

효율적인 Transfection Method

Calcium Phosphate Transfection of Neuronal Cells



Min Jiang & Gong Chen
 Department of Biology, Huck Institutes of Life Sciences,
 The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802.
 Correspondence should be addressed to G.C. (gongchen@psu.edu).

본 실험에서는 Clontech의 CalPhos™ Mammalian Transfection Kit를 이용하여 신경세포(neuronal cells)에 transfection 할 수 있는 매우 효율적이고 새로운 방법을 찾을 수 있었다. 이 방법을 이용함으로써 낮은 세포 독성을 유지하면서도 기존 방법보다 transfection 효율을 10배 정도 높일 수 있었다. 중요한 2단계의 변화로 transfection 효율을 크게 향상시킬 수 있었는데, 첫 번째는 DNA-Ca²⁺-phosphate precipitate 준비시 균일하게 잘 섞일 수 있도록 DNA-Ca²⁺과 phosphate solutions을 천천히(gently) 혼합하였다. 두 번째는 이 precipitate를 cell과 함께 incubation한 후 독성을 줄이기 위해, 약산성 배양 배지에 용해시켰다. 이와 같이 높은 transfection 효율과 낮은 독성을 나타내는 새로운 프로토콜은 mature neurons 뿐만 아니라 single autaptic neurons의 transfection도 가능하게 만들었다⁽¹⁾.

배양된 neuron은 DNA를 transfection하기 가장 어려운 세포 중 하나로, 매우 민감해서 transfection 후 곧바로 죽는 경우가 많다. Calcium phosphate transfection은 이용이 간편하고 낮은 독성 때문에 neuron의 transfection시 널리 사용되는 방법 중 하나이지만⁽²⁻⁷⁾, 다른 방법들^(2,8,9)과 비교했을 때 transfection 효율이 낮다(평균 1-5% 정도 낮음). 이상적인 transfection 실험 방법은 사용하기 쉬워야하고 calcium phosphate 법과 같은 낮은 독성을 유지해야하며, transfection 효율을 증가시켜 유전학 적인 분석에 널리 적용될 수 있어야 한다.

Forming a Homogeneous DNA-Ca²⁺ - Phosphate Precipitate

본 고에서는 종전에 사용하던 프로토콜에서 transfection 효율을 저해하는 몇 가지 중요한 요인들을 밝혀 Clontech CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (TaKaRa Code 631312)를 사용하여 최저의 독성을 유지하면서도 transfection 효율을 향상시키는 방법을 제시하였다(그림 1). 이 프로토콜의 자세한 내용과 troubleshooting 가이드는 Jiang, M. & Chen, G., 2006⁽¹⁾을 참조하기 바란다. 프로토콜에서는 균질화한 DNA-Ca²⁺ phosphate precipitate를 만드는 것이 가장 중요한 실험 단계 중 하나라고 강조하였다(그림 2). 이 방법은 DNA분자가 endocytosis를 통해 세포로 도입된 후, 다시 핵안으로 도입된다는 점에 착안하여⁽⁸⁾ 종전의 다른 실험법에서 사용했던 계속적으로 강한 vortexing 방법을 사용할 경우, 고르지 못한 큰 침전입자가 형성되고, 이로 인하여 세포의 endocytosis가 충분히 일어나지 못한다는 것을 알아냈다(그림 2, Panel A). 따라서, 본 프로토콜에서는 DNA-CaCl₂과 2X HBS solutions을 서서히 섞어주고 약하게 vortexing함으로써 endocytosis가 더 쉽게 일어나도록 균일하고 작은 입자를 만들 수 있었다(그림 2, Panels B & C).

