

Technical Report

Nucleic Acid Labeling and Delivery Tools for Neurobiology

Aaron G. Loomis, Jennifer L. Duzeski, Laura K. Juckem, Kira J. Machnik, Shyla L. Tessmer, Mary-Anne V. Watt, James E. Hagstrom, Mirus Corporation.

서론

Mirus에서는 신경과학자들이 필요로 하는 트랜스펙션transfection과 표식 labeling을 위해 최적화된 다양한 제품을 개발하고 있다. *TransIT-Neural Reagent*는 다양한 신경세포에 plasmid를 도입하고자 할 때 세포 생존 능력을 유지하면서도 높은 트랜스펙션 효율을 보이도록 특화된 시약이다. 가장 인기 있는 Mirus 제품 중 하나인 *TransIT-TKO Transfection Reagent*는 신경 세포를 포함한 다양한 포유류 세포에 siRNA를 효과적으로 도입한다. 그리고 *Label IT Tracker Kit*와 *Label IT siRNA Tracker Kit*을 이용하면 핵산과 원스텝 공유결합 표식을 통해 핵산 본래의 기능을 유지하면서도 세포내 추적 가능하게 한다. 또한 *Label IT Tracker Kit*와 *Label IT siRNA Tracker Kit*을 이용하면 다양한 표식(Cy3, Cy5, CX-Rhodamine, TM-Rhodamine, Fluorescein, Biotin)이 가능하기 때문에 하나 이상의 형광 물질로 핵산을 추적할 때 이상적이다. 본 고에서는 이 시약들을 어떻게 신경생물학 연구를 위한 유전자 도입과 조절에 효과적으로 적용할 수 있는지 보여주고자 한다.

방법

표식된 pDNA 준비

*Label IT Tracker*의 프로토콜에 따라 DNA 1 μ g 당 1 μ l의 reagent의 비율로 *Label IT Tracker Reagent*를 넣어 37°C에서 1시간 반응하여 플라스미드 DNA를 표식하였다. 샘플은 에탄올 침전법으로 정제하고 표식된 DNA pellet은 D.W.로 녹여 정량한 뒤 빛을 차단하고 -20°C에 보관하였다.

pDNA의 트랜스펙션

플라스미드 DNA 1 μ g 당 *TransIT-Neural Transfection Reagent* 1~16 μ l(세포에 따라 다름)를 100 μ l의 serum-free 배지에 첨가하여 vortexing한 후, 5~10분간 실온에서 반응하여 트랜스펙션 시약을 준비하였다. Firefly luciferase plasmid(12well plate의 1 well당 1 μ g)를 희석된 *TransIT-Neural Transfection Reagent*에 첨가한 뒤 파이펫팅으로 부드럽게 섞은 다음 실온에서 5~10분간 추가로 반응한다. 이렇게 준비한 트랜스펙션 복합체를 세포(50~70% confluent cell)가 자라고 있는 배지에 첨가한다. 트랜스펙션 후 37°C에서 24~48시간 배양하여 유전자 발현을 분석한다.

siRNA Duplexes 준비

Firefly luciferase의 코딩영역에 직접 상응하는 RNA oligonucleotide와 그와 상보적인 oligonucleotide를 합성하고 PAGE로 정제하였다. 역상보적인 RNA oligonucleotide를 100 mM NaCl과 50 mM Tris pH 6로 hybrid시켜 anti-firefly luciferase siRNA duplex를 만들었다. 동일한 버퍼를 1 μ M 농도로 희석하여 반응 용액으로 사용하였다.

