

# Low toxicity, 높은 transfection 효율 진핵세포용 유전자 transfection reagent TransIT® Transfection Reagents 시리즈

배양세포에 유전자(DNA, RNA, siRNA)를 도입하기 위해서는 liposome 법이 가장 많이 사용되고 있다. TransIT® 시리즈는 독자적인 지질을 포함하는 polyamine을 기본으로 한 진핵세포 용 transfection reagent로 기존의 liposome 을 사용한 제품에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 본 고에서는 호평을 받고 있는 TransIT® 시리즈를 사용한 유전자 도입 실험의 예를 소개하고자 한다.

## TransIT® 시리즈의 특징

- 높은 효율로 유전자(DNA, RNA, siRNA) 도입이 가능하다.
- 각종 세포에 최적화된 시약을 준비하고 있다.
- 세포에 대한 독성이 낮으므로 번거로운 배지 교환과 같은 조작이 필요하지 않다.
- 1 개의 튜브로 시약과 유전자의 혼합만으로 조작이 완료된다(15 분 정도).
- 혈청을 포함하는 배지 상태로 조작이 가능하다.

TransIT® 시리즈의 가장 큰 특징은 cell에 toxicity가 매우 낮다는 것이다. Transfection 후의 cell 상태가 매우 중요한 RNAi 등의 유전자 발현 연구에 매우 이상적이다.

## 실험 예1: TransIT®-LT1을 사용한 포유동물 배양세포로의 plasmid DNA의 도입

TransIT®-LT1은 각종 cell에 DNA 도입이 가능한 범용성이 높은 제품이다. 본 제품을 사용하여 GFP 발현 plasmid를 그림 1의 방법으로 293 cell과 HT1080 cell에 도입한 후 48 시간 후에 transfection efficiency를 FCM(Flow Cytometry)으로, 세포독성을 WST-1 assay(Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System(TaKaRa Code MK400))로 cell의 상태를 관찰하였다. 또한 비교를 위하여 A사의 제품을 사용하여 동일한 실험을 하였다. FCM 해석으로 GFP 발현 plasmid가 293 cell 및 HT1080 cell에 고효율로 도입되어 있다는 것을, 또한 WST-1 assay 결과에서 TransIT®-LT1은 상당히 세포독성이 낮은 것을 확인할 수 있었다(그림 2). 그리고 TransIT®-LT1의 경우에는 transfection에 따라 세포 상태가 변화하지 않으며, GFP 유전자 또한 고효율로 발현하고 있는 것이 확인되었다(그림 3).

