

Transport™ Protein Delivery Reagent를 이용한 transfection 효율의 증대

By Anatoliy Koval과 Zoe Damian(Cambrex)

Transport™ Protein Delivery Reagent는 생물학적 활성 분자(단백질, 펩타이드, 항체)를 살아있는 cell에 직접, 세포독성 없이 전달 하는 가장 효율적인 제품이다. Transport Reagent는 DNA transfection에서 일어날 수 있는 문제를 최소화시키고, 세포와 단백질 기능을 빠르고 쉽게 연구할 수 있도록 해준다. 새롭게 발견된 펩타이드는 배양 배지에 첨가되었을 때 그 자신과 부착된 분자들을 배양된 cell로 이동시킨다. 분자에 위치한 free thiol(즉, cysteine)과 결합된 disulfid bond를 형성하는 시약의 2-pyridyldithio 그룹을 통해 Transport Reagent와 분자들의 결합이 발생한다.

DNA를 cell로 전달하는데 일반적으로 calcium phosphate, microinjection, electroporation, cationic liposomes과 같은 방법들이 사용되나, 효과에 비해 시간이 많이 걸린다. DNA를 RNA로 전사하고 그 RNA를 다시 단백질로 번역하는 host cell의 기작에 따라 실험이 달라지며, 이는 세포독성과 발현시 문제를 일으키는 중요한 문제점이 된다. 단백질의 직접적인 전달과 효율적인 cell내 흡수는 cellular phenotype을 연구하는데 여러 가지 장점을 가진다.

- 단백질 transfection의 높은 효율(단백질을 cell로 전달할 때에는 종종 transduction이라고도 함)
Cell type, 부착 또는 현탁, monolayer 또는 aggregate와 상관없이 transfection의 효율성을 100%까지 올릴 수 있다(그림 1)
- Primary cell들을 포함하여 폭넓은 cell에 transfection(표 1)
지금까지 높은 효율성으로 transfection되지 않은 primary cell 이나 cell line은 없었다.
- 빠른 transfection 프로토콜
2시간 이내 짧은 시간에 단백질 전달
- 단백질의 dose dependent transfection
Transport Reagent는 아주 높은 농도에서도 cell에 독성을 일으키지 않는다.
- 크기와 상관없이 생물학적 활성 단백질을 전달
150 kDa까지의 단백질을 테스트한 결과 효율적으로 transfection되었다(그림 2).

- 쉽게 실행할 수 있는 단백질 transfection
Transport Reagent를 단백질과 간단하게 혼합하여 cell에 적용한다.
- 세포 배양 조건에 적합한 유연성
무혈청 배지 또는 혈청 함유 배지에 상관없이 실험하는 cell에 최적인 배지를 사용한다.

