

# 전기생리학적 연구를 위한 흰쥐의 해마절편조직 배양에서 Sindbis-virus 감염특성을 이용한 특정 단백질의 발현조절 기법 소개

김경덕, 정성철

제주대학교 의학전문대학원 생리학교실

(Received November 25, 2013; Revised December 2, 2013; Accepted December 9, 2013)

## Abstract

### Introduction of the Method to Regulate Protein Expression Using Sindbis-viral Infection in Organotypic Hippocampal Slice Cultures of Rats for Electrophysiological Studies.

Kyeong-Deok Kim, Sung-Cherl Jung

Department of Physiology, School of Medicine, Jeju National University

There are several in-vitro preparations of brain tissue for electrophysiological researches. In this paper, we introduce an organotypic slice culture preparation and its efficiency for viral infection to manipulate the expression of specific proteins in hippocampal neurons. Using Sindbis virus is very useful for electrophysiological studies because of its high infection efficiency with channel proteins in hippocampal neurons. Furthermore, the organotypic slice culture of hippocampus of rodents exhibits a great benefit in both optical images and electrophysiological recordings as they are clearly thinner than 100  $\mu$ m and show hyper-connectivity of synapses. In the present paper, we discussed about the effective combination of organotypic slice culture and viral infection with rat hippocampi, and in last, introduced some technical know-how to enhance the infection rate. This method helps investigators to easily modify target proteins in neurons of mammalian central nervous system. (J Med Life Sci 2013;10(2):125-129)

**Key Words :** Electrophysiology, Hippocampus, Sindbis virus, GFP

## 서론

해마절편배양 (hippocampal slice culture)에서 Sindbis virus를 통한 감염은 그 감염률이 높기 때문에, 특정 유전자나 단백질을 인공적으로 발현시키는 연구에 상당한 이점이 있다. 일반적으로 100  $\mu$ m 이하 두께를 갖는 해마절편배양은 광학 현미경하에서 진행되는 전기생리학 실험에 최적인데, 회귀성 시냅스의 형성을 늘리고, 발현확율이 높은 시냅스 장기 강화 (Long-term potentiation, LTP)를 보여준다. Sindbis virus는 일반적으로 생후 7일된 실험쥐에서 얻은 해마절편배양에 주입된다. 이 논문에서는 저자가 실험을 통해 확보할 수 있었던 know-how를 통하여 Sindbis virus를 감염시킬 수 있는 Stoppini 방법을 이용한 최적의 해마절편배양 프로토콜을 소개하고자 한다. 이러한 실험기

법은 연구자로 하여금 유전적 조작을 보다 손쉽게 처리함으로써, 적절한 실험결과를 유도하는데 주요하게 사용될 수 있다. 본 논문에서는 감염과 영상 적용을 최적화시킨 쥐 해마조직배양의 제작에 대한 프로토콜을 간략하게 기술하고, GFP를 포함한 Sindbis virus를 이용하여 어떻게 배양 조직을 감염시키는지를 소개하였으며, 마지막으로, 기관형적 (organotypic) 쥐 배양 제작과 배양 감염에 대한 문제 해결방법을 기술하였다.

## 본론 - 실험적 절차

### 1. Stoppini방법을 이용한 쥐의 해마절편배양을 만드는 프로토콜

용액의 준비 : 해마절편 제작을 위한 배양액은 두 달까지 사용 가능하나, 일반적으로 한 달마다 새로운 배양액을 만드는 것이 좋다. 모든 용액은 멸균 환경에서 준비되고 멸균 여과로 처리되어야 하며, 배양은 35°C의 온도하에 5% CO<sub>2</sub>의 water-jacketed cell-culture incubator에 저장되어야 한다. 또한 이 프로토콜에서는 standard dissection microscope이 필요하다.