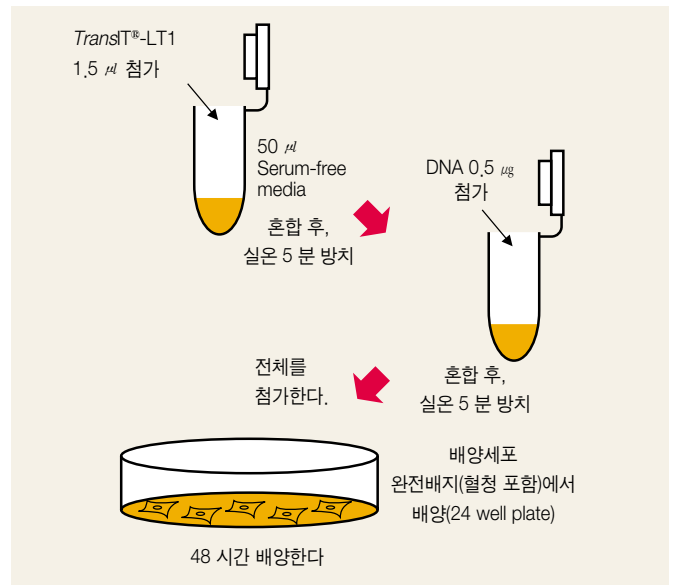


그림 1 TransIT®-LT1을 사용한 유전자 도입 방법

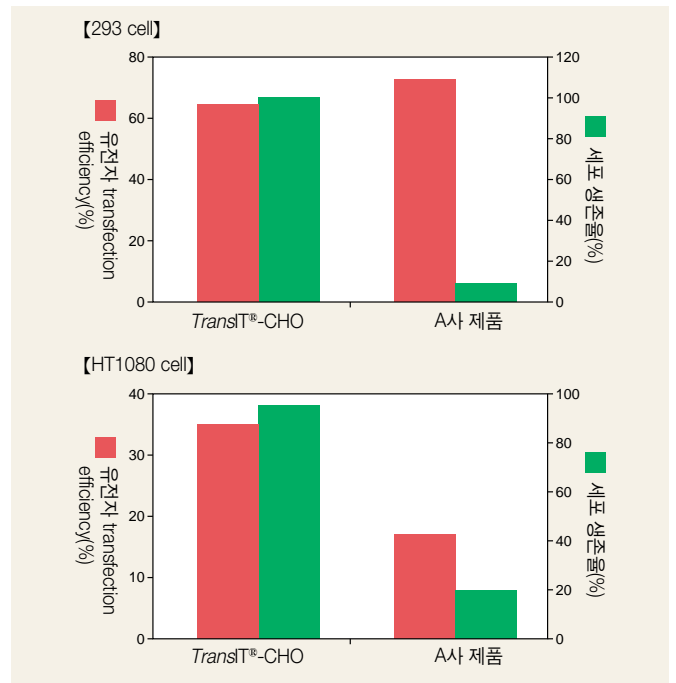
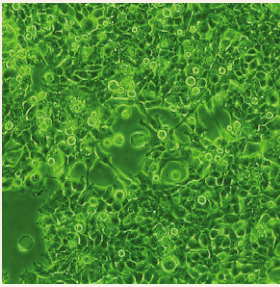


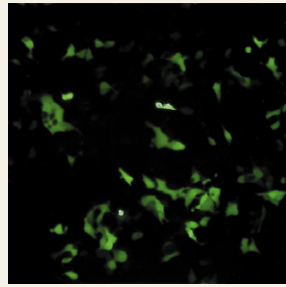
그림 2 TransIT®-LT1과 A사 제품으로 유전자 transfection efficiency와 세포 생존율

