또는 절단)에 의해 유전자의 발현을 제어하는 것으로 밝혀졌다.

U6 또는 H1 promoter의 전사 개시 염기는 가능하면 purine(G or A)이 좋다. 또한 어떠한 경우든 서열을 인식하는 antisense 사슬의 마지막에 UUUU가 부가되기 때문에, target site의 전사 개시점에 해당하는 염기 앞의 2 개는 AA인 것이 좋다. 따라서 Tandom형 경우의 target 서열 제약은 AAG(N17-19) C 또는 AA(G/A)(N19-23)(C/T)가 된다(U6의 경우, Wild형이 G이므로 AAG(N19-23) C를 선택하였지만 A 스타트도 무방하다). 이에 비해 stem-loop 형의 경우는 AAG(N18-20) 또는 AAA(N18-20)가 제약이 된다.

본 고에서는 주로 Pol III계를 이용한 siRNA 발현 시스템을 소개하지만, 최근 Xia 외에 Pol II계를 이용한 siRNA 발현 시스템도 보고되고 있다<sup>12)</sup>. 이와 같은 방법의 효과를 높이기 위하여 CMV promoter의 전사 개시점 부근에 stem-loop를 삽입하거나 짧은 Poly(A) 부가 서열을 이용하는 방법을 연구하고 있다. 또한 tetracycline으로 조절할 수 있는 promoter로 RNAi를 조절할 수 있는 것으로 보고하고 있다. 이에 대해서는 아직까지 많은 검토가 필요하지만, 실험결과에 따르면 Pol III계와 비교하였을 때 동등 이상의 효과를 확인할 수 있었다. Pol II계열이 실현되면 부위 특이적인 silencing 등 Pol III계에서 할 수 없는 조절이 가능해지기 때문에 앞으로의 많은 발전이 기대된다.

## 준비사항

### 1) Target 부위의 선택

학회 등에서 발표를 하다 보면 서열을 어떻게 선택하면 좋은가에 대해 질문을 가끔 받는다. siRNA의 효과는 그 만큼 Target 부위에 따라 크게 다르며, 효과를 예측하기가 상당히 어렵다. 따라서 최소한 3~5개의 target 부위에 대한 vector를 구축해야 한다. 어떤 위치를 선정할 것인가 대해서는 논란이 많지만, translation 영역을 주로 target 부위로 선택하고 있다. GC contents는 30~70 % 범위에서 선택하고, 경험적으로 강한 2차 구조를 가지는 부분은 활성이 낮으므로 가능한 RNA 구조가 열려 있다고 판단되는 부위를 선택한다. 또한 T염기가 4 개가 계속되면 Pol III계의 전사가 멈추게 되므로, 이러한 서열을 포함하지 않도록 주의한다. 선택한 서열은 Blast로 검색하여 다른 유전자에 작용하지 않는 것을 확인한다.

· Tandom형의 경우

앞에서 소개한 대로 promoter의 제약에서 AAG(N17-19) C를 찾는다. 좋은 장소가 없으면 AA(G/A)(N19-23)(C/T)를 찾는다. 없을 경우는 CA(G/A)(N19-23), A(G/A)(N19-23)의 순으로 찾는다.

· Stem-loop의 경우

AAG(N21)를 찾는다. 좋은 부위가 없을 경우에는 AAA(N21), CA(G/A)(N21)의 순으로 찾는다.

