

TransIT-X2와 Cas9단백질의 조합에 의한 효율적인 Genome Editing

[실험절차 요약]



[실험 방법]

1) 실험시약

- Cas9 protein: [Guide-it™ Recombinant Cas9 \(Electroporation-Ready\) \(Code 632641\)](#)
- sgRNA: [Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit](#) (Code 632635)를 이용해 ZsGreen1 유전자에 대한 sgRNA 제작
- Transfection 시약: [TransIT-X2 Dynamic Delivery System \(Code MIR 6000\)](#) 또는 A사 Transfection 시약

2) 실험절차

(1) 1일차: 세포의 준비

ZsGreen 1을 발현하는 293T Cells을 3.5×10^5 cells/ml로 준비하고 0.5ml씩 24well plate seeding

↓

(2) 2일차: RNP 복합체의 세포 내 도입

- TransIT-X2 (24well plate) protocol
 - a) Opti-MEM 1 Reduced Serum Media $50\mu\text{l}$ 에 Cas9 protein과 sgRNA를 첨가한 후, 37°C 5 min incubation
 - b) TransIT-X2 Dynamic Delivery System 시약을 $1\mu\text{l}$ 첨가한 후 Pipetting
 - c) 실온에서 15~30분 incubation
 - d) 세포에 첨가
- A사 Transfection protocol: 제품의 Protocol에 준수하여 실험 실시

↓

(3) 4일차: Cell passaging

↓

(4) 9일차: Knock-out 효율 확인

Flow cytometry를 이용하여 ZsGreen1 Knock-out 효율 확인

[결과]

293T-ZsGreen1 세포의 ZsGreen1 Knock-out 효율을 확인하였다. 그 결과, TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Code MIR 6000)을 사용한 경우 "B"와 "C" 조건에서 모두 50% 이상의 Knock-out 효율을 보였으며, 이는 A사의 Transfection 시약을 이용하였을 때보다 5배 이상의 효율을 나타낸 결과이다 (조건 C와 E).

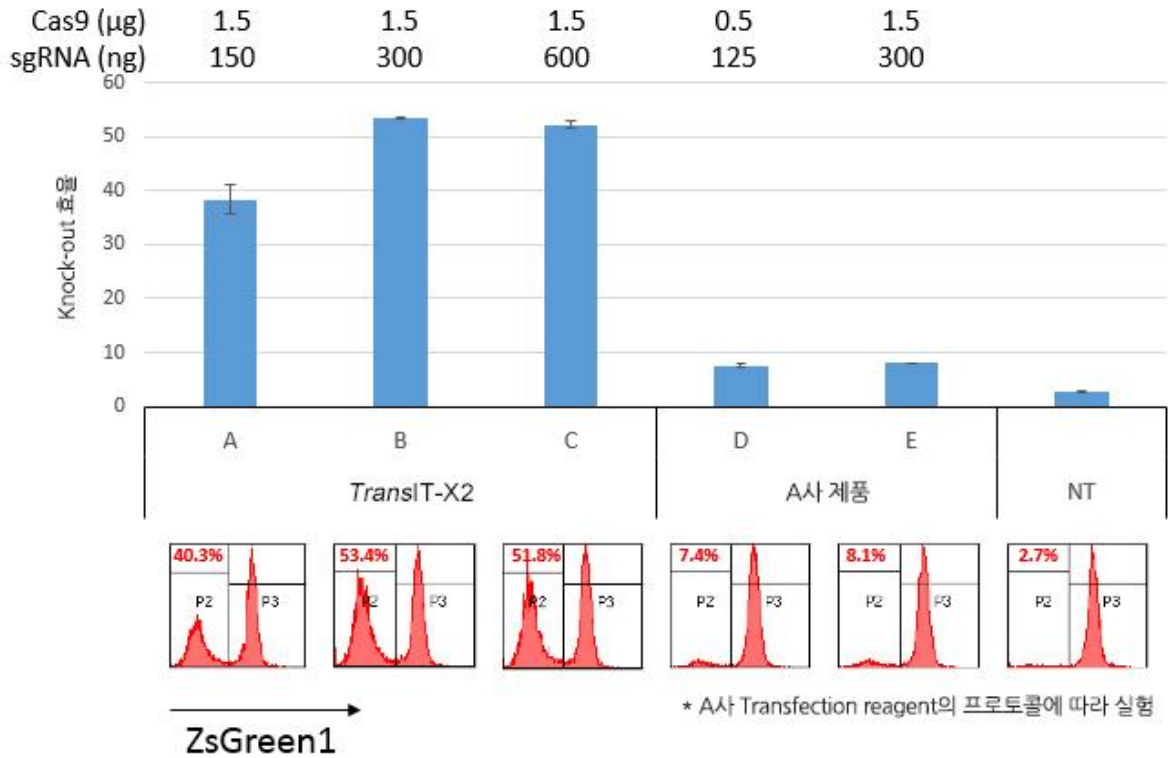


그림 1. 293T-ZsGreen1세포에서의 Knock-out 효율 비교