

**Subject: RNA-seq library prep with SMARTer® technology**

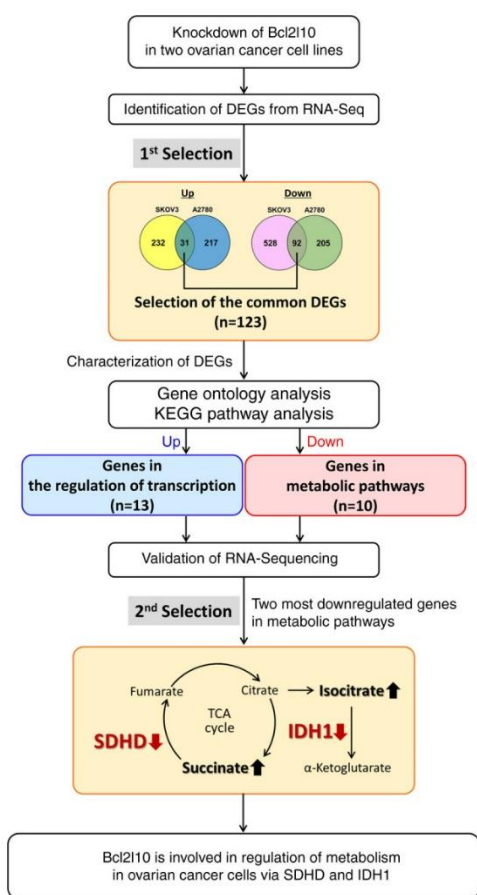
<https://doi.org/10.3892/or.2021.7998>

**Bcl2110 induces metabolic alterations in ovarian cancer cells by regulating the TCA cycle enzymes SDHD and IDH1**

Su-Yeon Lee, Jinie Kwon, and Kyung-Ah Lee

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

Abstract 미리보기



Bcl2-like-10 (Bcl2110)는 암의 종류에 따라 oncogenic과 tumor suppressor의 기능을 모두 가진다. SKOV3, A2780와 같은 자궁암 세포에서 Bcl2110의 억제제가 세포 주기를 멈추고 proliferation을 강화하는 역할을 하면서, 자궁암 세포에서 tumor suppressor 유전자 역할을 한다고 알려져 있다. 본 논문은 자궁암 세포주에서의 Bcl2110 작용 기전을 확인하고 관련 downstream target 유전자를 발굴하는 것을 목적으로 연구되었다. Bcl2110-suppressed SKOV3, A2780 세포를 대상으로 RNA-seq를 수행하여 differentially expressed genes (DEGs)를 얻고, 이를 RT-qPCR과 western blot 분석을 통해 검증하였으며, Bcl2110-knockdown 후의 대사물질의 발현은 colorimetric assay kits로 확인하였다. Pathway enrichment 분석에서는 Bcl2110 knockdown 후 SKOV3, A2780 세포에서 일반적으로 downregulated된 유전자가 metabolic pathway와 밀접하게 관련되어 있음을 나타냈다. RNA-seq으로 확인하고, RT-qPCR로 검증한 DEG 분석에서는 oncometabolite 생산을 조절하는 TCA 회로의 주요 효소인 succinate dehydrogenase complex subunit D (SDHD)와 isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)가 Bcl2110의 potential downstream target일 가능성을 보였다. 게다가, Bcl2110

knockdown은 실제로 SDHD와 IDH1의 downregulation을 통해 succinate와 isocitrate의 축적을 유도하였다. 본 논문은 자궁암 세포에서의 Bcl2110의 대사 조절 기능을 처음으로 증명하였으며, 자궁 암에서 Bcl2110이 치료 타겟으로 사용될 수 있다는 가능성을 시사했다.