### 2) 시약

- Gel extraction
- PCR purification kit
- Pyrobest<sup>®</sup>
- Ligation Kit

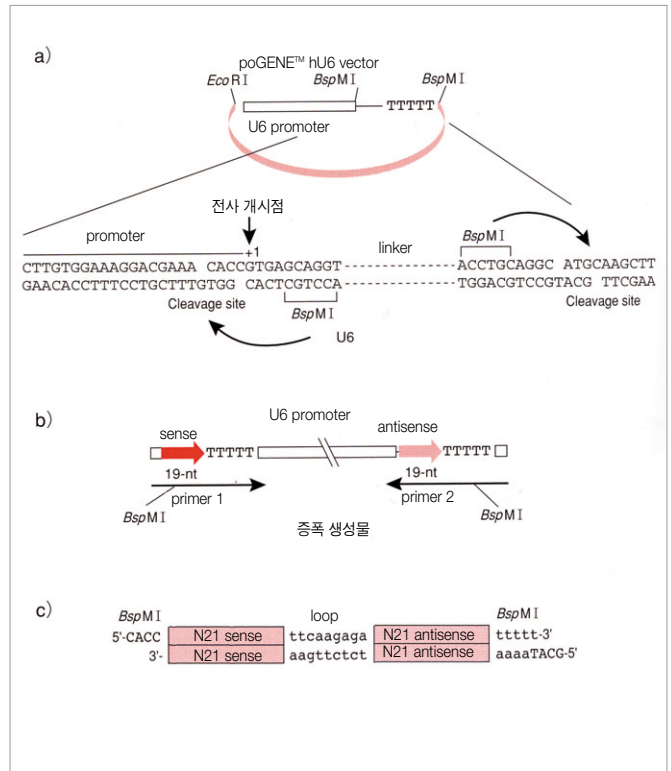


그림 2 piGENE<sup>™</sup>hU6 vector (TaKaRa Code SV307)

- a) piGENE<sup>™</sup>hU6 vector의 클로닝 사이트 b) Tandom형 제작시 insert 단편  
c) Stem-loop 형 제작시 insert 단편의 서열

## 프로토콜

Tandom형 및 stem-loop형 siRNA 발현 vector를 한꺼번에 구축할 수 있는 vector로 piGENE<sup>™</sup>hU6 vector를 설계하였다(그림 2). 이 vector는 사람의 U6 promoter 하류에 2 개의 BspM I 사이트를 가지고 있다. BspM I 은 IIS 등급의 제한효소로, 인식서열과는 다른 사이트를 절단한다. 이것을 이용하여 U6의 바로 아래에 서열을 삽입할 수 있다. Tandom형의 경우는 PCR로 sense, antisense 서열을 포함하는 primer로 promoter 부분을 증폭하고, 증폭 단편을 제한효소로 절단한 후 U6 promoter 하류에 삽입한다. Stem-loop 형의 경우에는 sense, loop, antisense 서열을 포함하는 oligonucleotide를 annealing후, U6 promoter의 하류에 삽입한다.

### 1. Vector의 제작

3~5  $\mu$ g의 piGENE™hU6 vector를 100  $\mu$ l의 반응으로 O/N(overnight)로 절단한다.



Agarose gel 전기영동 후, gel extraction kit으로 회수한다. Tandom 형을 제작할 경우, BAP 처리를 하고 PCR purification kit으로 회수한다



마지막 elution은 30  $\mu$ l로 하고 1  $\mu$ l(약 100 ng)을 ligation한다.

### 2. Insert의 제작

#### A) Tandom 형의 경우

다음의 primer를 합성/주문한다

primer1

5'-ggctctagaACCTGCcgccaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNttttcaattcaaggtcgggcag-3'

primer2

5'-ggctctagaACCTGCtagcgcataaaaaNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggtgttcgctctccacaag-3'



N19를 선택한 서열 AAG(N18)의 G(N18)부분 sense strand, antisense strand로 바꾸어 삽입한다.

이때, sense, antisense-용에 주의한다. 예를 들면 target 서열이 GTG CGC TGC TGG TGC CAA C의 경우에는

5'-ggctctagaACCTGCcgccaccGTGCGCTGCTGGTGCCAACttttcaattcaaggtcgggcag-3'

5'-ggctctagaACCTGCtagcgcataaaaaGTGCGCTGCTGGTGCCAACggtgttcgctctccacaag-3'

가 된다



PCR :

이 primer를 이용하여 piGENE™hU6 vector를 template로 U6 promoter 부분을 아래의 조건으로 증폭한다.

효소는 TaKaRa의 *Pyrobest*™를 이용하여 100  $\mu$ l의 반응으로 한다

95 °C 1 분	} 30 cycles
98 °C 10 초	
55 °C 1 분	
72 °C 1 분	



제한효소 처리 및 정제 :

PCR 산물을 PCR purification kit으로 정제하고 100  $\mu$ l로 Bsp M I 으로 2 시간 이상 처리한다. 이후, agarose gel 전기영동 후 gel purification kit으로 회수한다. 10  $\mu$ l로 elution한다.

