

{Q&A}

TransIT[®]-LT1 Transfection Reagent 특집

Mirus 사의 TransIT[®] Transfection Reagent는 여러 종류의 primary cell과 established cell line에 대해 transfection 효율이 매우 뛰어난 제품이다. 간단한 사용법, 재현성 및 transfection 효율성으로 다른 gene delivery 방법에 비해 큰 장점을 가지고 있을 뿐만 아니라 transfection에서 일반적으로 나타나는 cell toxicity을 크게 줄일 수 있다. TransIT[®] Transfection Reagent는 이와 같은 장점으로 transfection 이후의 세포 상태 연구에 용이하고, 모든 gene expression 연구에 이상적인 시약이다.

Mirus는 다양한 cell type에서 plasmid와 siRNA의 전달을 연구하기 위하여 적합한 제품을 선택할 수 있으며, 특정 cell line에서 transfection 효율을 최상으로 올리기 위해서는, cell line specific TransIT[®] Transfection Reagent 제품들 중에서 선택하면 좋은 실험결과를 얻을 수 있다.

일반적인 질문

Q_1...

TransIT[®]-LT1 시약의 성분은 무엇인가?

A_1...

TransIT[®] transfection 시약은 histone과 독특한 지방질이 포함된 protein/polyamine을 기반으로 한 시약이다.

Q_2...

TransIT[®] Transfection Reagent를 사용하여 성공적으로 transfection한 reference를 어디서 찾아볼 수 있는가?

A_2...

Mirus 사의 홈페이지(www.mirusbio.com)에 기재되어 있다. Technical Resources→Research Reagent Products→Technical Resources→Product Citations

사용자 편의를 위해 citations은 제품 이름과 세포 유형으로 분류되어 구성되어 있다.

TransIT[®]-LT1 Transfection Reagent의 대표적인 reference는 다음과 같다.

-Abe, Kuo, Hershenson, Rosner. 1999. Extracellular Signal-Regulated Kinase 7 (ERK7), a Novel ERK with a C-terminal Domain That Regulates its Activity, its cellular Localization, and Cell Growth. *Molecular and Cellular Biology* **19**(2): 1301.

COS, CV-1, 3T3, PC-12 cells.

-Ahern, Arikath, Vallejo, Gurnett, Powers, Campbell, Coronado. 2001. Intramembrane Charge Movements and Excitation-Contraction Coupling Expressed by Two-Domain Fragments of the Ca²⁺ Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 6935.

Primary Embryonic Mice cells.

-Awasthi, Vivekananda, Awasthi, Smith, King. 2001. CTP: phosphocholine cytidyltransferase inhibition by ceramide via PKC- α , p38 MAPK, cPLA2, and 5-lipoxygenase. *AJP-Lung Cellular and Molecular Physiology* **281**(1): L108.

NCI-H441 cells.

-Bai, Miyake, Iwai, Yuasa. 2003. CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* **22**: 7942.

Human Osteocarcinoma Cells (SAOS-2 and U-20S) and HT-29 Cells

-Berg, Ahern, Vallejo, Conklin, Powers, Gregg, Coronado. 1999. Involvement of the Carboxy-Terminus Region of the Dihydropyridine Receptor Beta1a Subunit in Excitation-Contraction Coupling of Skeletal Muscle. *Biophys. J.* **77**(6): 2953.

Primary Mouse Myotubes.

Q_3...

TransIT[®]-LT1 시약을 사용하여 primary cells에서 pDNA를 transfection 할 수 있는가?

A_3...

사용할 수 있다. Mirus 사에서는 human astrocytes, human chondrocytes, mouse 및 rat의 hepatocytes, human keratinocytes와 같은 primary cell들을 transfection 하여 좋은 결과를 얻었다. 본 제품의 설명서에는 이외 다양한 cell line에서의 결과가 기재되어 있다.

Q_4...

A_4...

TransIT[®] 시약들은 suspension cells을 transfection 하는 데에 사용할 수 있는가?

사용할 수 있다. Adherent cell을 위한 TransIT[®]-LT1 설명서에 따라 실험하고, harvest/assay를 할 경우는 원심분리를 통하여 cell을 모은다. Transfection의 효율성은 cell density에 따라 약간씩 달라지며, 일반적으로 suspension cells들은 adherent cell보다 더 높은 밀도에서 배양된다. Transfection 하기 전날 400,000 cells/ml 또는 transfection 당일 800,000 cells/ml 배양을 권장한다.

Q_5...

A_5...

TransIT[®]-LT1로 단백질을 transfection할 수 있는가?

사용할 수 있다. Mirus사에서 별도의 테스트는 수행하지 않았지만, 많은 reference에서 TransIT[®]-LT1 transfection 시약으로 단백질을 transfection 하는데 성공한 사례들이 보고되어 있다.