논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

**SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit (Code 634836)**

- SMART® 기술을 이용해 cDNA 합성 및 Illumina® 분석용 library 제작
- 전사체의 strand information을 확인할 수 있어, sense 서열만 특이적으로 분석 가능
- 100 pg-100 ng의 RNA (purified Poly A+ RNA 또는 rRNA depleted RNA)에서 Library 제작

## Higher expression of KCNK10 (TREK-2) K<sup>+</sup> channels and their functional upregulation by lipopolysaccharide treatment in mouse peritoneal B1a cells

Si Won Choi, Joochan Woo, Kyung Sun Park, Juyeon Ko, Young Keul Jeon, Seong Woo Choi, Hae Young Yoo, Inseong Kho, Tae Jin Kim, Sung Joon Kim

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### Abstract 미리보기

Serous cavity에 위치한 Innate-like CD5<sup>+</sup> B1a 세포는 지질 다당류 (lipopolysaccharide, LPS)와 같은 자극에 의해 활성화되어, T cell independent한 항체 반응을 유도한다. 이온 채널은 항상성과 면역 세포 활성화에 중요한 역할을 하지만, B1a 세포의 전기생리학적 특성은 현재까지 연구된 바 없었다. 본 논문의 저자들은 이전 연구에서 mouse B cell lymphoma cell에서 전압에 independent한 two-pore-domain potassium (K2P) 채널이 음전하의 막전위를 형성하고, Ca<sup>2+</sup> 유입을 유도함을 확인하였다. 본 논문에서는 mouse splenic follicular B (FoB), marginal zone B (MZB), peritoneal B1a cell에서 K2P 채널의 발현과 활성 정도를 새롭게 비교하였다. NGS 분석으로 FoB와 MZB 세포보다 B1a 세포에서 TREK-2 및 TWIK-2 전사체를 더 높게 발현함을 확인하였다. 또한, patch clamp technique를 이용해 전기생리학적 분석을 진행했으며, FoB와 MZB 세포보다 B1a cell에서 더 특징적인 large unitary conductance (~250 pS)를 가지는 TREK-2 활성도를 더 높게 나타냈다. TREK-2는 2시간 이상 LPS 처리 시 더 높은 활성을 보였으며, 이는 FoB와 MZB 세포보다 B1a cell에서 더 두드러지게 확인되었다. B cell 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 강한 K<sup>+</sup> 탈분극 ( $\Delta R_{KCl}$  (%))으로 인해 감소하였으며, 이는 음막 전위로 인해 기저로 Ca<sup>2+</sup> 유입이 유도됨을 시사한다. LPS를 처리했을 때  $\Delta R_{KCl}$  값은 B1a cell에서 유의한 증가 값을 보였으나, FoB와 MZB 세포에서는 보이지 않았다. 본 연구는 mouse primary B cell subset에서의 K2P 채널을 처음으로 비교하였으며, TREK-2의 기능적인 upregulation과 B1a cell의 Toll-like receptor 4의 자극으로 인해 Ca<sup>2+</sup>의 유입이 증가되는 것을 증명하였다.

### Takara 제품을 이용한 method 미리보기

Total RNA는 [RiboGone-Mammalian \(Code 634846\)](#)을 처리하여 rRNA를 제거하였으며, 이후 [SMARTer<sup>®</sup> Stranded RNA-Seq Kit \(Code 634836\)](#)을 이용해 cDNA 합성 및 증폭을 진행하였다. SMARTer oligonucleotide와 Illumina<sup>®</sup> adapter sequence를 포함하도록 single strand 형태의 1<sup>st</sup> strand cDNA 합성 및 정제한 후, [SeqAmp<sup>™</sup> DNA Polymerase \(Code 638504\)](#)를 이용해 PCR 18 cycle로 정제 산물을 증폭하고 그 과정에서 Illumina<sup>®</sup> Index를 추가하였다. 제작된 library는 정제 및 size selection, normalization을 진행한 후, Illumina<sup>®</sup> NextSeq 500 sequencer에서 75-bp paired-end reads (2 X 75)로 분석하였다.