Correspondence to : Sung-Cherl Jung  
Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine  
Ara 1 dong, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail: jungsc@jejunu.ac.kr

뇌조직 절개를 위한 용액은 총 두가지가 필요한데, 첫번째는 조직 cutting buffer와 두번째는 조직 culture solution이다. Cutting buffer는 멸균 덮개 안에 500ml 멸균 필터 세트 (sterile filter-set)로 만들며, 미리 두개의 batches의 cutting buffer를 준비한다; (1) 15cm 멸균 Petri dish로 옮기고, -80℃로 냉동 처리한 50ml conical tube에 45ml batches로 나뉜 것, (2) 50ml conical tube에 45ml batches로 나뉜고 4℃에 저장된 것. Cutting buffer의 조성은, 1) Gey's Balanced Salt Solution(GBSS) 500ml, 2) 1M stock MgCl<sub>2</sub> 5 ml, 3) 10ml 45% glucose (made in dH<sub>2</sub>O), 4) 2.38g HEPES로 되어 있으며, pH는 7.2로 조정하고 최종적으로 멸균필터를 이용하여 멸균해준다. Cutting solution이 너무 알칼리성일 경우에는 pH가 7.2에 이를 때까지 1M KOH를 이용하여 조정해주어야 한다.

Culturesolution의 조성은, 1) MEM+Glutemax 250ml, 2) Earle's Balanced Salt Solution(EBSS) 125ml, 3) heat-inactivated horse serum 125ml, 4) 50X B27 supplement 10 ml, 5) 32.5% glucose (made in solution with MEM+Glutemax) 으로 이루어져있다.

쥐 해마 절개 : 절개하기 24시간전에, cutting buffer를 담은 Petri dish를 적어도 한 개 정도 냉동시킨다. 절개 1-2시간 전, -80℃ 냉동고에 이 dish를 놓으면 되지만, 미리 24시간 전에 해두는 것이 편하다. 그리고, 절개에 사용될 도구들을 고압멸균소독한다. 이 절개도구는 다음과 같이 구성되는데, 2개의 작고 둥근 모양의 spatulas; 17cm straight Mayo scissor 한 쌍; 9cm straight Iris scissor 한 쌍; Moria hippocampal dissecting tools; Dumon #5 fine tip forceps 한 쌍; straight 12cm serrated Adison forceps 한 쌍; broken tip과 bulb filler가 달린 glass Pasteur pipette; 작은 blade holder/breaker; 높은 탄소 함량을 깨기 쉬운 양 방향 razor blades; 작은 Moria spoon/spatula이며, 대부분 이 도구들은 기성품 (주로 Fine Science Tools)으로 준비할 수 있다. 뇌절편 절개를 위해서는 여과지가 필요한데, 여과지는 지름 4.25cm, 구멍 사이즈 20-25 $\mu$ m 인 Whatman을 사용하며 유리 Petri dish에 놓고 절개 전에 고압 멸균 처리를 한다. Cutting surface와 razor blades 가 필요한데, Mcilwain Mechanical Tissue Chopper는 cutting surface 가 포함되는데, cutting surface는 이보다 약간 더 큰 플라스틱 재질의 둥근 부품으로 깔려 있어야 하며, 둥글게 잘린 3M-투명지로 cutting surface를 충분히 덮는다. 투명지는 미리 만들어 Petri dish에 70% EtOH를 이용한 멸균처리하여 사용한다. Razor blades는 조직 절개에 필요한 micro-blades를 만들려면 작은 blade holder를 사용하여 작은 파편으로 부러뜨린다. 이를 미리 준비하고 멸균 Petri dish에 담아 둔다. 그 외에, 절개 시작 전 필요한 다른 재료들은, Millipore Millicell Organotypic Inserts; 6 well-세포 배양 접시; 50ml Pyrex beaker, dissection microscope (Zeiss StemiSV6); Mcilwain Mechanical Tissue Chopper이다. 여기서 tissue chopper는 두께 300 $\mu$ m 절편으로 잘리도록 설정해둔다. Mcilwain tissue chopper는 이중 razor

blade를 사용한다.