표식된 siRNA 준비

*Label IT siRNA Tracker Reagent*의 프로토콜에 따라 1 μ g의 siRNA 당 1 μ l의 시약을 넣어 37°C에서 1시간 반응하여 Duplex siRNA를 표식하였다. 반응액은 에탄올 침전법으로 정제하여 침전된 siRNA를 siRNA Dilution Buffer(Kit내 제공)로 녹인 후 정량했다. 표식된 siRNA는 빛을 차단하고 -20°C에 보관하였다.

siRNA Duplexes 트랜스펙션

1~8 μ l의 *TransIT-TKO Transfection Reagent*를 50~200 μ l(plate 크기에 따라 적용량 다름)의 serum-free 배지에 첨가하여 vortexing 후 실온에서 5~10분간 반응하여 준비하였다. Anti-firefly luciferase siRNA duplex(최종 농도 5~50 nM/well)를 트랜스펙션 시약에 첨가하여 파이펫팅으로 부드럽게 섞은 후 실온에서 5~10분간 추가 반응하였다. 준비된 트랜스펙션 복합체를 배양 세포(50~70% confluent cell)에 첨가한 후 부드럽게 흔들어 섞어졌다. 37°C에서 24~48시간 배양 후 유전자 발현 분석을 진행했다.

pDNA와 siRNA duplexes를 동시에 세포로 도입

트랜스펙션은 프로토콜에 따라 준비하였다. 1~2 μ l의 *TransIT-Neural Reagent*를 50 μ l의 serum free 배지에 첨가하여 vortexing후 실온에서 5~10분간 반응하였다. 두 종류의 플라스미드 DNA(5 ng의 sea pansy luciferase, 500 ng의 firefly luciferase)를 희석한 *TransIT-Neural Reagent*에 첨가한 후 파이펫팅으로 부드럽게 섞은 뒤 5~10분간 실온에서 반응하였다. 동일한 반응액에 0.5~2 μ l의 *TransIT-TKO Transfection Reagent*를 첨가한 후 파이펫팅으로 섞은 뒤 5~10분간 실온에서 반응한 후 anti-firefly luciferase siRNA duplex(5~10 nM)를 첨가하고 파이펫팅하여 다시 5~10분 동안 실온에서 반응하였다. 이렇게 준비한 트랜스펙션 복합체를 24-well plate에서 배양된 세포(50~70% confluent cell)에 첨가한 후 부드럽게 흔들어 섞어졌다. 37 °C에서 24시간 배양 후 유전자 저해에 대한 분석을 실시했다.

결과 및 논의

신경세포에서 높은 형질전환 효율

*TransIT-Neural Transfection Reagent*은 C6, Daoy, DBTRG-05MG, DI-TNC1, HCN-1A, Neuro-2a, PC-12, SK-N-MC, SVG p12, human astrocytes와 같은 다양한 신경세포에 플라스미드 DNA를 트랜스펙션하는데 최적화되어 있다. *TransIT-Neural Transfection Reagent*의 효율 확인을 위해 신경생물학에서 보편적으로 사용되는 neuroblastoma cell line인 Neuro-2a cell에 EGFP 플라스미드 DNA를 도입하였다. 트랜스펙션 48시간 후에 세포를 고정하여 공초점현미경 confocal microscopy으로 관찰하였다(그림 1). 세포의 생존력은 유지되는 반면 75% 이상의 Neuro-2a cell이 성공적으로 형질전환 되었다.

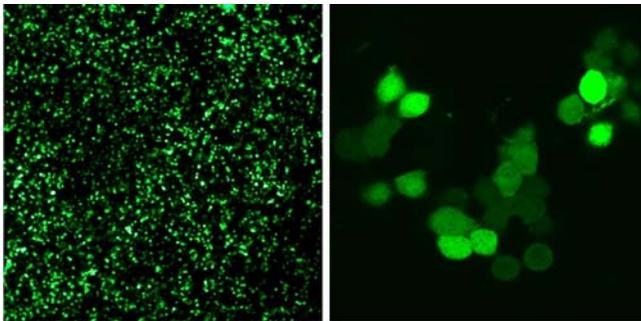


그림 1. Expression of pEGFP in Neuro-2a Cells.

Neuro-2a cells transfected with 4 μ l *TransIT-Neural Transfection Reagent* and 2 μ g pEGFP (Clontech) per well of a 6-well plate and incubated in complete media. The image on the left was acquired 48 hours post-transfection on a Zeiss Axiocam. The image on the right was acquired 48 hours post-transfection on a Zeiss LSM 510 Confocal Microscope.