### 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMARTer<sup>®</sup> Stranded RNA-Seq Kit \(Code 634836\)](#)

- Stranded 정보를 포함하는 Illumina<sup>®</sup> 분석용 library 제작
- Total RNA를 샘플로 사용하는 경우, 별도의 rRNA 제거 과정이 요구됨
- Mammalian cell (poly A<sup>+</sup> RNA) 뿐 아니라, bacteria 샘플 (non-poly A<sup>+</sup> RNA)에도 적용 가능

#### [RiboGone<sup>™</sup>-Mammalian \(Code 634846\)](#)

- Human, mouse, rat의 total RNA 샘플로부터 5S, 5.8S, 18S, 28S nuclear rRNA (Ribosomal RNA) 및 12S mtRNA (mitochondrial RNA)를 제거하는 시약

## A pathogen-derived metabolite induces microglial activation via odorant receptors

NaHye Lee, YoonGyu Jae, Minhyung Kim, TaeHo Cho, ChaeEun Lee, Yu Ri Hong, Do Young Hyeon, Sanghyun Ahn, Hongmok Kwon, Kyul Kim, Jae Hoon Jung, Sehyun Chae, Jeong-Oh Shin, Jinwoong Bok, Youngjoo Byun, Daehee Hwang, JaeHyung Koo

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### └ Abstract 미리보기

Microglia (MG, 미세 아교 세포)는 뇌의 신경 면역에 관여하는 주요 세포로서, 지속적으로 환경 변화를 감지하고 병원체, 독소 및 세포 debris 에 반응하여 신경 염증에 영향을 미친다. 미생물 병원체는 신경 염증반응에 영향을 미치는 작은 대사 산물을 생산하지만, 이의 분자적 매커니즘이 신경 염증에서의 미세 아교 세포의 활성화에 어떤 영향을 미치는지는 아직까지 밝혀지지 않았다. 본 논문의 저자들은 G protein-coupled receptor 의 가장 큰 subfamily 인 odorant receptors (ORs)가 병원체에서 유래한 작은 대사 산물에 의해서 미세 아교 세포의 활성화에 관여한다고 가정하였다. MG 가 *Streptococcus pneumoniae* 가 분비하는 병원성 대사 산물인 2-pentylfuran 을 인식하는 mouse OR 인 Olfr110 과 Olfr111 을 높은 수준으로 발현한다는 것을 확인하였다. 이러한 상호작용은 MG 를 활성화하여, chemotaxis, 사이토카인 생산, 식균 작용 (phagocytosis), 활성 산소 종 생성에 관여하며, 이는  $G_{\alpha s}$ -cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A-extracellular signal-regulated kinase 및  $G_{\beta\gamma}$ -phospholipase C- $Ca^{2+}$  pathway 에 의해 매개되었다. 이를 종합했을 때, 본 논문에서는 병원성 유래 대사물질과 ORs 사이의 상호 작용을 확인하였으며, 병원체 인식에 의한 미세 아교 세포의 활성화에 대해 이해할 수 있었다.

### └ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

$2 \times 10^6$ 개의 primary MG 세포로부터 total RNA를 추출한 후, 8.5 이상의 RIN 값을 가지는 샘플을 이용해 mRNA sequencing에 활용하였다. Full-length cDNA는 [SMART-Seq<sup>®</sup> v4 Ultra<sup>®</sup> Low Input RNA Kit for Sequencing \(Code 634888\)](#)을 이용해 제작하였다. First-strand cDNA 합성을 위해  $1 \mu\text{l}$  3' SMART CDS primer II A를 10 ng total RNA에 넣어, 72 °C에서 3분간 반응하였다. Second strand는 SMARTer-seq v4 oligo와 SMARTScribe reverse transcriptase를 넣어 합성하였고, 42 °C에서 90분간 반응한 후 70 °C에서 10 분간 반응하였다. Double-strand cDNA는 8 cycle의 PCR 과정을 통해 증폭되었으며, 정제 과정을 거쳐 Illumina<sup>®</sup> 사의 Nextera XT DNA library preparation kit를 이용해 library를 얻었다. 제작된 library는 Illumina<sup>®</sup> HiSeq 2500 기기에서 100 bp paired end의 dual index로 분석되었다.