쥐 해마 절개 시, 생후 6-8일 된 실험쥐를 이용하는 것이 중요한데, 이 시점은 절개 3일 후 Sindvis virus를 감염시키는 것이 주 목적이기 때문에, 그것에 최적화를 둔 시점이며, 실험 결과에 지대한 영향을 미친다. 모든 절개과정은 멸균 상태 하에 실행될 것을 전제로 한다. Mcilwain Mechanical Tissue Chopper에 있는 cutting surface와 blade를 포함해서, 모든 표면을 절개 직전에 70% EtOH로 철저히 세척한다.

## 2. 조직절편을 위한 구체적 준비과정

- 1) 6-well 배양 접시의 6 wells 안에 culture solution 1 ml를 pipette으로 옮긴다. 되도록이면 culture solution은 거품이 나오지 않도록 한다.
- 2) 조심스럽게 각 well에 organotypic insert를 넣으며, insert 아래쪽으로 기포가 생기지 않도록 한다.
- 3) Water-jacketed incubator (35℃, 5% CO<sub>2</sub>)안에 6-well 접시를 넣는다.
- 4) 얼음을 준비하고, 이 얼음 안에 45ml cutting buffer를 채운 50ml conical tube를 넣는다.
- 5) 작업대에 5-15cm Petri dishes를 놓고, 이 중 하나를 꺼내서 얼음 안에 넣는다.
- 6) 도구들을 배치하고 tissue chopper에 blade와 cutting plate를 조립하며 동물 검체들을 갖추면서 작업대를 준비한다. 투명지를 tissue chopper의 cutting plate 위에 놓을 때에는 최대한 바닥에 밀착시킨다.
- 7) -80℃ 냉동기에서 찬 cutting buffer의 petri dish 한 개를 꺼낸다.
- 8) 찬 buffer를 큰 덩어리로 잘라서 절단면을 나란히 놓는다. 찬 buffer의 1/2을 50ml beaker에 놓고, 나머지 1/2은 얼음에 담긴 Petri dish에 놓는다. 그 다음에 cutting buffer로 가득 채운 conical tube를 50ml beaker에 붓고, 또 다른 conical tube를 얼음에 있는 15cm Petri dish에 붓는다.
- 9) Mayo scissors로 동물을 참수시키고 두개골을 드러내기 위해 피부를 자른다.
- 10) 9cm straight iris scissors를 이용하여 뇌의 소뇌 (lambda) 구역에서부터 코 쪽으로 세로 방향으로 자르는데, 정수리 (bregma)를 약간 지나면 멈춘다. 가위로 뇌를 건드리지 않도록 주의하여 출혈과 조직 손상을 입히지 않도록 한다.
- 11) 두개골을 열기 위해 정수리를 따라 두 개의 작은 절제면을 만든다.
- 12) straight 12cm serrated Adison forceps를 이용하여 천천히 두개골을 풀어당겨 원 상태의 뇌를 드러낸다.
- 13) 작은 spatula로 전체 뇌 아래에 미끄러지듯 들어가서 천천히 꺼낸 후, cutting buffer와 찬 cutting buffer 덩어리가 담긴 얼음 위의 Petri dish에 담는다.
- 14) 두 번째 쥐에도 이 같은 단계를 반복한다.