Q_6...

A_6...

TransIT[®]-LT1 transfection 시약은 in vivo 에서 세포를 transfection 하는데 사용될 수 있는가?

사용할 수 없다. in vivo 조건 하에서 사용할 경우에는 TransIT[®]-QR(Quick Recovery)이나 TransIT[®]-EE(Enhanced Expression), TransIT[®] In Vivo gene delivery system과 같이 in vivo 에 사용될 수 있도록 고안된 kit의 사용을 권장한다. 이와 같은 제품은 특별히 tail vein injection으로 mouse나 rat의 생체 내로 transfection 가능하게 한 제품이다.

TransIT 사용법 관련

Q_7...

A_7...

Transfection 실험에 가장 좋은 TransIT[®]-LT1:DNA의 비율은 얼마인가?

대부분의 cell에서 6-well plate의 각 well 마다 3:1의 비율을 권장한다(7.5 μ l TransIT[®] 시약: 2.5 μ l DNA). Cell type, passage number, cell density, incubation time에 따라 1:1에서 8:1까지의 비율 중 최적인 것을 선택할 수 있다.

Q_8...

A_8...

혈청 함유 배지 또는 무혈청 배지 중 어떤 세포에 DNA complex를 첨가하여야 하는가?

TransIT[®] 시약은 혈청 배지나 무혈청 배지 중 어느 쪽에 있는 cell이든 핵산을 효과적으로 전달할 수 있다. 대부분의 경우 TransIT[®]-LT1 시약/DNA complex를 complete growth media(혈청 포함)에 있는 세포에 직접 첨가하고, transfection 후에 배지 교환이 필요 없다. TransIT[®]-LT1 시약/DNA complex가 무혈청 배지에서 complex로 형성되던 것이 혈청이 있는 배지에서는 적절히 complex가 형성되지 않는 경우도 있다.

Q_9...

A_9...

항생제가 transfection을 방해하지는 않는가?

Kanamycin과 같은 일부 항생제들은 양이온이어서 transfection을 방해한다. 항생제를 사용하기 전에 저해 하는지 여부를 확인하거나, transfection을 하는 동안에는 항생제를 가능하면 사용하지 않는 것이 좋다. Transfection 배지에 penicillin과 streptomycin을 다 0.1X 또는 10 units/ml 로 사용할 것을 권장한다.

Q_10...

A_10...

TransIT[®]-LT1 시약에 침전물이 있다. 정상인가?

TransIT[®]-LT1 시약을 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하다 보면 때때로 침전물이 형성될 수도 있다. 이것은 시약의 성능에는 문제가 되지 않으며, 사용하기 전에 시약의 온도를 상온으로 올리고 시약을 부드럽게 혼합하면 용해된다. 만약 자주 transfection을 한다면, TransIT[®]-LT1 시약을 4 $^{\circ}$ C에서 보관할 것을 권장한다.

Troubleshooting

Q_11...

A_11...

Cell density(% confluence)과 passage number는 transfection 반응에서 중요한 요소인가?

그렇다. 최적 밀도(50-70% confluence)는 대부분의 cell에서 성공적인 transfection을 위해 필수적이다. 일반적으로 transfection 하루 전에는 60,000-225,000 cells/ml를 plate 배양하고 transfection 당일에는 400,000-800,000 cells/ml를 배양한다. 최적 transfection 효율을 만들어내는 조건을 결정하기 위해서 cell의 passage number와 성장 시간을 모니터링해야 한다.

Q_12...

A_12...

Cell 위에 얼마나 오랫동안 complex를 두어야 하는가?

대부분의 cell에서 TransIT[®]-LT1 시약/DNA complex를 혈청함유 배지 안에 있는 cell에 직접 첨가하고, 그 후에 도입된 유전자의 발현을 위해 24-48 시간 후에 모은다. 효율적인 transfection을 위한 배양 시간은 24-72시간으로 다양하다. Media change를 하기 전에 최소한 24시간 동안 complex를 cell 위에 둔다.

Q_13... Cell에 대한 transfection 효율성을 어떻게 평가할 수 있는가?

A_13... Mirus에서는 plasmid DNA에 표식하고 transfection 하기 위한 *Label IT[®] Tracker Intracellular Localization Kits*를 개발하였다. 프로토콜에서는 tracking 실험에서 효율적이면서도 파괴가 없는 방식으로 DNA에 직접 표식 하고 그것을 전달하기 위한 직접 접근법을 제공한다. 또한 Mirus는 tracking에 응용하기 위하여 이미 표식 된 DNA control을 제공한다. 표식된 시료의 mammalian cells로의 이동에 따라 세포질 내 이동과 기능을 동시에 모니터링할 수 있다.