### └ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMART-Seq<sup>®</sup> v4 Ultra<sup>®</sup> Low Input RNA Kit for Sequencing \(Code 634888\)](#)

- 범용적인 샘플 적용: 1,000개 이하 intact한 세포 혹은 10 pg - 10 ng의 high quality RNA (RIN > 8)
- Oligo dT priming을 통한 고품질의 full-length cDNA 합성
- 높은 재현성과 GC-rich transcript의 분석 coverage

#### [SMART-Seq<sup>®</sup> v4 PLUS Kit \(Code R400752\)](#)

- Illumina<sup>®</sup> library 제작을 위한 all-in-one kit
  - 구성: cDNA 합성 과정 + cDNA fragmentation + library prep kit + adapter / index
- ThruPLEX 기술을 접목하여, library 제작 과정이 single tube 내 3-step protocol로 매우 간편

## RNA demethylation by FTO stabilizes the FOXJ1 mRNA for proper motile ciliogenesis

Hyunjoo Kim, Young-suk Lee, Seok-Min Kim, Soohyun Jang, Hyunji Choi, Jae-Won Lee, Tae-Don Kim, and V. Narry Kim

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### └ Abstract 미리보기

Adenosine N6-methylation (m6A)는 매우 보편적으로 나타나는 mRNA 변형이지만 m6A 제거 현상 (demethylation)의 생리학적 중요성은 아직 밝혀지지 않았다. 본 논문에서는 m6A demethylase FTO가 motile ciliogenesis의 보존 조절 인자로서 기능함을 확인하였다. FTO는 탈메틸화 작용으로 ciliary transcription factor인 FOXJ1에 코딩하는 mRNA를 안정화 시키는 작용 기전을 가진다. Fto 결손 *Xenopus laevis* 배아에서는 motile cilia 결함이 다수 확인되었고, Foxj1이 주요 표현형 타겟 중 하나로 밝혀졌다. 사람 기도 상피 내에서 FTO 결손 또한 FOXJ1 mRNA의 불안정화를 유도하였고, 심각한 ciliated cell의 손실과 함께 주변의 goblet cell의 증가를 보였다. 알러지를 유발한 Fto knockout mice에서도 기도 상피 내의 ciliated cell의 결함으로 인한 심각한 천식과 유사한 형태를 확인하였다. 종합했을 때, 본 연구에서 embryonic ciliogenesis와 homeostatic ciliogenesis 간의 FTO-FOXJ1의 유전자의 역할이 주요함을 확인하였다.

### └ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

M6A-seq (또는 MeRIP-Seq)은 m6A-methylated RNA mapping 표준 실험 기법으로, m6A를 특이적으로 인식하는 항체와 negative control 역할의 input RNA를 사용해서 RNA의 서열을 확인하게 된다. 여기에서 충분한 양의 input RNA가 사용되었으며, standard mRNA-seq과 동일하게 병렬식으로 서열 분석되었다. 이 연구에서 해당 과정의 반복 실험을 진행하지 않았으나, RT-qPCR 등으로 대신하여 결과를 검증하였다. Sequencing library는 [SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit](#)를 이용해 제작되었으며, 실험 과정은 제조사의 매뉴얼에 따라 진행했다. 정제된 m6A-seq library는 Illumina® MiSeq에서 분석을 진행했으며, 분석 결과는 Gene Expression Omnibus (GEO)의 GSE167139로 등록되어 있다.

### └ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMART-Seq® Stranded Kit \(Code 634442\)](#)

- Single cell 수준의 샘플에도 적용 가능한 Illumina® 분석용 RNA-seq library 제작 제품 (약 7시간)
  - 적용 샘플: 1 ~ 1000개의 세포 혹은 극소량의 total RNA (10pg - 10ng)
- Human, mouse, rat 유래의 rRNA를 제거하는 ZapR 기술을 활용하고 있어, 별도의 rRNA depletion 과정 불필요
- FFPC나 LCM, cell-free RNA를 포함하는 낮은 quality RNA (RIN > 2)에서 재현성 높은 결과 확인
- Library 내 stranded origin 정보를 포함하고 있어, 분석 시간 및 비용 절감 가능