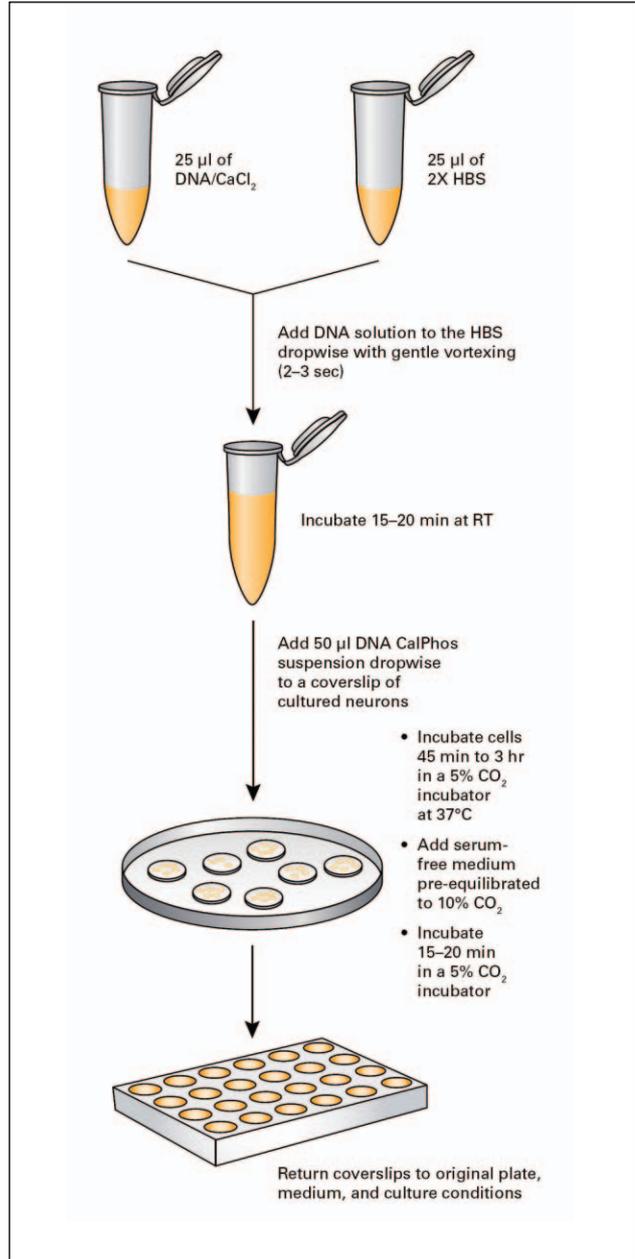


그림 1. Flowchart of our main Ca²⁺- phosphate transfection protocol. For complete details, see Jiang, M. & Chen, G., 2006 (1).

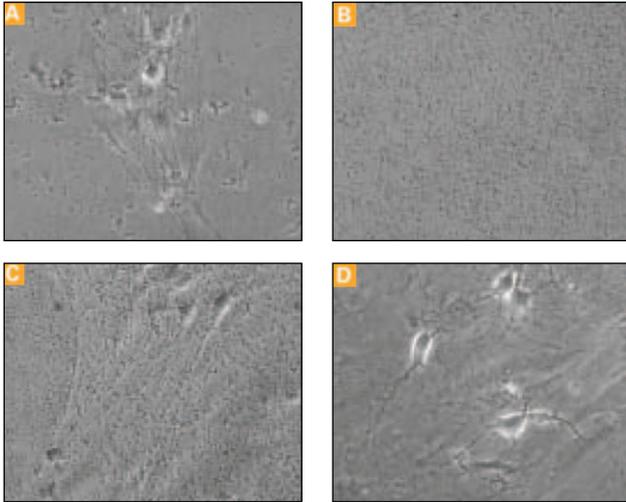


그림 2. Formation and subsequent dissolution of the DNA-Ca²⁺-phosphate precipitate. Panel A, Continuous vortexing when mixing DNA with Ca²⁺ and phosphate buffer results in large clusters of precipitate (examined after a 1 hr incubation). Panels B & C, Formation of an optimal DNA-Ca²⁺-phosphate precipitate through gentle vortexing during mixing (image taken after 1 hr incubation). Panel D, Dissolution of the precipitate with slightly acidic transfection medium pre-equilibrated in a 10% CO₂ incubator (Reproduced from references 1 and 12).

Dissolving the DNA-Ca²⁺ Phosphate Precipitate

본 실험법에서 다른 중요한 한가지는 transfection incubation하는 동안에 DNA-Ca²⁺- phosphate precipitate를 제거하는 것이다. 대부분의 프로토콜에서 사용하는 세척(washing)으로는 transfection medium의 세포에 남아있는 precipitate를 제거하는데 효과적이지 못하다. 10% CO₂ incubator에서 pre-equilibrated된 serum-free transfection medium 으로 교체해준 다음, 5% CO₂ incubator에 단기간 보관하는 것으로 문제를 해결하였다(그림 2, Panel D). 본 프로토콜에서는 10% CO₂에서 pre-equilibration하면 배지를 약산성 화시켜 침전물을 용해하는데 도움이 된다. 이 단계에서 neuronal toxicity를 눈에 띄게 감소시켜 cell이 침전물을 포함한 상태로 더 오랫동안 생존할 수 있도록 하였고, 결과적으로 transfection 효율을 높일 수 있었다.

또 다른 중요한 단계는 새로운 culture plate (with the cells on cover slips)로 교체하여 transfection 한 후, 세포를 원래의 배지와 plate로 다시 옮겨 transfection을 완료하는 것이다. 이런 개선된 방법으로 low-density primary neuronal cultures에서 transfection 효율을 60%까지 높일 수 있었다(그림 3). 본 프로토콜은 transfection precipitate를 녹임으로써 낮은 세포 독성을 유지하며 높은 transfection 효율을 얻을 수 있는 첫번째 방법이다. 최근 Clontech에서는 synaptic vesicle endocytosis의 endophilin function을 연구하기 위해 보다 더 효율적인 calcium phosphate transfection method를 이용하여 transfection을 시도하고 있다⁽¹⁰⁾.