신경세포에서 plasmid DNA 추적 및 발현

다양한 방법으로 배양 중인 신경세포로 표식 플라스미드 DNA를 트랜스펙션할 수 있다. *TransIT-Neural Transfection Reagent*는 낮은 세포독성과 높은 트랜스펙션 효율을 갖고 있다. 그림 2에서 보듯이 형질전환 24시간 후 모든 세포에서 *Label IT-Tracker Cy5*로 표식된 EGFP 플라스미드를 확인할 수 있었고, 동시에 EGFP가 발현된 것을 확인할 수 있었다. 플라스미드 DNA의 발현과 추적에 관한 더 자세한 내용은 Mirus의 *Label IT Tracker Intracellular Nucleic Acid Localization Kits Technical Report*에서 확인하기 바란다.

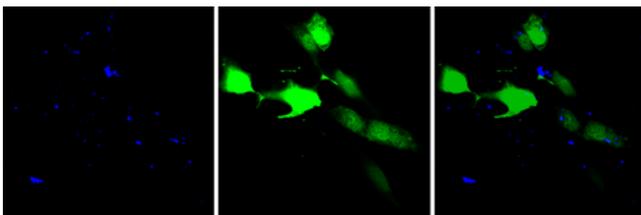


그림 2. Tracking and Expression of Plasmid DNA in DI-TNC1 Cells.

DI-TNC1 astrocytes were transfected with 1 μ g *Label IT Tracker Cy5* labeled pEGFP and 3 μ l *TransIT-Neural Transfection Reagent* per well of a 6-well plate in complete media. The blue represents the Cy5 fluorescence, and the green represents pEGFP expression. Images were acquired at 24 hours post-transfection using a Zeiss LSM 510 Confocal Microscope.

목적 유전자 발현의 억어

*TransIT-TKO Transfection Reagent*를 이용하여 siRNA를 트랜스펙션하면 유사한 유전자 발현에 영향 없이 목적유전자의 발현만 선택적으로 억제할 수 있다. Firefly luciferase 발현 vector와 sea pansy luciferase 발현 vector를 *TransIT-Neural Transfection Reagent*를 이용하여 다양한 세포에 동시에 트랜스펙션시켰다. 동일한 튜브에 *TransIT-TKO Reagent/anti-firefly luciferase siRNA* 복합체를 첨가했다. 5-10 nM의 siRNA를 이용하여 실험한 모든 세포주에서 sea pansy luciferase(untarget)와 비교해서 firefly luciferase 발현이 85% 이상 감소된 것을 확인하였다(그림 3).

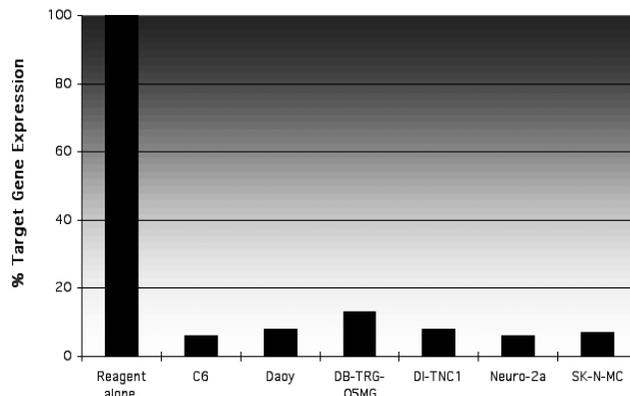


그림 3. Target Gene Expression Knock Out in Neural Cell Lines.