### 3. 해마 절개 및 절편 제작

- 1) 15cm Petri dish 안에 Whatman 여과지 한 장을 넣고, 찬 buffer 한 조각과 cutting solution을 가득 채운 conical tube를 첨가한다. 여과지 위 접시에 중뇌를 아래 방향으로 하여 뇌를 통째로 넣는다.
- 2) 해마 절개 도구를 사용하여 소뇌 안에 뇌 조직을 제거한다.
- 3) 그 다음에 두 개의 뇌 반구를 형성하는 중간선의 뇌를 자른다.
- 4) 작은 spatula를 이용하여 천천히 각 반구에 중뇌를 자르는데, 눈으로 보이는 해마 부위를 남겨둔다.
- 5) 해마 아래에 spatula를 미끄러지듯 넣고, Dumont #5 fine tip forceps을 사용하여 해마 주변 혈관들을 제거한다. 이때, 해마는 건드리지 않도록 주의한다.
- 6) 작은 blade holder안에 micro-blade shard를 이용하여 대뇌 피질을 가르면서 해마 주변을 자르는데, 해마 외곽에 위치한 피질은 조금 남겨둔다. 이후 해마를 피질에서 끄집어낸다.
- 7) 다른 뇌 반구도 이를 반복한다.
- 8) 해마를 tissue chopper에 옮긴다. 이때 해마의 둥근 면을 위로 배치하여 모든 해마가 같은 방향에 놓이도록 한다.
- 9) Whatman 여과지 2~3장을 이용하여 tissue chopper의 cutting surface에 넘친 cutting buffer를 천천히 제거한다. 자르기 전에 가능한 많은 cutting buffer를 제거하는데, 해마를 건드리지 않도록 주의한다.
- 10) tissue chopper를 쳐고 해마를 자르는 데, blade의 강도는 가장 높게 설정하고 chopping 빠르기는 중간 정도로 한다.
- 11) 해마가 잘리면, 두 개의 15cm Petri dishes를 각각 cutting buffer를 채운 conical tube로 채운다. 부러진 glass Pasteur pipette에 bulb suction을 놓는다.
- 12) 조직이 잘린 후, cutting surface를 덮고 해마가 놓인 투명 플라스틱을 제거한다. 이 때 tissue chopper에서 이를 제거하기 위해 플라스틱을 구부리거나 휘지 않도록 주의한다.
- 13) cutting buffer가 담긴 Petri dish 안에 해마를 뒤집어 놓고 buffer에서 해마 조각을 떼어 놓기 위해 힘차게 섞는다.
- 14) 작은 spatula를 사용하여 천천히 해마 절편을 분리한다. 해마의 납작한 표면을 건드리지 않도록 조심한다. 내비 피질 (entorhinal cortex)에 절편을 분리하는 것이 가장 좋은 방법이다.
- 15) 절편을 분리한 뒤, 가장 적당한 절편을 6-well plate에 옮기기 위해, Pasteur pipette을 사용하여 두 번째 Petri dish에 옮긴다. well당 최대 절편이 3개이거나, 6 well plate에 전체 18개 절편이 놓이도록 한다.
- 16) 6-well plate에 membrane 위로 각 개별 절편을 서서히 떨어뜨린다. 이 때 membrane 위에 cutting buffer를 가능하면 최소한으로 남겨둔다. 남은 cutting buffer는 200 $\mu$ l 피펫으로 제거한다. 제거 시 절편을 건드리지 않도록 주의한다.
- 17) 모든 절편을 놓은 뒤, 35°C의 water-jacketed 5% CO<sub>2</sub>

incubator로 옮긴다. 3일 마다 공급해준다.

### 4. 쥐 해마절편배양의 바이러스 감염(절편배양 3일 후)

바이러스 감염에 필요한 재료: 1.5cm Petri dish, sharp tip에서 2 $\mu$ m까지 끌어당길 수 있는 3-4glass micropipettes (전기생리학적 patch clamp recordings에는 glass micropipettes을 사용하는 것이 좋다, World Precision Instruments (WPI) Item No. 4878), Mineral oil (생물학적 등급), micromanipulator가 부착된 WPI Nanoliter 2000 injector, Dissection microscope (Zeiss StemiSV6), glass micropipettes (WPI MicroFil)을 채우기 위한 syringe와 pipette filler.

주의사항: 바이러스를 이용한 연구는 고도의 각성이 요구된다. 바이러스를 사용하기 전후에는 모든 작업대를 70% EtOH와 10% Bleach solution으로 세척한다. 바이러스는 institutional guideline에 따라 반드시 처리한다.