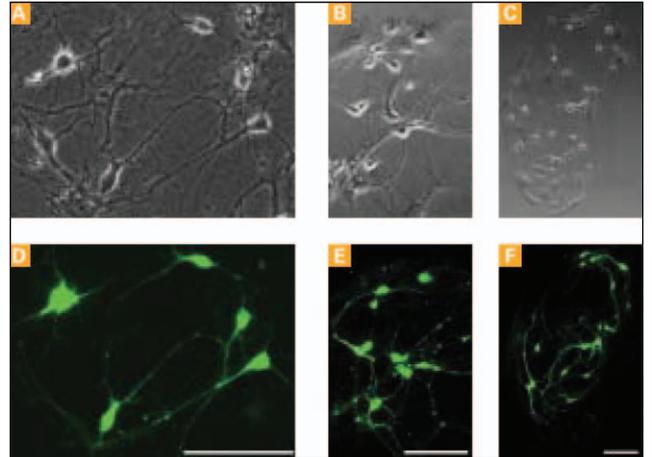


그림 3. High transfection efficiency is achieved in low-density hippocampal cultures with our improved protocol. Panels A-C, Phase-contrast micrographs. Panels D-F, Fluorescent images of GFP-transfected cells in three independent transfections. Note that the majority of neurons in the local field (microislands) are transfected. Neurons were cultured for 10-15 days according to previously described methods^(11, 12) Scale bar, 50 μm (Reproduced from references 1 and 12).

High Transfection Efficiency in Low-Density Hippocampal Cultures

효과적인 transfection을 위해서는 plasmids에 따라 각기 다른 incubation times이 필요할 것이다. 이 과정에서 plasmid incubation times은 세포가 용해되기 전 DNA-Ca²⁺-phosphate precipitate에 노출되는 시간의 변화에 따라 최적화 할 수 있다.

Clontech은 최고의 transfection 효율과 최저의 세포 독성을 얻기 위해서는 45분 ~ 3시간 정도의 incubation time이 적절함을 알아냈다. 그림 3에서는 대부분의 뉴런이 GFP 발현을 보임으로써 transfection이 높은 효율로 성공적으로 이루어졌음을 보여준다. 한 개의 microisland는 총 22개의 뉴런을 포함하고 있으며 그 중 17개의 뉴런이 transfection 됨으로써 ~80% 정도의 효율을 보여 주고 있다(Panels C & F). 총 211개의 뉴런에서 127개의 뉴런이 transfection되어 ~60.2%의 효율을 보였다. 이는 이전에 보고되었던 평균 1-5% (2,13,14) 보다 훨씬 높은 수치이다. 또한, exogenous gene 발현은 안정적이고 매우 빠르게 일어났다. 뉴런의 GFP 발현은 transfection후 4시간 이내에 관찰되었고 1주일 이상 유지되었다.

Transfection of Mature Neurons in Culture

Calcium phosphate transfection methods는 2-10일간 배양된 어린 뉴런의 transfection에 이용되곤 한다. 성숙한 뉴런은 transfection 후 곧바로 죽는 경우가 많아 transfection에 많은 어려움을 겪는다. Clontech의 개선된 실험법을 이용하면, 2~82일 동안 배양한 뉴런도 성공적으로 transfection되고 synaptic networks를 잘 형성하여 세포내 유전학적 분석을 가능하게 하였다 (예 ; 20일 이상 배양된 세포 ; 그림 4). 배양시 뉴런이 3개월 이상 생존하는 것은 매우 드물기 때문에, 82-day-old 뉴런의 transfection이 성공했다는 것은 매우 주목할 만한 일이다.

성숙한 뉴런과 같이 민감한 세포에 transfection이 가능하다는 것은 Clontech의 실험법이 실제로 독성의 영향력이 거의 없다는 증거라고 볼 수 있다.

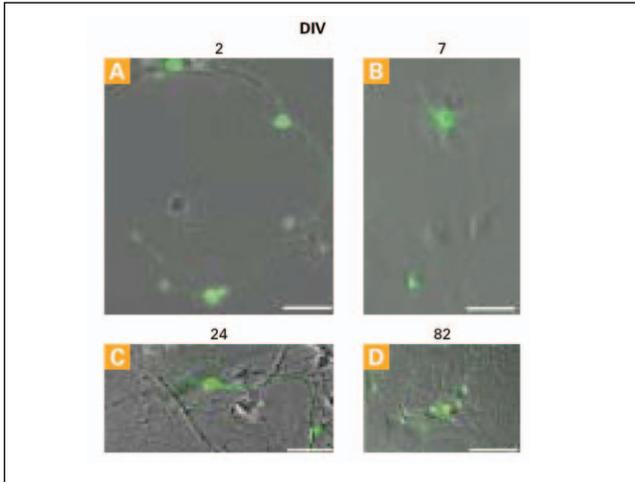


그림 4. Successful transfection of both mature and immature neurons. Panels A & B. Transfection of young neurons with EGFP at 2 and 7 days in vitro (d.i.v.). Panels C & D. Transfection of mature neurons with EGFP at 24 and 82 d.i.v. Scale bar, 50 mm (Reproduced from reference 1).