#### B) Stem-loop 형의 경우

다음의 oligonucleotide를 합성/주문한다\*

(Target 서열이 GTGCGCTGCTGGTGGCCAACCC의 경우)

5'-caccGTGCGTGTGTGGTttAAtCCgtgtgtgtccGGGTTGGCACCAGCAGCGCACtttt-3'

5'-gcataaaaaGTGCGCTGCTGGTGGCCAACCCggacagcacGGaTTaaCACCAaCaAaCGCAC-3'

① 루프 서열은 micro RNA 유래로 최적화된 것을 사용하였다.



Annealing :

100  $\mu$ M의 oligonucleotide를 각각 5  $\mu$ 씩 섞어 염농도가 최종 농도 100 mM~150 mM 되도록 NaCl를 첨가한다\*

다음의 온도 조건으로 annealing한다

99 °C 2분

72 °C에서 4 °C까지 2시간 동안 냉각한다

Annealing한 oligonucleotide를 TE로 200 배 희석하고, 1  $\mu$ l를 ligation에 사용한다

② 처음부터 TE, 100 mM NaCl에 oligonucleotide를 녹여도 된다.

### 3. Ligation, Transformation\*\*

BAP 처리된 vector 1  $\mu$ l와 insert 1  $\mu$ l, ligation mix를 2  $\mu$ l를 섞은 후 16 °C에서 30분 배양한다



대장균에 transformation한다. Host는 DH5  $\alpha$ 를 사용한다



siRNA 발현 vector의 평가는 실험 예를 참조

③ Stable cell line을 채취하거나 바이러스 vector를 사용할 경우에는 발현 unit 부분을 필요로 하는 vector에 다시 넣는다.

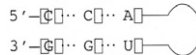
④ Tandom형과 stem-loop 형의 활성을 비교하면 plasmid 농도가 낮은 경우는 stem-loop 형이 활성이 높다는 결과가 나오고 있다. 이것을 뒷받침을 하듯이 바이러스 vector를 이용하였을 경우에는 지금까지 stem-loop 형 쪽이 좋은 결과가 나오고 있다. 그러나 약제내성이고 stable cell line을 얻었을 경우에는 tandom 형 쪽이 효과가 있다는 예가 있으며, 또한 stem-loop로 효과가 있더라도 효과가 없어지는 경우가 있기 때문에 두 개를 적절히 사용하는 것이 좋다.

### MEMO

#### <Stem-loop의 문제점과 해결방법>

Stem-loop 형을 그대로 제작하면 sequence를 읽을 수 없거나 자주 recombinant를 제작해야하는 문제가 발생한다. 이것은 sense strand에 몇 개의 mutation을 도입하면 줄일 수 있다. 일반적으로 sense strand에 C→U mutation 또는 A→G mutation을 3 개 또는 4 개 넣도록 하고 있다<sup>11-13</sup>.

이와 같이 C→U 또는 A→G mutation을 sense strand에 넣으면 sequence의 문제가 없어진다.



### 실험 예

형광단백질인 GFP와 DsRed에 대한 siRNA 발현 vector결과를 그림 3에 나타내고 있다. HeLaS3 Cell에 GFP 또는 DsRed2 발현 vector 및 각각에 대한 stem-loop 형 siRNA 발현 vector와 co-transfection한 후 2일 후에 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 모든 경우 siRNA vector로 약 90 %의 발현억제가 관찰되었다.

