유전자 치료와 Retrovirus Vector

유승신
(주)바이로메디카 패시

유전자치료(gene therapy)의 목적은 결손된 유전자를 교정하거나 세포에 새로운 기능을 제공하여 각종 질환을 치유하는데 있다. 즉 유전자치료는 각종 질병이나 이상현상을 교정하기 위해 외부에서 생명체로 유전자를 전달하는 기술이라 정의할 수 있다. 최초의 유전자치료 개념은 단일 유전자의 결함으로 인한 유전질환을 치료하려는 목적에서 출발하였으나, 최근에는 유전병은 물론 암이나 관절염과 같은 complex disease나 AIDS와 같은 감염성 질환을 포함하여 다양한 형태의 질병을 치료할 수 있는 치료기술과 의약품으로 대두되고 있다. 최초의 임상시험이 실시된 1990년 이후 유전자치료는 급격한 발전을 이뤄 현재 20개국 이상의 나라에서 400개의 임상 시험이 3000명 이상의 환자를 대상으로 이루어지고 있으며 주변기술의 급격한 발전에 힘입어 21세기에는 첨단 치료기술로 등장할 것으로 예상되고 있다.

유전자치료법을 대중화, 상용화하는데 가장 중요한 문제이면서 극복하기 어려운 장애물은 효율적인 유전자 전달방법이 없다는 것이다. 특히 유전자를 고효율로 세포에 전달하고 세포내에서 오랜기간동안 치료효과를 지속할만한 농도로 유전자를 발현할 수 있는 벡터가 없다는 것이 가장 큰 문제점이다. 현재 임상시험에 사용되고 있는 유전자 전달체로는 물리·화학적 벡터(리포좀)와, 생물학적 벡터[retrovirus, adenovirus, adeno부속 virus(AAV), 폭스 virus 등]가 있는데 구미 선진국에서 시행하고 있는 임상실험의 50% 이상에서 MLV(murine leukemia virus)에 기초한 retrovirus가 사용되고 있다. Retrovirus vector는 *in vitro*에서 쉽게 조작할 수 있으며, 유전자 전달이 효율적이고 유전자가 숙주세포의 염색체내로 안정하게 삽입되어 자손 세포에 전달될 수 있다는 장점을 가지는 반면, 분열하는 세포에만 감염될 수 있으며, adenovirus와 같은 DNA virus 벡터에 비해 낮은 역가로 생산되고 또한 숙주 세포 염색체내로 무작위로 삽입된다는 단점을 갖는다. 최근에는 다양한 포장 세포주(packaging cell line)의 개발과 virus 농축방법의 개선, 그리고 virus 막 단백질의 변형 등으로 다양한 표적세포에 보다 효율적인 감염과 고농도의 virus 농축액을 얻을 수 있게 되었으며, 또한 EIAV, HIV, FIV등을 이용한 렌티virus의 개발은 retrovirus vector를 분열하지 않는 세포에 *in vivo*로 전달할 수 있게 해 주었다. 본 고에서는 MLV를 중심으로 하여 retrovirus vector의 발달과 특성, 그리고 유전자치료법에의 적용에 관해 논하고자 한다.

▶ 역사적 배경

1911년 Rous는 닭에서 fibrosarcoma의 원인이 되는 virus를 보고하였다. 이것은 우리에게 Rous sarcoma virus(RSV)로 알려진 retrovirus로서, 이는 *src*를 포함하고 있다. 이후 RSV와 같은 RNA tumor virus는 oncogene과 세포성장을 이해하는 중요한 도구가 되었다. Retrovirus와 관련된 중요한 진전으로는 1970년 Baltimore와 Temin에 의한 reverse transcriptase의 발견을 들 수 있는데 이는 분자생물학의 central dogma를 뒤엎고 'retrovirology'라는 새로운 연구영역을 구축하였으며 발암, 진화, 그리고 유전자치료 영역에 지대한 영향을 미쳤다. 이로써 이들은 1975년 노벨상을 수상하였다. 1970년 중반 Jaenisch는 쥐의 초기 착상전 태아(embryo)를 retrovirus와 함께 배양하여 virus가 세포속으로 들어가도록 유도한 뒤 이를 pseudopregnant 암컷의 자궁에 착상시켜 chimera 형태의 태아로 자라도록 하였다. 성체가 된 chimeric 쥐는 provirus가 삽입된 정자와 난자를 생산하게 되고, 이들을 breeding함으로써 1세대 transgenic mice를 탄생시켰다. 1980-81년사이 Wei, Shimotohno, Temin 등은 retrovirus vector를 이용하여 유전자를 세포내로 전달함으로써 염색체로 삽입시켜 발현하는데 성공하였으며, 1980년대와 1990년대에 걸쳐 Mulligan과 Miller group은 helper-free retrovirus vector 시스템을 개발하였다. 이후 수많은 실험실에서 수많은 사람들에 의해 동물을 이용한 *ex vivo* 유전자치료 시험이 행해졌으며, 이들 실험의 성과를 뒷받침으로 하여 1989-90년 NIH에서 인간을 대상으로 하는 retrovirus를 이용한 최초의 유전자치료 시험을 허가받기에 이르렀다.

▶ Retrovirus의 특징

Retrovirus는 감염된 세포에서 RNA 게놈이 DNA로 전환되어 숙주세포의 염색체내로 삽입되는 일련의 virus군으로, retrovirus 입자는 2가닥의 RNA를 포함하는 단백질 core가 지질 외막에 의해 둘러싸인 형태를 하고 있다. Retrovirus의 생활사는 외막 단백질(envelope)이 세포 표면의 특정 수용체와 결합함으로써 시작되는데, 쥐과 동물 세포에 감염할 수 있는 ecotropic 외막의 경우 그 수용체는 cationic amino acid transporter이며, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 MLV amphotropic 외막의 수용체는 phosphate transporter(Ram-1)로 알려져 있다. Virus와 세포막 간의 융합 혹은 세포흡수작용에 의해 virus는 세포내로 도입되고 virus의 RNA는 역전사과정에 의해 DNA로 전환되어 핵으로 이동한다. 대부분의 retrovirus는 이 DNA가 핵속으로 들어가기 위해 유사 분열과 그에 따른 핵막의 파괴를 필요로 하며, 핵내에서 DNA는 염색체내로 삽입되어 provirus를 형성한다. 삽입된 provirus에서 전사된 RNA로부터 *gag*, *pol*, *env* 유전자 산물이 합성되고 이들은 게놈 크기의 virus RNA만을 포장하여 virus 입자를 생산하게 된다. MLV 게놈은 8264 bp의 크기를 가지며 모든 retrovirus와 마찬가지로 *gag*, *pol*, *env*의 단백질 코딩 부위가 5′, 3′ 끝에 존재하는 LTR 내에 포함되어 있다(그림 1). LTR은 게놈의 삽입과 전사 조절에 필요한 염기서열을 포함하고 있으며, 5′LTR 바로 뒤에는 tRNA primer가 결합하여 역전사가 시작되는 -P 부위가 있으며, 그 하류의 splice donor(SD)는 subgenomic 외막 mRNA 생산에 이용된다. SD와 *gag* 유전자 사이의 psi(φ)서열은 게놈 RNA의 encapsidation에 필요한 것이다. Virus의 복제와 포장에 요구되는 단백질은 *gag*, *pol*, *env* 세 유전자의 산물이며, *env* 유전자의 끝과 3′LTR 사이에 존재하는 purine rich 부위는 + strand cDNA 합성이 시작되는 부위(+P)이다.

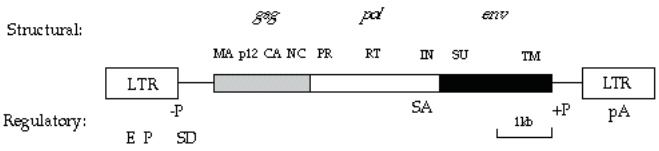


그림 1 Moloney murine leukemia virus의 구조
E-enhancer; P-promotor; -P-rRNA primer 결합부위; SD-splice donor; φ-encapsidation signal; SA-splice acceptor; +P-positive strand initiation site; pA-polyadenylation signal.

▶ 벡터 디자인

Virus 게놈으로 부터 *gag*, *pol*, *env*의 virus 유전자를 제거하더라도, 이들 유전자 산물이 외부로부터 공급될 경우 virus RNA는 virion 내로 포장 될 수 있다. 이러한 특성을 이용하여 virus 유전자가 외부 유전자로 대체된 재조합 virus는 독자적으로 복제를 할 수는 없지만 외부로부터의 virus 단백질들의 공급에 의해 다른 세포에 감염하여 숙주 세포의 염색체내로 안정하게 삽입될 수 있다(그림 2). 다양한 형태의 retrovirus vector가 개발되었는데, 일반적으로 외부 유전자의 발현을 조절하는 인핸서/프로모터(enhancer/promoter)의 종류와 위치에 따라 세 유형으로 나뉘고(그림 3), 이들 각각의 시스템은 자신만의 독특한 장점을 갖는다.

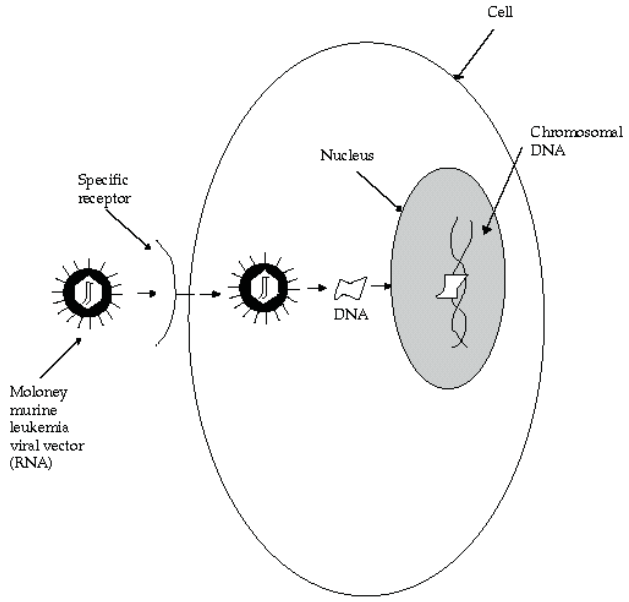


그림 2 Moloney murine leukemia virus vector
Retrovirus를 이용한 유전자 전달 시스템은 자연적인 바이러스 생활사를 이용한다. Vector가 세포 표면 수용체에 결합한 후 숙주세포의 세포질 내부로 도입된다. 세포 내에서 바이러스 RNA는 역전사 효소의 작용에 의하여 DNA로 전사되고 숙주의 염색체 내로 삽입됨으로써 replication-defective viral vector의 생활사는 끝나게 되는데, 야생형의 바이러스인 경우 바이러스의 단백질과 RNA를 합성하여 assembly 과정을 거쳐 바이러스 입자를 생산하고, 이는 budding을 통하여 세포 밖으로 방출된다.

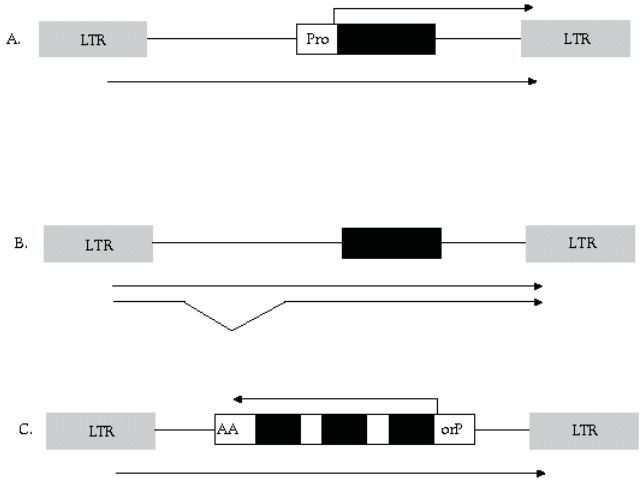


그림 3 Retrovirus vector의 세가지 유형
내부 프로모터 벡터(A), LTR-근간 벡터(B), 그리고 유전자 카세트 벡터(C)는 치료 유전자 발현을 위한 인핸서/프로모터의 위치와 유형에 의하여 나뉜다.
검은색 box는 치료 단백질의 코딩 염기서열을 나타내며, 흰색 box는 intron, 혹은 3′ non-coding sequence를 나타낸다. 유전자 카세트 벡터에서 AA는 polyadenylation site를, orP는 프로모터가 역방향으로 존재함을 표시한다.

① 내부 프로모터 벡터(Internal promoter vectors)

이것은 이종 프로모터가 virus LTR 사이에 삽입되어 치료 유전자 혹은 선별 마커의 발현을 조절하는 형태로(그림 3A), 어떤 경우 3′LTR의 U3를 불활성화시켜 역전사에 의해 3′LTR이 5′LTR로 복제된 후 유전자 발현을 유도할 수 없도록 만들기도 한다(SIN 벡터). 이 경우 유전자 발현은 LTR이 아닌 내부 프로모터에 의해 조절되며, 세포 특이성을 갖는 프로모터를 사용하거나 항상 발현되는 프로모터(constitutive promoter)를 이용하여 조직

특이적인, 혹은 높은 수준의 유전자 발현을 유도할 수 있다. 또한 내부 프로모터와 3′LTR의 U3 부분을 함께 유지하도록 하여, LTR에 의해 또 다른 유전자가 동시에 발현되도록 할 수도 있으나, 이 경우에는 LTR과 내부 프로모터라는 두 프로모터가 존재하므로 유전자의 발현량이 감소하거나 한 프로모터의 작용을 저해하는 것으로 보인다.

② LTR-근간 벡터(LTR-based vectors)

두 번째 유형의 벡터는 유전자 발현이 LTR로 부터 유도되고 내부 프로모터를 포함하지 않는 것으로(그림 3B), 치료 유전자가 splicing 되지 않은 RNA에서 유래되거나, 혹은 splicing 된 RNA로부터 발현되도록 한다. 이러한 유형의 벡터는 몇몇 세포에서 유전자 발현이 매우 효율적임이 관찰되었으나, virus의 프로모터를 이용하기 때문에 조직특이적으로 유전자 발현을 조절할 수는 없다. 이들 벡터의 cis-acting element를 변형시킴으로써 특정 세포에서 발현을 증가시킬 수 있음이 알려졌는데, myeloid proliferative sarcoma virus(MPSV) LTR의 인핸서/프로모터를 3′LTR에 도입함으로써 조혈세포에서 보다 효율적인 유전자 발현이 가능해졌으며, HCMV, 혹은 체세포 유전자의 enhancer/promoter를 3′LTR에 삽입함으로써 특정 세포에서 유전자발현을 향상시킬수 있음이 알려졌다.

cis-acting sequence를 변형시킴으로써 retrovirus vector를 향상시킬 수 있는 또 한 예가 B2 돌연변이로서, 벡터내 tRNA 결합 부위에 단일 염기 돌연변이(B2)를 도입함으로써 F9와 같은 embryonic carcinoma cell에서의 유전자 발현이 가능해졌다. 이들 유형의 벡터에서 여러 종류의 유전자를 발현시키기 위한 방법으로는 alternative splicing을 이용하는 방법을 들 수 있으나, 보다 효율적인 방법은 internal ribosome entry site(IRES)를 이용하는 것으로, 이는 single polycistronic RNA로 부터 여러 단백질의 해독을 촉진할 수 있다. 이 IRES는 내부 프로모터를 사용하는 벡터 시스템에도 적용할 수 있다.

③ 유전자 카세트 벡터(Gene cassette vectors)

세 번째 유형의 벡터는 특별한 유전자 치료에 적용되는 경우로 조절 유전자를 포함한 전체 유전자가 벡터내로 삽입되는 경우이다(그림 3C). 이 경우 retrovirus vector는 유전자 카세트 벡터를 세포 내로 운반하기 위한 운반체로서의 역할만 할 뿐 유전자 발현에는 관여하지 않는다. 이때 유전자 카세트는 virus의 전사방향과 역방향으로 삽입되어 virus 유전자 발현이 영향을 받지 않도록 한다. 또는 3′LTR의 U3 부위에 유전자 카세트를 삽입함으로써 재조합 virus에 감염된 목적 세포에는 유전자 카세트가 5′LTR과 3′LTR에 2 copy가 존재하도록 할 수 있다. 특히 5′LTR에 존재하는 유전자 카세트는 virus 유전자 발현의 영향을 덜 받게 됨으로써 그 발현이 증가된다.

▶ 포장 세포주(Packaging Cell lines)

Virus RNA를 포장하기 위해 필요한 단백질들을 *in trans*로 공급할 수 있기 때문에 *gag*, *pol*, *env* 유전자를 안정하게 발현하여, retrovirus vector가 도입되었을 경우 감염 가능한 virus 입자를 생산해낼 수 있는 포장 세포주를 제조할 수 있다(그림 4). MLV벡터를 위한 최초의 포장 세포주는 단순히 MoMLV의 provirus로 부터 *psi* 염기서열만을 제거하고, 이를 3T3 세포에 도입하여 만들어졌는데, 이 경우 높은 역가의 virus를 얻을 수는 있으나 한 번의 재조합만으로도 replication competent retrovirus(RCR)가 생산될 수 있다(그림 5). 재조합 확률을 줄이기 위해 packaging signal을 제거하는 것 외에도 3′LTR을 SV40의 polyadenylation signal로 대체한 포장세포주가 제조되었고, 이 경우 RCR 형성을 위해 최소 2번의 재조합이 요구된다. 보다 안전한 virus 생산세포주의 제조를 위해 포장에 필요한 단백질이 2개의 분리된 플라스미드에 의해 발현되도록 하고, 3′혹은 5′LTR을 다른 프로모터로 대체하는 등의 변형이 가해졌다. 일반적인 ecotropic 혹은 amphotropic MLV 외막 단백질 외에도 숙주 세포의 범위를 넓히거나 혹은 제한하기 위해 다른 virus의 외막 단백질을 사용할 수 있는데, gibbon ape leukemia virus(GaLV)의 외막 단백질을 사용할 경우 조혈 모세포로의 감염이 보다 효율적이며, vesicular stomatitis virus(VSV)의 외막 단백질을 이용할 경우 다양한 세포로의 유전자 전달 효율을 높일 수 있음이 알려졌다.

그 외에도 외막 단백질에 epo나 LDL 수용체에 대한 항체를 포함하도록 디자인하여 특정 표적세포-epo인 경우는 조혈세포를, LDL 수용체 항체인 경우는 간세포(hepatocytes)를 치료대상 세포로 하고자 하는 노력들도 시도되고 있다.

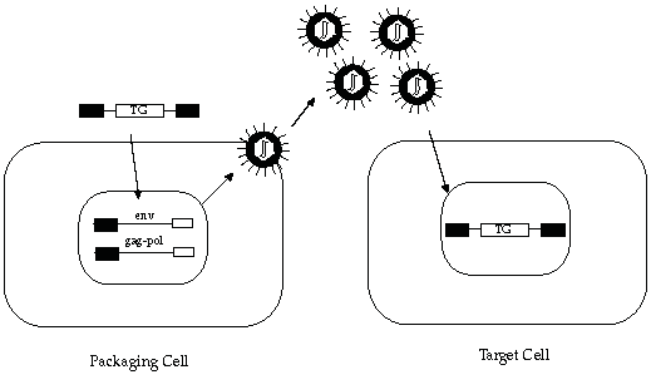


그림 4 복제 결함 retrovirus vector의 생산.
gag-pol 유전자와 *env* 유전자를 발현하는 플라스미드에 의해 안정하게 transfection 되어 있는 세포주에 retrovirus vector가 도입되면, 이로부터 생산된 바이러스는 목적 세포에 감염되어 염색체 내로 안정하게 삽입되나 바이러스 단백질들의 결여로 복제를 할 수는 없다.

▶ 렌티virus(Lentivirus) 벡터

Retrovirus의 일종인 lentivirus는 현재 유전자 전달 벡터로 광범위하게 쓰이고 있지는 않으나 일반적인 retrovirus와는 달리 분열하는 세포 뿐 아니라 성장이 멈춘 세포나 분화가 끝난 세포에도 감염할 수 있다는 특성 때문에 유전자 전달 벡터로 개발되고 있다. 그 대표적인 예가 HIV인데, 이는 *gag*, *pol*, *env* 외에도 6개의 accessary 유전자를 더 포함하고 있다. 몇몇 accessary 유전자를 제거한 HIV 벡터의 경우 VSV 외막 단백질로 pseudotyping 되었을 때 동물시험에서 뇌, 간, 근육 세포 등 광범위한 세포로 감염할 수 있고, 6개월 이상 지속적인 유전자 발현을 유도할 수 있음이 보고된 바 있다. 따라서 현재보다 안전한 HIV, 혹은 feline immunodeficiecy virus, equine infectious anemia virus 등을 이용한 lentivirus 벡터를

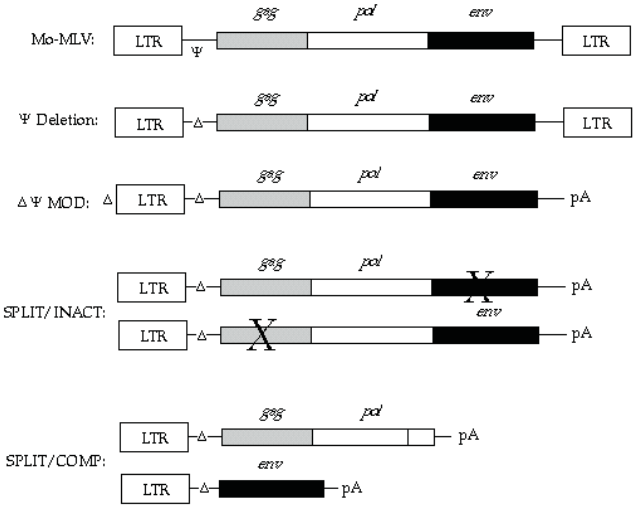


그림 5 포장세포주

Retrovirus의 포장세포주를 제조하기 위하여 일반적으로 사용하는 virus 게놈의 구조이다. 1세대 φ결실 세포주는 단순히 φ염기서열만을 제거함으로써 제조되었다. 2세대 포장세포주(Δφ modifications)는 3' LTR을 제거하고, integration이 일어나지 않을만큼 5' LTR을 제거하였다. Split gene(inact) 포장세포주는 2개의 변형된 게놈을 사용하고 있다. Split gene(complete) 포장세포주 또한 2개의 게놈을 사용하나, 이 경우 *env* 유전자는 *gag/pol* 발현 plasmid로부터 완전히 제거되었으며, *env* 발현 vector는 *env* 염기서열만을 포함한다.

개발하여 이를 분화가 끝난 신경 세포로의 유전자 전달을 위한 시스템으로 사용하고자 하는 노력들이 진행중이다.

▶ Retrovirus vector의 임상적용

현재까지 retrovirus vector는 감염질환과 유전질환에의 적용을 위해 다른 virus 벡터들에 비해 가장 선호되고 있다. Retrovirus가 분열하는 세포에 면역반응을 유도하지 않으면서 안정하게 감염할 수 있다는 특성은 유전병의 영구적인 치료를 위한 매우 중요한 특성이다. Retrovirus vector는 그러나 분열하는 세포에만 감염 가능하며, 또한 비교적 낮은 역가로 생산되기 때문에 주로 *ex vivo* 유전자 치료에만 적용되어 왔으며, 몇몇 특별한 경우 retrovirus 혹은 생산세포주 자체가 *in vivo* 유전자전달에 사용되기도 한다.

▶ 안전성

Retrovirus vector의 사용과 관련된 위험성은 retrovirus의 삽입에 의한 돌연변이의 유발과 replication-competent retrovirus(RCR) 생성에 의한 감염이다. 그러나 일반적으로 retrovirus의 무작위 삽입에 따른 oncogene의 활성화나 tumor suppressor gene의 불활성화로 세포가 암화될 확률은 이론적으로 매우 낮으며, 실제 이러한 예가 보고된 바는 없다. 보다 심각한 안전성의 문제는 쥐의 endogenous MLV와 포장세포주 그리고 벡터 MLV간에서 발견되는 동종 염기서열간의 재조합에 의한 RCR의 출현이다. 비록 정상인에게는 무해한 virus일지라도 면역시스템이 극도로 약화된 환자의 경우 RCR의 출현은 예기치 않았던 또 다른 질병의 원인이 될 수도 있다. 이 문제를 해결할 수 있는 한가지 방법으로는 MLV를 포함하고 있지 않은 사람 혹은 영장류 세포의 포장세포주를 사용하거나 포장세포주와 벡터 그리고 endogenous virus 간의 동종 염기서열을 제거함으로써 재조합의 가능성을 배제하는 것을 들 수 있으며, 유전자 치료 적용에 있어서 RCR 생성 가능성을 최소화하는 벡터와 포장세포주의 선택이 상당히 중요하다.

▶ 맺음말

Retrovirus를 이용한 유전자치료는 놀라우리만큼 빠른 속도로 진전되고 있어 최초의 포장세포주가 보고된지 6년만에 인간을 대상으로 한 임상시험이 실시되기에 이르렀고 그 이후 현재까지 약 1500 여명의 환자들이 retrovirus를 이용한 유전자치료를 받고 있다. 아직 유전자치료와 관련된 어떠한 부작용도 보고된 바는 없으며, 비록 현재 사용되는 벡터들이 비교적 효율적으로 유전자 전달에 사용되고는 있으나 미래에 상용화되기 위해서는 벡터와 포장세포주 모두 개선되어 역가를 높이고, 특정 기관으로의 targeting이 가능하며, 유전자 발현을 조절할 수 있도록 되어야 할 것이다. 앞으로도 당분간 retrovirus vector는 각종 유전자치료 임상시험에 널리 사용될 것으로 여겨지며 대체 치료방법이 없는 많은 환자들을 치료하고 그들의 삶의 질을 높이는데 기여할 수 있으리라 본다.

유 승 신
이학박사
책임 연구원, 연구담당이사
(주)바이로메디카 패시픽
(서울대학교 유전공학연구소 산학협동지원실내)

1988년 서울대학교 미생물학과 졸업
1990년 서울대학교 대학원 미생물학과 이학석사
1995년 서울대학교 대학원 미생물학과 이학박사
1995~1997 MIT, Whitehead Institute Postdoctoral Fellow

BIO21 은
당사의 고객서비스의 이름입니다.
새로운 천년의 시작 21세기는
생명과학의 세기가 될 것으로
기대하고 있습니다.
당사의 기술지원과 고객 서비스를
바이오토피아를 상징하는
BIO21 로 명명하여
수준 높은 토탈서비스로
생명과학의 시대를
선도하고자 합니다.

TaKaRa
BIOMEDICALS

보현바이오메디칼주식회사
Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691
E-mail bohan@bohan.co.kr
URL www.bohan.co.kr

BIO WHITTAKER

최고급의 품질을 다양하게 준비하고 있습니다 !!