【293 cell】

TransIT®-LT1

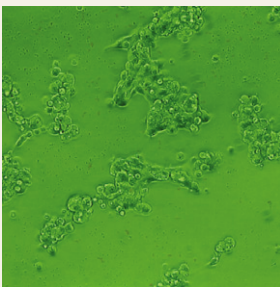


광학현미경

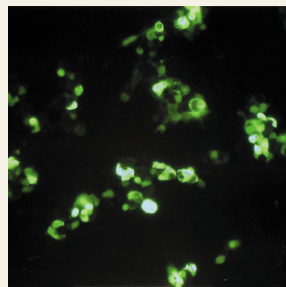


형광현미경

A사 제품



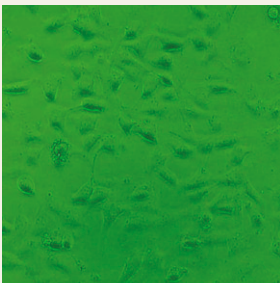
광학현미경



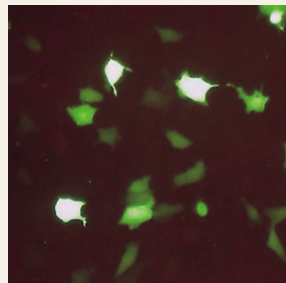
형광현미경

【HT1080 cell】

TransIT®-LT1

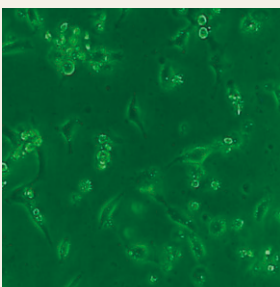


광학현미경

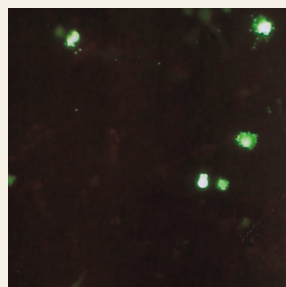


형광현미경

A사 제품



광학현미경



형광현미경

그림 3 GFP 발현 plasmid를 transfection한 후의 Cell 상태

이와 같이 TransIT®-LT1을 사용하면 포유동물 세포에 외래 유전자를 간편하고 고효율로 도입할 수 있다.

### 실험 예2: TransIT-TKO®를 사용한 siRNA의 도입

TransIT® 시리즈에는 DNA 뿐 아니라 RNA와 siRNA의 도입용 제품도 있다. TransIT-TKO®를 사용하면 고효율로 siRNA를 각종 포유동물 배양세포에 도입할 수 있다. TransIT-TKO®를 사용하여 각종 세포에 형광 표식 siRNA를 transfection하고 24시간 후에 FCM에 따라 각 세포에서의 siRNA transfection efficiency를 구하였다(그림 4).

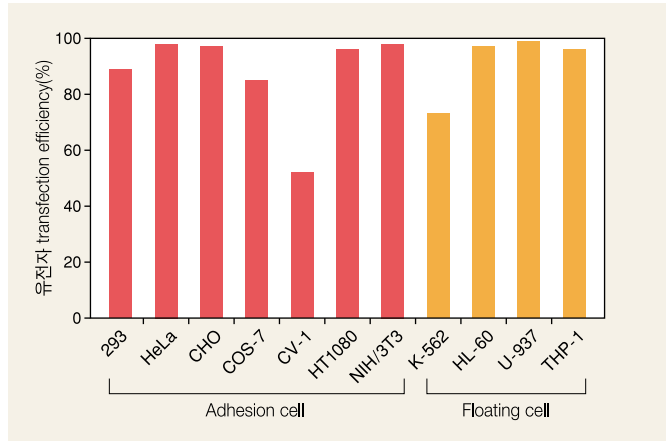


그림 4 TransIT-TKO®에 의한 각종 세포의 siRNA transfection efficiency

TransIT-TKO®를 사용하여 GAPDH 유전자(housekeeping gene)의 siRNA(siGAPDH)를 프로토콜에 따라 293 cell 및 HT1080 cell에 도입하였다(RNAi Training Kit(TaKaRa Code 3710)을 사용). 또한 negative control로 Kit에 포함되는 scrambled RNA(siNC)를 사용하였다. 48 시간 후에 cell에서 RNA를 추출하여 역전사 반응을 실시한 후, real time PCR로 GAPDH의 mRNA 양을 정량하여( $\beta$ -actin의 mRNA 양으로 보정) siRNA에 의한 knock-down 효과를 관찰하였다.

그 결과, TransIT-TKO®를 사용하여 siGAPDH를 transfection한 293 cell과 HT1080 cell에서는 GAPDH mRNA의 발현량이 현저하게 감소하여 siRNA에 의한 knock-down 효과가 확인되었다(그림 5).

이와 같이 TransIT-TKO®를 사용하면 각종 포유동물 세포에 siRNA를 간편하고 고효율로 도입할 수 있다.