## Identification of differentially expressed *Legionella* genes during its intracellular growth in *Acanthamoeba*

Fu-Shi Quan, Hyun-Hee Kong, Hae-Ahm Lee, Ki-Back Chu, Eun-Kyung Moon

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### └ Abstract 미리보기

*Legionella*는 포유류 macrophage (대식세포)와 같은 free-living amoeba 세포 내에서도 증식한다. 현재까지는 *Acanthamoeba* 세포 내에서의 *Legionella*의 전체적인 유전자 발현 패턴에 대해 모두 밝혀지지 않았다. Intracellular bacteria는 host의 gene expression을 변화시킬 뿐 아니라 생존에 관여하는 자신의 유전자 발현 또한 조절할 수 있다. 본 연구에서는 *Acanthamoeba* 내에서 *Legionella*를 24시간 동안 증식시키고, 그 기간 동안 발현하는 유전자가 어떻게 변화하는지를 비교 분석하였다. RNA sequencing 분석을 진행하여 intracellular *Legionella*가 발현하는 3,003개의 유전자를 확인하였고, 일반적인 free *Legionella*와 비교했을 때, 115개의 유전자가 2배 이상 과발현 되었고, 1,676개의 유전자는 2배 이상 더 낮은 발현을 보임을 확인하였다. Gene ontology (GO) 분석에서는 intracellular *Legionella* 내에서 molecular function 기준 'ATP binding'과 'DNA binding'으로 분류된 다양한 유전자가 발현되지 않는 것을 확인하였다. 독성과 항산화 스트레스 반응에 관여하는 alkylhydroperoxidase 효소의 발현은 배양 24시간 후에 매우 높아졌다. 에너지 생산을 활성화하는 Amino acid ABC transporter substrate-binding protein도 역시 높게 발현되었다. Aylhydroperoxidase, glucose pathway, Dot/Icm type IV secretion system과 관련된 유전자들은 차등적인 발현을 보였다. 이렇게 얻은 결과들은 *Acanthamoeba* 세포 내의 *Legionella*의 생존 전략을 더 심층적으로 이해하는 데 도움을 줄 수 있다.

### └ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

일반적인 free *Legionella*와 *Acanthamoeba* 내에서 증식한 *Legionella*에서 추출한 각 total RNA 5 ug으로부터 Ribo-Zero Magnetic Kit를 이용해 rRNA를 제거하였다. 이후 [SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit](#)를 이용해 library를 제작하였다. rRNA-depleted RNA는 제조사의 매뉴얼에 따라 cDNA 합성과 shearing하였고, Illumina® index 1-12를 부가하였다. Library를 제작한 후, fragment size 확인 및 정량 과정을 거쳐 HiSeq 2500 (Illumina®)에서 paired-end로 분석을 진행하였다.

### └ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v3 - Pico Input Mammalian \(Pico-v3\) \(Code 634485\)](#)

- pg 수준의 극소량 샘플로부터 Illumina® 분석용 RNA-seq library 제작 가능 (약 7.5 시간)
  - 적용 샘플: human, mouse, rat 유래의 total RNA (250 pg - 10 ng) 혹은 intact cell (10-1,000개)
  - \*\* 위의 논문과 같이 human, mouse, rat 이외의 종에서 분석을 진행할 경우, rRNA를 먼저 제거한 후 제품에 적용할 수 있음.
- FFPC나 LCM, cell-free RNA등과 같이 낮은 quality RNA (RIN > 2)에서 재현성 높은 결과 확인
- UDI (Unique Dual Index)와 UMI (Unique Molecular Index)의 적용으로 분석 정확도 UP

## ZNF746/PARIS overexpression induces cellular senescence through FoxO1/p21 axis activation in myoblasts

Ju-Hyeon Bae, Hyeon-Ju Jeong, Hyebeen Kim, Young-Eun Leem, Dongryeol Ryu, Sang Chul Park, Yun-Il Lee, Sung Chun Cho & Jong-Sun Kang