NEW ▶ AMNIOCHROME™-II 태아유래 양수세포 배양용 배지

출생전 진단에 사용하는 태아유래 양수세포의 배양에 최적인 배지이다. 양수세포의 핵형분석, 효소활성측정, 특정 물질의 대사동태의 검사 등을 실시하는 경우에 양수 천자로 얻은 사람의 양수세포를 복잡한 첨가물질을 첨가하지 않고 배양할 수 있다.

- **AMNIOCHROME™-II Complete Medium System**
- **기본배지** AMNIOCHROME™-II Basal Medium
- **첨가용액** AMNIOCHROME™-II Supplement

NEW ▶ 정상 사람 신경 전구세포(Normal Human Neural Progenitor Cell:NHNP)

NEW ▶ 정상 사람 골아세포(Normal Human Neural Osteoblast Cell:NHOst)

정상 사람 신경 전구세포는 신경조직의 발생, 분화 등의 연구에 아주 적당한 세포이다.
정상 사람 골아 세포(Osteoblast)는 골형성 능력을 갖는 단핵세포이며 또한 Differnetial SingleQuots(분화유도용 첨가인자 셋트)를 사용하면 석회화를 유도할 수 있다.

- **각종 Normal Human Cell**
- **전용배지 Kit**
- **첨가 인자**

▶ Normal Human Cell and Media

- **동결세포**

혈관계세포
제대동맥/정맥 내피세포
대동맥 내피세포
관상동맥 내피/평활근세포
대동맥 평활근세포
폐 미소혈관 내피세포
장골 동맥 내피세포
자궁 근층 미소혈관 내피세포

신경세포
Astrocytes

표피계세포
표피 각화세포
피부 섬유아세포
표피 멜라닌세포
진피성 내피세포

장기유래세포
기관지 평활근/상피세포
소기도 상피세포
폐 섬유아세포
신장 근위 뇨세관 상피/피질상피세포
Mesangial cells
자궁 평활근세포
골격근세포
유선 상피세포
전립선 상피세포
전립선 Stroma cells

- **각 세포전용 증식용배지**
- **각 세포전용 첨가인자세트**
- **각 세포전용 표식용배지**

▶ 무혈청 · 저혈청배지
— Ultra 시리즈 —

판매원

녹십자양행
LS사업팀 Tel. 02-3471-7437(직) Fax. 581-0137
대전 Tel. 042-823-6957 Fax. 832-0821
대구 Tel. 053-959-3611 Fax. 959-6136
광주 Tel. 062-525-1155 Fax. 527-0821

(주)코아바이오시스템
Tel. 02-841-7530
Fax. 02-841-7531
수원 0331-284-8592
대전 042-622-2726

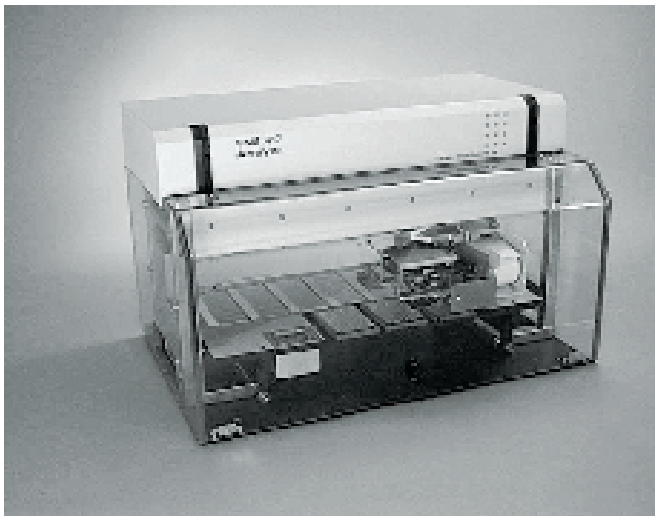
DNA Chip 제작장치 & DNA Chip 해석장치

- Functional genomics 연구의 강력한 파트너 -

지난 9호(제3권 4호)에서 소개한 바와 같이 DNA chip 기술은 다수 유전자의 발현, 변이 및 다형성을 동시에 해석할 수 있어 발암 등의 cascade를 해명하는데 있어서 경이적인 screening법으로서 등장하였다. 본 고에서는 TaKaRa가 판매를 시작한 Genetic MicroSystems사(GMS사)의 DNA Chip 제작장치와 DNA Chip 해석장치 및 이들의 application data를 소개한다.

■ DNA Chip 제작장치

GMS 417 Arrayer



고밀도 array의 제작이나 정확한 해석을 위해서는 spotting이 정확하고 재현성이 있어야 한다는 점이 상당히 중요하다. GMS사의 독자적인 spotting 기술인 [Pin & Ring 방식]은 종래의 quill 방식(pen 방식)을 능가하는 완전히 새로운 첨단 기술이다.

Pin & Ring(그림 1)

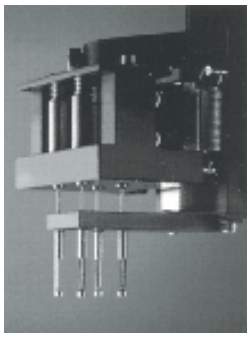
Ring으로 reserve한 DNA 용액을 pin으로 spot한다. Pin의 선단에서는 매회 일정량(직경 150 ㎛의 pin으로, 수 백 pl)이 drop되어 spot 된다.

Pin의 영구성(그림 2)

Quill 방식에서는 pen 끝을 glass 표면에 찍을 때에 강한 충격력이 발생 하나 [Pin & Ring 방식] 에서는 pin이 스프링으로 지지되어 있으므로 충격이 적어 pin 끝이 거의 마모되지 않는다. 따라서 pin을 교환해 줄 필요가 거의 없다. 또 slide glass 뿐만 아니라 cover glass나 membrane filter에도 spotting이 가능하다.

고속 spotting

Ring에 의한 1회의 reserve 공정에서 1,000회 이상의 spotting에 충분한 양의 DNA 용액이 reserve되므로 pin이 microplate에 되돌아가지 않고 동시에 slide glass상에서의 복수의 spotting이나 복수의 slide glass로의 spotting을 한꺼번에 할 수 있다. 또한 spotting을 위한 4 set의 pin & ring이 장착되어 있으므로(우측 사진), 4개의 well에 준비된 DNA 용액을 동시에 spotting할 수 있다. 따라서 다수의 DNA chip을 아주 빠른 속도로 제작할 수 있다.



Spotter

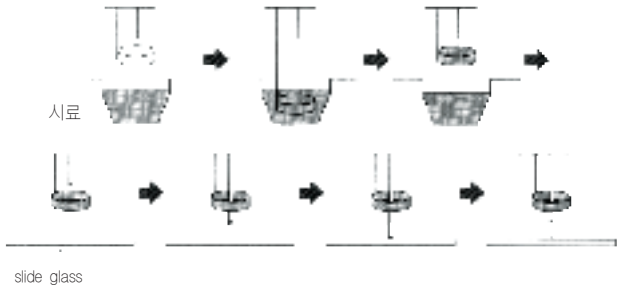


그림 1 Pin & Ring 방식에 의한 spotting

Microplate 내의 시료용액을 ring으로 reserve하고 이어서 42장의 slide glass에 spotting한다.

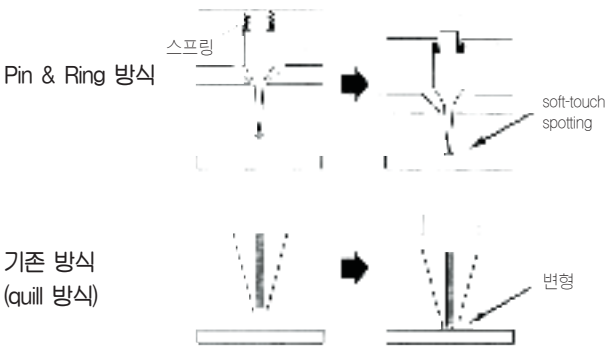
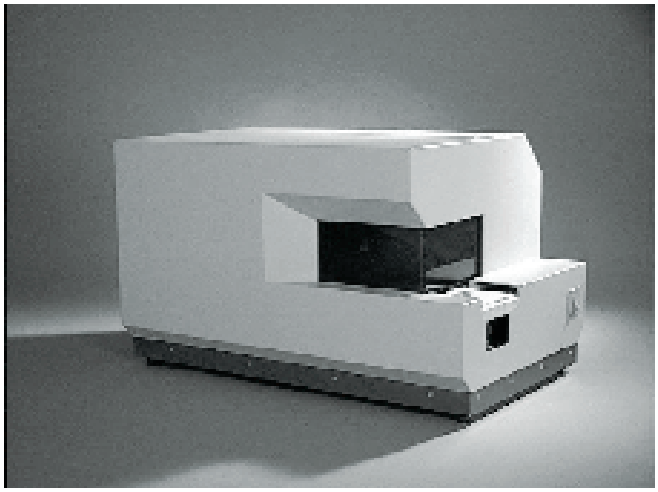


그림 2 Pin의 영구성

Spotting시에 pin 끝이 slide glass에 주는 충격을 흡수할수 있도록 하기 위하여 pin은 스프링으로 지지되어 있다. 따라서 pin 끝의 마모가 적어 pin을 교환해 줄 필요가 거의 없다.

■ DNA Chip 해석장치

GMS 418 Array Scanner



귀중한 시료와 시간을 효과적으로 이용하기 위해서는 고감도의 scanning을 고속으로 실시하는 것이 매우 중요하다. GMS사의 독자적인 scanning 기술을 이용한 [Flying Objective Microscope]를 이용함으로써 종래의 scanning 장치를 훨씬 능가하는 고속의 scanning이 가능해졌다.

Confocal Laser Scanning

Confocal Laser Scanning은 종래의 laser scanning 보다 초점 범위가 더 좁은 것이므로 background가 적게 생기며 정확하게 검출할 수 있다.

Flying Objective Microscope(그림 3)

GMS사 독자의 기술로 laser head가 wiper처럼 이동하여 고속으로 scanning 한다. 30 lines/sec의 속도로 scanning하기 때문에 slide glass 전면(22 mm × 75 mm)의 2색의 fluorescent signal을 불과 6.25분만에 해독할 수 있다.

개구수 (Numerical Aperture, NA)

GMS 418 Array Scanner는 NA0.9의 렌즈를 채용하고 있기 때문에 뛰어난 집광능력 및 분해능력을 가져 고감도의 검출이 가능하다.

Auto focus 기능

Slide glass의 두께 차이를 auto focus로 해석하므로 정확하게 분석할 수 있다.

Laser Monitoring 기능

Laser 출력을 pixel 단위로 monitor하여 검출 data에 feedback하므로 정확한 data를 얻을 수 있다.

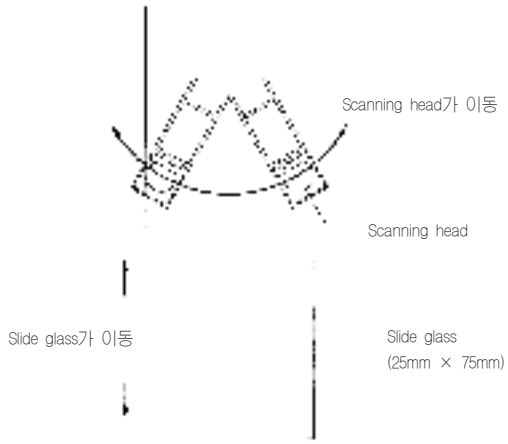


그림 3 Flying Objective Microscope에 의한 scanning

■ 실험례

(1) 발현 검출

Human cDNA 70개를 GMS 417 Arrayer로 spot하여 DNA chip을 제작하였다. 그 다음에 각종 세포로부터 얻은 mRNA를 형광표식한 시료를 chip상의 DNA와 hybridization시킨 후 GMS 418 Array Scanner로 scanning하였다(그림 4).

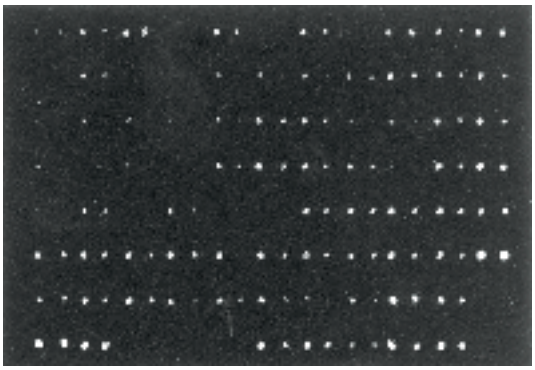


그림 4 발현 검출례

probe : HL60 유래 mRNA를 역전사효소로 Cy3 표식한 것.

(2) 변이해석

c-Ki-*ras* 61의 변이를 갖는 8종류의 oligonucleotide를 GMS 417 Arrayer로 spot하여 DNA chip을 제작하였다. 그 다음에 Rhodamine 표식 primer를 사용하여 변이부분을 함유하는 영역을 PCR로 증폭하여 얻은 시료를 chip 상의 oligonucleotide와 hybridization시켜, GMS 418 Array Scanner로 scanning하였다.

기기사양

[GMS 417 Arrayer]		[GMS 418 Array Scanner]	
Spot size	: 최소 50 ㎛~최대 300 ㎛	해석시료	: 25 mm × 75 mm 표준 slide glass
Spot size의 오차	: ±10%	해석범위	: 22 mm × 75 mm
Spot 간격	: 10 ㎛ 단위로 자유설정	해상도	: 10 ㎛
Spot 속도	: 4 spot/sec	Scanning 속도	: 6.25 분 이하/22 mm × 75 mm/2파장 (30 lines scanning/sec)
사용 slide glass	: 표준크기(25 mm × 75 mm) slide set 매수: 1~42매 (표준 slide glass 사용시)	여기파장	: 532 nm 및 635 nm
		검출방식	: 광전자 증배관
사용 microplate	: 96 well 또는 384 well set 매수 : 3매	외형치수	: 38 cm(W) × 61 cm(D) × 38 cm(H)
		중량	: 25 kg
외형치수	: 80 cm(W) × 53 cm(D) × 50 cm(H)	사용전력	: 90~250 VAC, 50~60 Hz(자동전환방식), 500 W 이하
중량	: 65 kg	출력파일	: TIFF(16 bit), BMP
사용전력	: 90~250 VAC, 50~60 Hz(자동전환방식), 600 W 이하	사용 computer	: IBM 호환, Pentium® class, RAM 64MB 이상, 100MB 이상의 HD 빈 용량, 빈 PCI slot × 1
사용 computer	: IBM 호환, Pentium® class, RAM 16MB 이상, 10MB 이상의 HD 빈 용량		

* 본 사양은 개량을 위해 예고없이 변경될 수도 있습니다.

여러분의 Clone을 DNA Chip으로 만들어 세계의 연구자에게 !!

Post Genome 시대의 Functional Genomics 연구에 여러분의 귀중한 재료를 DNA Chip으로 만들어 세계의 연구자에게 공급하여 드립니다.

EST clone, cDNA clone 등은 아주 큰 가능성을 갖고 있습니다. 당사는 미국 GMS사의 종합 DNA Chip system을 공급함은 물론이고 각종 DNA Chip을 제작 공급합니다. 국내 연구자의 clone을 DNA Chip으로 제작하여 세계의 연구자에게 제공하므로서 Functional Genomics 연구를 가속화하고자 합니다.

자세한 내용은 당사에 문의하시기 바랍니다.

Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691

URL www.bohan.co.kr

e-mail jhl@bohan.co.kr

Virus vector를 이용한 유전자 도입

1. Retrovirus vector pDON-AI을 이용한 효율적인 유전자 도입

표적세포에 목적유전자를 도입하여 발현시키는 방법에는 electroporation 등의 물리적인 방법과 DEAE-Dextran, liposome, calcium-phosphate 등을 이용하는 화학적 방법 등이 있다. 이외에 virus vector를 이용한 외래유전자의 고효율적 도입법에 관한 연구도 진전되고 있다. 이 방법으로서 현재 이용되고 있는 대표적인 virus vector로는 retrovirus, adenovirus, adeno associate virus, vaccinia virus 등이 있다. 특히 retrovirus vector를 이용한 유전자 도입은 다음과 같은 잇점을 가진다.

1) 도입유전자가 염색체에 재조합되므로 장기간 안정하게 유전자를 발현할 수 있다. 도입유전자를 염색체에 삽입시키는 능력이 없는 다른 vector의 경우 도입유전자가 세포내에서 분해되거나 세포분열과정에서 희석되어 버린다. 따라서 유전자발현이 일관성 있게 지속할 수 없다. Retrovirus vector는 염색체에 재조합되므로 분열 후에도 확실히 안정하게 전달된다.
2) Retrovirus 이외의 virus vector를 제작하기 위한 조작과정은 매우 복잡하지만 Retrovirus의 경우는 비교적 쉽게 virus vector를 제작할 수 있다.
3) 증식기에 있는 다수의 세포종으로의 유전자도입이 가능하다. 특히 물리·화학적 방법으로는 조혈모세포에 유전자를 거의 도입할 수 없었지만 fibronectin fragment을 이용함으로써 retrovirus vector를 매개로 한 조혈모세포로의 고효율적인 유전자도입이 가능하게 되었다.

금번 TaKaRa는 유전자 도입용 retrovirus vector로서 서울대학교 유전공학연구소와 (주)바이로메디카 패시픽이 개발한 pDON-AI DNA를 발매하였다. TaKaRa는 이미 retrovirus를 매개로 한 배양세포 및 조혈모세포로의 유전자도입 효율을 높일 수 있는 재조합 fibronectin fragment, 즉 RetroNectin™(TaKaRa Code T100A/B) 및 이를 코팅한 RetroNectin™ Dish(TaKaRa Code T110A) 를 발매하였으므로 이들을 retrovirus vector pDON-AI와 병용함으로써 보다 효율적으로 표적세포에 유전자를 도입할 수 있게 되었다.

■ Retrovirus vector에 대하여

(1) 구조

Retrovirus는 (+) single strand RNA를 genome으로 갖는 100 nm 크기의 입자로서 감염후에는 RNA genome이 DNA로 역전사되어 숙주염색체로 들어간다. Virus genome은 *gag*, *pol*, *env*의 3종류의 coding region과 양말단의 LTR(long terminal repeat)로 구성되어 있는데, LTR에는 유전자의 발현에 필요한 promoter, enhancer, polyA signal 등의 element가 함유되어 있다. 또 5'측 LTR의 내측에는 RNA virus genome이 virus 입자속에 들어가는데 필요한 packaging signal(Ψ)이 존재한다(그림 1).

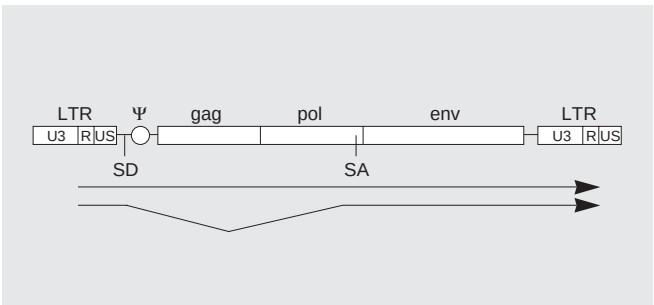


그림 1 Retrovirus의 provirus DNA 구조

모든 retrovirus는 기본적으로 동일한 유전자로 구성된다. 여기서는 MoMLV의 경우를 예로 나타내었다.

(2) 감염기작

Retrovirus는 우선 envelop 당단백질과 표적세포 수용체와의 특이적 결합을 통해 세포막에 흡착한 뒤 RNA genome을 함유하는 virus core를 세포내부로 방출시킨다. 세포내로 들어간 RNA genome은 자기 유래의 역전사효소에 의해 double strand DNA로 역전사된 후 숙주염색체로 integration되어 provirus가 되면 감염이 완료된다. Provirus DNA는 RNA로 전사되어 일부는 mRNA로서 또 일부는 RNA genome으로서 기능한다. 이것에 의해 숙주세포 내부에서 virus core가 형성되고 최종적으로는 envelop 당단백질을 표면에 갖고 있는 세포막을 파괴하면서 세포외로 방출(출아)된다(그림 2).

Retrovirus vector pDON-AI DNA에 대하여

(1) pDON-AI DNA에 대하여

pDON-AI DNA는 서울대학교 유전공학연구소의 김선영 교수팀[1]이 개발한 retrovirus vector이다. 본 vector는 LTR 이외에 MoMLV 유래유전자(*gag*, *pol*, *env* code 배열)을 가지며, 동시에 5'LTR의 U3영역이 Cytomegalovirus 유래의 promoter로 치환되어 있는 것이 특징이다. pDON-AI DNA를 이용하면 도입효율이 높은 고역가의 vector virus를 획득할 수 있다(그림 3).

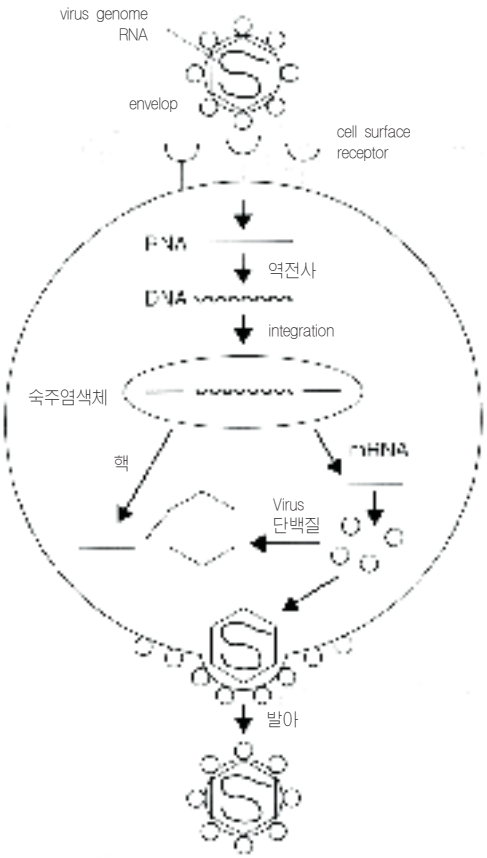


그림 2 Retrovirus의 생활환

야생형 retrovirus의 감염에서는 염색체에 삽입된 virus genome으로부터 새로운 virus 입자가 형성되고 이것이 세포외로 방출된다.

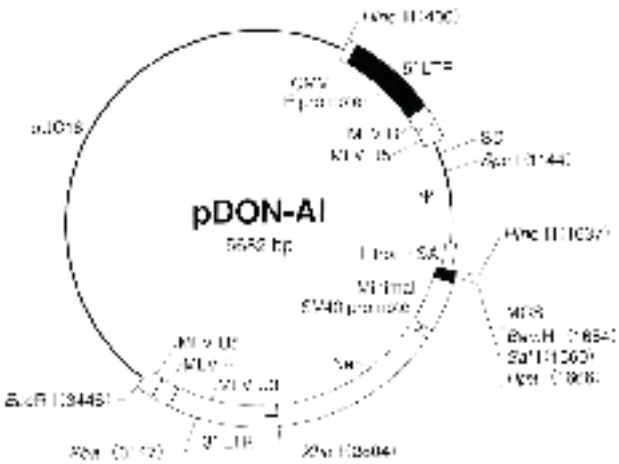


그림 3 pDON-AI DNA

(2) Retrovirus vector pDON-AI DNA를 이용한 유전자도입의 원리

Ψ배열을 제거한 provirus DNA(helper plasmid)가 도입된 세포에서는 provirus에서 생성한 RNA genome이 virus 입자내로 들어가지 않으므로 empty virus particle이 만들어진다. 이러한 세포들을 packaging cell이라 한다. Virus genome DNA의 양말단 LTR과 Ψ배열을 남긴 채 목적의 유전자를 삽입시킨 vector plasmid를 packaging cell에 도입하면 vector DNA가 숙주 염색체 내로 integration 된 후 전사에 의해 생긴 vector RNA genome(Ψ배열 함유)이 virus 입자내로 들어가 vector virus particle이 생성된다. 이와 같이 제작한 virus 생산 세포주(producer cell)는 감염성 virus vector를 생산하여 배지중에 방출시킨다. 획득한 고역가의 recombinant vector virus를 표적세포에 감염시킴으로써 목적의 유전자를 쉽게 도입할 수 있다[2,3](그림 4). 또 recombinant virus는 복제능력을 결손시킨 것이므로 helper phage가 혼입되어 있지 않는 한 감염표적세포로부터 virus particle이 새롭게 생산되는 일은 없다. pDON-AI DNA는 종래의 vector와는 달리 5'측 LTR의 U3영역에 HCMV의 IE promoter를 가지므로 vector RNA genome의 전사효율이 높아 고역가의 vector virus를 얻을 수 있다.

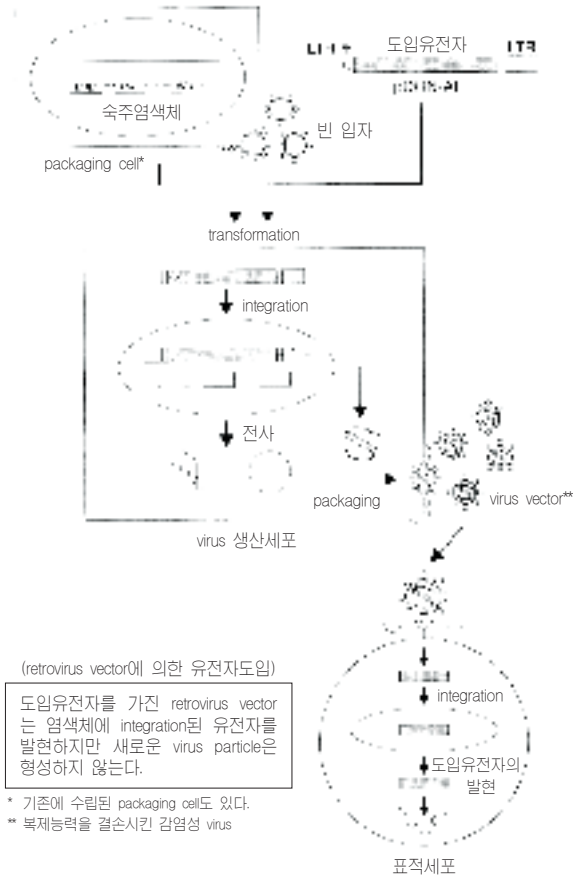


그림 4 재조합 retrovirus vector의 조제와 도입유전자의 발현

실험례 1: *LacZ* 유전자를 가진 DON-AI vector 를 이용한 vector virus 의 제작

[조작]

pDON-AI DNA의 *Bam*H I site에 *LacZ* 유전자를 삽입시켜 DON-AI *lacZ* vector를 제작하였다.

또 LXSN, ZipNeoSV 및 LXIN에도 동일한 유전자를 삽입하여 본 실험의 control vector로 사용하였다. *LacZ* 유전자를 삽입한 각 vector plasmid를 Bosc23 packaging cell[4]에 calcium-phosphate법으로 transfection하여 각각의 vector virus를 제작하였다. 획득한 vector virus를 polybrene의 존재하에서 NIH/3T3 세포에 감염시키고 2일 후에 X-gal 염색을 실시하여 각 vector virus의 역가를 비교하였다.