Efficiency of knock out in various neural lines using the *TransIT-TKO Transfection Reagent* with 5-10 nM anti-firefly luciferase siRNA duplexes (Dharmacon Research, Inc). Cell lines were first transfected with plasmids expressing firefly and sea pansy luciferase using the *TransIT-Neural Transfection Reagent*. Twenty-four hours post-transfection, cell lysates were assayed for both firefly and sea pansy luciferase expression using Promega's Dual-Luciferase Reporter Assay System.

siRNA Duplexes의 추적

*TransIT-TKO Reagent*로 도입한 siRNA의 세포내 위치를 가시화하기 위해 *Label IT-siRNA Tracker Cy3*로 표식한 siRNA duplex를 human astrocytes (그림 4)와 C6 glioma cell (그림 5)에 트랜스펙션 후 공초점 현미경으로 관찰하였다. 대부분의 siRNA는 세포질에서 관찰되었고, 표식된 siRNA 분자가 도입된 두 군집에서는 분산된 시그널과 반점형태punctuate의 시그널 모두가 관찰되었다. 하나는 세포질에 있고 다른 하나는 endosome에 분포되어 있었다.

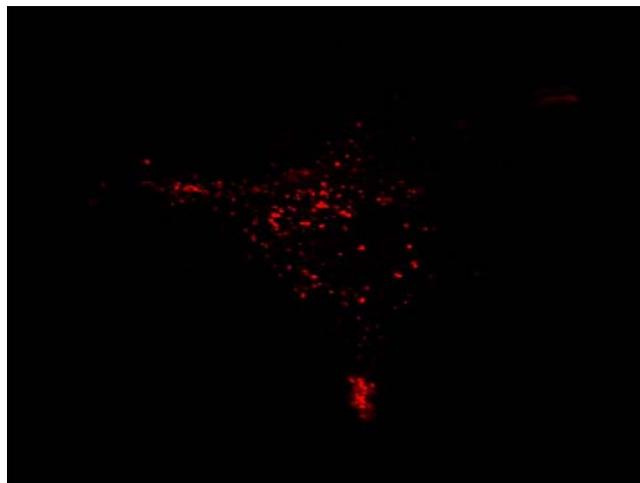


그림 4. siRNA Tracking in Human Astrocytes.

Human astrocytes (ScienCell Research Laboratories) were seeded on poly-D-lysine coated coverslips in a 24-well plate and incubated overnight. One μ l of *TransIT-TKO Transfection Reagent* was diluted in 50 μ l of serum-free media and 50 nM (final concentration in well) of *Label IT siRNA Tracker Cy 3* labeled siRNA duplex was added to the diluted *TransIT-TKO Transfection Reagent* for complex formation. Subsequently, these complexes were added to 30% confluent human astrocytes in their complete growth media. Confocal image of the single astrocyte was acquired 24 hours post-transfection on a Zeiss LSM 510 Confocal Microscope.

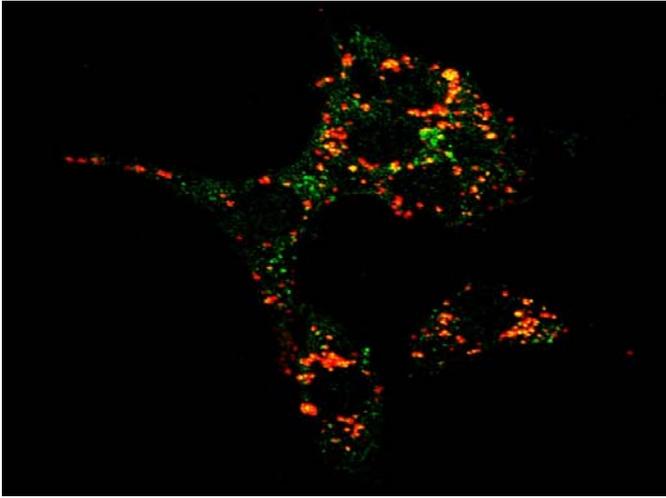


그림 5. siRNA Tracking in C6 Cells.

C6 glioma cells were seeded on poly-D-lysine coated coverslips in a 6-well plate and incubated overnight. Eight μ l of *TransIT*-TKO Transfection Reagent were diluted in 200 μ l of serum-free media and 50 nM (final concentration in well) of *Label IT* siRNA Tracker Cy3 labeled siRNA duplex was added to the diluted *TransIT*-TKO Transfection Reagent for complex formation. Subsequently, these complexes were added to 45% confluent C6 cells in their complete growth media. Confocal image was acquired 20 hours post-transfection on a Zeiss LSM 510 Confocal Microscope.