High Transfection Efficiency in Neurons but not Glial Cells

Neuron 배양시 cortical astrocytes는 단층형태로 자라기 때문에 glial cell을 포함하고 있었다. 그러나 높은 background signal(예 ; GFP)이 생성되거나 neuron-glia 상호작용으로 neuron 기능에 직접적인 영향을 줄 수 있기 때문에 과도한 astrocyte의 transfection은 바람직하지 않다.

Clontech의 방법을 이용하면, 이와 같은 혼합된 세포배양액에서 glia는 거의 transfection되지 않는다(그림 5). 이것은 cytosine arabinoside가 glial proliferation을 중단시키고 transfection을 억제하기 때문일 것으로 생각된다. 또한, neuron-glia 접촉을 최소화시키는 Banker-type cultures에서도 transfection이 가능하다.

Clontech의 실험법을 이용하면 low-density neuronal cultures시 astrocytes 유(25.2%), 무(21.6%)에 관계없이 일정한 수준의 transfection 효율이 유지되는 것으로 보인다.

이 실험법은 cultured neuron에 매우 낮은 독성을 유지하면서 높은 transfection 효율을 올릴 수 있도록 한다. 이 방법의 핵심 요소는 균질하게 Ca²⁺-phosphate precipitate를 만들고 약산성배지에 침전물을 용해시키는 것이다.

이 방법은 mature neuron과 immature neuron에 모두 효과적이며, 심지어는 single autaptic neuron에도 transfection가능하여 functional genetic analysis에 이용할 수 있다.

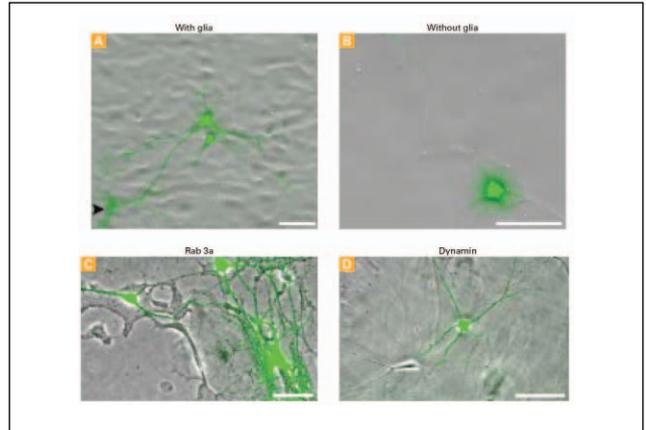


그림 5. Transfection efficiency in glial cells is very low. Panel A. Only a few glial cells (arrowhead) are transfected in neuronal cultures with a monolayer of astrocytes. Panel B. In Banker-type cultures where neurons usually do not contact glial cells directly, transfection efficiency remains high (21.6%). Panels C & D. Many constructs can be successfully transfected using our protocol. Illustrated here are EGFP-Rab3a (Panel C) and EGFP-dynamin (Panel D) (Reproduced from reference 1).

Product	Size	TaKaRa Code
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	each	631312

References

- Jiang, M. & Chen, G. (2006) *Nat. Protoc.* 1(2):695-700.
- Xia, Z. *et al.* (1996) *J. Neurosci.* 16(17):5425-5436.
- Micheva, K. D. *et al.* (2003) *Nat. Neurosci.* 6 (9):925-932.
- Chen, W. G. *et al.* (2003) *J. Neurosci.* 23 (7):2572-2581.
- Holz, R. W. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275 (23):17878-17885.
- Passafaro, M. *et al.* (2003) *Nature* 424 (6949):677-681.
- Goetze, B. *et al.* (2004) *J. Neurobiol.* 60(4):517-525.
- Craig, A. M. (1998) *Transfecting Cultured Neurons*, MIT Press, Cambridge, MA.
- Washbourne, P. & McAllister, A. K. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* 12(5):566-573.
- Chen, Y. *et al.* (2003) *Cell* 115(1):37-48.
- Chen, G. *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(4):1063-1068.
- Jiang, M. *et al.* (2004) *Gene Ther.* 11(17):1303-1311.
- Kohrmann, M. *et al.* (1999) *J. Neurosci. Res.* 58(6): 831-835.
- Watanabe, S. Y. *et al.* (1999) *Neurosci. Res.* 33(1):71-78.