[결과]

DON-AI *lacZ* vector 를 이용한 경우에서는 다른 retrovirus vector의 경우에 비해 약 2~8배의 높은 역가를 가진 재조합 retrovirus를 얻을 수 있었다(표 1).

표 1 각종 vector에 의한 virus 역가의 비교

vector	virus 역가
LXSN *lacZ*	34.9
ZipNeoSV *lacZ*	12.5
LXIN *lacZ*	41.5
DON-AI *lacZ*	100

* : 각 vector를 단계희석하여 각각 일정한 수의 host cell에 감염시킨 후 형성된 G418 내성 colony 수를 측정하였다. DON-AI vector를 이용한 경우의 virus 역가를 100%로 나타내었다.

실험례 2: pDON-AI vector 를 이용한 다른 reporter 유전자의 발현

[조작]

pDON-AI, pMFG 및 pLXSN vector에 *lacZ* 유전자 또는 CAT 유전자를 삽입한 plasmid를 FLYA13 packaging cell에 transfection하여 vector virus를 조제하였다. *LacZ* 유전자에 대해서는 β-galactosidase(X-gal 염색)에 의해, CAT 유전자에 대해서는 CAT 활성측정으로 유전자 도입을 assay하였다. 또 marker 유전자로서 각 vector에 함유된 neomycin 내성유전자에 대해서는 G418 내성 colony의 출현 측정으로 평가하였다.

[결과]

이러한 도입 발현 실험에 있어서 pDON-AI vector를 이용한 경우 이미 높은 평가를 받고 있는 MFG vector와 비교하여도 동등 이상의 발현과 virus 역가를 나타내었다(표 2).

표 2 각종의 vector에 의한 reporter 유전자의 발현과 virus 역가의 비교

vector	reporter 유전자의 발현 (β-galactosidase 활성)	virus 역가 (X-gal 염색)
MFGneo *lacZ*	1.0	1.0
DON-AI *lacZ*	2.5±0.8	1.7
	(CAT활성)	(G418 내성)
MFGneo CAT	1.0	1.0
DON-AI CAT	0.9±0.5	0.9
LXSN CAT	0.5±0.4	1.0

* : 각각 MFGneo를 이용한 경우의 활성과 역가를 각각 1.0으로 한 상대표시.

참 고 문 헌

1) Kim, S. H., Yu, S. S., Park, J. S., Robbins, P. D., An, C. S. and Kim, S. (1998) *J. Virol.* **72**, 994-1004.
2) Miller, A. D. and Buttimore, C. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2895-2902.
3) Mann, R. C., Mulligan, R. C. and Baltimore, D. (1983) *Cell* **33**, 153-159.
4) Warren, S. P., Garry, P. N., Martin, L. S. and Baltimore, D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8392-8396.
5) I. Kato 감역 (1994)「동물세포의 유전자 공학」(TAKARA SHUZO CO., LTD)

■ Product list 및 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
pDON-AI DNA	3650	20 μg
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)		
	T100A	0.5 mg
	T100B	2.5 mg
RetroNectin® Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mmφ)		
	T110A	10 dishes

[본 제품의 사용상의 주의]

본 제품을 이용한 실험에 있어서는 아래의 사항에 주의하여 주시기 바랍니다.

- 사용시 관할 관청 및 기관 내 안전위원회의 재조합실험지침에 따라 실시해야 합니다.
- 본 제품은 연구목적 이외에는 사용할 수 없습니다. 사람, 동물의 치료 및 임상진단에는 사용하지 않도록 주의하여 주시기 바랍니다.

  (또한 본 제품에 의해 획득한 생물재료는 제 3자에 양도할 수 없습니다.)
- 본 제품을 연구목적 이외에 사용하는 경우는 사전에 당사로 문의해 주시기 바랍니다.

2. Adenovirus Expression System을 이용한 동물세포에의 유전자 도입

Adenovirus Expression Vector Kit　　TaKaRa Code　6150　1 Kit(5회용)

동물세포에의 유전자 도입법에는 virus vector를 이용하는 생화학적 방법, liposome이나 DEAE-Dextran, calcium-phosphate 등을 이용하는 화학적 방법 및 electroporation 등의 물리적 방법 등이 있다. 또 현재 이용하고 있는 virus vector에는 retrovirus vector, adenovirus vector, adeno associate virus vector 등이 있다. 그 중에서 adenovirus vector를 이용한 유전자 도입법은 일반적으로 다음과 같은 잇점이 있다.

(1) 고역가의 virus를 얻을 수 있다.

10^8~10^9 pfu/ml 정도의 바이러스액을 쉽게 얻을 수 있으며 10^{11} pfu/ml 정도까지 농축할 수도 있다. 따라서 접착성 세포의 경우 거의 100%의 세포에 유전자를 도입할 수 있다.

(2) 사람 뿐만 아니라 mouse・rat을 포함하여 폭 넓은 동물종에 이용할 수 있다.

(3) 증식세포 뿐만 아니라 정지기의 세포에도 감염 및 발현을 시킬 수 있다.

신경계를 포함한 다수의 분화・미분화 동물배양세포를 표적으로 사용할 수가 있고 또한 동물개체로의 직접 주입・투여에 의한 유전자발현이 가능하다.

그러나 지금까지의 recombinant adenovirus는 제작과정이 복잡할 뿐만 아니라 비효율적이었기 때문에 널리 사용되지는 못하였다. 동경대학 의과학연구소의 Izumi Saito 박사 등은 recombinant adenovirus의 제작법을 개량함으로써 종래 방법보다 수 십배의 효율로 recombinant adenovirus를 제작하는데 성공하였다(COS-TPC법)[1]. 본 고에서 소개하는 [Adenovirus Expression Vector Kit]은 COS-TPC법에 기초하여 recombinant adenovirus를 제작하기 위한 kit이다.

■ Adenovirus vector란

외래유전자를 삽입하기 위한 일반적인 adenovirus vector는 adenovirus 5형(Ad5)에 초기유전자 E1 및 E3를 결실시킨 것이다. E1이 결실되어 있으므로 통상의 세포에서는 증식할 수 없고 E1을 발현하는 293세포에서만 증식할 수 있다. Adenovirus vector에는 약 7 kb까지의 외래유전자를 도입시킬 수 있다. 또 293세포는 사람의 태아 신장세포에 Ad5의 E1유전자를 형질전환하여 수립한 세포주로서 E1을 항상적으로 발현한다.

■ COS-TPC 법이란

종래에는 recombinant adenovirus를 제작하기 위하여 adenovirus genome DNA와 목적유전자를 삽입한 plasmid를 이용하여 왔다. 본래 adenovirus genome DNA의 양말단에는 말단단백질(TP)이 결합되어 있지만 이 종래법에서 이용한 genome DNA에는 TP가 부착되어 있지 않았다.

TP가 부착되어 있지 않은 genome DNA는 virus particle을 형성하는 효율이 매우 낮기 때문에 recombinant adenovirus를 높은 효율로 얻기가 어렵다. COS-TPC법에서는 이 말단단백질이 결합되어 있는 genome DNA(DNA-TPC)와 목적유전자를 삽입한 plasmid를 이용하기 때문에 recombinant virus의 출현효율이 종래법보다 수십~수백배 높아졌다. 따라서 대부분의 경우에서 목적으로 하는 recombinant adenovirus를 확실하게 얻을 수가 있다.

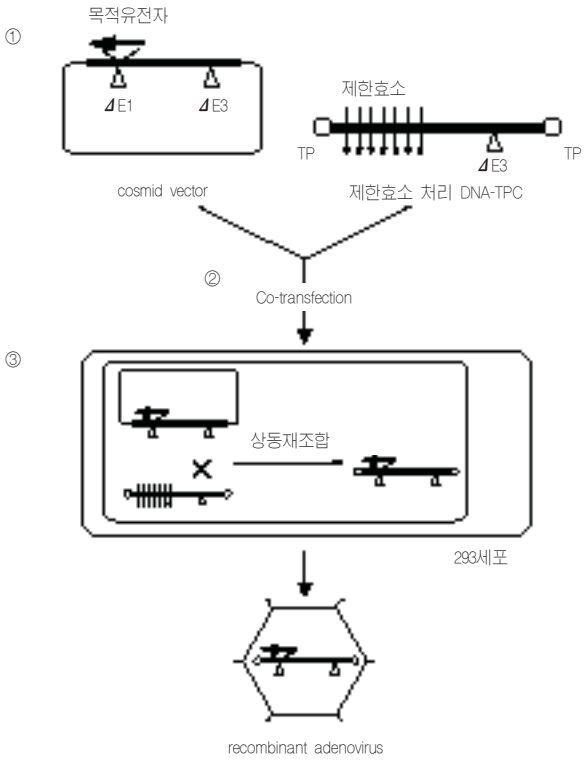


그림 1 COS-TPC법에 의한 recombinant adenovirus 제작법

① cosmid vector(adenovirus genome 함유)에 목적의 유전자를 삽입시킨다.
② 획득한 cosmid와 제한효소로 소화시킨 DNA-TPC를 293세포에 co-transfection한다.
③ 세포내에서 상동재조합이 일어나 recombinant adenovirus가 만들어진다.

■ 원리

우선 cosmid vector(adenovirus genome 함유)에 목적의 유전자를 삽입시킨다. 획득한 cosmid와 제한효소로 소화시킨 DNA-TPC를 293세포에 co-transfection하여 도입하면 세포 내에서 상동재조합이 일어나 recombinant adenovirus가 만들어진다. 통상 수십에서 수백주의 recombinant adenovirus주가 얻어지며 그 중 절반 이상은 목적의 recombinant adenovirus이다(그림 1).

■ 내용

1. 제한효소 처리 DNA-TPC		25 μl
2. Cosmid Vector pAxcw[*1]	0.3 μg/μl	25 μl
3. Cosmid Vector pAxCAwt[*2]	0.3 μg/μl	25 μl
4. 제한효소 *Swa* I	10 U/μl	40 μl
5. 10× H Buffer		1 ml
6. DNA Dissolution Buffer		100 μl
7. Ligation Solution		60 μl
8. 10× TNE		1 ml × 2개
9. Proteinase K	20 mg/ml	200 μl
10. 10% SDS		200 μl
11. Control Cosmid pAxCAiLacZ[*3]	0.4 μg/μl	20 μl

* 1 : promoter 없음[3]
* 2 : CAG promoter 함유[2,3]
* 3 : pAxCAwt에 βgal 유전자를 삽입시킨 것

Recombinant adenovirus의 제작을 위해서는 본 제품 이외에도 유전공학 및 세포공학 실험을 실시하기 위한 기본적인 시약 및 설비와 293세포, λ-packaging kit 등이 필요하다(상세한 것은 제품설명서 참조).

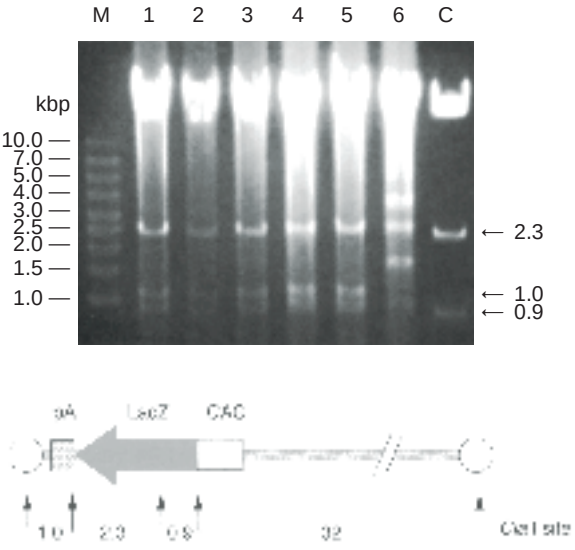


그림 2 Recombinant adenovirus의 확인

293세포에서는 다량의 recombinant adenovirus가 생산되므로 감염세포의 전체 DNA를 추출하여 제한효소로 처리함으로써 recombinant adenovirus를 확인할 수 있다. 여기서는 제한효소 *Cla* I으로 처리한 후 agarose gel 전기영동을 실시하였다. Lane 1~5에는 목적의 recombinant adenovirus가 존재한다. Lane 6에는 비상동성 재조합에 의해 발생한 것으로 생각되는 virus가 존재한다. Lane C는 cosmid pAxCAiLacZ, lane M은 DNA Marker(1-10 kb DNA Marker ; TaKaRa Code F50471)이다.

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
293 세포	B1215	4 ml
HeLa 세포	B7229	4 ml
DMEM	B2707	500 ml
L-Glutamine(200 mM)	B76051	20 ml
Penicillin-Streptomycin Mixture	B76021	100 ml
(Penicillin : 10,000 U, Streptomycin : 10,000 μg)		

실험례 1 : Recombinant adenovirus의 제작

본 kit 내에 들어있는 control plasmid pAxCAiLacZ (pAxCAwt에 *LacZ* 코드영역을 재조합시킨 것)을 이용하여 recombinant adenovirus를 제작하였다.

[조작]

Adenovirus Expression Vector Kit의 protocol에 따라 실시하였다.

[결과]

약 200의 recombinant adenovirus를 획득하였다. 이 중 임의로 6 clone을 선택하여 DNA를 추출한 후 제한효소 처리를 통해 확인한 결과 5 clone이 목적의 recombinant adenovirus였다(그림 2).

실험례 2 : Recombinant adenovirus의 감염과 발현

[조작]

실험례 1에서 얻은 recombinant adenovirus를 HeLa 세포에 moi 10으로 감염시키고 2일 후에 X-gal 염색을 실시하였다.

[결과]

거의 100%의 세포에서 β-galactosidase가 발현되고 있음을 관찰하였다(그림 3).

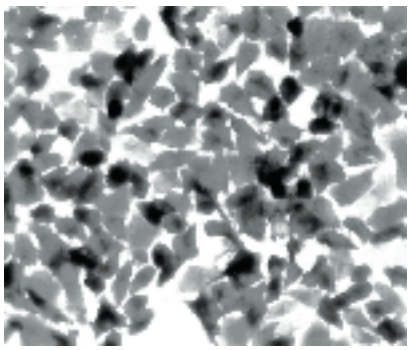


그림 3 Recombinant adenovirus의 감염과 발현

실험례 3 : 각종 배양세포에의 감염과 발현

이 실험은 COS-TPC법의 개발자인 동경대 의과학연구소의 Kanegae Yumi 박사 및 Saito Izumi 박사가 실시한 것이다.

[조작]

사람 간세포(HepG2), 원숭이 신장세포 (CV1), 고양이 신장세포(CRFK), mouse 태아유래 세포(NIH3T3), 그리고 사람 T-세포(Jurkat)에 *LacZ* 유전자를 함유하는 recombinant adenovirus를 moi 10(Jurkat만 moi 100)으로 감염시키고 2일 후에 X-gal 염색을 실시하였다.

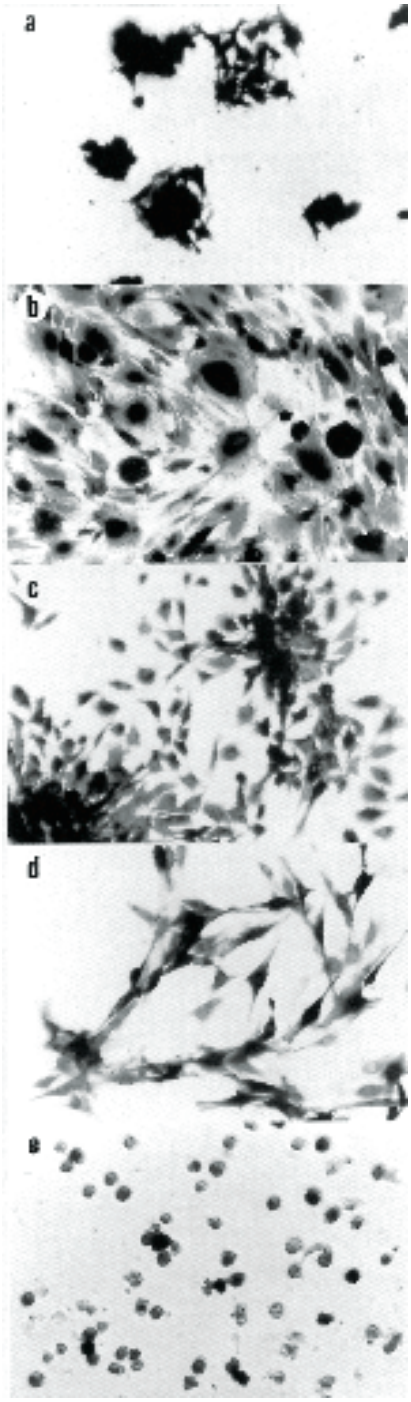


그림 4 각종 배양세포로의 감염과 발현

(a) HepG2, (b) Cv1, (c)CRFK, (d) NIH3T3, (e) Jurkat

[결과]

Recombinant adenovirus는 여기서 이용한 각종 세포에 대하여 높은 효율로 감염 및 발현하였다(그림 4).

참고문헌

COS-TPC법으로 제작한 recombinant adenovirus을 이용한 유전자 도입과 발현에 관한 문헌의 일부를 소개한다. Terada 등은 neurofilament M을 code하는 adenovirus vector를 이용하여 느린 축색운송의 관찰을 *in vivo*에서 실시하였다[4]. Yoshida 등은 각종 cytokine이나 증식인자를 code하는 adenovirus vector를 rat에 감염시켜 간질성 폐렴과의 상관관계를 조사하였다[5]. Ozaki 등은 adenovirus vector를 이용하여 암의 유전자 치료에 있어서 혈관 신생저해를 통한 새로운 방법을 모색하였다[6]. Hashimoto 등은 각종 promoter의 하류에 reporter 유전자를 연결시킨 adenovirus vector를 *in vitro*와 *in vivo*에서 신경세포에 감염시켜 cell-type에 따른 특이적인 발현을 조사하였다[7]. Kiwaki 등은 ornithine transcarbamylase를 발현시키는 adenovirus vector를 이용하여 OTC 결손증에 대한 유전자치료법의 개발을 실시하였다[8].

Tsukui 등은 transgenic animal의 제작에 adenovirus vector가 유용함을 보고하였다[9]. COS-TPC법과 관련해서는 Saito 등이 protocol과 사용법에 대하여 다수 보고하였다[10~14].

1) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1320.
2) Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) *Gene* **108**, 193.
3) Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., T. Sakaki, T., Sugano, S. and Saito, I. (1995) *Nucl. Acids Res.* **23**, 3816.
4) Terada, S., Nakara, T., Peterson, A. C. and Hirokawa, N. (1996) *Science* **273**, 784.
5) Yoshida, M., Sakuma, J., Hayashi, S., Abe, K., Saito, I., Harada, S., Saikatani, M., Yamamoto, S., Matsumoto, N., Kaneda, Y. and Kishimoto, T. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9570.
6) Ozaki, K., Yoshida, T., Ide, H., Saito, I., Ikeda, Y., Sugimura, T. and Terada, M. (1996) *Human Gene Therapy* **7**, 1483.
7) Hashimoto, M., Aruga, J., Hosoya, Y., Kanegae, Y., Saito, I. and Mikoshiba, K., (1996) *Human Gene Therapy* **7**, 149.
8) Kiwaki, K., Kanegae, Y., Saito, I., Komaki, S., Nakamura, K., Miyazaki, J., Endo, F. and Matsuda, I. (1996) *Human Gene Therapy* **7**, 821.
9) Tsukui, T., Kanegae, Y., Saito, I. and Toyoda, Y. (1996) *Nature Biotechnology* **14**, 982.
10) Y. Kanegae 등 (1994) 실험의학 증간 **12**(15), 1804.
11) Y. Kanegae 등 (1994) 세포공학 **13**(8), 757.
12) Y. Kanegae 등 (1996) 실험의학 별권「유전자 공학 handbook」, 238.
13) T. Saito 등 (1996) 바이오 매뉴얼 업 시리즈「유전자 치료의 기초기술」, 91.
14) T. Saito 등 (1997) 실험의학 별권「Protocol 시리즈 유전자 도입과 발현해석 실험법」, 27.
15) T. Saito 등 (1996)「유전자 치료의 기초기술」, 240

[본 제품 사용상의 주의]

본 제품을 이용한 실험에 있어서 아래의 사항에 주의하여 주시기 바랍니다.

- 사용시 관할 관청 및 기관내 안전위원회의 재조합실험지침에 따라 실시해야 합니다.
- 본 제품은 연구목적 이외에는 사용할 수 없습니다. 사람, 동물의 치료 및 임상진단에는 사용하지 않도록 주의하여 주시기 바랍니다(또한 본 제품에 의해 획득한 생물재료는 제 3자에 양도할 수 없습니다).
- 본 제품을 연구목적 이외에 사용하는 경우는 사전에 당사로 문의해 주시기 바랍니다.

TaKaRa
BIOMEDICALS

보현바이오메디칼주식회사
Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691
E-mail bohan@bohan.co.kr
URL www.bohan.co.kr

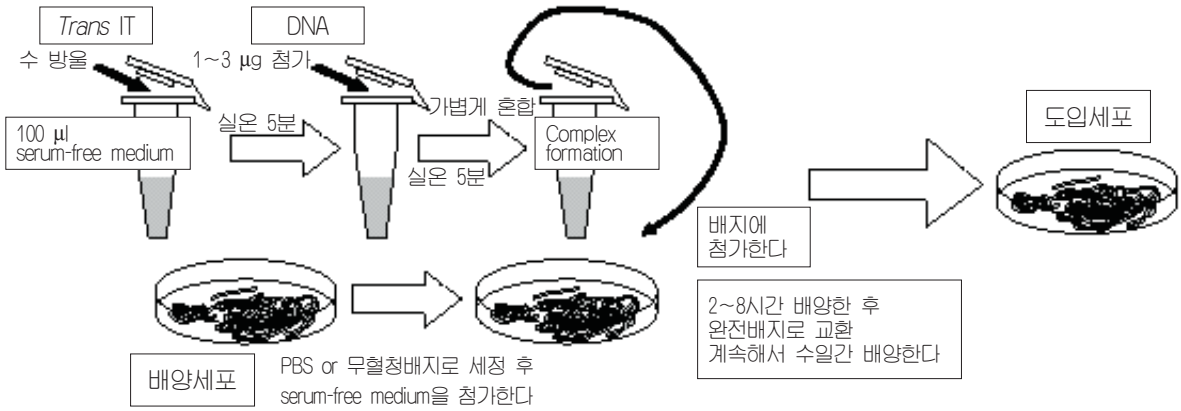
Trans IT™ 진핵세포용 유전자 도입시약

Polyamine Transfection Reagents

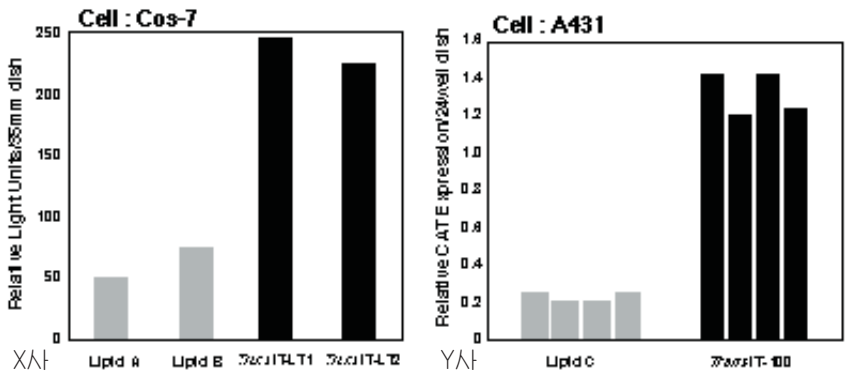
Trans IT™ Polyamine Transfection Reagents는 DNA와 RNA를 transfection으로 세포 내에 도입하는 데에 가장 적합한 시약입니다. 배양세포 내에 유전자를 도입하는 방법으로는 인산칼슘법, DEAE-dextran법 등이 있는데, 이들 방법에 비해 liposome법은 transfection 효율이 높고 조작이 간편하기 때문에 다수의 sample을 처리할 경우에 적합합니다. 이 시약은 종래의 liposome 시약과 비교해서 높은 transfection 효율을 얻을 수 있습니다. 또한 transfection시에 세포에 대한 독성도 종래의 시약과 비교해서 낮다는 사실이 확인되었고, transient 및 stable transformant를 획득할 수 있습니다.

● 특징 ●

1. 고효율로 DNA, RNA를 세포에 도입
2. Transient 및 stable transformant를 획득
3. 종래의 시약과 비교하여 낮은 세포독성



▶ 종래의 시약과 Transfection 효율 비교 ◀



▶ 제품 안내 ◀

제품명	TaKaRa Code
Trans IT™-LT1	V2310
Trans IT™-LT2	V2320
Trans IT™-100	V2100
50~200회의 transfection이 가능합니다. (35 mm dish)	
Trans IT™-Panpak	V2500
(조건검토용 3종 Set package)	

판매원

주식회사 녹십자양행
LS사업팀 Tel. 02-3471-7437(직) Fax. 581-0137
대전 Tel. 042-823-6957 Fax. 832-0821
대구 Tel. 053-959-3611 Fax. 959-6136
광주 Tel. 062-525-1155 Fax. 527-0821

(주)코아바이오시스템
Tel. 02-841-7530
Fax. 02-841-7531
수원 0331-284-8592
대전 042-622-2726

PCR에 의한 특정영역의 변이 검출 (2)

1. PCR-SSOP법

Shinichiro Yasunaga, Takehiko Sasazuki

HLA 유전자군은 사람의 유전자군 중에서 다형성이 아주 풍부한 것으로 알려져 있다. 필자 등은 임의 또는 이미 알고 있는 유전적 다형성을 검출하는 우수한 방법으로서 염기서열 특이적 probe(SSOP)를 이용한 hybridization법을 이용하여 *HLA* 유전자의 DNA를 typing하였다. 이 방법은 쉽고 간단한 기술이며, 정확하게 다수의 검체를 비교적 저렴한 비용으로 처리할 수 있다는 점이 PCR을 이용하는 다른 1 염기치환 검출법에 비해 가지는 장점이다.

서론

사람의 MHC class 중의 하나인 HLA 항원(human leukocyte antigen)을 code하는 유전자군은 6번 염색체 상에 cluster로 존재하여 고도의 다형성과 연쇄불평형의 존재에 따라 특징지워 진다. 필자 등은 한 종류 또는 복수의 대립유전자에 특이적인 oligonucleotide probe(sequence specific oligonucleotide probe:SSOP)를 합성한 후 이것을 nylon filter에 고정한 PCR 산물에 hybidization 함으로써 HLA의 DNA typing을 실시하는 시스템을 개발하였다[1~3]. PCR-SSOP법(또는 PCR-SSO법)은 기지의 유전적 다형성을 검출하는 데에 우수한 방법으로 다른 분야로의 응용도 용이하다. 본 고에서는 PCR-SSOP법의 실제에 대하여 설명한다.