요약

Mirus의 *TransIT*-Neural과 *TransIT*-TKO Transfection Reagents는 각각 플라스미드 DNA와 siRNA를 신경세포에 고효율로 트랜스펙션이 가능하다. 각각의 최적화된 프로토콜은 serum이 포함된 배지에서 배지의 교체 및 추가 없이 높은 트랜스펙션 효율과 높은 세포 생존을 보인다. *Label IT* Tracker와 *Label IT* siRNA Tracker Kits은 플라스미드 DNA와 siRNA를 직접적으로 표식할 수 있는 시약이다. 이 제품들을 이용하면 신경세포에서 트랜스펙션 효율을 측정하거나 핵산 본래의 기능을 유지하면서 세포내 위치를 연구할 수 있다. 따라서 신경세포에서 목적 유전자의 knockout과 같은 유전자 도입이나 발현에 대한 재현성 있는 연구를 간편하게 진행할 수 있다.

관련 제품

TransIT-Neural Transfection Reagent

Code	제품명	용량
MIR 2144	<i>TransIT</i> -Neural Transfection Reagent	0.4 ml
MIR 2140	<i>TransIT</i> -Neural Transfection Reagent	1 ml
MIR 2145	<i>TransIT</i> -Neural Transfection Reagent	1 ml×5
MIR 2146	<i>TransIT</i> -Neural Transfection Reagent	1 ml×10

TransIT-TKO Transfection Reagent

Code	제품명	용량
MIR 2154	<i>TransIT</i> -TKO Transfection Reagent	0.4 ml
MIR 2150	<i>TransIT</i> -TKO Transfection Reagent	1 ml
MIR 2155	<i>TransIT</i> -TKO Transfection Reagent	1 ml×5
MIR 2156	<i>TransIT</i> -TKO Transfection Reagent	1 ml×10

Label IT Tracker Intracellular Nucleic Acid Localization Kit

Code	제품명	용량
MIR 7020	<i>Label IT</i> Tracker Cy3 Kit	1 Kit
MIR 7021	<i>Label IT</i> Tracker Cy5 Kit	1 Kit
MIR 7022	<i>Label IT</i> Tracker CX-Rhodamine Kit	1 Kit
MIR 7023	<i>Label IT</i> Tracker TM-Rhodamine Kit	1 Kit
MIR 7024	<i>Label IT</i> Tracker Biotin Kit	1 Kit
MIR 7025	<i>Label IT</i> Tracker Fluorescein Kit	1 Kit

Kit 구성품은 *Label IT* Tracker Reagent, Tracker Reconstitution Solution, 10X Labeling Buffer A, *TransIT*-LT1 Transfection Reagent가 포함되어 있다. 50-200 μ g의 plasmid DNA를 표식할 수 있는 분량과 50번의 transfection을 수행할 수 있는 용량이다.

Label IT siRNA Tracker Intracellular Localization Kit

Code	제품명	용량
MIR 7212	<i>Label IT</i> siRNA Tracker Cy3 Kit without Transfection Reagent	50 μ g 용
MIR 7213	<i>Label IT</i> siRNA Tracker Cy5 Kit without Transfection Reagent	50 μ g 용
MIR 7214	<i>Label IT</i> siRNA Tracker CX-Rhodamine Kit without Transfection Reagent	50 μ g 용
MIR 7215	<i>Label IT</i> siRNA Tracker TM-Rhodamine Kit without Transfection Reagent	50 μ g 용
MIR 7216	<i>Label IT</i> siRNA Tracker Fluorescein Kit without Transfection Reagent	50 μ g 용
MIR 7217	<i>Label IT</i> siRNA Tracker Biotin Kit without Transfection Reagent	50 μ g 용

Kit 구성품은 *Label IT* siRNA Tracker Reagent, *Label IT* Reconstitution Solution, 10×Labeling Buffer A, siRNA Dilution Buffer가 포함되어 있다. 50 μ g의 siRNA를 표식할 수 있는 용량이다.

License Notice [www.mirusbio.com 참조]