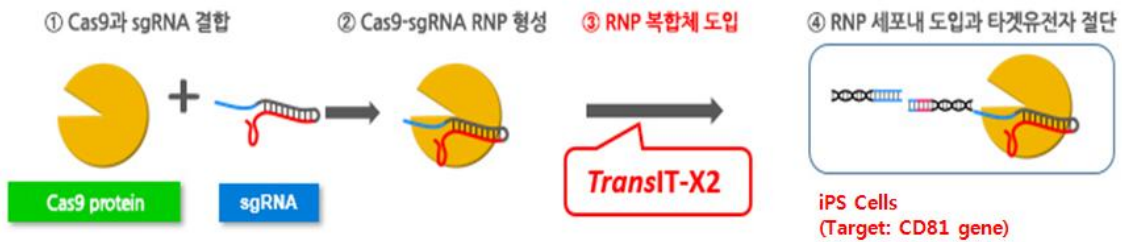


TransIT-X2와 Cas9단백질의 조합에 의한 효율적인 Genome Editing

- Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) 적용-

[실험절차 요약]



[실험 방법]

1) 실험시약

- Cells: [Cellartis human iPS cell line 12 \(ChiPSC12\) Kit \(Code Y00285\)](#)
- 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 \(Code MIR 6000\)](#)

2) 실험절차

(1) 1일차: 세포의 준비

ChiPSC12 cells를 3.5×10^5 cells/ml로 준비하고 0.5ml씩 24well plate에 seeding하였다.

↓

(2) 2일차: RNP 복합체의 세포 내 도입 및 Genome Editing

- TransIT-X2를 이용한 RNP (Ribonucleo Protein) delivery (24well plate)
 - a) Opti-MEM 1 Reduced Serum Media $50\mu\text{l}$ 에 Cas9 protein과 sgRNA를 가하여 복합체 (complex)를 형성한 후, 37°C 에서 5분간 incubation
 - b) TransIT-X2 Dynamic Delivery System 시약을 $1\mu\text{l}$ 첨가한 후, Pipetting
 - c) 실온에서 15~30분 incubation
 - d) 세포에 첨가

↓

(3) 5일차: Cell passaging

세포 박리 후, 계대 배양

↓

(4) 9일차: Knock-out 효율 확인

Flow cytometry를 이용하여 CD81 negative iPS 세포의 비율 확인

[결과]

iPSC의 CD81 Knock-out 세포의 비율을 Flow Cytometry로 평가하였다. 그 결과, "C" 조건 (Cas9 1.5 μ g, sgRNA 600ng)에서 비교적 높은 Knock-out 효율 (13.4%)을 확인할 수 있었다. 이는 TransIT-X2 Transfection 시약을 이용하여 iPSC에서 Genome Editing이 가능함을 보여준다.

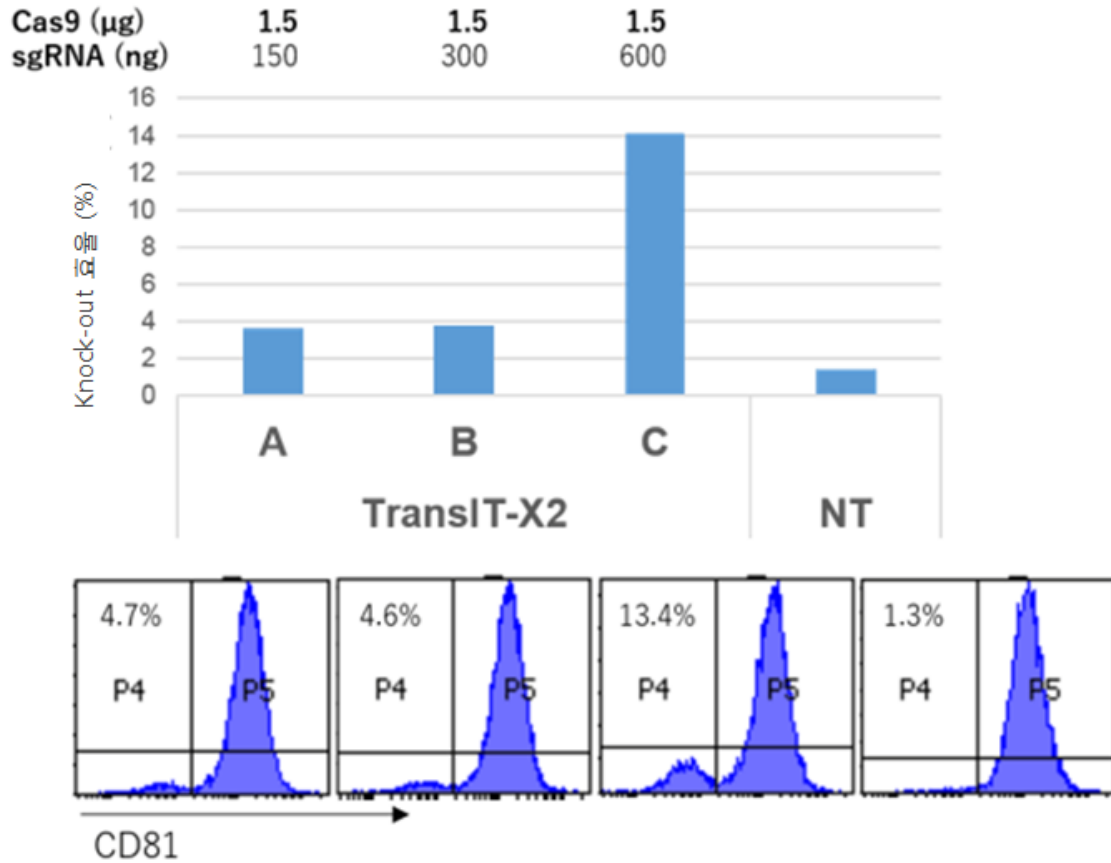


그림 1. iPSC세포에서 CD81 Knock-out 효율