I. 시스템의 설정

1. PCR에 의한 대상유전자의 증폭

PCR-SSOP법에서는 대상으로 하는 유전자 또는 대립유전자군에 특이적인 유전자를 증폭하는 것이 필수이다. 염기서열이 유사한 다른 기능성 유전자나 위유전자가 존재하는 경우에는 primer 서열과 목적으로 하는 유전자 서열의 상동성을 바꿀 필요가 있다. 즉 primer의 3'측의 1, 2염기에 mismatch가 있는 유전자는 증폭하기 어렵기 때문에 mismatch 부위를 primer의 3'측에 설정하여 특이적으로 유전자를 증폭하는 것이다. 유전자간 경합은 annealing 온도가 높고 PCR 완충액의 Mg^{2+} 농도가 낮을수록 특이성은 높아진다. 필자 등은 primer는 18~20염기로, GC 함량은 약 50%(T_m 값 54~60)로 설정하여 55℃의 annealing 온도에서 PCR하는 것을 표준으로 하고 있으나 최근에는 높은 T_m 값(60~80)과 높은 annealing 온도(65℃ 전후)에서 특이적 증폭이 일어나는 경우도 있다. 단, 사용하는 thermal cycler의 종류에 따라 반응조건이 다소 달라지는 경우가 있다. 따라서, 특이적 증폭의 반응조건을 설정하기 위해서는 각 연구실마다 예비실험을 충분히 거쳐야 한다. 주형 DNA로는 genome DNA나 cDNA 어떤 것도 상관없다.

필자 등은 최대 약 1200 bp 까지 PCR 산물을 얻은 경험이 있다 또 다수 검체의 반응성을 검토하는 경우, 필터에 dot되는 PCR 산물의 양이 극단으로 균일하지 않으면 판정이 곤란해지는 경우가 있으므로 안정한 PCR의 반응조건이 바람직하다.

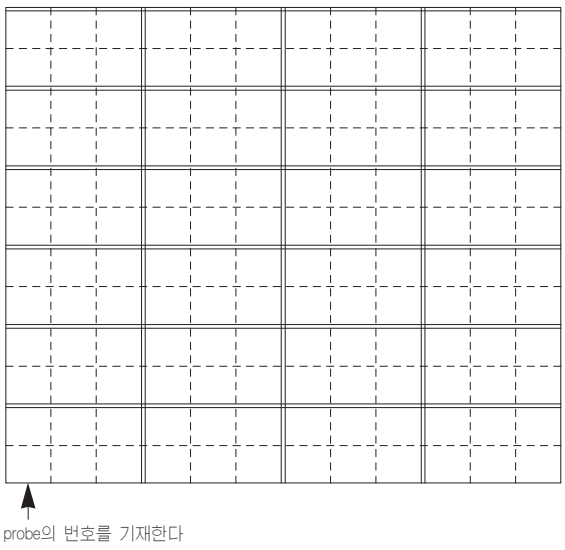


그림 1 dot용으로 인쇄된 nylon membrane

2. SSOP의 선택

종래의 PCR-SSOP법에서는 1염기의 차이를 인식하기 위하여 각 probe마다 다른 온도나 염농도 등의 hybridization 조

건을 설정하였다. 필자 등은 tetra methyl ammonium(TMAC)을 사용함으로써 SSOP의 염기 길이는 18염기로 통일하고 hybridization 온도는 54~55℃, 세정온도는 58~59℃로 하여 한꺼번에 hybridization을 실시하게 하였다. SSOP를 위한 염기서열을 선택할 때는 다음의 두가지 사항을 주의하여야 한다. 첫째, 다른 대립유전자와의 mismatch 부위를 가능한 한 SSOP의 중심 가까이에 설정하는 것이다. 18염기의 SSOP의 경우 양단의 3염기를 mismatch 부위로 설정하는 것은 절대 피하여야 한다. 둘째, SSOP 내에서의 self-annealing에 의한 2차구조의 형성이 5' 말단에서 일어나지 않도록 하는 것이다. 왜냐하면 polynucleotide kinase는 5' 돌출말단에서의 ^{32}P 전이 효율이 높기 때문이다. 예를 들어 SSOP의 5' 말단 2염기(예를 들면 GA)에 대응하는 염기서열(CT)이 3' 측에서 존재하지 않도록 설정한다. SSOP를 설정하는 방향은 sense 방향이나, antisense 방향, 어느 쪽도 상관없으므로 이상의 조건을 충족할 수 있는 방향으로 설정하는 것이 바람직하다.

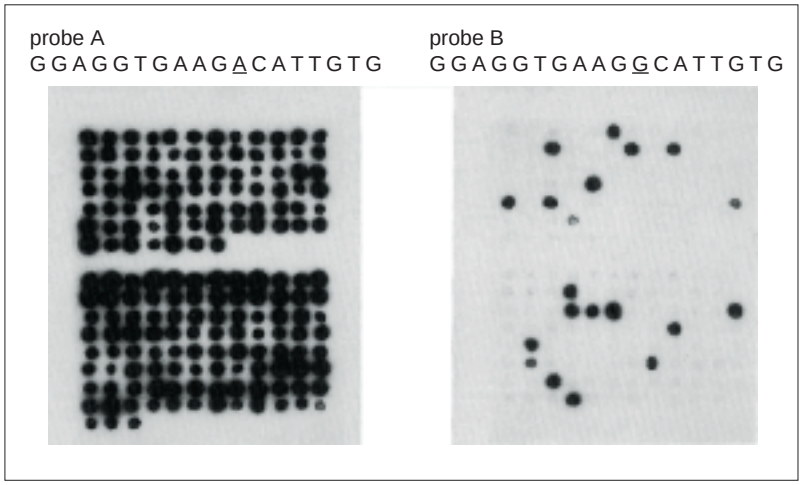


그림 2 hybridization의 일례

probe A는 모든 검체가 hybridize한다. 한편, total 21 검체가 probe B에 hybridize하여 이들의 검체는 대립유전자 A와 B의 이형접합체임을 알 수있다.

II. 실험법

1. PCR 산물의 filter에 부착

Pore size 0.45 ㎛의 nylon membrane(southern transfer에 사용하는 것과 동일)을 SSOP의 검체수에 따라 준비하여 10× SSPE(1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaH_2PO_4, 100 mM Na_2HPO_4, pH7.4)에 10분간 적신 후 30분 이상 실온에서 건조한다. Filter 위에 PCR 산물을 1~2 ㎕(25~50 ng) 떨어뜨린 후 실온에서 30분 이상 건조한다. 필자 등은 그림 1에 나타낸 것처럼 dot printer로 membrane에 6 mm의 사각형을 인쇄하여 1~2 ㎕의 0.5× 염색액을 PCR 산물과 혼합하여 떨어뜨렸다. 이어서 0.4 N NaOH에 5분간 적신 후(급하게 적시지 않도록 주의한다) 10× SSPE에 10분간 적신다. 65℃에서 1시간 건조하여(baking) DNA를 membrane에 완전히 고정한다. 실온에서 한나절 이상 건조하여도 무방하므로 완전히 건조하는 것이 바람직하다.

2. SSOP의 표식

SSOP(5 pmol)를 50 mM Tris-HCl(pH7.6), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DDT 속에서 20 pmol(2220 kBq)[γ-^{32}P] ATP와 혼합하고, 20 unit의 T4 polynucleotide kinase를 첨가하여(최종 반응액량은 25 ㎕로 한다) 37℃에서 30분~1시간 반응한다. 이어서 75 ㎕의 20 mM EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 반응을 정지한 다음 probe로 사용한다.

3. Hybridization과 세정

Membrane을 hybridization 용액(0.1% SDS, 5× Denhardts 용액, 2 mM EDTA(pH 8.0), 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl(pH8.0), 100 ㎍/ml 변성 salmon sperm DNA)에 담긴 plastic bag 속에 넣어 54~55℃에서 1시간 이상 정치한다(prehybridization). 조제한 probe(total 100 ㎕)를 hybridization 용액에 첨가한 다음 54~55℃에서 1~3시간 진탕하면서 반응한다. Bag에서 membrane을 꺼내고 실온에서 2× SSPE, 0.1% SDS로 10분간 2회, TMAC 용액(0.1% SDS, 2 mM EDTA, 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl(pH8.0))으로 10분간 1회, 58~59℃에서 TMAC 용액으로 10분간 2회 세정한다. 마지막으로 2× SSPE로 5분간 세정한 뒤 실온에서 30분간 건조한다. 통상 autoradiography는 실온에서 1시간~한나절 실시한다(그림 2). DNA를 고정한 membrane은 dehybridization함으로써 반복하여 사용할 수 있다. Dehybridization은 사용한 membrane을 0.4 N NaOH 속에 42℃에서 20분간 정치한 후 dehybridization 용액(0.2 M Tris/HCl(pH8.0), 0.1× SSPE, 0.1% SDS)에 20분간 정치함으로써 실시된다.

맺음말

PCR-SSOP법의 시스템 설정과 실제법에 대하여 개설하였다. 필자 등은 SSOP의 표식에는 ^{32}P에 의한 방사선표식을 주로 이용하지만, 비방사선표식에 의한 검출 방법도 개발되어 있다. 가장 빈번하게 이용하는 것은 biotin-dUTP를 이용하여 SSOP를 표식하여 avidin-ALP로 검출하는 방법이다. 그러나 방사선표식에 비하여 cross-hybridization에 의한 background가 높아서 문제가 되는 경우가 많아, SSOP의 염기길이나 서열을 신중히 검토할 필요가 있다. 또한 다수 검체의 다수 SSOP에 대한 반응성을 검토해야 하는 HLA의 DNA typing에서는 SSOP를 membrane이나 microtiter plate에 고정해 두고 PCR 산물을 비방사성으로 표식한 후 hybridize하는 PCR-SSOP법의 개량법[PCR-RD(reverse dot)법, PCR-MPH(microtiter plate법)]도 개발되었다.

이들 방법은 hybridization 및 결과의 해석이 모두 기계화되어 매우 신속하고 간단하게 typing이 가능해졌다.

참고문헌

1) Kimura, A., Sasazuki, T. : *in* HLA 1991 : Proceedings of the Eleventh International Workshop and Conference (ed. Tsuji, K. *et al.*), Vol. 1, pp. 397-419, Oxford University Press, Oxford (1992)
2) Date, Y., Kimura, A., Kato, H., Sasazuki, T. : *Tissue Antigens*, in press (1995)
3) Yasunaga, S., Kimura, A., Hamaguchi. K., Ronningen, K. S., Sasazuki, T. : *Tissue Antigens*, in press (1995)

2. GC cramp를 부가한 DNA fragment의 DGGE

Chiyoko Satoh, Norio Takahashi

변성제의 농도 기울기를 부가한 polyacrylamide gel로 약 500 bp의 DNA fragment를 전기영동하는 DGGE에서는 double strand DNA상에 일어나는 1염기의 치환 및 수십 염기쌍까지의 삽입, 결실 등의 변이를 용이하게 검출 할 수 있다. DNA 서열을 PCR로 증폭할 때에 그 일단에 GC cramp를 부가하여 DGGE를 실시하면 변이의 검출효율은 이론적으로는 100%가 된다. 이 PCR-DGGE법은 재현성도 좋아 screening에 적합하다. 융해지도를 참고로 하여 검사하고자 하는 서열의 절단점을 결정하면 변이 검출확률을 높일 수가 있다.

서론

변성제 농도 기울기 겔 전기영동법(denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE)은 double strand DNA 상의 1염기 치환 및 수십 염기쌍까지의 삽입, 결실 등의 작은 변이를 높은 효율로 검출하는 방법이다[1, 2]. 해석하고자 하는 DNA 서열(target)을 PCR로 증폭하여 DGGE를 실시하는 PCR-DGGE법[3~5]에서는 ethidium bromide 염색으로 DNA 밴드를 검출하므로 방사성 동위원소를 필요로 하지 않는다. 또한 target을 증폭할 때 말단에 GC rich한 염기서열(GC cramp)을 부가할 수 있으므로 변이의 검출확률은 이론적으로 100%가 된다[6]. mRNA상의 변이는 mRNA를 역전사효소에 의하여 cDNA로 변환한 후 PCR-DGGE를 실시하여 검출한다. 재현성이 매우 높으며 최적조건으로 설정하면 99% 이상의 확률로 양호한 영동패턴을 얻을 수 있다. 이 방법은 통상의 실험실 내에서도 간편하게 할 수 있는, 효율이 좋은 screening법이다[7].

한편 염기서열에 대한 정보가 없는 DNA상의 변이[8]나 methyl화의 정보[9]가 필요한 때에는 genome DNA를 약 500 염기쌍의 fragment로 절단한 후 DGGE를 실시하는 방법[10](gDGGE)도 있다.

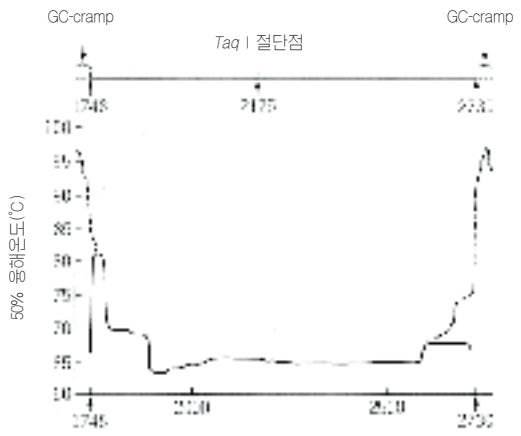


그림 1 human 혈액응고 제 IX인자 유전자(*F9*) 단편의 융해지도

실선은 *F9*의 GenBank 염기서열 번호 1748-2730간의 DNA fragment(938 bp)의 융해지도. 이 fragment의 5'측, 3'측의 쌍방에 40 bp의 GC cramp[8]를 부가하여 1063 bp의 서열로 한 경우의 융해지도는 점선으로 표시한 형태로 변화한다. 융해지도상에 표시한 실선은 서열번호 1748-2730간의 DNA fragment를 나타내며 그 양단의 점선은 GC fragment를 나타낸다. 2175 위치는 *Taq* I 절단점이다.

Ⅰ. 원리[11]

Double strand DNA는 온도상승에 따라 2중 나선구조가 부분 융해를 거쳐 완전히 분리된 random coil 형태의 single strand로 천이한다. 연속한 20~300개의 염기쌍이 비교적 좁은 온도범위에서 2중나선에서 random coil로 변환하는 경우이를 domain이라 하는데 그 형성과 융해온도(T_m)는 염기서열에 의존한다. DNA의 염기서열에 대응하는 T_m을 blot한 것이 융해지도(melting map)이다.

그림 1은 Lerman 등의 컴퓨터 프로그램[12]을 이용하여 작성한 것인데, 각 염기쌍이 2중 나선구조와 random coil 구조 사이에서 50:50의 평형을 취하는 온도를 나타내고 있다. 이 융해지도의 모양으로부터 변이분리의 가능성을 예측할 수 있다. DNA 분자의 구조변화는 polyacrylamide gel 전기영동에서 DNA 분자의 이동도로 나타난다. 즉, 일부에서는 2중나선 구조를 취하고 일부에서는 single strand로 해리된 DNA 분자의 이동도는 완전한 2중나선분자나 single strand DNA에 비하여 아주 늦다. 열에 대한 안정성과 변성제에 대한 불안정성은 거의 동등하다. Lerman 등은 이 원리를 이용하여 변성제(urea와 formamide)의 농도기울기를 준 polyacrylamide gel 속에 DNA fragment를 전기영동하는 DGGE법을 개발하였다[1, 2]. 단일 염기치환 등의 작은 변이는 변이를 포함하는 domain의 T_m을 상승 또는 하강시킨다. T_m이 낮은 염기서열을 갖는 fragment는 T_m이 높은 fragment에 비하여 낮은 변성제 농도(보다 원점에 가까운 위치)에서 부분 해리되고 이동도가 현저하게 감소하므로 변이의 유무에 따라 DNA fragment를 서로 분리할 수 있다. 그러나 T_m이 가장 높은 domain 중에 변이가 존재하면, 융해후 생기는 single strand DNA의 이동도에는 변이의 유무에 따라 차이가 생기지 않으므로 양자가 분리되지 않는다. Myers 등은 GC cramp를 target 배열에 연결하면 이 부분이 T_m이 가장 높은 domain이 됨을 이용하여 이같은 문제점을 극복하였다[3~6].

그림 2에 PCR-DGGE의 개략을 모식도로 나타내었다. 정상형 동형접합(A) 및 변이형 동형접합(C)의 DNA로부터 증폭된 fragment는 각각 이동도가 다른 homoduplex가 된다. 한편 정상형 및 변이형의 이형접합 DNA(B)의 경우에는 정상형과 변이형의 두 종류의 homoduplex만이 아니라 PCR 도중에 두 종류의 heteroduplex도 생성한다. 이 때문에 영동조건이 적당한 경우에는 모두 4개의 밴드가 관찰된다. Mismatch가 존재하는 heteroduplex는 불안정하며 homoduplex의 밴드보다 항상 이동도가 늦다. 따라서 homoduplex끼리는 분리하지 않는 조건하에서도 검출이 가능하여 변이 검출효율을 향상시킬 수 있는 잇점이 있다.

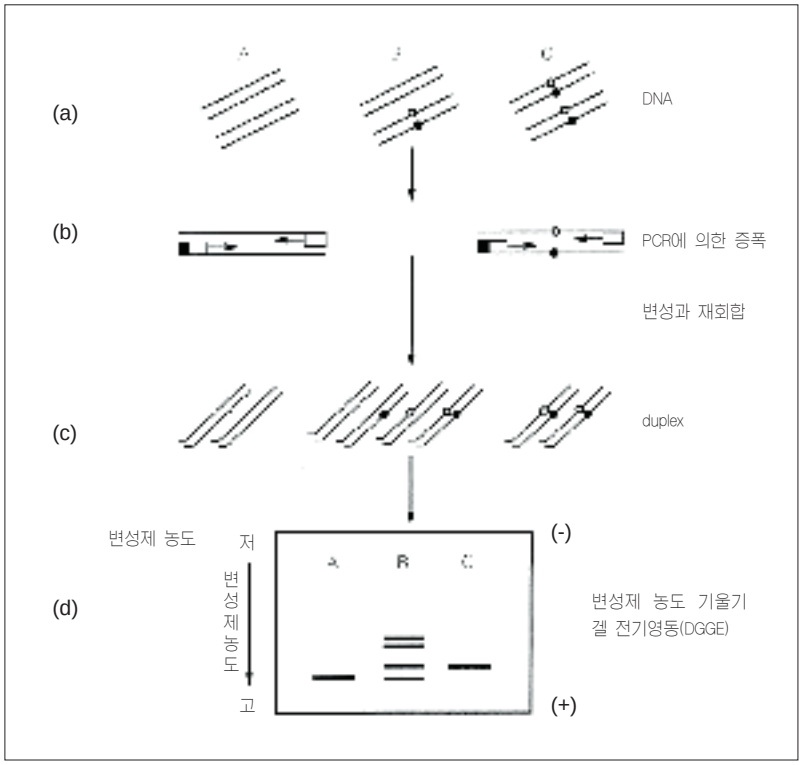


그림 2 PCR 증폭 DNA fragment의 DGGE(PCR-DGGE)의 모식도

(a) A: 정상형 동형접합 DNA, B:정상형 및 변이형의 이형접합 DNA, C:변이형 동형접합 DNA, ●, ○:DNA상의 변이(치환, 결실, 삽입 등),(b) ■□→: 5'측 primer(흑색부분은 GC cramp를 나타낸다, ←□: 3'측 primer, (C) 정상형 homoduplex, 두 종류의 heteroduplex, 변이형 homoduplex, 횡선부분은 GC cramp를 나타낸다, (d) 평행 DGGE 패턴의 모식도; (-)(+)는 음극, 양극을, 겔의 좌측화살표는 변성제 농도의 증가방향을 나타낸다.

Ⅱ. GC cramp를 부가한 DNA fragment의 DGGE

1. PCR

5'측에 GC cramp를 부가한 primer를 이용하여 PCR을 실시한다. 필자 등도 40 bp의 cramp[3]를 사용하였으나[7] Abrams 등이 29 bp의 cramp로 성공적인 결과를 얻은 이후[13] 현재는 5'-GCCCCCCGTCCCCGACCGCCCCGCACGCCG-3'을 사용하고 있다.

2. 평행 DGGE와 수직 DGGE

변성제의 농도기울기의 방향과 전기영동의 방향을 평행으로 하는 평행 DGGE(parallel DGGE)는 다수의 시료를 동시에 검사할 수 있으므로 screening에 적합하다. 한편 서로 수직이 되는 수직 DGGE(perpendicular DGGE)를 이용하면 target이 융해되기 시작하는 변성제의 농도와 2종류 이상의 duplex가 분리되는 변성제의 농도범위에 관한 정보를 얻을 수 있다[14]. 필자 등은 이러한 정보도 이용하여 수직 DGGE의 조건을 설정하고 있다. 수직 DGGE는 최적조건 설정을 위한 예비실험이 필요없으므로 소수 시료 중의 변이의 유무를 신속하게 검출하는데 좋은 방법이다.

3. PCR-DGGE법의 장치 및 영동법[15]

영동장치는 Fisher 등[1]의 문헌을 참고로 개조한 특수 주문품이다. 그외의 장치(gradient maker, 항온수조, power supply, pelister pump)는 모두 시판품을 사용할 수 있다. TAE 완충액(40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, acetic acid로 pH7.4로 조정)중 acrylamide의 총 농도는 6.5% 또는 12%(T=6.5% 또는 12%)로 가교도는 C=2.6%(acrylamide/bisacrylamide=30/0.8)로 하여 변성제 농도에 직선 기울기가 되도록 만든다. 40%(v/v) formamide, 7 M urea를 함유하는 용액을 100%의 변성제농도로 정의한다.

전기영동은 영동조를 60℃의 항온조에 부착하여 가온한 양극액에 겔판 전체가 잠기도록 함으로써 겔의 온도를 60℃로 유지한다. 겔 상부의 음극액과 양극액을 pelister pump로 순환시켜 완충액의 pH를 유지시킨다. 150V에서 17시간동안 영동한 후 겔을 ethidium bromide로 염색한다.

4. 평행 DGGE의 영동조건의 설정

변이의 검출여부는 target의 성질(길이, domain의 수와 T_m)과 전기영동의 조건에 따라 결정된다. 필자 등의 경험으로는 350~700 bp의 fragment 내의 변이가 가장 높은 검출율을 나타내었다. 또한 융해지도에서 5'이나 3'측의 어느 한쪽의 융점이 높고, L자형 또는 역 L자형을 나타내는 경우에는 sharp한 밴드를 얻을 수 있어, 아주 작은 이동도의 차이도 검출할 수 있다. GC cramp를 target에 도입하는 경우에도 이점에 유의해야 한다. 그림 1의 fragment와 같이 중앙 domain의 T_m이 낮은 U자형의 경우는 밴드의 폭이 커져 변이의 검출이 곤란해진다. 그러나 이 fragment를 중앙에서 절단하면 생기는 두 개의 약 500 bp 밴드가 각각 L자형과 역 L자형의 융해지도를 나타낸다. 실제로 필자 등은 이들 두 개의 각 fragment에 의존하는 C→T 변이를 검출하였다[7](그림 3). 더구나 이 방법은 screening의 효율상승과 비용절감에도 도움이 된다. 필자 등은 영동조건을 아래와 같이 결정하였다. 즉, 2~3 kb target의 양단에 GC cramp를 도입하도록 PCR한 후에 수 종류의 제한효소로 절단한다[7]. 가능한 한 다수의 fragment가 변이검출에 적합한 융해지도를 나타낼 수 있도록 제한효소를 조합한다. 이 fragment를 4종류의 겔(T=12%, 6.5%와 변성제 농도 0~100%, 20~60%의 조합)로 영동하여 최적 영동조건을 결정한다. 수직 DGGE를 실시하여 sigmoid curve 중심점의 변성제 농도가 ±20%인 겔로 영동하는 것도 좋은 방법이다[2].

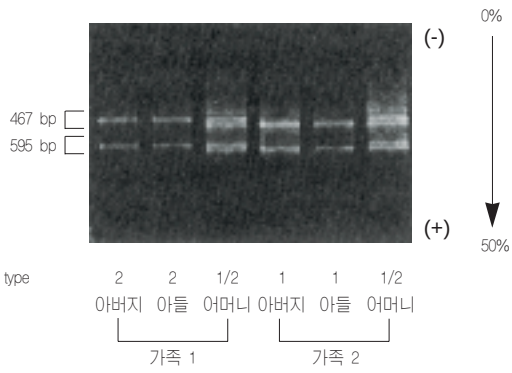


그림 3 GC cramp를 부가한 human 혈액응고 제 IX인자 유전자(*F9*) fragment의 DGGE 상

그림 1의 융해지도에 나타낸 1063 bp의 DNA fgagment를 두 개로 절단하여 얻은 DGGE상이다. *F9*의 983 bp fragment(GenBank 염기서열 번호 1748-2730 사이)의 양단에 40 bp의 GC fragment[3]가 부가되도록 PCR하여 생성된 1063 bp fragment를 *Taq* I을 사용하여 2개의 fragment(467 bp와 596 bp)로 절단한 후 DGGE를 실시하였다(*T*=12%, 농도 기울기 0~50%). *F9*는 X 염색체상의 유전자이다. 두 개의 fragment 중의 변이는 서로 연쇄하고[7] 있어, 두 개의 밴드가 set로서 빠른 이동도를 갖는 경우를 type 1, 그와 반대로 set로서 늦은 경우를 type 2로 명명하였다. 가족 1의 아버지와 아들은 type 2, 가족 2의 아버지와 아들은 type 1의 hemizygote이며 두 가족의 어머니는 모두 type 1과 type 2의 heterozygote(1/2로 나타냄)이다. sequence 분석 결과, type 1에서는 1780 위치 및 2268 위치가 C인 것에 비하여 type 2에서는 두 잔기 모두 T임을 확인하였다.

맺음말

DGGE법은 DNA 분자의 안정성이 염기서열에 따라 다르며 불과 1염기의 차이가 안정성의 변화로서 전기영동의 이동도로 반영되는 것을 이용한 변이검출법이다. PCR법에 의해 GC cramp를 target에 도입할 수 있게 되어 검출확률이 높고 간편하게 되었다. 같은 원리를 이용한 것으로는 온도 기울기를 갖는 gel 상에서 영동하는 온도기울기 겔 전기영동법(TGGE)과 항온도 변성제 겔 전기영동법(CDGE)이 있다. 후자는 기지의 변이를 검출하기 위한 최적 변성제 농도에서 다수의 검체를 screening하여 그 변이의 유무를 검사하는 방법이다.