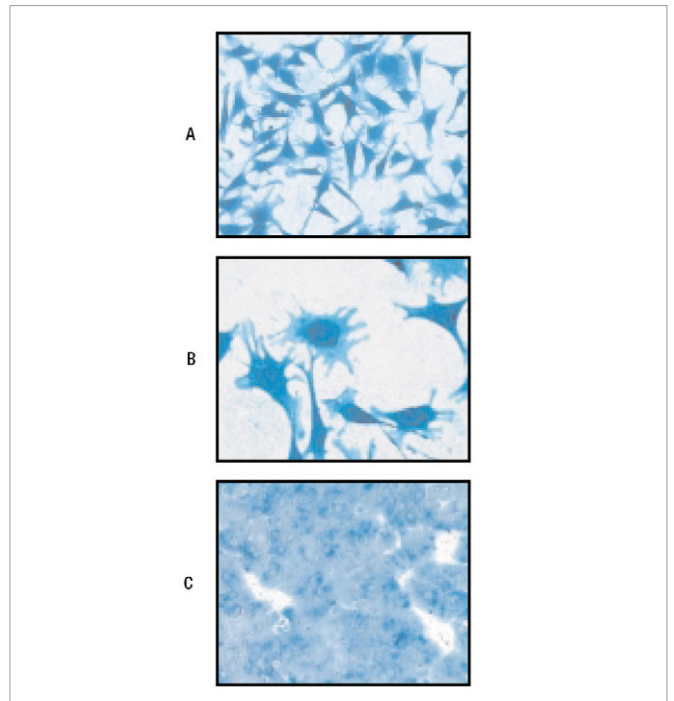


그림 1. Transport™ Regent를 사용한 β-galactosidase의 transfection, A와 B는 NIH 3T3 cell의 transfection: 각각 20×와 40×로 확대. C는 rat hepatocytes의 transfection: 20× 확대

표 1

Primary cells and cell lines successfully transduced with Transport™ Delivery Reagent		
■ Human Neural Progenitors	■ Human Dermal Fibroblasts	■ NIH 3T3
■ Human Bronchial Epithelial Cells	■ Rat Hepatocytes	■ 293
■ Human Epidermal Keratinocytes	■ Rat Cortical Neurons	■ C2C12
■ Human Aortic Smooth Muscle Cells	■ Rat Hippocampal Neurons	■ CHO

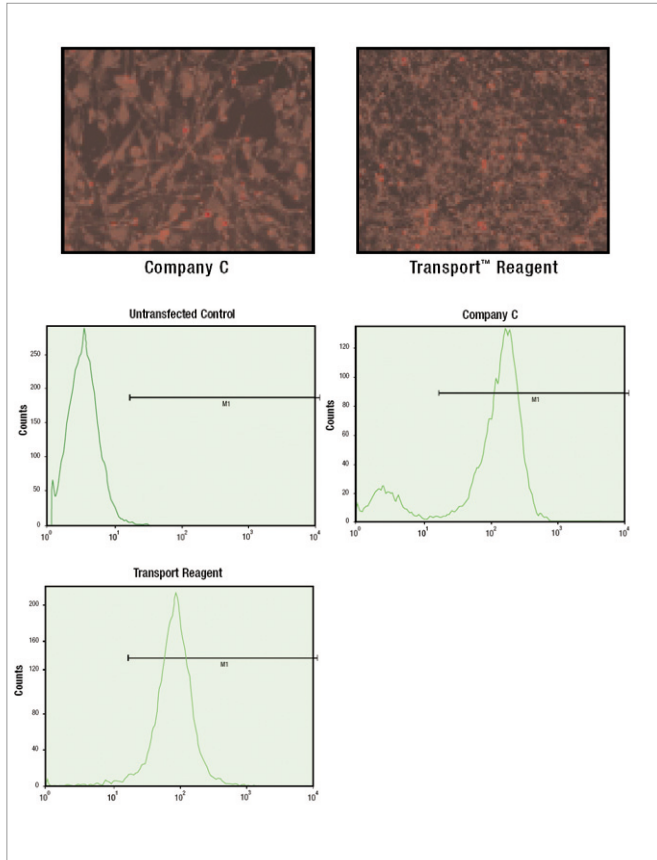


그림 2. 항체의 transfection, NIH 3T3 cell에 C사 시약(왼쪽) 또는 Transport™ Protein Delivery Reagent(오른쪽)를 사용하여 Alexa Fluor® 568 labeled goat anti-rabbit IgG를 transfection하였다. 아래쪽 panels은 transfection된 cell들의 FACS 분석 결과들을 나타내며, Transport Reagent에 의하여 100% transfection 되었음을 보여준다.