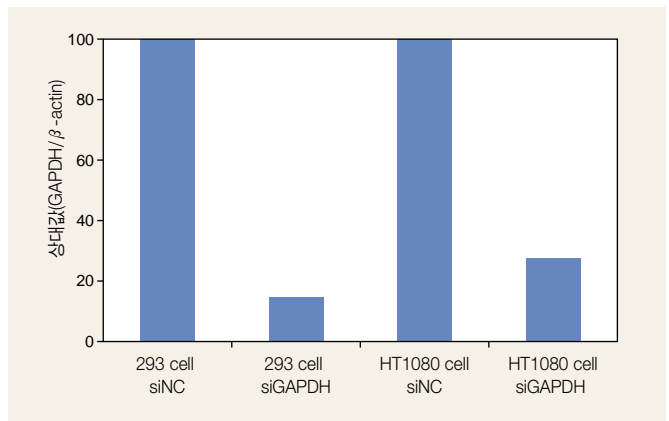


그림 5 TransIT-TKO®를 사용한 siRNA knock-down 효과

### 실험 예3: *TransIT*<sup>®</sup>-293과 *TransIT*-CHO<sup>®</sup>를 사용한 RNAi 효과의 검토

*TransIT*<sup>®</sup>-LT1과 *TransIT*<sup>®</sup>-293 등의 DNA용 transfection reagent와 siRNA transfection reagent인 *TransIT*-TKO<sup>®</sup>를 조합하면 DNA와 siRNA를 cell에 co-transfection할 수 있다. 그림 6의 방법에 따라 *TransIT*<sup>®</sup>-293을 사용하여 GFP 발현 plasmid를, *TransIT*-TKO<sup>®</sup>를 사용하여 GFP에 대한 siRNA(siGFP)\*를 293T cell에 co-transfection하였다. 또한 negative control은 GFP에는 영향을 미치지 않는 서열 siRNA(siNC)를 사용하였다. 48 시간 후에 FCM 해석으로 GFP 단백질의 형광 강도를, real time RT-PCR로 GFP 유전자의 mRNA 양을 조사하였다.

그 결과, 농도 의존적으로 GFP에 대한 RNAi 효과가 관찰되었다(그림 7).

\*: siGFP의 서열: Juhana, E. et al.(2002) *FEBS Lett.*, **527**,274-278.

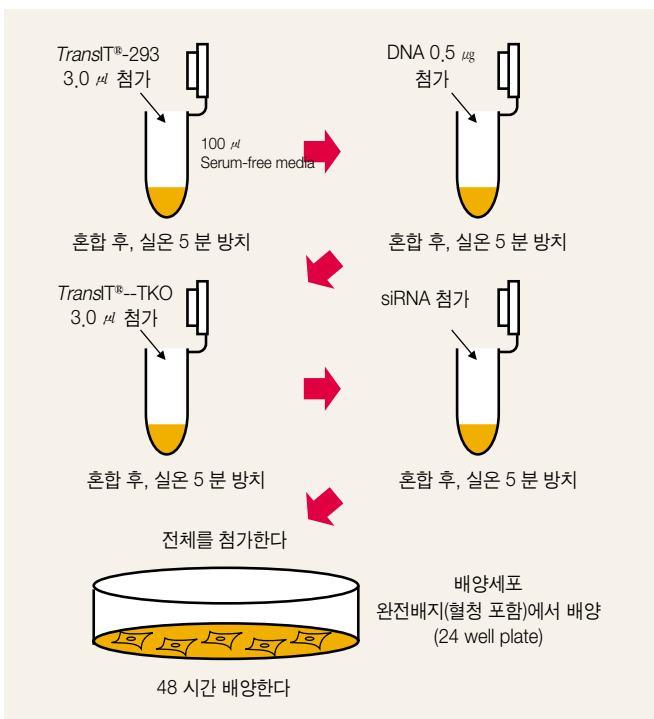


그림 6 *TransIT*-TKO<sup>®</sup>와 *TransIT*<sup>®</sup>-293을 사용한 siRNA와 GFP 발현 vector의 293T Cell로의 co-transfection 방법