참고문헌

1) Fischer, S. G., Lerman, L. S. : *in* Methods in Enzymology(ed. Wu, R.), Vol. 68, pp. 183-191, Academic Press, New York (1979)
2) Myers, R. M., Maniatis, T., Lerman, L. S. : *in* Methods in Enzymology (ed. Wu, R.), Vol. 155, pp. 501-527, Academic Press, New York (1987)
3) Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., Myers, R. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 232-236 (1989)
4) Sheffield, V. C., Cox, D. R., Myers, R. M. : *in* PCR protocols (ed. Innis, M. A.), pp. 206-218, Academic Press, New York (1990)
5) Myers, R. M., Sheffield, V. C., Cox, D. R. : *in* PCR technology (ed. Erlich, H. A.), pp. 71-88, Stockton, New York (1989)
6) Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., Maniatis, T. : *Nucl. Acids Res*., **13**, 3131-3145 (1985)
7) Satoh, C., Takahashi, N., Asakawa, J., Hiyama, K., Kodaira, M. : *Am, J. Hum. Genet*., **52**, 167-175 (1993)
8) Burmeister, M., diSibio, G., Cox, D. R., Myers, R. M. : *Nucl. Acids Res*., **19**, 1475-1481 (1991)
9) Collins, M., Myers, R. M. : *J. Mol. Biol*., **198**, 737-744 (1987)
10) Gray, M., Charpentier, A., Walsh, K., Wu, P., Bender, W. : *Genetics*, **127**, 139-149 (1991)
11) Lerman, L. S., Fischer, S. G., Hyrley, I., Silverstein, K., Lumelsky, N. : *Ann. Rev. Biophys. Bioeng*., **13**, 399-423 (1984)
12) Lerman, L. S., Silverstein, K., : *in* Methods in Enzymology (ed. Wu, R.), Vol. 155, pp. 482-501, Academic Press, New York (1987)
13) Abrams, E. S., Murdaugh, S. E., Lerman, L. S. : *Genomics*, **7**, 463-475 (1990)
14) C. Saito 등 : 대사, **28**, 731-739 (1991)
15) N. Takahashi : 일본임상, **52** (특별호), 467-473 (1994)

3. RNase protection법

Akira Horii

유전자 변이를 확인하기 위해서는 염기서열을 조사하지만 그 효율을 높이기 위하여 1차 screening을 실시한다. RNase protection법은 그 하나의 방법으로 다소 시간이 걸리지만 PCR artifact의 영향을 적게 받으며 감도가 좋은 점 등의 장점이 있다. RNase protection법 이외에도 몇가지 방법이 1차 screening에 이용되고 있으나 각 방법의 장단점을 잘 이해한 후에 적절한 방법을 선택할 필요가 있다.

서론

의학이 발달함에 따라 보다 많은 질환의 원인을 유전자 수준에서 밝히는 시대가 도래하였다. 후보유전자가 어떤 질환의 원인 유전자인지 확인하려면 몇가지 사항을 증명할 필요가 있다. 예를 들면 유전자 이상에 의하여 유전자산물에 중대한 변화가 생겨 정상적인 기능을 발휘할 수 없게 되고, 이 유전자 이상이 그 질환에 특이적이라는 것을 증명하는 것 등이다. 유전자 이상을 확인하려면 염기서열을 조사할 필요가 있는데, 후보유전자의 전염기서열을 모든 환자를 대상으로 조사하는 것은 상당한 시간과 노력이 필요하기 때문에 일반적으로는 1차 screening을 먼저 실시한다. 1차 screening 방법 중 현재 자주 이용되는 것으로는 RNase protection법[1, 2]이 있고 이외에도 SSCP(single strand conformation polymorphism)법, DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)법, IVSP(*in vitro* synthesized protein)법 등이 있다. 이들 방법에는 각각 장단점이 있다. RNase protection법의 장점으로는 PCR artifact의 영향을 거의 받지 않고, 감도가

좋다는 점 등을 들 수 있다. 반면에 시간이 걸리고 모든 유전자의 이상을 검출할 수 없다는(효율 약 70%)점 등의 단점도 있다. RNase protection법으로 mRNA의 정보도 얻을 수 있지만 본 고에서는 1염기의 차이를 검출하는 방법으로서의 RNase protection법에 대하여 설명한다.

표 1 RNase protection법에 사용하는 시약류

(A) RNase protection 반응 buffer	
(1) Hybridization용 buffer(최종농도)	
40 mM Pipes (pH 6.4)	
1 mM EDTA	
0.4 M NaCl	
80% Formamide	
(2) RNase A buffer(최종농도)	
0.2 M NaCl	
0.1 M LiCl	
0.02 M Tris(pH 7.5)	
1 mM EDTA	
(B) RNA probe 제작용 시약류	
주형 DNA(200~400 ng)	x μl
5 X Transcription buffer	4 μl
100 mM DTT(dithiothreitol)	2 μl
RNase Inhibitor(40 U/μl)	1 μl
10 mM ATP	1 μl
10 mM GTP	1 μl
10 mM CTP	1 μl
1 mM UTP	1 μl
[α-^{32}P]UTP (800 Ci/m mole)	4 μl
(T3 또는 T7) RNA poylmerase	1 μl
DEPC 처리수	y μl
Total	20 μl

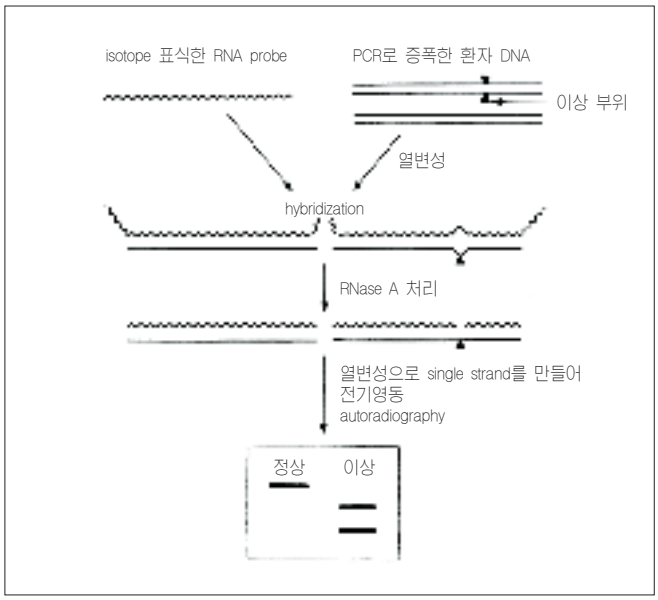


그림 1 RNase protection법의 원리

I. RNase protection법의 원리

RNase protection법의 원리를 그림 1에 나타내었고, 현재 널리 이용되고 있는 PCR법과 병용한 것에 대하여 설명한다. 또 표 1에는 RNase protection법에서 사용하는 시약을 정리하였다. 우선 조사하고자 하는 영역에 대응하는 정상의 염기서열을 갖는 RNA probe를 제작하고, 이 probe와 조사하고자 하는 핵산(일반적으로는 환자의 혈액이나 암조직 등에서 추출한 DNA나 RNA를 PCR로 증폭한 산물)을 hybridize한다. 만약 염기치환 등이 존재하면 그림 1에 나타낸 바와 같이 mismatch가 생기므로 RNase를 작용시키면 mismatch 부분에서 절단하기 때문에 전기영동에 의하여 extra 밴드로서 검출된다.

II. RNA protection법의 실제

1. Probe의 제작

먼저 정상 염기서열을 plasmid에 cloning한다. 이 때 cloning 부위의 양측에 clone화 한 plasmid를 한 부위만 절단하는 제한효소 인식부위와 RNA polymerase의 promoter 서열이 존재하도록 한다. 필자 등은 통상 pBluescript II SK(-)를 이용한다(이 경우 cloning 부위는 polylinker 내부에 있으며, 그 양측에 T3, T7 promoter 서열이 있다). 그림 2에 T3 promoter측으로부터 probe를 제작한 예를 나타내었는데 T7 promoter측의 probe도 동일한 방법으로 제작할 수 있다. Probe가 만들어지면 RNase free-DNase I을 이용하여 plasmid DNA를 분해해 둔다.

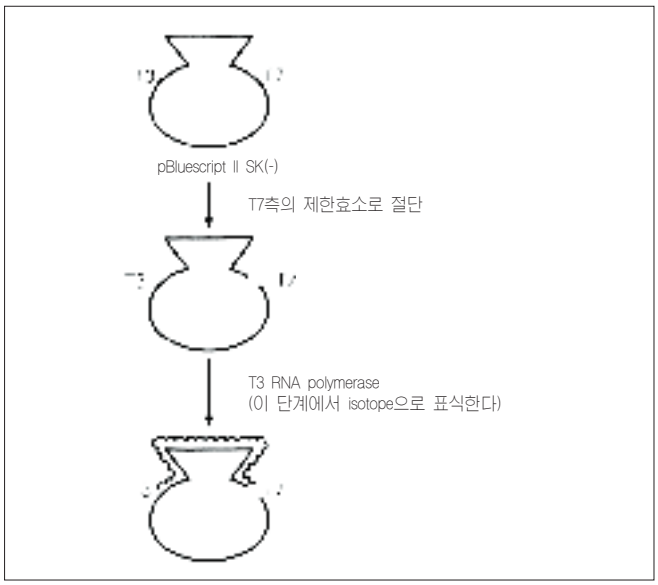


그림 2 RNA probe의 제작

그림은 T3 probe의 경우

2. PCR

조사하고자 하는 영역의 DNA 또는 RNA를 PCR로 증폭한다. 필자 등의 경험으로는 약 400 bp의 PCR 산물까지는 높은 효율로 염기서열의 이상을 검출하였다. PCR을 실시할 때 다소의 artifact가 존재하여도 RNA probe와는 hybridize하지 않으므로 목적의 영역이 충분히 증폭되었으면 진행해도 된다. PCR이 완료되면 산물을 전기영동으로 확인한 후, 이 중 1 μl를 취하여 RNase protection 반응을 실시한다.

3. RNase protection 반응

PCR 산물 1 μl와 RNA probe를 buffer 속에서 50℃, 2시간 이상 hybridization 한다. 30~60분간 RNase A로 처리한 다음 proteinase K, phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 처리하고 변성 polyacrylamide gel로 전기영동하여 autoradiography로 이상

의 유무를 조사한다. 그림 3에 실례를 나타내었다. RNase A는 모든 mismatch를 검출하지는 못하므로 T3과 T7측으로부터의 양방향 RNase protection 반응을 실시함으로써 검출효율을 높일 수 있다. 실제로 그림 3의 A(T3측)에서는 이상이 검출되었으나 B(T7측)에서는 이상이 검출되지 않았다.

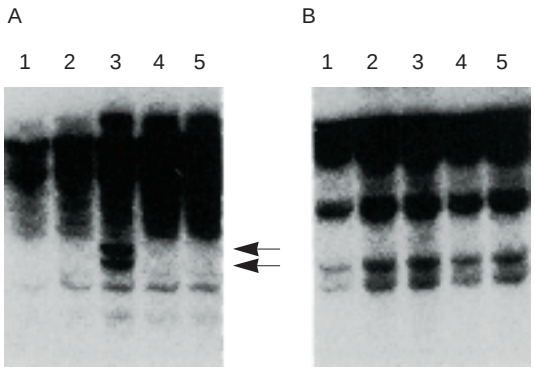


그림 3

(A)는 T3측, (B)는 T7측으로부터 RNA probe로 반응한 것이다. T3측에서는 lane 3의 시료에 이상 밴드(화살표로 표시)가 확인되었다.

4. 염기서열의 결정

RNase protection 반응에서 이상 밴드가 검출된 경우에는 염기서열을 조사하여 의미가 있는 이상인지의 여부를 판정한다. 그림 3에서 관찰된 이상 밴드(lane 3)의 염기서열을 그림 4에 나타내었다.

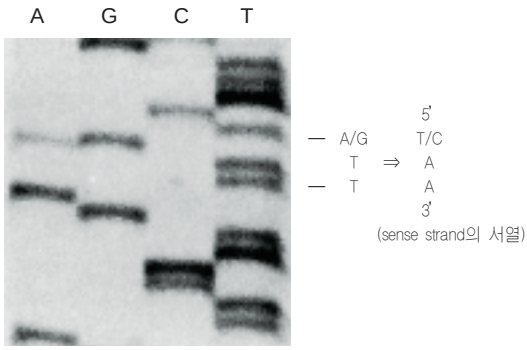


그림 4 Lane 3 시료의 염기서열

Antisense의 염기서열을 나타낸 것인데 정상인 sense strand에서의 CAA 부위가 TAA (nonsense mutatin)로 존재함을 확인하였다(Horii, A., *et al.* : *Cancer Res.*, **52**: 3231-3233 (1992)에서 개변).

맺음말

본 고에서는 RNase protection법의 개략에 대하여 설명하였다. 이 방법은 다소 시간이 걸리지만 감도가 양호하며 가장 큰 특징은 약간의 PCR artifact가 있어도 문제가 되지 않는다는 점이다. 이외에도 각종 유전자이상의 검출방법이 있으므로 각 상황에 따라 적절한 방법으로 연구를 진행하는 것이 중요하다.

참고문헌

1) Myers, R. M., Larin, Z., Maniatis, T. : *Science*, **230**, 1242-1246 (1985)
2) Winter, E., Yamamoto, F., Almoguera, C., Perucho, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7575-7579 (1985)

4. PCR-RFLP법

Satoru Nagase, Akira Horii

RFLP란 특정 제한효소로 DNA를 절단하면 DNA 서열에 개체간의 차이가 존재하므로 이에 따라 제한효소 소화단편의 길이가 달라지는 성질을 의미하는 것이다. RFLP marker는 linkage 해석으로부터 유전성질환의 원인유전자 동정, 종양에서의 이형접합성의 소실(Loss of heterozygosity; LOH)의 검출에 의한 암억제유전자의 존재영역의 한정 등에 이르기까지 폭넓게 이용되고 있다. 최근 급속하게 발달하고 있는 PCR법과 병용함으로써 RFLP의 검출 뿐만 아니라 점돌연변이의 검출 등에도 응용할 수 있게 되었다.

서론

최근 염색체상의 유전자 위치에 관한 정보를 근거로 원인유전자를 cloning하는 방법(positional cloning)에 의해 유전성질환의 원인유전자나 각종 종양의 암억제유전자의 존재부위가 해명되고 있다. 이것이 가능하게 된 가장 큰 이유는 RFLP(restriction fragment length polymorphism) marker를 비롯한 다형성 DNA marker를 사용하여 부모 유래의 상동염색체 2개를 용이하게 구별할 수 있게 되었기 때문이다. 그 결과 human gemome에 있어서의 유전적 염색체지도의 작성, 유전성질환의 원인유전자 염색체의 mapping 그리고 종양에서의 이상(결실, 삽입, 변이 등)의 검색이 가능하게 되었다. 현재 각종 암에 대한 암억제유전자의 국재부위 검색은 이형접합성의 소실(Loss of heterozygosity; LOH)을 지표로 널리 실시되고 있다. 최근 비약적인 발전을 거듭하고 있는 PCR법과 병용함으로써 목적으로 하는 영역을 증폭한 후에 점돌연변이의 유무를 검출하는 등 암유전자, 암억제유전자의 해석에도 도움이 되고 있다.

본 고에서는 PCR법과 병용한 RFLP의 증폭의 응용으로서 암유전자의 점돌연변이의 검출법에 대한 개략을 중심으로 설명한다.

I. Linkage 해석과 RFLP marker

Linkage 해석으로 유전성질환의 원인유전자가 존재하는 영역을 동정하기 위해서는 재조합의 유무를 판정하고 염색체상의 지표가 되는 marker가 필요한데, 최초로 널리 이용된 것이 RFLP marker이다. RFLP란 개체간에 다양하게 존재하는 염기서열을 유전적 표식으로 하는 다형성 DNA marker의 일종으로 DNA 서열에 개체차가 존재하기 때문에 제한효소로 절단하는 경우 개체에 따라 DNA 단편의 길이가 달라짐을 이용하는 방법이다(그림 1). 특정 RFLP marker가 linkage 해석으로 그 질환과의 관련성이 밝혀졌다면, 이것은 그 질환의 원인유전자가 link되어 있는 RFLP marker의 근방에 위치함을 의미하는 것이다. 그러나 RFLP marker는 이형접합 확률이 반드시 높지는 않으며 또한 지금까지 분리된 marker가 human gemome상에서 높은 빈도로 분포하지 않으므로 현재는 human gemome상에서 이보다 더 높은 빈도로 존재하는 microsatellite marker를 많이 사용하며 이미 전염색체에 이르는 상세한 연쇄지도가 완성되어 있다[1]. Microsatellite marker는 이형접합의 확률이 높고 primer의 설정에 따라 PCR 산물의 크기를 작게 조절할 수 있으며, 또 paraffin block 유래의 DNA도 분석할 수 있다는 장점이 있어 linkage 해석 및 allele type 해석에 매우 유용한 것이다.

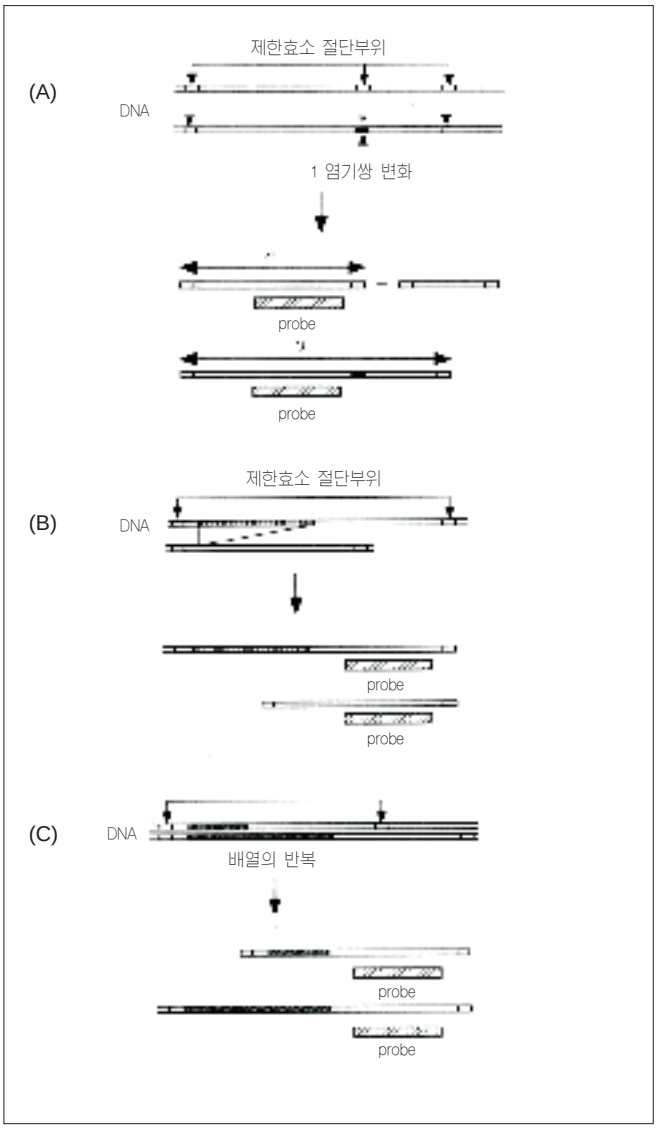


그림 1 염기서열의 변화로 발생하는 RFLP

(A) 제한효소에 의해 그림에 표시한 세 부위에서 절단되는 염색체와 염기서열의 차이로 인해 *부위가 절단되지 않는 염색체에서 RFLP를 검출하는 probe(▨)에 의해 길이가 다른(a와 b) DNA 단편이 검출된다. (B) insertion/deletion polymorphism의 예이다. 정상의 염색체에서도 insertion(삽입) 또는 deletion(결실)(▩)로 표시한 부분)이 존재하기 때문에 검출되는 DNA 단편의 길이가 다르다. (C) 일부에 반복 서열이 존재하여 RFLP probe로 검출되는 DNA 단편의 길이에 변화가 생기는 경우가 있다. 염색체상의 여러 위치에 존재하는 반복 횟수는 염색체 간에 큰 차이를 보이는데 이를 microsatellite 또는 VNTR이라 부른다.

II. RFLP의 검출

RFLP는 개체간의 염기서열이 다름에 따라 제한효소 단편의 길이에 차이가 생기는 것인데, 이러한 차이를 검출할 때에는 southern hybridization을 이용하는 경우와 PCR법을 이용하는 경우가 있다. PCR법에 의한 검출은 특정 marker를 포함하는 영역을 PCR법으로 증폭한 후에 그 산물을 제한효소로 절단하여 agarose 또는 polyacrylamide gel로 전기영동한 뒤 gel을 ethidium bromide로 염색하는 것만으로 RFLP를 검출하는 방법이다. 이 경우 염기서열의 정보를 미리 알고 있어야 하며 PCR로 증폭가능한 길이의 범위 내에서만 이용할 수 있다는 단점이 있지만, 수 bp와 같은 작은 단편의 길이 차도 검출할 수 있고 방사선 동위원소를 사용하지 않아도 단시간에 검출할 수 있다는 점 등 많은 장점이 있다.

III. PCR-RFLP법에 의한 점돌연변이의 검출

제한효소의 절단부위에서 1염기만 치환하여도 RFLP가 생성되는 원리를 이용하여 기지의 염기서열에서의 점돌연변이의 확인에도 응용할 수 있다.

즉 특정 영역을 PCR법으로 증폭한 후 점돌연변이가 생긴 부위를 절단부위로 인식하는 제한효소로 처리하면 점돌연변이가 생긴 DNA에서는 절단되지 않고, 점돌연변이가 생기지 않은 DNA는 길이가 다른 allele로서 검출되는 것이다. PCR법을 병용하여 K-*ras* 유전자 codon 12의 점돌연변이를 검출한 방법[2]을 그림 2에 나타내었다. 췌장암, 대장암 등에서는 고빈도로 K-*ras* 유전자의 점돌연변이가 존재함이 보고되었는데[3, 4], 점돌연변이의 거의 대부분이 codon 12에서 발생하였다. K-*ras* 유전자의 codon 11~12에는 제한효소 *Bst*N I의 인식서열(CCTGG)이 존재한다. 이 부위에 점돌연변이가 일어나면 *Bst*N I의 인식서열을 소실한다. 따라서 시료 DNA를 PCR법으로 증폭한 product를 제한효소로 처리하면 정상 염기서열을 갖는 DNA는 절단되나 점돌연변이를 함유하는 DNA 단편은 절단되지 않고 남아있게 된다. 제한효소로 처리한 PCR 산물은 agarose 또는 polyacrylamide gel 전기영동을 통하여 DNA 단편의 길이의 차이로 검출된다. 이 방법에서는 PCR에 앞서 제한효소로 절단함으로써 정상세포가 다수 혼입되어 있는 시료 중의 점돌연변이도 검출할 수 있으며 증폭이 잘 되면 정상세포 10^3~10^5개 중 1개의 암세포로도 검출할 수 있다[5].

K-*ras* 유전자 이외에도 많은 유전자의 점돌연변이를 검출하기 위하여 이용되고 있다.

예를 들면, *APC*(adenomatous polyposis coli) 유전자는 가족성 대장선종증(familial adenomatous polyposis; FAP)의 원인유전자인데 FAP 가계의 환자나 가족에 대하여 APC 유전자의 선천성 이상의 유무를 screening함으로써 발증전에 진단할 수 있다(그림 3). *APC* 유전자의 이상이 비교적 많이 검출된 부위에 대하여 PCR법으로 증폭한 후에 적당한 제한효소로 처리하면 점돌연변이로 인하여 제한효소 인식서열이 소실되

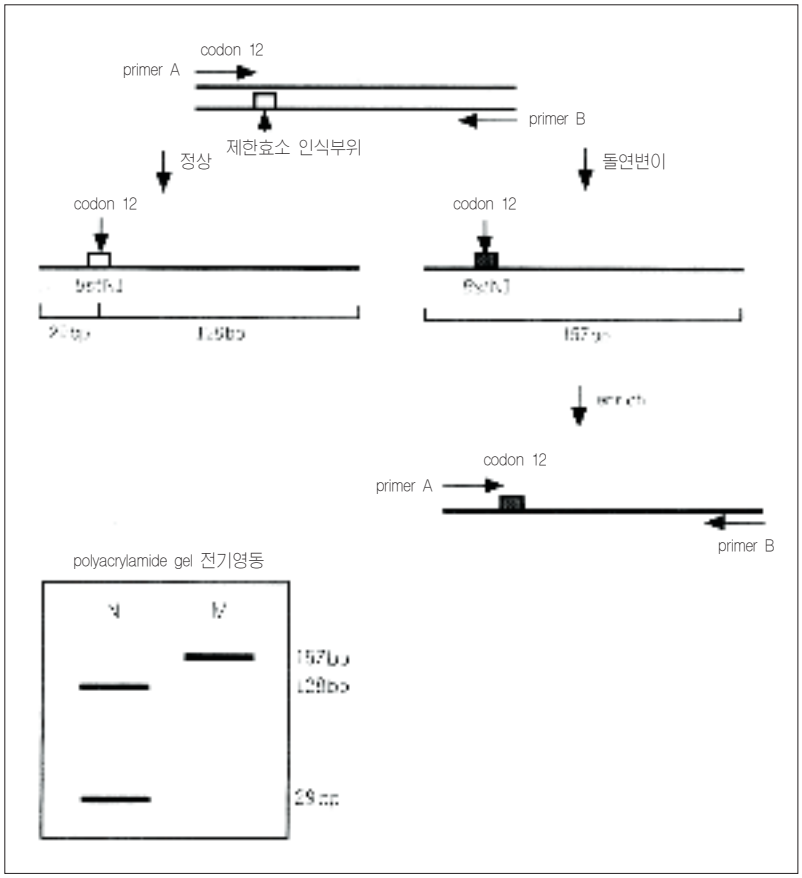


그림 2 PCR-RFLP법에 의한 K-*ras* 유전자의 돌연변이 검출법의 개요

primer A, B를 이용하여 K-*ras* 유전자 exon 1의 일부를 PCR로 증폭하면 157 bp의 PCR 산물이 생성된다. PCR 산물을 *Bst*N I으로 처리하면 정상 allele에서는 128 bp와 29 bp로 절단된다. 돌연변이 allele에서는 codon 12 부위에서는 절단되지 않고 157 bp의 allele가 생성된다. 또 PCR에 앞서 제한효소로 절단해 두면 돌연변이 allele만이 특이적으로 증폭되어(enrich) 검출효율이 증가한다.