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### Abstract 미리보기

산화스트레스 (Oxidative stress)를 포함한 다양한 스트레스는 근육 줄기 세포의 증식 능력 즉 근육 재생 능력을 저하시켜 근육의 노화 또는 근육 질환을 유발시킨다. ZNF746 (PARIS)는 E3 ligase Parkin의 기질로, 이의 축적은 파킨슨병과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 myoblast 기능 중 PARIS의 역할을 연구하였다. PARIS는 myoblast에서 발현되고, 분화하는 과정에서 발현이 감소한다. PARIS overexpression은 세포 사멸의 유도 없이 myoblast의 증식과 분화를 모두 감소시켰던 반면, PARIS depletion은 myoblast 분화를 가속화했다. 흥미롭게도, myeloblast 혹은 fibroblast에서 높은 수준의 PARIS는 p53 signaling, 염증, 산화 스트레스에 대한 반응과 관련된 유전자 발현 변화 함께 세포 노화를 유도하였다. Myoblast에서의 PARIS overexpression은 산화스트레스를 더욱 심화시켰고, 항산화제인 Trolox 처리를 통해 PARIS 과발현으로 인한 증식 감소를 완화할 수 있었다. PARIS overexpression된 세포에서는 FoxO1과 p53 단백질 발현이 상승하여 p21 단백질의 개시를 유도하였으며, FoxO1과 p51 단백질이 고갈된 후에는 유도되었던 p21 수준을 감소시켰다. 또한, PARIS와 FoxO1 모두 p21 promoter 영역에서 recruit되었고, Trolox를 처리했을 때 FoxO1의 recruitment가 약화되었다. 이를 모두 종합했을 때, PARIS upregulation은 산화스트레스와 관련되어 있는 FoxO1과 p53 활성화를 유도하였고, 이는 p21의 개시와 myoblasts의 세포 노화를 유발한다는 것을 확인하였다.

### Takara 제품을 이용한 method 미리보기

RNA sequencing을 위해 transfection된 C2C12 cell을 0.1% FBS가 포함된 배지에서 24시간 배양하였다. Transcriptional profile은 이바이오젠을 통해 분석하였다. Library는 total RNA로부터 [SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit](#)를 이용해 제작되었다. Poly (A) RNA Selection Kit (LEXOGEN)을 이용해 mRNA를 정제하였으며, 정제된 mRNA는 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA 합성 및 shearing하였다. 이후 Illumina® index 1-12를 부가하였으며, PCR을 통해 enrichment를 과정을 진행하였다. 합성된 library는 Agilent 2100 bioanalyzer를 이용해 fragment 크기를 점검한 후 qPCR로 정량 분석하였다. 이후 HiSeq 2500 기기에서 100 bp paired-end로 시퀀싱을 진행하였으며, TopHat software를 이용해 mRNA-Seq 결과를 mapping하여 데이터 분석을 진행하였다.

### 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMART-Seq® Stranded Kit \(Code 634442\)](#)

- Single cell 수준의 샘플에도 적용 가능한 Illumina® 분석용 RNA-seq library 제작 제품 (약 7시간)
  - 적용 샘플: 1 ~ 1000개의 세포 혹은 극소량의 total RNA (10pg - 10ng)
- Human, mouse, rat 유래의 rRNA를 제거하는 ZapR 기술을 활용하고 있어, 별도의 rRNA depletion 과정 불필요
- FFPC나 LCM, cell-free RNA를 포함하는 낮은 quality RNA (RIN > 2)에서 재현성 높은 결과 확인
- Library 내 stranded origin 정보를 포함하고 있어, 분석 시간 및 비용 절감 가능