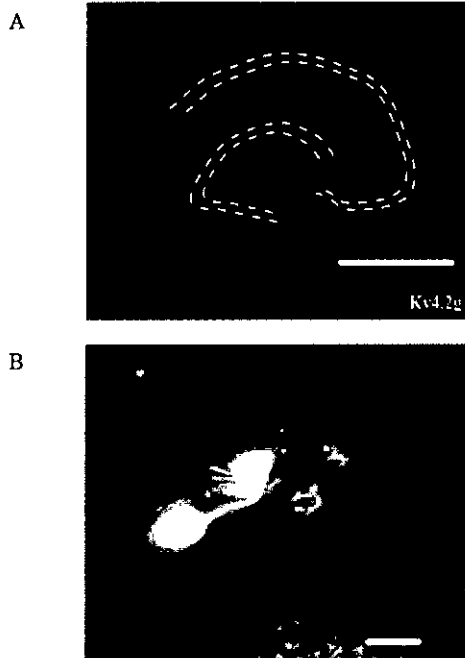
- 1) 1.5cm Petri dish에 culture solution을 채우고, incubator에 넣어 따뜻하게 한다.
- 2) 6-well culture plate의 각 well에 culture solution 1ml를 채우고, incubator에 넣는다.
- 3) Sharp microelectrode의 tip을 끊어서 15-20 $\mu$ m 크기로 만들고, microscope과 calibrated slide, MicroForge (Narishige MF-830)에 이용할 수 있게 한다.
- 4) 얼음을 준비하고 이 얼음 안에 바이러스 5 $\mu$ m aliquot를 해당시킨다.
- 5) 15분 동안 UV 멸균 하에 glass micropipette과 mineral oil을 소독한다.
- 6) Glass micropipette과 mineral oil을 멸균시키는 동안, Parafilm 1square를 자르고 microscope에 놓는다.
- 7) 멸균 후, pipette tip을 mineral oil로 채우되, 반드시 거품이 없도록 한다.
- 8) Nanoliter 2000 injector를 dissection microscope에 배치시킨 뒤, micropipette을 부착시키고, microscope을 아래로 낮춰서 거품이 있는지 tip을 점검한다. tip에 거품이 있을 시에는 버리고, 다른 micropipette을 사용한다.
- 9) 10 $\mu$ l pipette을 사용하여 parafilm 중앙에 바이러스 3 $\mu$ l 방울 정도를 떨어뜨린다.
- 10) Micropipette이 방울을 약간 관통할 때까지 낮추고, Nanoliter 2000 injector에 "fill" 버튼을 눌러서 micropipette에 바이러스를 채운다. Microscope 하에 방울이 없다면 micropipette이 채워진 것이다.
- 11) Incubator에 1.5 cm Petri dish와 6-well plate를 옮긴다.
- 12) 절편과 함께 culture membrane을 1.5cm Petri dish로 옮긴다. 이 dish를 dissection microscope에 놓고 판독범위에 위치시킨다. micropipette을 절편배양 구역으로 낮춘다.
- 13) Micropipette으로 절편배양 표면을 서서히 건들면서 tip을 위치시킨다. 너무 깊게 들어가면 절편에 천공이나 손상을 입힐 수 있다. Nanoliter 2000 injector에 "inject"를 두 번

누르고, 용액이 micropipette tip에서 주입되는 지 관찰한다. 용액이 보이던 한 번 더 버튼을 누른다. 용액이 보이지 않으면 보일 때까지 “inject”를 누른다.

- 14) 초기 주입 위치에서 최소 1-2mm 떨어진 판독범위 안에 두 번째 구역을 위치시키고 주입 과정을 반복한다.
- 15) Culture membrane에 모든 절편에 대한 같은 과정을 반복하고, 이 membrane을 6-well culture dish에 되돌려 놓는다. 모든 절편에 주입되면, 새롭게 감염시킨 절편 배양과 함께 모든 membrane을 incubator 안에 있는 새로운 6-well culture dish에 옮긴다.
- 16) 절편은 감염이 검출되기 전 18~24시간 동안 배양한다 (그림 1).

요한 요소이다. 매우 건강한 절편을 사용하도록 한다. 이는 해마의 Dentate Gyrus, CA1, CA3 구역을 관찰하면서 결정해야 하는데, 만일 각 구역에 대해서 세포체 일대가 분명하게 보이지 않는다면 그 조직은 건강하지 않으므로 폐기한다.