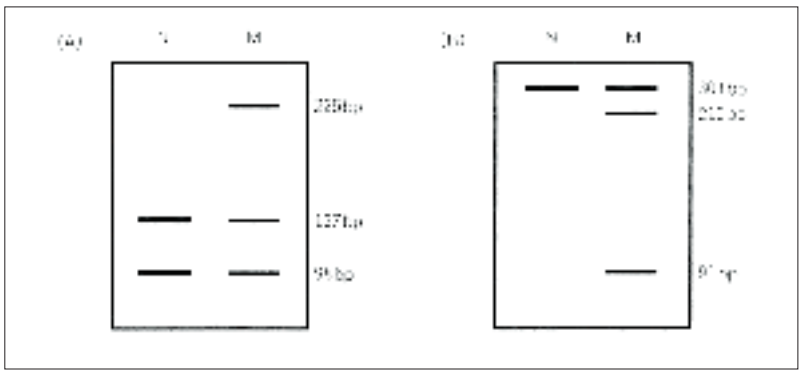


그림 3 PCR-RFLP법에 의한 *APC* 유전자의 돌연변이 검출의 모식도

(A) APC의 codon 232(CGA)를 함유하는 영역을 PCR법으로 증폭한 후 *Acc* I으로 절단하면 돌연변이 allele에서는 nonsense mutation으로 인하여 CGA → TGA로 되어, *Acc* I의 인식서열(GTATAC)이 소실하므로 PCR 산물은 절단되지 않고 225 bp인 채로 남는다. (B) APC의 codon 932(TCA)가 점돌연변이로 인하여 TCA → TAA로 되면 *Mse* I의 인식서열(TTAA)가 생긴다. Codon 932를 함유하는 영역을 PCR법으로 증폭하여 *Mse* I으로 처리하면 돌연변이 allele에서만 절단되어 210 bp와 91 bp의 allele가 생성된다.

어버린 경우와 반대로 점돌연변이로 인하여 다른 제한효소 인식서열이 생성된 경우에는 polyacrylamide gel 전기영동에서 정상과 다른 크기의 allele로서 검출된다. 이러한 방법을 이용하여 원인유전자를 분리한 유전성질환에 대하여 carrier로서의 존재여부를 판단하는 발증전 진단을 단시간에 그리고 확실하게 할 수 있어[6] 환자의 진단에 귀중한 정보를 얻을 수 있다.

맺음말

본 고에서는 PCR법과 조합한 RFLP의 응용으로서 유전자의 점돌연변이 검출법에 대하여 설명하였다. 이 PCR-RFLP법을 응용함으로써 다량의 정상세포가 혼입되어 있는 시료에서도 이상 유전자의 염기서열을 선택적으로 농축(enrich)하여 유전자 이상을 검출할 수 있다. 또 다수의 검체를 단시간에 처리할 수도 있으며 또한 유전자 이상의 해석을 통한 예후 판정 및 carrier의 발증전 진단 등의 임상분야에도 널리 응용할 수 있을 것이다.

참고문헌

1) Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., Weissenbach, J. : *Nature Genet*., **7**, 246-339 (1994)
2) Kahn, S. M., Jiang, W., Culbertson, T. A., Weinstein, I. B., Williams, G. M., Tomota, N., Ronai, Z. : *Oncogene*, **6**, 1079-1083 (1991)
3) Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. : *Cell*, **53**, 549-554 (1998)
4) Vogelstein, B., Fearon, E., Hamilton, S., Kern, S., Preisinger, A., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smith, A., Bos, J. : *New Engl. J. Med*., **319**, 525-532 (1988)
5) Kumar, R., Barbacid, M. : *Oncogene*, **3**, 647-651 (1988)
6) Ando, H., Miyoshi, Y., Nagase, H., Baba, S., Nakamura, Y. : *Gastroenterology*, **104**, 989-993 (1993)

TaKaRa
BIOMEDICALS

보현바이오메디칼주식회사
Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691
E-mail bohan@bohan.co.kr
URL www.bohan.co.kr

*in vitro*에서의 전사·번역을 하나의 튜브에서

Single Tube Protein™ System 3

제품명	TaKaRa Code	용량
T7용	NV712	50회용
	NV7121	10회용
SP6용	NV713	50회용
	NV7131	10회용

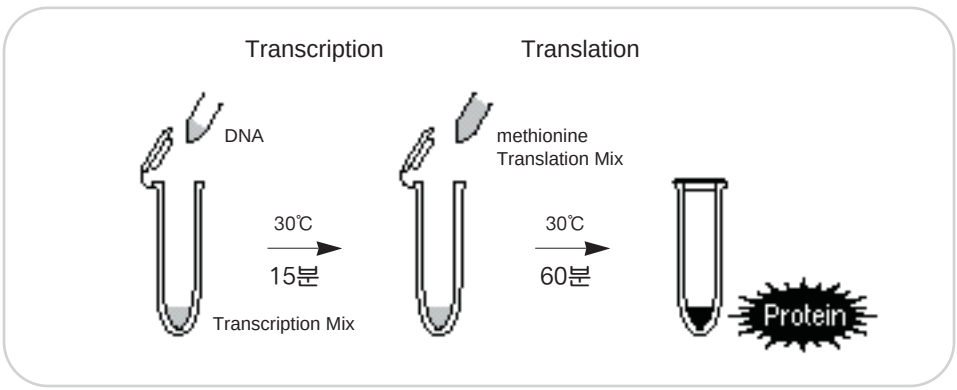
Novagen사 제품입니다.

Template DNA로부터 간단, 신속하게 단백질을 합성할 수 있습니

본 제품은 supercoil 또는 linear DNA를 template로 하여 *in vitro*에서 직접 단백질을 합성할 수 있도록 설계한 single tube의 전사, 번역 시스템이다. Template DNA를 첨가하는 것만으로 T7 또는 SP6 promotor하류에 삽입한 배열을 간단, 신속하게 발현 시킬 수 있다.

- **발현벡터 구축의 확인에**
- **단백질의 기능특성 연구에**
- **단백질:단백질, 단백질:핵산, 단백질: ligand의 상호작용 연구에**
- **non-sense 변이나 frame shift 변이의 screening에**
- **colony screening, RT-PCR, Exon PCR 등의 PCR 산물 유래의 단백질의 확인에**

STP3의 개요



별도의 Novagen사 카다로그가 준비되어 있습니다.

판매원

녹십자양행
LS사업팀 Tel. 02-3471-7437(직) Fax. 581-0137
대전 Tel. 042-823-6957 Fax. 832-0821
대구 Tel. 053-959-3611 Fax. 959-6136
광주 Tel. 062-525-1155 Fax. 527-0821

(주)코아바이오시스템
Tel. 02-841-7530
Fax. 02-841-7531
수원 0331-284-8592
대전 042-622-2726

TaKaRa Taq 21% 가격 대폭 인하

그 동안 고객 여러분에게 품질 좋은 제품을 저렴한 가격에 공급하는 것 뿐만 아니라, 보다 나은 서비스를 통하여 연구자들이 안심하고 실험에 임할 수 있도록 하고자 노력하여 왔습니다.
금번 여러분의 성원에 보답하고자 TaKaRa 본사의 적극적인 협력으로 PCR 효소의 가격을 대폭인하하기로 하였습니다.

표준 PCR용 효소

TaKaRa Taq (dNTP mix, 10× Buffer 첨부)

R001A 250 U 176,000원 → **139,000원**

R001B	1000 U (250 U × 4)	**520,000원**(250 U 130,000원 상당)
R001C	3000 U (250 U × 12)	**1,440,000원**(250 U 120,000원 상당)

* Mg^{2+} free buffer version도 있습니다

증폭효율과 증폭길이가 획기적으로 좋아진 premium PCR

TaKaRa Ex Taq (dNTP mix, 10× Buffer 첨부)

RR001A 250 U 198,000원 → **173,000원**

RR001B	1000 U (250 U × 4)	**660,000원**(250 U 165,000원 상당)
RR001C	3000 U (250 U × 12)	**1,860,000원**(250 U 155,000원 상당)

* Mg^{2+} free buffer version도 있습니다

40 kb까지 길고 정확한 증폭이 가능한

TaKaRa LA Taq (dNTP mix, 10× Buffer 첨부)

RR002A 125 U 196,000원 → **172,000원**

RR002B	500 U (125 U × 4)	**646,000원**(125 U 161,500원 상당)

* GC rich 영역을 증폭할 수 있는 GC buffer version도 있습니다.

정확도를 추구하는 PCR에 (*Taq*보다 10배 정확한 증폭)

Pyrobest DNA Polymerase(dNTP mix, 10× Buffer 첨부)

R005A 125 U **170,000원**

초고속 PCR을 실현, *Taq*에 비하여 5배 빠른 PCR

TaKaRa Z-Taq (dNTP mix, 10× Buffer 첨부)

R006A 200 U **368,000원**

TaKaRa의 PCR 및 그 관련제품은 License 계약에 의하여 제조·판매되는 정품입니다.

TaKaRa 주요 PCR 제품 목록

DNA PCR 관련제품

PRODUCT	CODE	단위
TaKaRa LA PCR™ Kit Ver. 2.1	RR013A	50회
LA PCR용 genome DNA Set	9060	각 20회
TaKaRa PCR Amplification Kit	R011	100회
Single-Tube PCR Kit(from Whole Blood)	RR021	50회
cDNA PCR Library Kit	6119	20회

RNA PCR 관련제품

TaKaRa RNA LA PCR™ Kit(AMV) Ver.1.1	RR012	50회
*Bca*BEST™ RNA PCR Kit	RR023A	50회
High Fidelity RNA PCR Kit	R020A	50회
TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1	R019A	50회
TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)	RR024A	50회
mRNA Selective PCR Kit Ver.1.1	RR025	50회
3'-Full RACE Core Set	6121	20회
5'-Full RACE Core Set	6122	10회

DNA · RNA 정량 PCR 관련제품

Competitive DNA Construction Kit	RR017	10회
Competitive RNA Transcription Kit	6125	10회
Human β-actin Competitive PCR Set	6607	20회
Rat Cytochrome P450 Competitive RT-PCR Set	6608	20회

DNA Typing 관련제품

Quick-Type HLA Typing Kit Series		
STR, VNTR marker 개체식별용 Kit		
Quick-Type Multiplex I Kit	LC040	100회
Quick-Type AMP-FLP Kit Series		
Quick-Type D1S80 AMP-FLP Kit	LC050	100회
Quick-Type D17S5 AMP-FLP Kit	LC053	100회

특수 유전자 검출용 제품

TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set	6601	50회
TaKaRa PCR Human Papillomavirus Detection Set	6602	50회
TaKaRa PCR Human Papillomavirus Typing Set	6603	50회
TaKaRa PCR HFRSU Detection Set	6606	50회
TaKaRa PCR Human Cytomegalovirus Detection Set	6605	50회
O-157 One Shot PCR Screening Kit	RR102A	48검체용
O-157 PCR Screening Set	RR100	100회용
O-157 PCR Typing Set	RR105A	50검체용
Salmonella균 One Shot PCR Screening Kit	RR112A	48검체용
장염 Vibrio 검출용 Primer Set		
독소원성 대장균 검출용 Primer Set		
장관 출혈성 대장균 검출용 Primer Set		
적리균과 장관침입성 대장균 검출용 Primer Set		
살모넬라균 검출용 Primer Set		
황색포도구균 검출용 Primer Set		
콜레라 독소 유전자 검출용 Primer Set	S014	1000 pmol
Welchii균 검출용 Primer Set	S020	1000 pmol
Botulinus균 검출용 Primer Set		

PCR Premix 효소

TaKaRa *Premix Taq*	R004A	120회
TaKaRa *Premix Ex Taq*	RR003A	120회
One Shot LA PCR Mix	RR004	25 μl × 24
Perfect Shot *Ex Taq*	RR005	48회

Technical Tips

rEGCase II를 이용한 당지질 당쇄 해석법

- 응용편 -

Ganglioside 등의 sphingoglycolipid에 작용하여 당쇄를 유리하는 Endoglycoceramidase(EGCase)는 sphingoglycolipid의 구조해석에 유용한 도구로서 이용되고 있다. TaKaRa는 이 효소를 재조합체[1]로서 대량생산하고 있으므로 아주 저렴한 가격에 구입할 수 있다. 재조합체 rEGCase II(TaKaRa Code 4460)에 의하여 sphingoglycolipid로부터 절단된 당쇄는 pyridyl amino화(PA화)로 형광표식할 수 있으므로 고감도의 분석이 가능하다. 본 고에서는 mouse의 대뇌에서 추출한 sphingoglycolipid의 당쇄를 형광 HPLC 시스템을 이용하여 고감도로 분석한 예를 소개하고자 한다.

■ 실험의 개요

Formaldehyde로 고정한 mouse 대뇌의 동결건조품으로부터 당지질을 추출하여 시료로 사용하였다. 당지질 시료를 rEGCase II로 소화하고 그 반응액을 건조시킨 후 잘려 나온 당지질 당쇄를 전자동 PA화 장치인 *Glyco*TAG™(TaKaRa Code GT100)을 이용하여 PA화 한 뒤 형광 HPLC 분석으로 당지질 당쇄를 고감도로 분석을 실시하였다. PA화된 당지질 당쇄의 분석계로서는 순상 column과 역상 column을 이용하여 2차원 mapping을 하는 방법[2]을 이미 발표한 바 있으나 이번에는 1회 분석으로 광범위한 당지질 당쇄의 분석이 가능한 amino계 순상 column, PALPAK® Type N(TaKaRa Code CA8100)을 이용하였다.

■ 실험조작

(1) 추출조작

Formaldehyde로 고정한 mouse 대뇌의 동결건조품(24.6 mg)을 acetone으로 탈지한 후 chloroform : methanol(2 : 1)로 추출하고(추출액 1), 또 잔사는 chloroform : methanol : H_2O (1 : 2 : 0.8)로 추출하였다(추출액 2).

(2) Folch 분배

추출액 1과 추출액 2를 섞은 후 원심농축기로 건조시켰다. 1 ml의 증류수에 현탁한 다음 5 ml의 chloroform : methanol (2:1) 을 첨가하여 잘 교반하였다. 원심분리하여 상층을 추출시료로 사용하였다(이 조작으로 rEGCase II의 저해물질과 HPLC 분석시의 불순물 peak를 제거할 수 있다. 시료량이 많은 경우나 뇌와 같이 지용성 성분이 많은 시료의 경우에는 지질 및 단백질을 줄이는 조작을 하면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있다).

(3) rEGCase II 소화

추출시료의 1/2500(건조 대뇌의 9.8 ㎍에 상당)을 *Glyco TAG*™ 전용의 반응 vial에 넣은 후 건조시켰다. 0.6% taurodeoxycholate를 함유하는 10 ㎕의 30 mM Acetate buffer (pH5.5)와 5 ㎕의 rEGCase II(10 mU)를 첨가하여 37℃에서 17시간 반응한 다음 건조하였다.

(4) PA화

GlycoTAG™을 이용하여 PA화를 실시하였다(건조물이 많은 경우에는 setting하기 전에 *GlycoTAG*™의 A액 10 ㎕를 시료에 첨가하여 잘 침투시켜 놓으면 표식효율의 저하를 예방할 수 있다).

(5) HPLC 분석

당단백질의 당쇄분석에 이용하는 PALPAK® Type N column 및 3액 혼합 gradient system의 분석계[3]를 당지질 당쇄용으로 개조하여 이용하였다.

분석조건 :

Column : PALPAK® Type N(4.6 mmϕ×250 mm)
Flow rate : 1 ml/min
Column temp : 40℃
Detection : Ex. 320 nm, Em. 400 nm
Solvent A : 200 mM acetic acid-triethylamine(pH7.3)/acetonitrile(5 : 95, v/v)
Solvent B : 25 mM acetic acid-triethylamine(pH7.3)/acetonitrile(40 : 60, v/v)
Solvent C : 4 M acetic acid-triethylamine(pH7.3)/acetonitrile (50 : 50, v/v)
Gradient :

Time(min)	B(%)	C(%)
0.1	2	1
15	2	1
35	96	1
45	96	1
60	82	15
80	2	96
90	2	96
90.1	2	1
105	2	1

(6) HPTLC 분석

Plate : Merck Silicagel 60 HPTLC
Solvent : chloroform/methanol/10% acetic acid (5 : 4 : 1, v/v/v)

■ 결과

그림 1에 HPLC 분석 결과를 나타내었다. 또 비교를 위해 rEGCase II 소화/PA화에 사용한 추출액의 동량 및 그 10배량, 20배량의 추출액을 HPTLC로 전개하고, Orcinol-H_2SO_4법으로 발색시킨 결과를 그림 2에 나타내었다. HPLC로 분석한 경우(그림 1)에서는 주요한 당지질 당쇄의 peak뿐만 아니라 몇 개의 minor peak도 검출되었다. 한편 HPTLC로 분석한 경우(그림 2)에서는 HPLC로 이용한 양의 추출액에서는 band가 거의 검출되지 않았다.

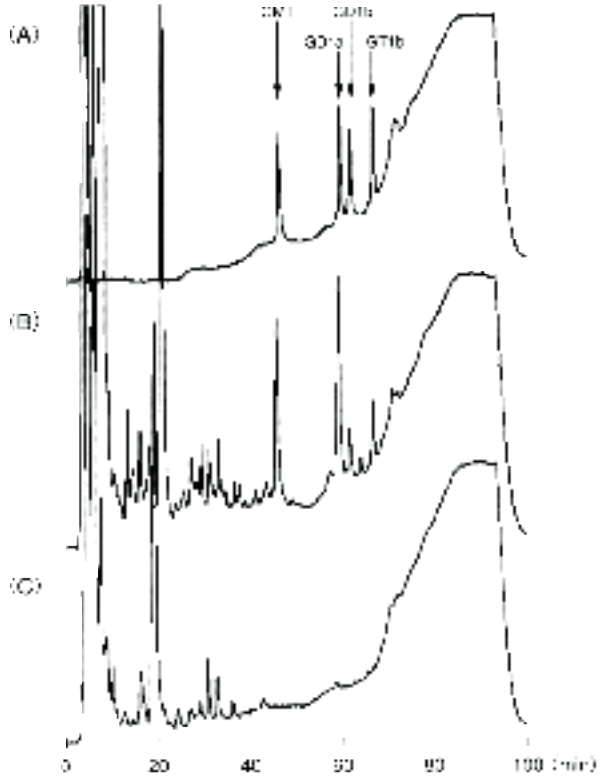


그림 1 PA화 시료의 HPLC 분석

A : PA화 당지질 당쇄 standard 각 10 pmol
B : rEGCase Ⅱ 처리 (건조 대뇌 추출물 9.8 ㎍에 상당)
C : rEGCase Ⅱ 미처리 (건조 대뇌 추출물 9.8 ㎍에 상당)

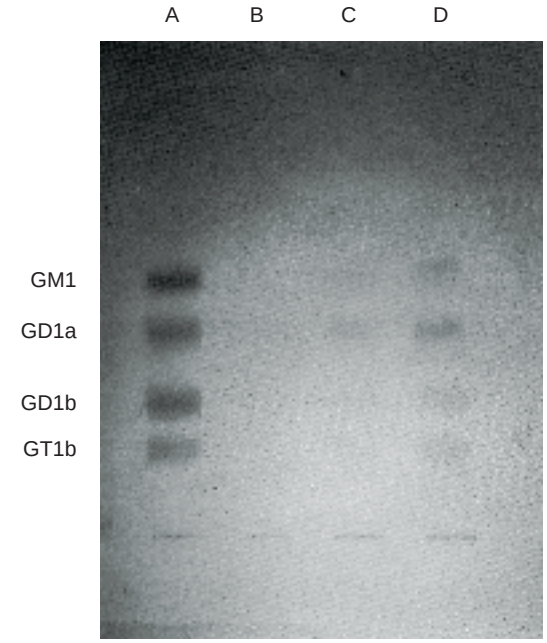


그림 2 대뇌 추출물의 HPTLC 분석 (Orcinol-H_2SO_4 염색)

A : 당지질 GM1, GD1a, GD1b, GT1b 각 2 nmol
B : 건조 대뇌 (9.8 ㎍에 상당) 추출물
C : 건조 대뇌 (98 ㎍에 상당) 추출물
D : 건조 대뇌 (196 ㎍에 상당) 추출물

■ 요약

이상과 같이 rEGCase Ⅱ를 이용하여 당지질로부터 당쇄를 잘라내어 전자동 PA화 장치를 이용하여 PA화함으로써 고감도로 당지질 당쇄를 분리·분석할 수 있다. 마지막으로 이 방법의 장점을 정리하였다.

1) 고감도로 방사성동위원소를 사용하지 않고 미량분석이 가능하다.
2) 분리가 잘 되어 양적비교가 쉬우므로 당지질의 pattern 비교에 적합하다.
3) HPLC의 용출 peak는 분취할 수 있으므로 다른 분리 mode에서의 해석이나 glycosidase 소화등에 의한 해석도 연속해서 실시할 수 있다.

참고문헌

1) Izu, H., Izumi, Y., Kurome, Y., Sano, M., Kondo, A., Kato, I. and Ito, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19846-19850.
2) Ohara, K., Sano, M., Kondo, A. and Kato, I. (1991) *J. Chromatogr.* **586**, 35-41.
3) Kondo, A., Kiso, M., Hasegawa, A. and Kato, I. (1994) *Anal. Biochem.* **219**, 21-29.

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	용량
rEGCase Ⅱ	4460	100 mU
EGCase Ⅱ *ACT*	4461	100 mU

Technical Tips

TaKaRa Z-Taq™을 이용한 고속 PCR

TaKaRa Z-Taq™을 이용한 O-157균의 Verocytotoxin 유전자의 검출을 40분만에!!

TaKaRa Z-Taq™ TaKaRa Code R006A 200 U
R006B 800 U

고속 PCR용 DNA polymerase인 *TaKaRa Z-Taq*™은 발매 이래 대단한 호평을 받고 있다. 반응속도가 종래의 *Taq* DNA polymerase에 비해 5배 이상 빠르므로 검체수가 많고 신속한 판정을 필요로 하는 식품의 미생물검사나 임상검사에 있어서 PCR에 의한 검사시간을 대폭 단축할 수 있다. 본 고에서는 장관출혈성 대장균 O-157의 Verocytotoxin 유전자의 검출에 *TaKaRa Z-Taq*™을 이용함으로써 검출감도의 저하없이 종래의 약 1/4의 PCR 반응시간으로 검출한 예를 소개하고자 한다.

■ 실험례

- 주형 DNA : 대장균 O-157 균체 열추출액
  control template EC3
- 증폭 target : Verocytotoxin 유전자 유래의 171 bp
  control template EC3 유래의 685 bp
- 반응액 조성 및 PCR 조건

[*TaKaRa Z-Taq*™ 사용]

- 1× *Z-Taq* Buffer
- 200 μM dNTP Mixture
- 400 nM Primer EVC-1
- 400 nM Primer EVC-2
- 2.5 U *TaKaRa Z-Taq*™
- control template EC3
- O-157 균체열추출액 (검체)

TaKaRa Thermal Cycler Personal 사용(Fast Mode)

98℃ 10초
55℃ 10초 ┐ 35 cycles
72℃ 7초 ┘

전체반응시간 : **44**분

[*TaKaRa Ex-Taq*™ 사용]

(O-157 One Shot PCR Screening Kit[TaKaRa Code RR102A] 사용)

- 1× *Ex Taq* Buffer
- 200 μM dNTP Mixture
- 200 nM Primer EVC-1
- 200 nM Primer EVC-2
- 2.5 U *TaKaRa Ex Taq*™
- control template EC3
- O-157 균체열추출액(검체)

TaKaRa Thermal Cycler MP 사용

94℃ 1 분
55℃ 1 분 ┐ 35 cycles
72℃ 1 분 ┘
72℃ 10 분

전체반응시간 : 약 **160**분

[결과]

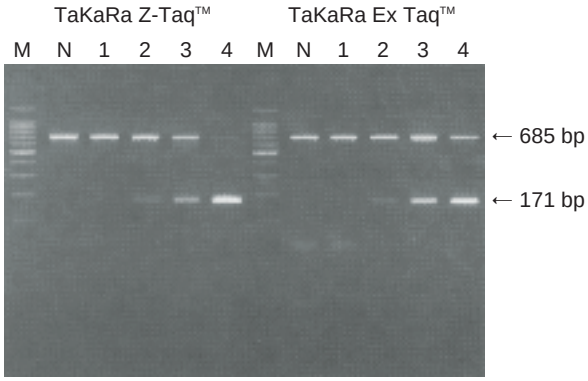


그림 *TaKaRa Z-Taq*™ 또는 *TaKaRa Ex-Taq*™을 이용한 PCR에 의한 대장균 O-157의 검출

검체를 단계희석하여 검출감도를 조사하였다. 위의 band는 control을, 아래의 band는 Verocytotoin 유전자 유래의 band를 나타낸다.

Lane
M : 100 bp DNA Ladder (TaKaRa Code 3407A/B)
N : Negative Control
1 : 1 cell에 상당/반응계
2 : 10 cells에 상당/반응계
3 : 10^2 cells에 상당/반응계
4 : 10^3 cells에 상당/반응계

TaKaRa Z-Taq™을 이용함으로써 지금까지의 O-157 One Shot PCR Screening Kit의 경우(약 160분)보다 약 1/4 정도 단축된 반응시간으로 동등한 검출결과를 얻을 수 있었다. 따라서 균체열추출액(검체)의 조제로부터 전기영동까지의 모든 공정을 약 90분만에 종료할 수 있게 되었다. 또 감도에 있어서도 10 cells/반응계에 상당하는 Verocytotoxin 유전자를 검출할 수 있어 고감도도 유지하였다. 검체수가 많고 신속한 판정을 필요로 하는 식품의 병원미생물 검사나 임상검사에는 고속 PCR용 DNA polymerase인 *TaKaRa Z-Taq*™이 대단히 유효함을 확인할 수 있었다.

TaKaRa PCR Related Products are sold under licensing arrangements with Hoffman-La Roche Ltd., Roche Molecular Systems, Inc. and The Perkin-Elmer Corporation.

Technical Tips

유전자 재조합 작물(GMO) 검정용 DNA 추출 · PCR Kit 신발매

TaKaRa 유전자 해석센터에서는 biotechnology의 산물인 유전자 재조합 작물(GMO 또는 유전자 변형작물)에 대한 충분한 이해를 넓힘과 동시에 그 표시를 의무화하는 동향에 발맞추어 유전자 재조합 작물의 검정에 관한 수탁서비스를 실시해 왔었다. 이번에 당사는 연구자 여러분의 요망에 대응하기 위하여 유전자 재조합 작물 검정용 Kit을 신발매하였다. 본 kit을 이용한 검정은 Multiplex PCR법에 기초한 TaKaRa 독자의 방법으로 실시한다. PCR법은 극히 미량의 DNA를 수백만배로 증폭해 주므로 작물의 원형을 보존하고 있는 검체가 있다면, 예를 들면 대두 한 알로서도 GMO의 검정이 가능하며 또 혼합물속에 GMO가 5% 이상 함유되어 있다면 검정할 수 있다.

또 TaKaRa는 연구용 이외의 이러한 PCR kit을 판매할 수 있는 권리도 취득하였다. 따라서 본 kit을 이용하여 고객이 자신의 시료를 검정하고자 할때는 PCR법의 실시에 관한 지불의무가 별도로 발생하는 일은 없다.