## Nogo-B promotes angiogenesis and improves cardiac repair after myocardial infarction via activating Notch1 signaling

Yanjun Zheng, Jingrong Lin, Dingsheng Liu, Guoqing Wan, Xuefeng Gu & Jian Ma

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### └ Abstract 미리보기

Nogo-B (Reticulon 4B)는 암의 발달 과정에서 신생 혈관 형성 (angiogenesis)의 조절자로서 알려져 왔다. 하지만, Nogo-B가 혈관 형성과 심근 경색 후 (post-myocardial infarction, MI)의 심장을 회복하는 데 관여하는지는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 MI 과정에서 심장 회복 과정에서 Nogo-B의 역할과 기전을 탐구하고자 했다. 마우스 MI 모델의 심장과 심장으로부터 분리한 미세혈관 내피 세포 (cardiac microvascular endothelial cell, CMECs)에서 Nogo-B의 발현 수준이 증가된 것을 확인하였다. 또한, Nogo-B는 oxygen-glucose deprivation (OGD)에 노출된 CMEC에서 크게 upregulation 되었다. Nogo-B는 도입한 마우스 내피세포의 특이적 promoter인 *Tie2*와 함께 AAV9로 도입되어 과발현 되었으며, 이는 심장 기능 개선, 흉터 크기의 감소, 신생 혈관 형성을 증가시켰다. RNA-seq으로 분석했을 때, 경색의 경계 영역을 따라 분리된 CMEC에서 Nogo-B가 과발현을 보이면서 Notch 신호 전달 경로가 deregulated 되었음을 나타냈다. Nogo-B는 기계적으로 Notch1 신호 전달 경로를 활성화하고, 심근 경색에서의 Hes1을 upregulation 시켰다. 특정 siRNA 및  $\gamma$ -secretase inhibitor를 이용한 Notch 신호 전달 경로의 억제는 네트워크 형성 과정에서의 Nogo-B의 과발현과 분리된 CMEC의 이동 촉진 효과를 억제했다. 게다가, 내피 세포의 Notch1 heterozygous deletion은 MI 모델에서 Nogo-B로 유도되는 cardioprotection과 신생 혈관 형성을 억제했다. 이를 종합해볼 때, 본 연구는 Nogo-B가 Notch 신호 전달 경로를 활성화한 신생 혈관 형성의 조절 인자임을 증명하였고, 이는 Nogo-B가 허혈성 질환에 대한 새로운 분자적 타겟 물질임을 시사한다.

### └ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

심근 경색을 유발한 1주일 후 AAV-NC와 AAV-Nogo-B를 감염시키고, CMEC로부터 total RNA를 추출하였다. [SMART-Seq<sup>®</sup> v4 Ultra<sup>®</sup> Low Input RNA Kit for Sequencing \(Code 634888\)](#)를 이용해 reverse transcription하여 합성된 cDNA는 제조사의 프로토콜에 따라 [Advantage<sup>®</sup> 2 Polymerase Mix \(Code 639201\)](#)로 증폭되었다. 이후, KAPA Stranded mRNA Seq kit (KAPA)를 이용해 cDNA library를 제작한 후, Illumina<sup>®</sup> HiSeq 2500 기기에서 150 bp paired end의 dual index로 분석되었다.

### └ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMART-Seq<sup>®</sup> v4 Ultra<sup>®</sup> Low Input RNA Kit for Sequencing \(Code 634888\)](#)

- 범용적인 샘플 적용: 1,000개 이하 intact한 세포 혹은 10 pg - 10 ng의 high quality RNA (RIN > 8)
- Oligo dT priming을 통한 고품질의 full-length cDNA 합성  
→ 다양한 분석 플랫폼을 위한 library 제작 시 활용 가능

#### [Advantage<sup>®</sup> 2 Polymerase Mix \(Code 639201\)](#)

- 높은 감도와 증폭 효율을 가진 high yield PCR 효소  
: 3'→5' exonuclease activity를 가지며, T/A overhang 형태로 증폭 산물 형성
- 긴 길이의 template (최대 6 kb gDNA, 18.5 kb plasmid)에 적용 가능해, library 구축 시 적합