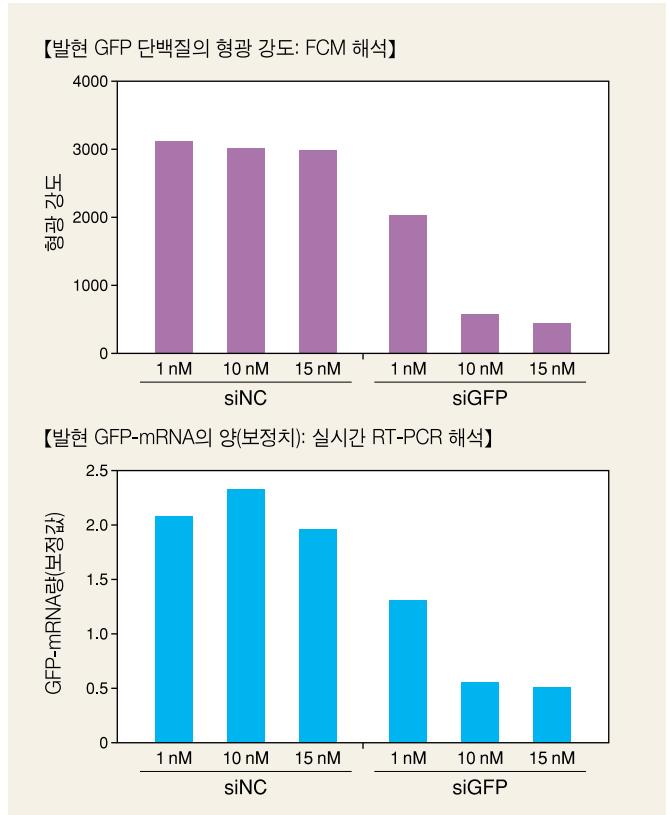


그림 7 GFP 발현 vector와 GFP 유전자에 대한 siRNA를 co-transfection하였을 때, RNAi 효과

이와 같이 *TransIT*-TKO<sup>®</sup>와 DNA 도입용 *TransIT*<sup>®</sup>(예를 들면 *TransIT*<sup>®</sup>-293)를 조합하면 발현 vector를 사용한 RNAi 실험을 할 수 있다. 또한 이런 *TransIT*<sup>®</sup> 제품은 세포독성이 낮기 때문에 co-transfection 후의 세포 상태가 악화하지 않으며 RNAi 연구에 가장 적합하다.

### 실험 예4: *TransIT*-CHO<sup>®</sup>를 사용한 CHO cell로의 유전자 도입

*TransIT*<sup>®</sup> 시리즈에는 각종 cell에 최적화된 제품도 준비되어 있다. 이런 제품을 사용하면 조건 검토를 하지 않고 목적하는 cell에 고효율로 유전자를 도입할 수 있다(표 1).

아래에 CHO cell에 최적화된 유전자 transfection reagent *TransIT*<sup>®</sup>-CHO

표 1 특정 cell에 최적화된 각종 제품과 *TransIT*<sup>®</sup>-LT1의 유전자 transfection efficiency 비교

Cell line	Transfection reagent	Transfection efficiency
CHO-K1	<i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1/ <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -CHO	30~40 %/50~60 %
COS-7	<i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1/ <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -COS	80~90 %/90~95 %
HEK293	<i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1/ <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -293	60~70 %/75~85 %
HeLa	<i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1/ <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -HeLaMONSTER <sup>®</sup>	40~45 %/50~60 %
Jurkat	<i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1/ <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -Jurkat	1~5 %/10~25 %
NIH/3T3	<i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1/ <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -3T3	40~50 %/55~65 %

- *TransIT*<sup>®</sup>-Neural의 유전자 transfection efficiency: C6 cell(20 %), Daoy cell(25 %), DB-TRG-05MG (25 %), DI-TNC1 cell(40~50 %), Neuro-2a cell(75 %), PC-12cell(20~30 %), SK-N-MC cell(60~80 %), SVGp12 cell(30 %).
- *TransIT*<sup>®</sup>-Prostate의 유전자 transfection efficiency: DU145 cell(50 %), LNCaP cell(50 %), PC-3cell(50 %).