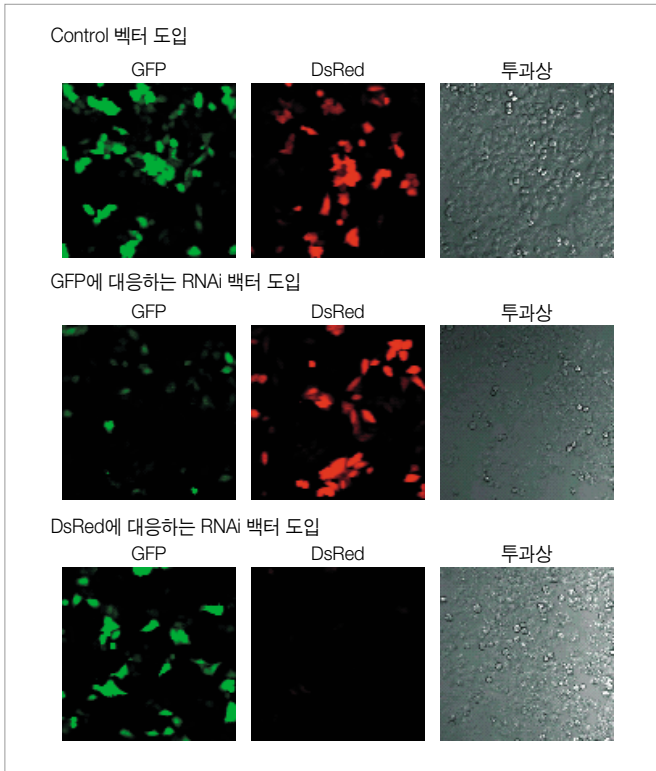


그림 3 siRNA 발현 vector에 의한 HygGFP 유전자 및 Dsred 유전자의 발현억제  
HygGFP 및 DsRed2에 대한 siRNA 발현 vector를 각각 HygGFP, DsRed2 발현  
vector와 HeLaS3 Cell에 co-transfection한 후, 2일 후에 형광현미경으로 관찰하였다.  
Target 부위는 GFP : GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC, DsRed2 : GTG GGA  
GCG CGT GAT GAA CTT

### 맺음말

siRNA가 mammalian에서 유효하다는 것이 발견된 후 약 2년이 경과한 최근  
에 와서 RNAi에 의한 knockdown법은 mammalian에서의 유전자 기능  
해석의 일반적인 방법으로서 이용되고 있다. Vector를 이용한 방법에서  
도 바이러스 vector를 이용하거나 transgenic 제작 등 다양한 실험 예가  
보고되고 있다. 그러나 RNAi vector를 유효하게 사용하기 위해서는 target  
부위의 선택방법, stable cell의 제작, transgenic mouse의 효율적 제작에  
대해 몇 가지 문제가 남아 있다. 이런 문제에 대해 앞으로 더욱 기술적 발  
전을 이루어지기를 바란다.

### 참고문헌

- 1) Fire, A. *et al.* : *Nature*, **391** : 806-811, 1998
- 2) Elbashir, S. M. *et al.* : *Nature*, **411** : 494-498, 2001
- 3) Brummelkamp, T. R. *et al.* : *Science*, **296** : 550-553, 2002
- 4) Lee, N. S. *et al.* : *Nature Biotech.*, **20** : 500-505, 2002
- 5) Miyagishi, M. & Taira, K. : *Nature Biotech.*, **20** : 497-500, 2002
- 6) Paddison, P. J. *et al.* : *Genes & Dev.*, **16** : 948-958, 2002
- 7) Sui, G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 5515-5520, 2002
- 8) Tuschl, T. : *Nature Biotech.*, **20** : 446-448, 2002
- 9) Paul, C. P. *et al.* : *Nature Biotech.*, **20** : 505-508, 2002
- 10) Yu, J. Y. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 6047-6052, 2002
- 11) 다이라 카즈나리(多比良和誠), 미야기시 마코토(宮岸 眞) 「siRNA 발  
현 system 및 이를 이용한 기능유전자 knock down 세포 등의 생성방  
법」 특허. 2001-363385, 2001
- 12) Xia, H. *et al.* : *Nature Biotech.*, **20** : 1006-1010, 2002

### Troubleshooting

문제	가능성	해결을 위한 조치
Target 유전자의 발현억제를 볼 수 없다	Target 부위가 좋지 않거나 또는 target 서열이 SNP 등의 이유로 바뀌었다.	Target 부위를 바꾼다 보통 5 ~ 10 개의 사이트에서 효과가 높은 부위를 선택하는 것이 좋다
내재된 유전자를 target으로 하였을 경우,	Target 부위가 좋지 않다	Target 유전자 발현 vector와의 transfection 실험 으로 target 부위를 선택한다
	target의 억제를 볼 수 없다	Transfection 효율이 낮다 Transfection 되어 있지 않은 Cell를 제거한다
Stable knock down Cell를 얻을 수 없다	Lethal gene이다	Tet-ON 등의 유도계를 검토한다
	Target 부위가 좋지 않다	Low copy로, 특히 Target 부위의 선택은 중요하다. Cell의 클론(Clone)화를 한다.