

## TransIT-X2와 Cas9단백질의 조합에 의한 효율적인 Genome Editing

- K562 Cell line 적용 -

### [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 CD81 유전자에 대한 sgRNA 제작
- Transfection 시약: [TransIT-X2 Dynamic Delivery System \(Code MIR 6000\)](#) 또는 A사 Transfection 시약

#### 2) 실험절차

##### (1) 1일차: 세포의 준비

K562 Cell line을  $3.5 \times 10^5$  cells/ml로 준비하고 0.5ml씩 24 well plate에 seeding하였다.

↓

##### (2) 2일차: RNP 복합체의 세포 내 도입

- TransIT-X2를 이용한 RNP (Ribonucleo Protein) delivery (24well plate)
  - a) Opti-MEM 1 Reduced Serum Media 50 $\mu$ l에 Cas9 protein과 sgRNA를 가하여 Complex를 형성한 후, 37°C에서 5분간 incubation
  - b) TransIT-X2 Dynamic Delivery System 시약을 1 $\mu$ l 첨가한 후, Pipetting
  - c) 실온에서 15~30분 incubation
  - d) 세포에 첨가
- A사 Transfection protocol: 해당 제품의 Protocol에 준수하여 실시

↓

##### (3) 4일차: Cell passaging

↓

##### (4) 9일차: Knock-out 효율 확인

Flow cytometry를 이용하여 CD81 Knock-out 효율 확인

CD81 Negative K562 Cell Line의 비율을 Flow cytometry로 분석하였다.



**[결과]**

Genome edited K562 Cell Line의 CD81 유전자 음성/양성 비율로 Knock-out 효율을 확인하였다. 그 결과, TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Code MIR 6000)을 사용한 경우 "C"의 조건 (Cas9 1.5 $\mu$ g, sgRNA 600ng)에서 가장 높은 Knock-out 효율을 보였다. 또한, "B"와 같은 동일한 조건 하에서도 A사 Transfection 시약을 이용하였을 때보다 월등한 Knock-out 효율을 보였다.

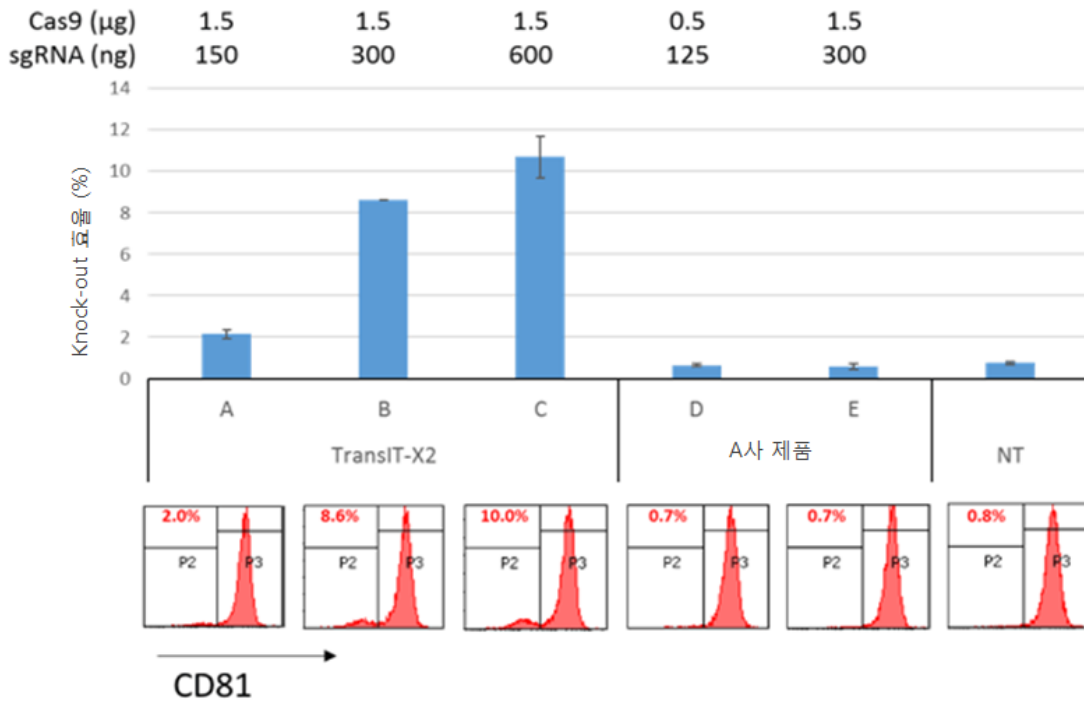


그림 1. K562 Cell Line에서 TransIT-X2 시약과 A사 Transfection 시약의 Knock-out 효율 비교