를 사용하여 CHO cell에 유전자 도입한 예를 소개한다. TransIT®-CHO를 사용하여 첨부한 프로토콜에 따라 GFP 발현 plasmid를 CHO cell에 transfection하였다. 48시간 후에 FCM으로 유전자 transfection efficiency와 생존세포의 비율을 조사하고, 비교를 위하여 A사 제품을 사용하여 동일한 실험을 하였다. 그 결과를 그림 8에 나타낸다.

TransIT-TKO®의 경우는 A사 제품에 비해 transfection efficiency는 약간 낮았지만 죽은 cell은 거의 관찰되지 않고 상당히 높은 생존율을 보였다. 이와 같이 TransIT-TKO®는 세포독성이 낮고 transfection efficiency도 충분히 높아 유전자 도입 실험에 유용하게 사용 할 수 있다.

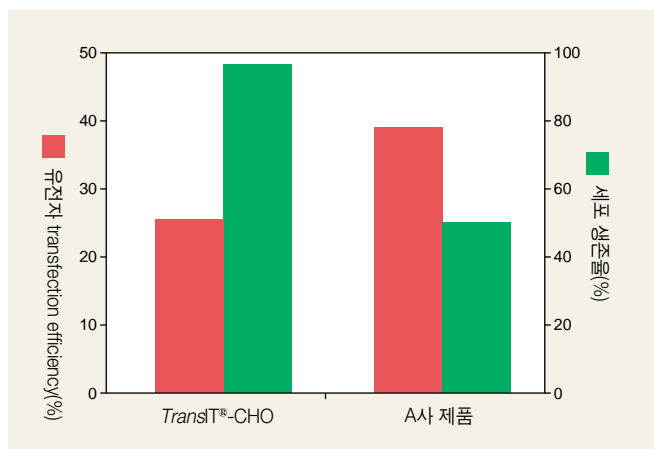


그림 8 GFP 발현 plasmid의 CHO 세포로의 도입-TransIT®-CHO와 A사 제품과의 성능 비교

### TransIT® Transfection Reagent 시리즈 제품

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격(부가세 별도)
<b>【일반적인 cell 의 transfection reagent】</b>			
TransIT®-LT1	V2304T	0,4 ml	305,000
TransIT®-LT2	V2404	0,4 ml	305,000
TransIT®-Express(96 well plate용)	V2004	0,4 ml	330,000
<b>【Cell specific transfection reagent】</b>			
TransIT®-293	V2704	0,4 ml	357,000
TransIT®-3T3	V2184	0,4 ml	376,000
TransIT®-CHO	V2174	0,4 ml	376,000
TransIT®-COS	V2194T	0,4 ml	376,000
TransIT®-HeLaMONSTER®	V2904	0,4 ml	376,000
TransIT®-Jurkat	V2124	0,4 ml	376,000
TransIT®-Keratinocyte	V2804	0,4 ml	376,000
TransIT®-Neural®	V2144	0,4 ml	376,000
TransIT®-Prostate	V2134		376,000
<b>【siRNA transfection reagent】</b>			
TransIT-TKO®	V2154	0,4 ml	437,000
TransIT®-siQUEST™	V2114	0,4 ml	437,000
<b>【Oligonucleotide transfection reagent】</b>			
TransIT®-Oligo	V2164	0,4 ml	437,000
<b>【Mouse transfection reagent】</b>			
TransIT®In Vivo Gene Delivery System	V5125	25 회	330,000
<b>【mRNA transfection reagent】</b>			
TransIT®-mRNA Transfection Kit	V2225	0,25 ml	554,000
<b>【곤충 세포로 유전자 transfection reagent】</b>			
TransIT®-Insecta	V2204	0,4 ml	313,000

위 제품에는 포장 용량이 다양하게 준비되어 있다. 자세한 내용은 당사 홈페이지(www.takara.co.kr)를 참조하기 바란다.