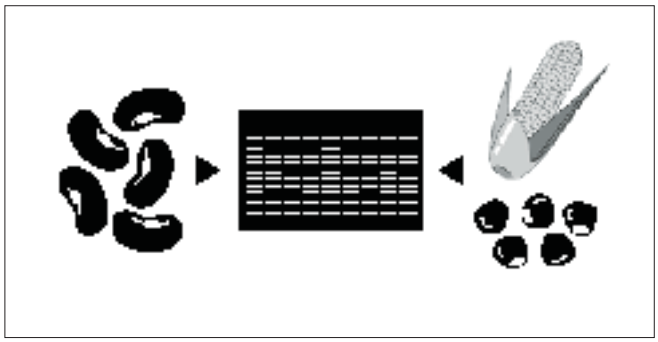
■ 유전자 재조합 작물 검정용 DNA 추출 Kit (DNA Extraction Kit for GMO Detection)

TaKaRa Code 9092		100회용
내용 :	1. Solution Ⅰ	100 ml × 5개
	2. Solution Ⅱ	100 ml
	3. Solution Ⅲ	50 ml

■ 유전자 재조합 대두 검정용 PCR Kit* (PCR Screening Kit for GM Soybean)

TaKaRa Code RR201A	48회용
내용 :	2× OneShot PCR solution tube (25 μl ×48개, 무색의 0.2 ml PCR tube에 미리 분주해 놓은 것)

Monsant사의 round-up ready에 재조합시킨 제초제 내성유전자의 검정용 primer와 control용으로서 actin 유전자의 primer를 사용하여 multiplex PCR법으로 GMO검정을 실시한다.



■ 유전자 재조합 옥수수 검정용 PCR Kit* (PCR Screening Kit for GM Maize)

TaKaRa Code RR202A	48회용
내용 :	2× OneShot PCR Solution Tube (25 μl ×48개, 무색의 0.2 ml PCR tube에 미리 분주해 놓은 것)

각사의 GM Maize에 재조합시킨 유전자의 발현용 promoter(CaMV35S)의 검정용 primer와 control용으로서 Zein(옥수수 단백질)유전자의 primer를 사용하여 multiplex PCR법으로 GMO 검정을 실시한다.

TaKaRa PCR Related products are sold under licensing arrangements with F. Hoffmann-La Roche Ltd., Roche Molecular Systems, Inc. and The Perkin-Elmer Corporation.
*Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for Food and Environmental Testing in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchaseed, i.e., an authoriaed thermal cycler.

보다 상세한 내용에 대해서는 당사의 기술지원팀으로 문의하여 주시기 바랍니다.

Tel. 02-577-2002
Fax. 02-577-3691
e-mail ts1@bohan.co.kr
URL www.bohan.co.kr

NEW

High Fidelity RNA PCR Kit

TaKaRa Code R020A 50회
R020B 50회×2

정확성으로 정평이 나 있는 *Pyrobest*™ DNA Polymerase로 cDNA를 증폭 !!

TaKaRa는 이번에 역전사활성을 갖는 *Bacillus caldotenax* 유래의 내열성 효소 *Bca*BEST™ DNA Polymerase와 proof reading 활성을 가진 *Pyrococcus* sp. 유래의 초내열성 효소 *Pyrobest*™ DNA Polymerase를 이용하여 RNA로부터 cDNA를 합성 및 증폭할 수 있는 High Fidelity RNA PCR Kit을 새로 발매하였다. 본 kit는 최적온도가 60~65℃로 높은 *Bca*BEST™ DNA Polymerase로 역전사반응을 실시하므로 복잡한 2차구조를 갖는 RNA일지라도 cDNA합성이 원만하게 진행된다. 또 3'→5' exonuclease 활성을 갖는 *Pyrobest*™ DNA Polymerase를 이용하므로 fidelity(정확성)가 높은 cDNA를 증폭할 수 있다. 그리고 이러한 일련의 반응(RNA PCR)을 한 개의 tubeLH에서 실시할 수 있다. 본 고에서는 본 kit을 이용한 실험례를 소개한다.

■ 내용(50회분)

*Bca*PLUS RTase	50 μl
RNase Inhibitor(40 U/μl)	25 μl
Random 9 mers(50 μM)	50 μl
Oligo dT-Adaptor primer FB(5 μM)*1	50 μl
RNase Free dH$_2$O	500 μl
Pyrobest™ DNA Polymerase(5 U/μl)	25 μl
Adaptor Primer FB(20 μM)*2	250 μl
2× *Bca* 1st Buffer	500 μl
10× *Pyrobest* Buffer	500 μl
dNTP Mixture(10 mM)	150 μl
MgSO$_4$(25 mM)	200 μl
Control F-1 Primer(20 μM)	125 μl
Control R-1 Primer(20 μM)	125 μl
Positive Control RNA(2×10^5 copies/μl)	25 μl

*1 : Oligo dT-Adaptor primer FB : TaKaRa 독자의 설계에 의해 dT 영역과 Adaptor primer FB 배열을 함유하는 primer로 3'-RACE에 사용할 수 있다.

*2 : Adaptor primer FB의 배열 : 5'-CATGGGATGGATCCTGCAGATC-3'

■ 실험례

본 제품의 protocol에 따라 아래의 반응액을 조제하여 transferrin receptor 영역(2 kb 및 4.4 kb)을 증폭하였다.

[역전사반응]

2× *Bca* 1st Buffer	10 μl
MgSO$_4$(25 mM)	4 μl
dNTP Mixture(10 mM)	1 μl
RNase Inhibitor(40 U/μl)	0.5 μl
*Bca*PLUS RTase	1 μl
Oligo dT-Adaptor primer FB	1 μl
시료 RNA*(U-937 유래 total RNA 0.5 μg/μl)	1 μl
DEPC 처리수	1.5 μl
	20 μl

* : 시료 RNA는 total RNA의 경우 0.5 μg이 최적량이다. 또 발현량이 적은 mRNA를 목적으로 하는 경우는 mRNA까지 정제한 것을 사용해야 한다.

역전사반응 조건 :
65℃ 1분
30℃ 1분
↓ 15분동안 승온
60℃ 30분
98℃ 5분
5℃ 5분

[PCR 반응]

10× *Pyrobest* Buffer	10 μl
dNTP Mixture	2 μl
Pyrobest™ DNA Polymerase(5 U/μl)	0.5 μl
Upstream primer(20 μM)(Sense)	5 μl
Downstream primer(20 μM)(Antisense)	5 μl
멸균수	57.5 μl
역전사반응액	20 μl
	100 μl

PCR 반응조건 : 94℃ 30초
60℃ 30초 ┐ 30 cycles
72℃ 5분 ┘

■ 결과

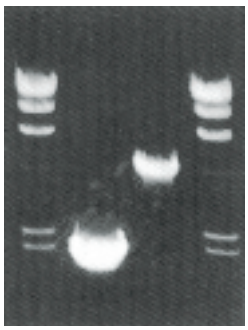


그림 High Fidelity RNA PCR Kit에 의한 transferrin receptor 영역의 증폭

Lane
M : marker
1 : 2 kb
2 : 4.4 kb

NEW

FP Screen-for-Competitors Kit, ER-α
(구제품명 : Estrogen Competitors Screening Kit)

TaKaRa Code VP2313 1 Kit
PanVera사의 제품입니다.

Full-Range BEACON® 2000을 이용한 환경호르몬의 연구에 !!

생체의 기능을 정상적으로 유지하기 위하여 체내에서는 다양한 호르몬들이 작용한다. 그 중 하나로서 존재하는 estrogen(대표예 : estradiol)은 성호르몬의 일종으로 특히 동물 암컷에 있어서 부속성선(자궁, 질 등)의 발육이나 생식에 대단히 중요한 역할을 한다. 본 제품은 TaKaRa가 시판해 온 형광편광도 측정시스템 Full-Range BEACON® 2000을 이용하여 이 estrogen과 경합하는 물질(estrogen competitor)을 방사성물질을 사용하지 않고 screening하기 위한 kit이다. Estrogen receptor와 결합하는 새로운 신규화합물의 동정이나 최근 사회적 문제로 부각되는 호르몬 교란물질(환경호르몬)의 *in vitro* 연구에 응용할 수 있다. 이러한 물질의 screening은 본 kit 내에 함유된 형광 estrogen(Fluormone™ ES1)과 estrogen receptor와의 결합에 대한 경합저해작용을 형광편광도의 변화로서 측정함으로써 실시한다(실험례 참조). 환경호르몬은 본래 호르몬이 작용하는 receptor에 경합적으로 결합하여 정상적인 호르몬의 작용을 교란함으로써 생체의 균형을 깨뜨리는 것이다. 지금까지 일반적으로 사용되고 있는 물질이나 이미 환경속으로 방출되어 온 물질 중에서 호르몬 교란작용을 가지는 것으로 판단되는 것이 다수 동정되고 있다. 또 특히 임신중의 모체내에서 발생단계에 있는 태아가 그 영향을 강하게 받고 있음이 시사되고 있어 생식이나 임신기에 중요한 역할을 수행하는 estrogen의 작용을 교란하는 환경호르몬의 연구는 대단히 중요한 것이다.

실험례 : Fluorescent Estrogen Competition Assay

시료로서 천연 estrogen인 estradiol과 환경호르몬으로 추정되는 몇 종류의 화학물질을 사용하여 본 kit 내의 Fluormone™ ES1(fluorescent estrogen)과 estrogen receptor의 결합에 대한 경합저해 작용을 Full-Range BEACON® 2000을 사용하여 측정하였다. 그 결과 아래의 그림처럼 가장 강력하게 경합저해작용을 나타낸 것은 estradiol(IC_{50}=13 nM)과 DES(diethylstilbesterol, IC_{50}=11 nM)였다. 또, 기타 화합물 [4-nonylphenol(IC_{50}=3.9 μM), bisphenol-A(IC_{50}=32 μM), butyl benzyl phthalate(BBP, IC_{50}=73~120 μM)] 등도 모두 약하지만은 estrogen receptor에 결합하였다.

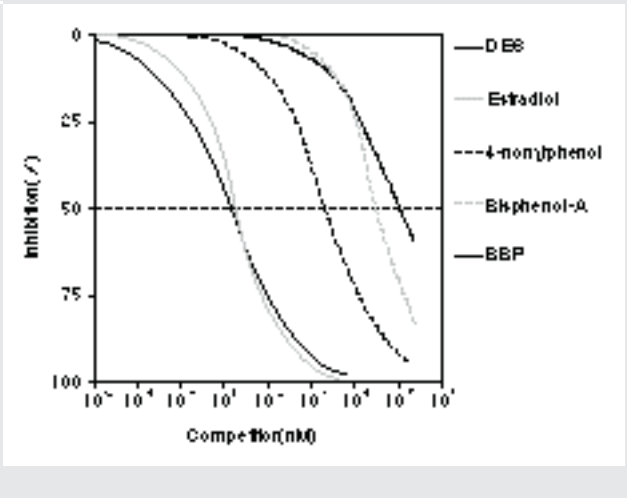


그림 1 Fluorescent Estrogen Competition Assay

■ 내용

1. Fluormone™ ES1
2. Estrogen Screening Buffer
3. Purified, Recombinant Human, Estrogen Receptor-α(ER)
4. Dithiothreitol (DTT)
5. Instructions

주) 본 제품을 사용할 때에는 형광편광도 측정시스템 Full-Range BEACON® 2000 이외에 Full-Range BEACON® 2000 전용필터가 별도로 필요하다.

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code
형광편광도측정시스템	
Full-Range BEACON® 2000	VP2370
Full-Range BEACON® 2000 전용필터 (360 nm)	VP2366
Estrogen receptor(α), rHuman (750 pmol)	V2187
Estrogen receptor(α), rHuman (3750 pmol)	V2188

NEW

Aureobasidin A 내성 효모 형질전환시스템 분열효모 *S. pombe*용 vector pAUR224

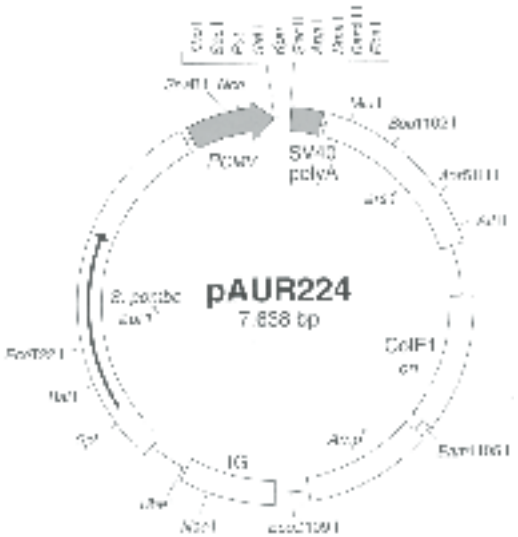
TaKaRa Code 3603 20 μg

*S. pombe*용의 단백질 발현용 vector 신 등장 !

TaKaRa는 지금까지 Aureobasidin A 내성효모 형질전환시스템으로서 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*용의 vector pAUR101, pAUR112 및 pAUR123을 발매해 왔으나 금번 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*용의 단백질 발현용 vector pAUR224를 새롭게 개발하였다. 여기서는 pAUR224 vector에 대하여 소개한다.

■ 서론

Aureobasidin A 내성효모 형질전환시스템은 항진균 항생물질 Aureobasidin A와 그 내성유전자를 selection marker로 하는 vector를 재조합하여 이용함으로써 효모의 형질전환과 선별하는 시스템이다. 지금까지 *S. cerevisiae* 유래의 내성유전자 *AUR1-C*를 함유하는 vector를 개발하여 발매하여 왔고, 이번에 새로 분열효모 *S. pombe* 유래의 Aureobasidin A 내성유전자 *aur1*^{R}을 cloning하여[1], 이 유전자를 selection marker로 하고 *S. pombe*를 숙주로 하는 효모・대장균 shuttle vector pAUR224(그림 1)을 개발하였다. pAUR224 vector는 *S. pombe* 균체 내에서 외래유전자를 발현할 수 있도록 Cytomegalovirus(CMV) promoter와 SV40 poly A signal을 갖고 있다. Multicloning site에 도입한 외래유전자는 효모형질전환체에서 구성적으로 다량 발현한다. 또 *S. pombe*의 복제개시점인 *ars1*을 포함하므로 효모균체 내에서는 plasmid 상태로 유지한다.



CTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCA

Xho I Sac I Pst I Sal I Kpn I Sac II Apa I Sma I BamH I Fba I

그림 1 pAUR224 DNA의 제한효소 지도 및 cloning site

실험례 : pAUR224 vector를 이용한 *lacZ* 유전자의 발현

pAUR224 vector의 Multicloning site에 *lacZ* 유전자를 삽입한 plasmid pAUR224-*lacZ*(10.8 kb)를 Sodium-acetate법으로 *S. pombe* LH121주(genotype: h$^+$ *ade6-M216 ura4-D18*)에 도입하였다.

LH121주가 전혀 생육하지 않는 Aureobasidin A의 최소저해농도는 0.1 μg/ml이었기 때문에, 선택배지로는 0.5 μg/ml의 Aureobasidin A를 함유하는 YEA agar plate를 사용하였다. 형질전환효율은 2.86×10^4 transformant/μg plasmid DNA였다. Transformant를 YEL배지에서 하룻밤 배양한 후 o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG)를 기질로 하여 β-galactosidase 활성을 측정하였다[2]. 획득한 pAUR224-*lacZ* transformant는 2～4 unit/OD_{600}의 활성을 나타내었다.

■ 결론

pAUR224 vector는 *S. pombe*의 Aureobasidin A 내성유전자 *aur1*^{R}을 selection marker로 가지는 *S. pombe*용의 단백질 발현용 vector이다. 지금까지의 본 시스템이 사용하였던 vector와 동일하게 높은 효율로 transformant를 얻을 수 있다. 또 효모균체내에서의 단백질 발현도 가능하다.

참고문헌

1) T. Hashida-Okado *et al.* (1997) Curr. Genet.
2) J. H. Miller (1972) Experiments in molecular genetics 352-355.

■ Sodium-acetate법에 의한 *S. pombe*의 형질전환법

1. 100 ml의 MB배지로 효모를 30℃에서 OD_{600}=0.2~0.5가 될 때까지 배양한다(약 15시간).
2. 2,000 rpm, 5분간의 원심분리로 균체를 회수한다.
3. 균체를 멸균수로 세정한다.
4. 50 OD_{600} unit 상당의 균체당 0.8 ml의 0.1 M sodium acetate를 첨가한 후 세포를 현탁한다.
5. Microtube에 100㎕의 균체현탁액을 분주하여 30℃에서 1시간 배양한다.
6. Plasmid DNA를 10㎕(약 1.0 ㎍) 첨가한다.
7. 290 ㎕의 50% PEG4000(30℃ 보온)을 첨가한 후 부드럽게 현탁한다.
8. 30℃에서 1시간 배양한 후 43℃에서 15분간 배양한다.
9. 실온에서 5분간 정치한다.
10. 5,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상청을 완전히 제거한다.
11. 균체를 5 ml의 YEL 배지에 현탁한 후 30℃에서 6시간 이상 배양한다.
12. 일부를 YEA 선택배지 plate에 이식한다.

- YEL medium(1 *l* 당)

Yeast extract	5 g
D-glucose	30 g

- YEA agar plate

  YEL medium에 2%의 agar를 첨가한다.

- YEA selective medium

  ≥0.5 ㎍/ml Aureobasidin A

- MB medium(1 *l* 당)

glucose	5 g
$(NH_4)_2SO_4$	5 g
KH_2PO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
CH_3COOK	0.36 g
NaCl	0.1 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g
trace elements	1 ml
vitamin solution	1 ml

- Trace element(100 ml당)

H_3BO_3	500 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	40 mg
KI	100 mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	200 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	530 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1,000 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	400 mg

- Vitamin solution (100 ml당)

nicotinic acid	1 g
myo-inositol	1 g
biotin	1 mg
pantothenic acid	100 mg

- 0.1 M sodium acetate(pH4.9)

  acetate로 pH를 4.9로 조정한 후 여과로 멸균한다.

- 50%(w/v) PEG4000

  여과 멸균

■ Aureobasidin A 내성 효모 형질전환 시스템 시리즈 제품

	제품명	TaKaRa Code	규격
	Aureobasidin A	9000	1 mg (선택배지 2 *l* 분)
	Aureobasidin A	9000B	1 mg ×5 (선택배지 10 *l* 분)
	pAUR101 DNA	3600	20 ㎍
	pAUR112 DNA	3601	20 ㎍
	pAUR123 DNA	3602	20 ㎍
NEW	pAUR224 DNA	3603	20 ㎍
NEW	pAUR123 F Primer	3951	150 pmol
NEW	pAUR123 R Primer	3952	150 pmol
NEW	pAUR224 F Primer	3953	150 pmol
NEW	pAUR224 R Primer	3954	150 pmol

NEW

His-Tag 단백질 전용 면역 adjuvant Z-Max™

TaKaRa Code ZN001 5 ml
Zonagene사의 제품입니다.

His-Tag 단백질에 대한 항체의 제작에 !!

최근 유전자조작에 의하여 다양한 재조합 단백질이 제작되고 있으며 이의 정제나 동정수단으로서 이용하기 위한 항체가 무수히 제작되고 있다. 재조합 His-Tag 단백질에 대한 항체의 제작에는 Z-Max™가 adjuvant로서 최적이다. Z-max™은 재조합 His-Tag 단백질 전용의 독특하고 효과가 높은 면역용 adjuvant로 His-Tag chelate 시약으로 구성되어 있으므로 His-Tag이 붙어 있다면 대장균, 효모, baculovirus, CHO 세포등 어떠한 계에서 발현시킨 단백질에도 유효하고 또한 His-Tag 배열을 첨가한 합성 peptide를 이용하는 면역에도 사용할 수 있다(효소로 Tag를 절단하여 제거한 단백질을 항원으로 하는 경우는 사용할 수 없다).

실험례

[방법]

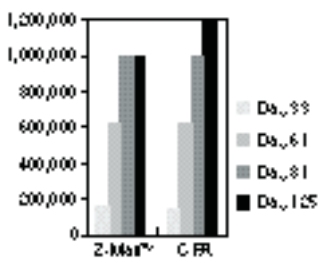
항원용액을 pH8 정도로 조정한다.

1 μg의 His-Tag 단백질 당 4 μl의 Z-Max™(slurry 상태)를 우선 PBS로 세정하여 원심분리한다. 그 상청을 제거한 후 His-Tag 단백질을 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 2시간 방치한다. 이 때 pellet에는 His-Tag 단백질이 농축되어 있다. 이 pellet을 PBS로 현탁하여 세정하고 원심분리한다. Pellet을 적당량의 PBS로 현탁한 후 그대로 동물에 투여한다(25G 주사침 사용).

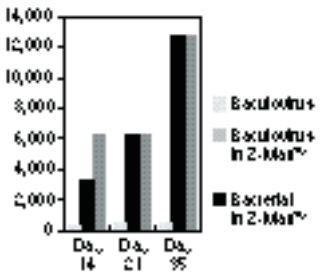
[결과]

복강내 투여에 의한 mouse 면역실험에서는 항원의 종류에 따라 다소 다르지만 1차 면역만으로도 2주후에 모두 100배 희석 혈청으로 ELISA가 가능한 정도의 역가가 검출되었다. His-Tag 단백질(항원)은 Z-Max™ adjuvant와 결합하여 불용성의 복합체를 형성하므로 전술한 세정조작으로 항원용액으로부터 협잡 단백질을 제거할 수 있다. 따라서 면역회수를 증가시켜도 매회순도가 높은 항원을 투여할 수 있다. 불용성 항원의 경우는 요소를 이용하여 시료를 녹이는 경우가 많은데 이 경우에도 세정조작에서 요소를 제거할 수 있다. Zonagen사가 실시한 몇 가지 예를 아래에 소개한다.

Recombinant Human Zona Pellucida B Protein



Recombinant Pig C versus Bacterial Recombinant Protein



Recombinant Pig Zona Pellucida C Protein

Dose	Titer to Recombinant	Titer to Native
10 μg		
Day 7	200	< 100
Day 35	12,800	800
Day 134	51,200	3,200
30 μg		
Day 7	12,800	400
Day 29	25,000	6,400
Day 64	> 102,000	6,400

[예 1]
CHO 세포에서 발현시킨 His-Tag recombinant human Zona Pellucida B protein을 Z-Max™ 또는 Complete Freund's adjuvants(CFA)와 혼합한 1 ml의 항원(항원량 250 μg)을 암컷의 어미 원숭이에 대하여 피하주사(0 day, 30 days, 63 days, 93 days after)를 하였다. 항체가는 항원을 코팅한 plate를 이용하여 ELISA로 조사하였다. 모든 adjuvant에서 동등한 항체가가 검출되었지만 Z-Max™를 adjuvant로 이용한 경우의 항체가는 순수하게 His-Tag 재조합 단백질에 대한 것으로 판단된다.

[예 2]
대장균 또는 baculovirus 계에서 각각 발현시킨 His-Tag recombinant Pig C versus protein을 Z-Max™와 혼합하여 토끼의 근육에 주사하였다. 항체가는 대장균에서 발현시킨 C-protein을 코팅한 plate를 이용하여 ELISA로 조사하였다. Z-Max™ 없이 투여한 경우에서는 항체가의 상승이 관찰되지 않았지만, Z-Max™를 혼합하여 투여한 경우는 대장균 또는 baculovirus 등 어떠한 계에서 발현시킨 재조합 단백질에 대해서도 효과적으로 항체가가 상승하였다.
이는 어떠한 종류의 계에서 발현된 재조합 단백질에 대해서도 유효함을 의미하는 것이다.

[예 3]
효모계에서 발현시킨 His-Tag recombinant Pig Zona Pellucida C protein을 Z-Max™와 혼합한 후 그 10μg 또는 30μg의 항원을 BALB/c mouse에 피하주사를 하였다(0 day, 28 days after).
Recombinant protein과 천연단백질 각각에 대하여 항체가를 ELISA로 조사하였을 때 천연단백질에 대하여 유효한 항체가 만들어짐을 표시하였다. 또 표에는 나타내지 않았지만 효모추출물에 대한 항체는 전혀 검출되지 않았다. 이는 Z-Max™가 항원을 보다 고순도로 투여할 수 있슴을 의미한다.

■ 관련제품

pET Expression System(Recombinant His-Tag protein Expression System)
His-Bind Resin and Buffer Kit (Recombinant His-Tag protein Purification System)

* Novagen사의 제품입니다. Novagen사 제품 카다로그가 필요하신 분은 대리점으로 연락하여 주시기 바랍니다.

당단백질, 당쇄의 당조성 분석

당사는 당 단백질과 당쇄의 당조성 미량분석을 실시하고 있다. 이를 위하여 당질 분석 시스템 *GlycoTAG*™을 사용한 pyridyl amino화(PA화) 형광 표식법으로 아미노 당, 중성당을 동시에 분석한다.

■ 분석 내용

1. STEP 1(단당의 동정)
시료 100 pmol 상당량을 산 가수분해한 후, PA화하여 HPLC를 통하여 함유되어 있는 단당을 동정한다(결과로 HPLC 분석차트 첨부).

2. STEP 2(단당의 정량, mol 비의 결정)
STEP 1에서 얻어진 결과를 근거로 적당한 량의 시료를 가수분해한 후, PA화를 실시하여 HPLC로 정량한다.

【가격 및 납기】

		가 격	납 기
STEP 1	1 반응(3시료까지)	108만원/반응	통상 10일
STEP 1, 2	1 시료 1 시료 추가	300만원 240만원	통상 2주일

■ 분석 결과물

분석 protocol
분석 결과
HPLC chromatogram data

■ 유의 사항

시료의 순도	98% 이상(HPLC에서 single peak가 바람직하다)
필요 시료량	STEP 1 500 pmol 정도 STEP 1, 2 1.5 nmol 정도 의뢰시에 알려준 시료량을 기준으로 분석하므로 양의 차이가 크면 정확한 분석결과를 얻지 못할 수 있다.
형 상	충분히 탈염한 동결 건조품이 최적이나 수용액도 가능하다. 이 경우에는 농도를 명기하여야 하며 여지조각 등 cellulose 유래의 혼합물이 없도록 준비하여야 한다.
기 타	분석 가능한 단당은 glucose, galactose, mannose, xylose, N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactosamine, N-acetyl mannosamine 등이다.

보한의 홈페이지가 새로워졌습니다 !!

NEW URL www.bohan.co.kr

당사는 1997년 1월부터 국내 관련업계로서는 최초로 한글에 의한 인터넷 서비스를 실시해 오고 있습니다. 당사의 인터넷 서비스의 목적은 제품정보 및 신제품소식을 안내함과 동시에 최신바이오뉴스 등의 다양한 정보란을 개설하여 양질의 생명과학 연구 정보를 고객들에게 제공하며, 한층 더 나아가 연구자들과의 쌍방향 정보교환을 통해서 국내 생명과학연구계의 발전에 미력이나마 일조를 한다는 데 있습니다.