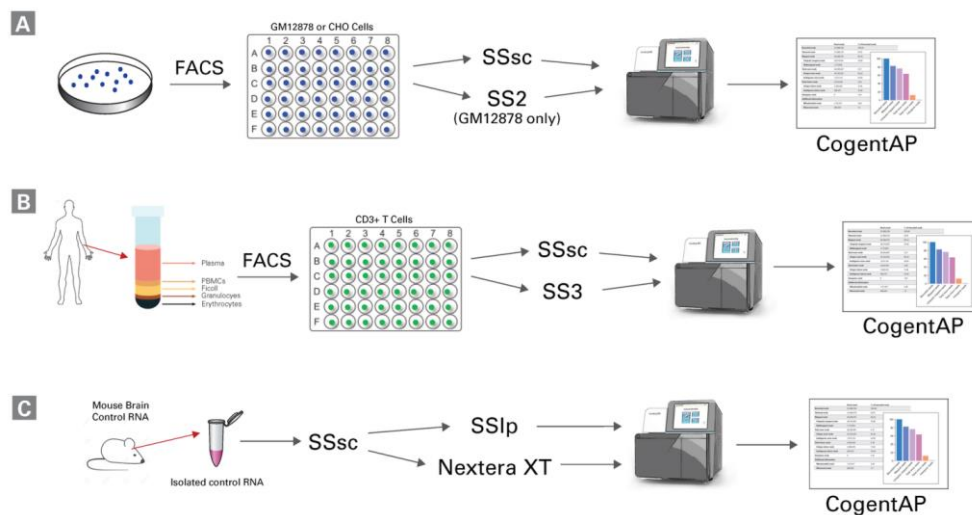
## Benchmarking Single-Cell mRNA-Sequencing Technologies Uncovers Differences in Sensitivity and Reproducibility in Cell Types With Low RNA Content

Ilona Holcomb, Nidhanjali Bansal, Tommy Duong, Paul Babb, Julie Laliberte, Karthikeyan Swaminathan, Hui Helen Xu, Leigh Ann Melloy, Jerry Hildebrand, Andrew Farmer

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### Abstract 미리보기

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq)은 각 세포를 분류하고 transcriptomic profile을 통해 특별한 세포 타입과 질병 상태를 확인할 수 있다. 이러한 single-cell 연구에서는 각 세포가 가지는 유전자를 민감도 있게 검출해 내는 것이 성공을 좌우하는 가장 큰 요인으로 작용한다. 최근 출시된 SMART-Seq Single Cell PLUS Kit (SSsc PLUS)는 single cell 서열 분석을 위해 주로 사용되는 방법들보다 더 높은 민감도와 재현성을 제공한다. 본 연구에서는 SSsc PLUS의 구성품인 [SMART-Seq® Single Cell Kit \(SSsc\)](#)를 이용해 cDNA를 합성하고 가장 많이 사용되는 homebrew protocol인 Smart-seq2와 업데이트 버전인 Smart-seq3를 함께 비교하였다. SSsc PLUS의 구성품인 SMART-Seq® Library Prep Kit는 보편적으로 scRNA-seq library 제작에 사용되는 Illumina® Nextera XT와 같은 방식을 채택하였다. 마지막으로, SSsc chemistry는 2종의 liquid-handler 장비 (MANTIS Liquid Handler, mosquito HV liquid handler)에서 시약 사용량을 1/4로 miniaturization했을 때에도 높은 민감도를 유지하는 것이 확인되었다. 결론적으로, SSsc PLUS는 다른 어떤 full-length 분석 방식과 비교했을 때 편리함, 민감도, 확인되는 유전자 수, 재현성에서 높은 성능을 보여주며, automation platform에도 완전히 호환하여 사용할 수 있다.



### 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [SMART-Seq® Single Cell PLUS Kit \(SSsc PLUS\) \(Code R400750\)](#)

- SMART® 기술을 이용해 single cell 혹은 10 pg 이하 RNA로부터 Illumina® 분석용 full-length RNA-seq library 제작
- 전 과정의 시약을 모두 포함한 all-in-one kit  
: Single cell lysis – cDNA 합성 – cDNA fragmentation – library 제작
- Homebrew (SS2, SS3 methods) 방식보다 높은 민감도와 재현성 있는 결과 획득
- Liquid-handler 장비 (MANTIS Liquid Handler, mosquito HV liquid handler)를 이용하는 경우, 1/2, 1/4 조성으로 진행되는 프로토콜 제공