Q_14... *TransIT[®]-LT1* 시약을 사용하여 cell를 transfection할 때, transfection 효율성이 낮을 경우 어떻게 해야 하는가?

A_14...

- *TransIT[®]-LT1*:DNA 비율을 최적화 한다
1 μ g DNA 당 시약 2-8 μ l 으로 최적 *TransIT[®]-LT1*:DNA 비율을 정한다. Transfection 효율이 최고가 되고 cell 독성이 최저가 되는 양을 선택하되, DNA 1 μ g 당 *TransIT[®]-LT1* 시약 3 μ l으로 시작한다.
- 무혈청 배지에 있는 cell에 complex를 첨가한 경우
무혈청 배지에서 complex를 형성하고 complete growth media(혈청 함유)에 있는 cell에 첨가한다. Complex를 complete growth media에 있는 cell에 첨가하여 4시간 동안 배지 교환이 없으면 transfection의 효율이 개선되고 독성이 감소한다.
- Transfection 시 cell density(% confluence)가 최적이지 아닌 경우
Transfection을 하는 시점에서, 대부분의 cell에 대한 권장 cell density는 50-70% confluence이다. 그러나 transfection의 효율성을 극대화하기 위해서는 각 cell 유형에 따라 최적인 cell density를 정할 필요가 있는 경우도 있다. 향후 실험에서 재현성을 정확하게 하려면 밀도를 일정하게 유지해야 한다.
- Complex 형성 동안에 배양 시간이 충분하지 않은 경우
권장 complex 형성 시간은 15-30분이다. 이 범위 내의 여러 시간대를 실험하여 각 cell에 따라 최적의 complex 형성 시간을 정할 필요가 있다.
- Transfection하는 DNA의 purity이 떨어지는 경우 (DNA 준비 중에 부분적으로 분해되거나 endotoxin이 들어갈 수도 있다)
Transfection에 사용되는 DNA는 고도로 정제된 것으로, endotoxin과 같은 오염물질이 없어야 한다. Mirus Bio의 *MiraCLEAN[®] Endotoxin Removal Kit*(TaKaRa Code MIR 5900)을 사용하여 endotoxin(bacterial lipopolysaccharide, LPS)을 제거한다. Transfection을 위한 최적 DNA 농도는 6-well plate의 한 well 당 1-5 μ g 으로, 6-well plate의 한 well 당 2.5 μ g의 *TransIT-LT1* 시약을 사용한다.
- *TransIT[®]-LT1* 시약/DNA complex 형성 동안에 Fetal calf serum이 존재하는 경우
Complex를 형성할 때에는 무혈청 배지를 사용하고, transfection은 혈청이 있는 상태에서 한다.
- Transfection 동안에 반응 억제제가 존재하는 경우
Dextran sulfate이나 heparin과 같은 polyanion이 존재하면 transfection이 억제된다. 이와 같은 Polyanion이 없는 transfection 배지를 사용을 권장한다.
- Cell 형태가 변화되는 경우
만약 cell passage number가 매우 높거나 너무 낮다면 transfection의 효율에 나쁜 영향을 미친다. 재현성을 높이려면 실험간 비슷한 passage number를 유지한다.

Q_15... *TransIT[®]-LT1* 시약으로 transfection 한 후에 cell toxicity을 발견한 경우 어떻게 해야 하는가?

A_15...

- Complex가 무혈청 배지에 있는 cell에 첨가된 경우
무혈청 배지에서 complex를 형성하고 complete growth media(혈청 함유)에 있는 cell에 첨가한다. Complex를 complete growth media에 있는 cell에 첨가하여 4시간 동안 배지 교환이 없으면 transfection의 효율이 개선되고 독성이 감소한다.
- Cell density(% confluence)가 transfection 당시에 최적이지 아닌 경우
Transfection을 하는 시점에서, 대부분의 cell에 대한 권장 cell density는 50-70% confluence이다. 그러나 transfection의 효율을 극대화하기 위해서는 각 cell 유형에 따라 최적인 cell density를 정할 필요가 있는 경우도 있다. 향후 실험에서 재현성을 정확하게 하려면 밀도를 일정하게 유지해야 한다.
- Transfection에서 *TransIT[®]-LT1* 시약/DNA complex의 양이 과도한 경우
Cell에 첨가되는 *IT[®]-LT1* 시약 또는 DNA의 양을 줄인다.
- *TransIT[®]-LT1* 시약/DNA complex가 well 안의 cell들과 완전하게 섞이지 않은 경우
모든 cell에 complex가 퍼지도록 잘 섞어 준다.
- Cell 형태가 변화되는 경우
만약 cell passage number가 매우 높거나 너무 낮다면 transfection의 효율에 나쁜 영향을 끼친다. 재현성을 높이려면 실험간 비슷한 passage number를 유지한다.