- 2) Sindbis virus는 약간 세포독성이 있기 때문에, 현미경 발현 검사와 전기생리학적 실험은 감염 후 2-5일 사이에 시행한다.
- 3) 해마절편배양의 감염에 대한 바이러스 적정량은 최대의 감염률을 얻기 위해 높을 수록 좋다.
- 4) 감염 후 세포가 분명하게 단백질을 발현하지 않거나, 형태학적으로 정상적인 모양을 유지하지 못할 경우 건강하지 않다는 것을 의미하며 폐기처분해야 한다.
- 5) 같은 구역에 한 번 이상 주입하는 것은 공간정확도를 감소시킬 위험이 있는 반면, 감염률을 높일 수도 있다. 이는 실험시에 경험적으로 결정되어야 할 부분이다.



**Figure 1.** 흰쥐의 해마 뇌절편배양체에서 Sindbis viral infection을 이용하여 예서의 voltage-dependent K<sup>+</sup> channel subunit Kv4.2를 과발현시킨 형태. A. Viralinfection 후 24시간이 경과한 해마 뇌절편. GFP-tagged Kv4.2와 Sindbis virus의 융합체를 이용하여 세포에 Kv4.2를 과발현시킨 상태이며, 녹색형광을 띤 부분이 viral injection을 통해 감염이 된 영역. Scale Bar : 1 mm. B. A에서 보여지는 형광부위의 CA1 신경세포를 400 배율로 확대하여 확인한 후 patch clamping을 위한 micro glass pipette을 붙여놓은 상태. 세포체 및 수상돌기등의 형광염색특성을 잘 보여주고 있다. Scale bar : 10 $\mu$ m.

### 5. 바이러스 감염에 대한 팁

- 1) 절편의 건강성이 Sindbis virus의 형질주입 효율성 (transfection efficiency)을 최대한 얻는 데에 무엇보다 중

### 논 의

뇌절편배양은 전기생리학적, 영상적 실험을 수행할 때 최대의 효율성을 발휘한다<sup>1)</sup>. 절편배양은 생체 외 (in vitro)에서 수 주간 (4주까지) 생존할 수 있다. 이는 acute절편이 수 시간인 것과 비교된다. 절편배양은 culture chamber와 recording chamber 사이를 쉽게 이동시킬 수 있는 장점이 있으며, 이로 인하여 실험 시행 전후 적정 기간동안 약물 또는 독소들이 적용하도록 유도할 수 있다. 추가적으로, 뇌절편배양은 다양한 시간에 걸쳐서 배양 접시를 옮길 수 있기 때문에 유전자 발현, 형태학적 활성화, 단백질 전환에 관한 장기간 연구를 수행할 수 있다. 마지막으로, 동물의 생후 사망이 일어나기 전에 뇌절편배양을 만들 수 있는 방법은, 유전자변형 동물에서의 조직을 체외 배양시킬 수 있는 기회를 제공함으로써, 실험자가 조작한 transgene의 기능적 중요성을 평가하는데 도움을 준다.

체외배양 후에 기관형적 뇌절편배양 (organotypic brain slice culture)은 신경세포의 초기 시냅스 형성기간을 거치게 되기 때문에, 안정적이고 고도로 조직화된 세포구조를 유지가 가능해진다. 이 구조물은 면밀하게 평가하자면 acute절편에서 보이는 것과 비슷하다. 기존 연구에 의하면, 체외배양 후 기관형적 절편배양은 in situ 시에 관찰될 표본을 접근하는 신경회로의 복잡성이 남아있다<sup>2)</sup>. 사실상, 성숙된 기관형적 해마 표본과 acute 해마 표본에 있는 CA1 pyramidal neuron의 형태학적 특징은 상당히 유사한데, 예를 들어, 기관형적 절편표본에 primary apical dendrite의 길이와 basal dendrite의 수는 acute절편에서 관찰되는 것과 크게 차이가 나지 않는다. 또한, 각각의 표본에서 apical dendrite와 basal dendrite를 따라 분포하는 dendritic spine 모양의 유형도 크게 차이가 없다.