일반적으로 진핵세포의 원형질막은 대다수의 펩타이드와 단백질들이 투과할 수 없다. 그러나 여러 가지 PTDs(protein transduction domains)는 활성 분자들을 원형질막을 통과하여 transfection할 수 있어서, 단백질이 세포내에 축적되도록 한다. 가장 많이 연구되고 있는 PTDs는 Drosophila homeotic transcription protein antennapedia(Antp)⁽¹⁾, herpes simplex virus structural protein VP22⁽²⁾, human immunodeficiency virus 1(HIV-1) transcription activator Tat protein^{(3), (4)} 로, 이들 PTDs 사이에는 상동성이 제한되어 있음에도 불구하고, 세포 내 흡수 비율은 존재하는 기본 아미노산의 수, 특히 arginine 잔기 수와 상관관계가 있다. Transport™ Reagent(특히 출원 중)는 주로 염기성 아미노산의 독특한 서열로 되어 있는 PTDs이며, 상업적으로 구할 수 있거나 논문에 발표된 PTDs 보다 훨씬 높은 transfection 활성을 지니고 있다. 다른 PTDs와 유사하게, 단백질의 transfection을 야기하는 Transport Reagent는 receptor, transporter 및 endocytosis와 독립적이며, 37 °C 와 4 °C 모두에서 농도 의존적으로 100% 성공적으로 transfection할 수 있다.

활성화된 Transport Reagent는 N-말단에 2-pyridyldithio 그룹을 포함해야 하며, 단백질은 직접 Transport Reagent에 결합할 수 있는 free thiol 그룹(즉, cysteine)을 가지고 있어야 하며, 결합은 상온 수용액 안에서 10-20분 내에 쉽게 이루어진다. 결합은 native PAGE gel에서 관찰할 수 있으며, 일반적인 단백질인 경우 4-20%의 gradient PAGER® Precast Gels(Cambrex)

을 사용하는 것이 편리하다. Transport Reagent와 단백질 사이의 S-S 결합은 불안전하므로, 어느 단계에서든지(단백질 결합, PAGE loading buffer, 배지 등) DDT나 β-mercaptoethanol, glutathione과 같은 환원제를 피하는 것이 중요하다.

Transport Reagent는 높은 양전하적 특성을 갖고 있어 complex가 수용액에서 침전되므로 살아있는 cell에 직접 transfection 할 수 없다.

또한 Transport Reagent 서열을 포함하고 있는 fusion protein은 매우 낮은 용해성을 보여, 겔으로는 단점으로 보이지만 단백질 transfection에 대한 새로운 접근법을 개발하는데 유용하다.

Transport™ Reagent complex를 tissue culture plate의 표면에 부착시켜 독특하면서도 간단하고 매우 효율적인 단백질 전달 방법(특허출원)을 개발하였다.

이러한 “bottom-up” 방법은 표준 “top-down” 접근법에 비해 10배 이상 transfection 효율을 상승시킬 수 있으며, 단백질의 세포 내 이동을 개선하여 새로운 프로테오믹스 tool 개발을 가능하게 하였다(그림 3).

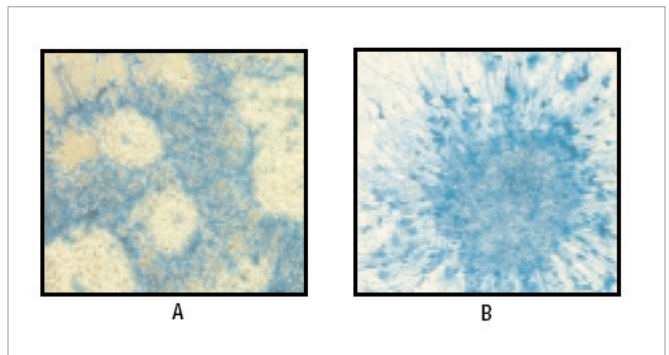


그림 3. Transfection “bottom up” 방법과 표준방법의 비교. Normal Human Neural Precursors를 표준방법(A: 20× 확대) 또는 “bottom up” 방법(B: 40× 확대)을 사용하여 Transport™ -β-galactosidase complex를 가지고 transfection 하였다. 분화된 세포들을 표준 방법으로 효과적으로 transfection 했음에도 불구하고, neurosphere를 transfection하는 것은 어려웠다. 하지만 “bottom up” 방법은 성공적으로 이 문제를 극복하였다.

참고자료

- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 1864-1868.
- Elliott, G., and O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**: 223-233.
- Green, M., and Loewenstein, P.M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**: 1179-1188.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**: 1189-1193.