절편배양개발 시에 몇 가지 예외사항과 더불어, 성숙된 뇌절편배양은 성숙된 acute절편과 비교하여 정상적인 전기생리학적 특성을 유지하는 것으로 보인다. 예를 들면, acute절편표본의 CA1 pyramidal cell에서 기록된 시냅스 전류의 빈도는 기관형적 절편의 CA1 pyramidal cell에 기록된 것과 크게 다르지 않다 (각각

5.6±0.8 Hz vs. 6.8±2.0 Hz)<sup>9)</sup>. 또한, acute절편의 CA1 pyramidal cell 대 기관형적 절편의 CA1 pyramidal cell에서 기록된 mEPSCs (miniature excitatory postsynaptic currents)의 진폭과 시간 경과도 또한 큰 차이가 없다 (진폭: 8.4±0.3 pA 배양절편 vs. 9.0±0.7 pA acute절편)<sup>9)</sup>. Acute해마절편과 기관형적 배양절편에 단일 시냅스로 짝을 이룬 CA3 pyramidal neuron에서 기록한 unitary EPSCs도 마찬가지로 진폭이 유사하다 (각각 28±6 pA vs. 23.6±6 pA)<sup>10)</sup>.

특히, 이 프로토콜은 살아있는 세포의 형태학적 연구에서, 역동적인 구조변화에 관한 추적이 가능하다. 왜냐하면 기관형적 절편배양은: (1) 국부적이면서 형질주입 된 cDNA를 높은 수준으로 발현시킨다. 또한 (2) standard epifluorescence microscopy를 이용하여 살아있는 세포에서 높은 해상도를 얻을 수 있다<sup>11)</sup>. 이는 acute 뇌절편에서 two photon laser scanning microscopy가 필요한 것과 대비된다. 영상을 얻은 절편은 고정이 가능하며, 전통적인 면역세포연구나 좀 더 세부적인 공초점 현미경 분석시에 사용될 수 있다. 특히, 이 프로토콜을 이용한 쥐의 기관형적 절편 배양을 사용하는 것은 배양기 동안 조직이 상당히 얇아진다는 점에서 주된 이점이 있다 (최초 체외배양 시에 ~300µm에서, DIV 7에서 ~70µm까지). 배양은 쉽게 다른 유전자들로 (biolistics, 바이러스 벡터를 이용하여) 형질전환 될 수 있고, 전통적인 전기생리학 또는 미세 광분해에 최적화된 영상을 접목시켜 연구에 사용될 수 있다<sup>12)</sup>. 이 프로토콜에서 Sindbis virus 감염을 이용할 경우, 단백질 발현이 빠르고, knock-out 또는 knock-down 쥐를 접목시켜서 연구자가 뇌 시냅스의 형태학과 생리학을 연구하는데 사용할 강력한 도구를 창출할 수 있다<sup>13)</sup>.

### Acknowledgement

The paper was supported by the 2013 Scientific Promotion Program funded by Jeju National University (2013-0418)

### References

- 1) Nestor MW, Mok LP, Tulapurkar ME, Thompson SM. Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. *J Neurosci*. 2007; 27(47): 12817-28.
- 2) De Simoni A, Griesinger CB, Edwards FA. Development of rat CA1 neurons in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol*. 2003; 550(Pt 1): 135-47.
- 3) Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM. Physiology and pharmacology of unitary synaptic connections between pairs of cells in areas CA3 and CA1 of rat hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol*. 1995; 73(3): 1282-94.
- 4) Miles, R. and Wong RK. Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol*. 1986; 373: 397-418.
- 5) Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1071-1089.
- 6) Thompson SM, Cai X, Dinocourt C, Nestor MW. The use of brain slice cultures for the study of epilepsy. in Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds): *Models of Seizures and Epilepsy*. 2006
- 7) Kim J, Jung A, Clemens R, Petralia D, Hoffman DA. Regulation of Dendritic Excitability by Activity-Dependent Trafficking of the A-Type K<sup>+</sup> Channel subunit Kv4.2. *Neuron*, 2007, 54(6):933-47.