금번 홈페이지를 새롭게 단장하여 제품검색기능의 보완, 인터넷 주문서비스 체계의 확립(5월 초부터 본격 실시), 기술지원의 체계화 및 신속화, 연구자와의 지속적인 대화창구의 개설, Bio21 클럽을 통한 e-mail에 의한 정보제공서비스의 신설 등을 꼽을 수 있습니다.

새 홈페이지에는 아래의 내용이 확충되었습니다

게시판/방명록

초기화면의 [새소식] 뿐만 아니라 [게시판]을 통해 뉴스, 공지사항 그리고 켐페인 안내 등을 소개합니다. 본 란을 통해 당사의 활동을 신속하게 접하실 수 있습니다.
또 [방명록]을 통해 여러분의 다양한 의견을 보내 주실 수 있습니다.

제품검색

기존에는 제품정보를 열람하려면 "제품찾아보기"를 통해 제품목록을 순서대로 찾아 들어가야 했습니다. 이번에 신속하고 편리하게 제품검색을 할 수 있게 database를 새로이 구축하였습니다.
1차적으로 4월까지는 keyword 검색체계만으로, 5월 이후에는 여기에 제품명, 연구분야, 코드번호 등의 카테고리를 추가한 종합적인 체계로 찾고자 하는 제품정보를 검색할 수 있도록 구성합니다.

신제품 안내및 신기술/신상품(생물과 산업) 소개

꾸준히 쏟아져 나오는 당사의 신제품에 관한 알찬 정보들을 소개합니다.
[신기술/신상품(생물과 산업)]란은 당사가 후원하고 있는 포항공대 생물학정보센터(BRIC) 홈페이지 내의 [생물과 산업] 으로 직접 연결됩니다. 여기에는 당사의 제품을 포함하여 다양한 분야의 연구제품들에 관한 database가 구축되어 있습니다.

기술지원신청/Q&A

[기술지원신청]란을 통해 문의사항 및 요청자료명을 기입하여 보내주시면 받는 즉시 대응해 드립니다. 또한 [Q&A]로 들어가셔서 문의를 하실 수 있으며, 화제에 대해 폭 넓은 대화를 포럼형식으로 나눌 수 있습니다.

Bio21 회원등록

당사는 철저한 회원관리를 통해 e-mail에 의한 정보제공 서비스를 실시합니다.
본 란을 통해 당사의 인터넷 정보 서비스 회원(Bio21 클럽)에 가입하시면 연간 4회(3월, 6월, 9월, 12월초)에 걸쳐 발행하는 기술정보지 Life Science & Biotechnology를 무료로 우송해 드리며, e-mail을 통해 신제품 및 신기술 정보, 각종 행사안내, 캠페인 안내 등을 해 드립니다. Bio21 클럽의 활성화를 위해 당사는 아래와 같이 별도의 행사를 마련하였습니다. 많은 참여 부탁드립니다.
당사의 Bio21클럽은 장기적으로 일반회원과 인터넷 주문 회원으로 나뉘어 관리됩니다.
인터넷 주문 회원은 5월 이후부터 본격적으로 실시하는 인터넷 주문(전자상거래)을 이용하실 수 있습니다. 가입하시면 독립적인 ID와 password로 제품을 주문하실 수 있습니다.
정보제공 서비스는 일반회원과 동등하게 받으실 수 있습니다. 지금부터 4월까지는 일반회원으로만 등록할 수 있습니다. 인터넷 주문을 원하시는 분은 5월 이후에 별도로 가입해 주시기 바랍니다.

TaKaRa Protocols

본 란을 통해 당사가 가진 know how를 연구자 여러분께 소개해 드립니다.
일반적인 실험기법 및 신기술을 소개함으로써 연구에 실질적인 도움을 드리고자 합니다.
본 란은 3월부터 작업을 시작하여 순차적으로 update 됩니다.

인터넷 정보제공 서비스 회원등록 및 경품잔치 실시

당사는 금번 인터넷 정보제공 서비스의 개시와 함께 Bio21 클럽을 운영합니다.

새 홈페이지(www.bohan.co.kr)의 [회원등록]란을 통해 당사의 인터넷 정보 서비스 회원(Bio21 클럽)에 가입하시면 기술정보지 Life Science & Biotechnology를 무료로 받으실 수 있으며, e-mail을 통해 신제품 및 신기술 정보, 각종 행사안내, 캠페인 안내 등을 신속하게 받으실 수 있습니다.

1999년 5월 15일까지 Bio21 클럽에 가입하시는 분들 중 126명을 추첨하여 아래의 경품을, 가입자 전원에게는 소정의 기념품을 증정해 드리는 경품잔치를 마련하였습니다.

1등 (1명)	:	휴대용컴퓨터 "모빌리안 익스프레스" (LG전자, 장영실상 수상 신제품)
2등 (5명)	:	*TaKaRa Taq* (250 Unit), dNTP mixture 첨부
3등 (10명)	:	제한효소
4등 (30명)	:	기념우산
5등 (80명)	:	UV scale

* 3등의 경우 *Bam*H I(10,000 U), *Eco*R I(10,000 U), *Hind* III(10,000 U), *Sma* I(2,000 U), *Xba* I(3,000 U) 중 택일.

발표 : 5월 20일경 e-mail에 의한 개별통보 및 홈페이지, 6월호 본지 11호에 게제

당사의 Bio21 클럽은 일반회원과 인터넷 주문 회원으로 나뉘어 관리됩니다. 본 행사에 참여하시면 일단 일반회원으로 등록이 됩니다.

인터넷주문 회원가입을 위한 양식은 5월 이후 update되므로 Bio21 클럽 회원께는 별도로 안내하여 드립니다.

다양한 정보를 꾸준히 무상으로 받으실 수 있는 Bio21 클럽에 지금 바로 가입하십시요!

실험강좌

처음으로 면역 조직 화학적 염색을 실시하는 분들에게

면역 조직 화학적 염색법의 기초 (3)

■ 서론

면역조직 화학에서 일반적으로 이용하는 formalin 고정·파라핀 포매로는 모든 항원을 최적의 상태로 보존하기에는 한계가 있으며 때로는 목적 항원이 실활되거나 손상되는 경우도 있다. 왜냐하면 채취한 조직이나 세포를 구성하는 단백질, 당질, 지질이 용매에 녹아 나오지 않도록 하여 이들이 생체 내에서의 상태와 최대한 가깝게 보관해 두기 위해서는 어느 정도 강한 고정제를 사용할 필요가 있기 때문이다. 그 결과 상당히 많은 항원들의 항원성이 실활되어 파라핀 절편으로는 염색이 불가능한 항원이 나오게 된다. 이러한 항원성의 소실에는 aldehyde계 고정액에 의해 유리 아미노기가 소실된 항원결정기 그 자체가 변성되어 버리는 경우(비가역적 실활)와 항원결정기를 함유하는 단백질 분자 내에서의 cross-link 또는 주변의 다른 단백질 분자와의 cross-link에 의해 입체장애가 발생해 버리는 경우(가역적 실활)가 있다.

후자의 대부분의 경우는 trypsin, pepsin, protease (proteinase) 등의 단백질 분해효소의 처리나 autoclave, microwave, 온욕 등에 의한 열처리, HCl, formic acid에 의한 산처리, DNase에 의한 핵산의 소화, 계면활성제에 의한 전처리 등을 실시하여 조직절편 중의 항원성을 부활화하면 목적으로 하는 항원의 국재를 관찰할 수 있다.

이번에는 부활처리 방법으로 Proteinase K 처리와 microwave 처리법을 예를 들어 소개한다.

조직의 종류와 보존상태, 조직절편의 제작조건(고정방법, 고정시간, 보존상태), 항원의 종류, 효소의 역가, 면역염색의 방법과 시간 등에 따라 부활처리의 조건이 달라질 수 있으므로 주의해야 한다. 충분한 예비실험을 거칠 것을 권장한다.

■ 준비시약

- xylene
- ethanol(100%, 90%, 80%)
- 증류수
- washing buffer(PBS[TaKaRa Code T900] 또는 TBS[TaKaRa Code T903])
- 과산화수소
- 항체(1차항체, 표식 2차항체)
- 항체희석액(blockase[대일본제약], BSA[SIGMA] 등)
- 발색기질(DAB [SIGMA사/DAKO사] 등)
- 대비염색액(hematoxylin 또는 methyl green)
- mount medium(봉입제)

■ 준비 기구 및 기기

- Coplin jar(slide staining jar)
- Micropipette
- Microtube
- 습윤상
- Cover slip
- Cover glass
- 핀셋
- 현미경

■ 간단한 염색 순서

1. 절편제작 : 고정·포매(10% 중성완충 formalin·paraffin), 박절

2. 탈파라핀

   xylene (5분×3) → 100% ethanol (5분×2) →
   90% ethanol (5분) → 80% ethanol (5분) →
   흐르는 물에 세정(2분) → 증류수

   주) 실온이 낮은 경우는 탈파라핀이 충분히 되지 않는 경우가 있으므로 xylene속에서의 침지시간을 연장하여 파라핀을 충분히 제거하도록 한다.

3. 항원의 부활처리(전처리)

효소처리	trypsin 처리
	pepsin 처리
	proteinase K 처리
가열처리	autoclave
	microwave
	온욕처리
기타	HCl, formic acid 등의 산처리
	계면활성제
	핵산 소화

-항원의 부활화-

면역 조직 화학적 염색법의 기초(1)로서 조직절편의 염색법을, 기초(2)로서 세포의 면역 화학적 염색법을 각각 본지 제 7호 및 9호를 통해 소개한 바 있다.

이번에는 기초(3)으로서 항원의 부활화에 대하여 소개한다.

4. Blocking
   - 내인성 peroxidase
   - 내인성 biotin
   - 비특이적 반응

   } 의 blocking
5. 1차 항체반응
6. 2차 항체반응
7. 발색
8. 핵염색
9. 탈수・투철・봉입
10. 관찰

■ 항원의 부활처리의 예

(1) Proteinase K 처리의 경우

[준비시약]

- Proteinase K(TaKaRa Code 9033)
- TBS

[순서]

1) 절편 표면의 수분을 제거한다.
2) 효소용액(0.4 mg/ml TBS : DAKO사 S3004)을 절편 위에 얹은 후 실온에서 3~6분 동안 반응한다. 낮은 농도의 효소용액의 경우는 반응시간을 연장한다.
3) 물로 씻은 후 증류수에 침지한다.

[주의점]

효소의 역가는 maker 및 lot에 따라 다를 수 있으므로 효소용액과 반응시간 등의 조건을 미리 검토해 놓아야 한다.

(2) Microwave 처리의 경우

[준비시약]

- 10 mM citrate buffer(pH6.0) : citrate 2.1 g/ *l* 증류수. NaOH로 pH6.0으로 조정한다.

[준비기구]

- 전자레인지/autoclave용 plastic(TPX 소재)
- staining bed와 tray(금속성은 불가)

[준비기기]

- 전자레인지(가정용 조리모드로 가능)

[순서]

1) Staining jar에 citrate buffer를 넣고 slide glass를 set하여 쌓는다.
2) 전자레인지의 turn table 위에 놓고 microwave를 3~5분간 조사한다.
3) Jar를 꺼내고 buffer를 교환하거나 증발한 수분을 보충해 준다. 3~5분간의 조사를 필요한 횟수(예비실험에서 조사해 놓는다)만큼 반복한다(반복할 때마다 buffer교환 또는 수분을 보충해 준다).
4) 조사 종료후 buffer에 담근 채로 실온까지 식히고(적어도 20분 정도 방치), 물로 씻은 후 증류수에 침지한다.

[주의점]

1) Microwave가 절편에 균일하게 작용하도록 하여 slide glass를 staining jar에 setting한다.
2) Buffer속에서 가열을 반복함에 따라 절편이 허물어지기 쉽다. 절편을 제작할 때는 silan 등으로 코팅처리한 slide glass를 사용하도록 한다.
3) 가열처리에 의해 DNA의 double strand가 변성되므로 methyl green의 핵염색은 할 수 없다. Hematoxylin으로 염색하는 것이 바람직하다.

Novagen

In situ hybridization용 파라핀 절편 조직

Hybrid-Ready Tissues

탈파라핀 처리만으로 바로 *in situ* hybridization이나 면역조직염색이 가능 ! !

생체를 이해하기 위해서 살아있는 그대로의 조직을 세포 수준에서 관찰할 수 있다면 더할 나위가 없겠지만 현실적으로는 불가능하다. 대개의 경우 조직을 잘라낸 후 비교하려는 생체 내의 조건과 동일한 상태로 고정하여 관찰한다. 또 단일 생세포를 이용하여 생리활성이나 기능을 관찰하는 방법도 있지만 다양한 이종세포의 집단으로 구성된 조직절편을 이용하는 방법은 세포간의 상호작용을 관찰할 수 있다는 점에서 유용한 것이다. 조직절편을 처음부터 제작하는 경우 재료를 신선한 상태로 채집하여 가능한 한 살아있을 때와 가까운 상태로 고정할 필요가 있으며, 또한 많은 과정과 숙련도를 요구하는 포매・박절의 작업이 필요하다. Hybrid-Ready Tissues는 지금까지 입수가 곤란하였던 재료를 탈파라핀 처리만으로 사용할 수 있는 상태까지 준비한 제품이므로 곧바로 *in situ* hybridization이나 면역조직 염색을 실시할 수 있다.

■ 제품설명

Hybrid-Ready Tissues는 *in situ* hybridization이나 면역조직염색의 재료로서 최적인 파라핀 포매 조직절편이다. Mouse나 rat의 각 조직 및 각종의 사람 정상조직 및 사람 종양 조직의 절편을 다수 준비해 놓았다. 이러한 절편 슬라이드는 종래 방법으로 탈파라핀 처리를 한 후 사용해야 한다.

조직절편에 처리한 내용 :
4% paraformaldehyde 고정(4℃, 24시간) 후 PBS 세정, 파라핀 포매

조직절편의 두께 : Mouse・Rat 조직 7 ㎛
사람 조직 5 ㎛

실험례 1: anti-β-catenin polyclonal antibody를 이용한 면역조직 염색 (그림 1)

사용한 조직절편 : Mouse Embryo Tissues
(8～16 day Mouse Embryo sets)
Multi-Tissues Sets
(human Digestive Tissue Sets)

전처리 : 부활처리(microwave 5분×6회, in 10 mM citrate buffer, pH6.0)
내인성 peroxidase의 blocking
(3% H_2O_2, 5분)

1차항체 : Anti-β-catenin polyclonal antibody
(TaKaRa Code M136)
10 ㎍/ml 실온 2시간

검출방법 : ENVISION Plus(DAKO) 실온 30분

발색기질 : DAB(diaminobenzidine)

실험례 2: anti-osteocalcin monoclonal antibody를 이용한 면역조직 염색(그림 2)

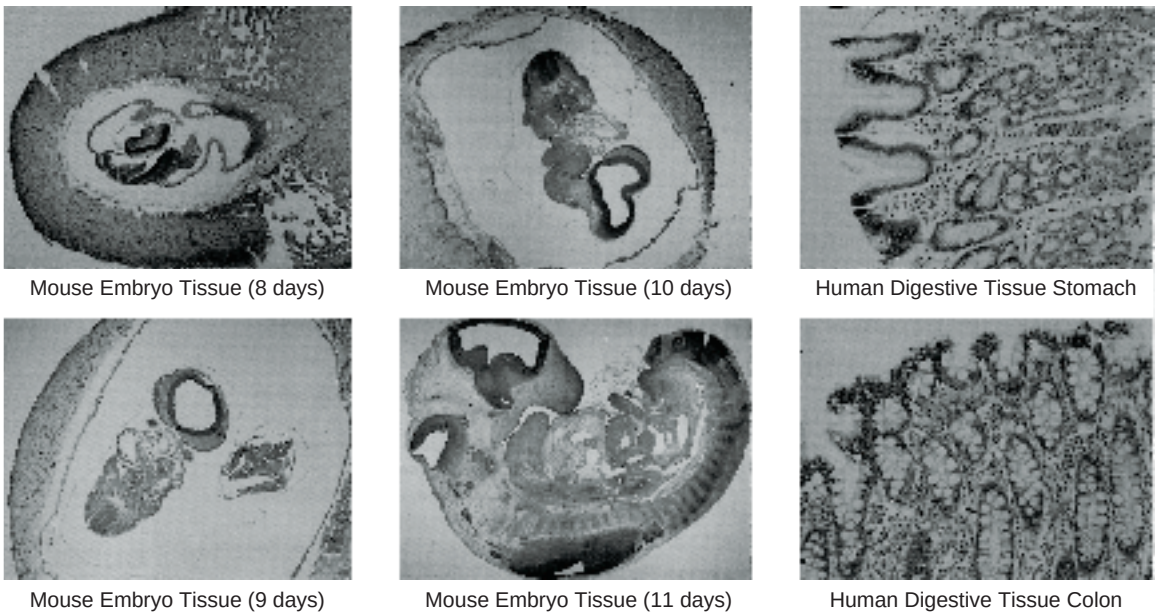
사용한 조직절편 : Human Disease Tissues(Bone Tumor)

전처리 : 내인성 peroxidase의 blocking
(3% H_2O_2, 5분)

1차항체 : anti-osteocalcin monoclonal antibody
(TaKaRa Code M042)
10 ㎍/ml 실온 2시간

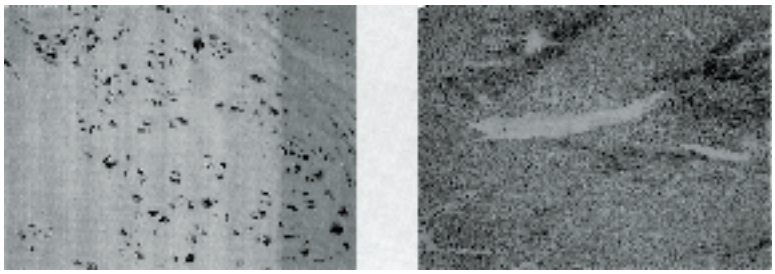
검출방법 : ENVISION Plus(DAKO) 실온 30분

발색기질 : DAB



Mouse Embryo Tissue (8 days) | Mouse Embryo Tissue (10 days) | Human Digestive Tissue Stomach
Mouse Embryo Tissue (9 days) | Mouse Embryo Tissue (11 days) | Human Digestive Tissue Colon

그림 1 anti- β-catenin polyclonal antibody를 이용한 면역조직 염색의 예



Chondro Sarcoma
Clone OCG2(TaKaRa Code M042)

Synovial Sarcoma
Clone OCG2(TaKaRa Code M042)

그림 2 anti-osteocalcin monoclonal antibody 이용한 면역조직 염색의 예

■ 제품목록

제품명	TaKaRa Code	규격
Mouse Embryo Tissues (8～16 day)		각 10 slides
Rat Embryo Tissues (8～16 day)		각 10 slides
8～16 day Embryo Set (Mouse)		1 slide × 9
8～16 day Embryo Set (Rat)		1 slide × 9
Adult Mouse Tissues (17 type)		각 10 slides
Adult Rat Tissues (17 type)		각 10 slides
Adult Tissue Set (Mouse)		1 slide × 16
Adult Tissue Set (Rat)		1 slide × 16
Normal Adult Human Tissues		
Multi-Tissue Set (70312-3～70321-3) 10종	NH150	5 slides
Normal Adult Human Brain Tissue (70251-3～70268-3) 7종	NH100	5 slides
Normal Adult Human Heart Tissue (70271-3～70285-3) 9종	NH130	5 slides
Human Disease Tissues		
Human Abdominal Tumor Tissue (70288-3～70291-3) 4종	NH200	5 slides
Human Adipose Tumor Tissue (70292-3) 1종	NH220	5 slides
Human Adrenal Tumor Tissue (70293-3～70297-3) 3종	NH230	5 slides
Human Alzheimer's Brain Tissue (70298-3) 1종	NH250	5 slides
Human Angioma Tumor Tissue (70299-3～70301-3) 3종	NH290	5 slides
Human Bladder Tumor Tissue (70303-3, 70304-3) 2종	NH280	5 slides
Human Bone Tumor Tissue (70305-3～70306-3) 2종	NH290	5 slides
Human Brain Tumor Tissue (70308-3～70330-3) 9종	NH300	5 slides
Human Breast Tumor Tissue (70331-3～70335-3) 4종	NH330	5 slides
Human Carotid Body Tumor Tissue (70336-3) 1종	NH350	5 slides
Human Colon Tumor Tissue (70337-3～70345-3) 7종	NH360	5 slides
Human Esophagus Tumor Tissue (70346-3～70349-3) 4종	NH380	5 slides
Human Fallopian Tube Tumor Tissue (70350-3) 1종	NH390	5 slides
Human Gallbladder Tumor Tissue (70351-3, 70352-3) 2종	NH400	5 slides
Human Greater Omentum Tumor Tissue (70354-3) 1종	NH410	5 slides
Human Kidney Tumor Tissue (70355-3～70359-3) 4종	NH420	5 slides
Human Liver Tumor Tissue (70360-3～70364-3) 5종	NH440	5 slides
Human Lung Tumor Tissue (70365-3～70372-3) 7종	NH460	5 slides
Human Lymph Node Tumor Tissue (70373-3～70377-3) 5종	NH480	5 slides
Human Mensenterium Tumor Tissue (70379-3) 1종	NH510	5 slides
Human Nose Tumor Tissue (70380-3) 1종	NH520	5 slides
Human Osteosarcoma Tissue (70382-3～70386-3) 3종	NH540	5 slides
Human Ovary Tumor Tissue (70390-3～70394-3) 4종	NH560	5 slides
Human Pancreas Tumor Tissue (70395-3～70397-3) 3종	NH580	5 slides
Human Pars Cervicalis Tumor Tissue (70398-3～70400-3) 2종	NH590	5 slides
Human Parathyroid Tumor Tissue (70401-3, 70402-3) 2종	NH600	5 slides
Human Parotid Tumor Tissue (70404-3～70406-3) 3종	NH610	5 slides
Human Pelvic Tumor Tissue (70407-3) 1종	NH620	5 slides
Human Prostate Tumor Tissue (70409-3, 70410-3) 2종	NH630	5 slides
Human Rectum Tumor Tissue (70411-3～70414-3) 4종	NH640	5 slides
Human Skin Tumor Tissue (70417-3) 1종	NH650	5 slides
Human Small Intestine Tumor Tissue (70423-3～70425-3) 3종	NH670	5 slides
Human Spine Tumor Tissue (70426-3) 1종	NH680	5 slides
Human Stomach Tumor Tissue (70429-3～70435-3) 7종	NH700	5 slides
Human Submaxillary Tumor Tissue (70436-3～70438-3) 3종	NH720	5 slides
Human Testis Tumor Tissue (70441-3) 1종	NH730	5 slides
Human Throat Tumor Tissue (70444-3, 70445-3) 2종	NH750	5 slides
Human Thymoma Tumor Tissue (70446-3) 1종	NH760	5 slides
Human Thyroid Tumor Tissue (70450-3～70453-3) 4종	NH770	5 slides
Human Tonsil Tumor Tissue (70454-3) 1종	NH790	5 slides
Human Ureter Tumor Tissue (70455-3) 1종	NH800	5 slides
Human Uterus Tumor Tissue (70457-3～70459-3) 3종	NH810	5 slides

Human Tissue는 제품군별로 TaKaRa Code로 관리됩니다. 주문시에는 TaKaRa Code 이외에 Novagen Code 및 제품명을 확인하여 주시고, 보다 상세한 내용에 대해서는 Novagen사 제품 카다로그를 참조하여 주시기 바랍니다.

BacMam™ Mammalian Expression System

BacMam™ Mammalin Expression System은 mammalian cell에서의 단백질 발현에 있어서 아주 강력하고 새로운 접근방법이다. Novagen사의 이 새로운 시스템은 baculovirus-budded virion이 아주 넓은 범위의 mammalian cell type들에 들어갈 수 있음을 발견한 Shoji 등의 최신 연구결과를 활용한 것이다(Shoji, *et al.* (1997) *J. Gen. Virol* **78**, 2657.).

BacMam System은 시간 및 재료의 소모가 적으며, 독성 및 감염 진핵세포의 비효율성을 개선하여 전 배양기간(14일 이상) 동안 발현을 완벽하게 유지해 준다.

pBacMam-1 transfer plasmid는 실험한 대부분의 세포에서 높은 수준의 발현을 유도하는 강력한 constitutive mammalian promoter를 가진다. Baculovirus 유전자들은 mammalian cell에서는 발현되지 못하므로 배양 중 감염성의 baculovirus virion이 생산되는 일은 없다.

■ 장점

1. 24시간 이내에 높은 수준의 발현을 확인할 수 있다.
2. Transfection 과정이 필요없다.
3. 100%에 이르는 모든 세포에서 발현한다.
4. 독성이 없다.
5. HeLa, HepG2, Huh7, IMR32, MT-2, CV-1, COS7, CPK12, FS-L3, RGM1, 그리고 PC12와 같은 광범위한 mammalian cell에 적합하다.
6. 사용이 간편하다-DNA나 virus를 정제할 필요가 없다.

(보다 상세한 내용에 관해서는 98/99 Novagen Catalogue 76~77페이지를 참조해 주시기 바랍니다.)

His · Bind Quick Cartridges and Columns

His · Bind Quick Cartridges and Columns로 target protein을 단 5분만에 정제!

Novagen사는 metal chelation chromatography에 의해 His · Tag sequence를 가진 융합단백질들을 신속하게 one-step으로 정제할 수 있는 His · Bind Quick Cartridges and Columns를 신제품으로 발매하였다. Cartridges와 Columns는 직경이 큰 cellulose matrix로 구성된 resin으로 packing 되어 있으며, Ni^{2+}를 precharge하여 놓은 것이다. His · Tag 융합단백질은 His · Bind resin상에 고정화된 2가 양이온(Ni^{2+})에 결합한다. 비결합단백질을 씻어낸 후 target protein은 imidazole의 용출로 얻을 수 있다.

His · Bind Quick 300 and 900 Cartridges는 syringe와 함께 사용하기 위해 고안된 것으로 일회의 running에서 각각 0.5 mg과 2 mg을 정제할 수 있다. His · Bind Quick Columns는 Novagen의 Vacuum Manifold와 함께 사용하도록 고안하였는데, 동시에 12개까지 진행할 수 있다.

Cellulose-based matrix는 agarose resin에 비해 5-50배 더 빠른 flow-rate를 가지는 반면 결합능력은 거의 동등하다. 또한 target protein을 crude lysate로부터 5분 내에 정제할 수 있다.

이러한 빠른 속도 때문에 His · Bind Quick Resin은 가격이 비싼 다른 metal chelation affinity matrix의 강력한 대안이 될 수 있다.

Format	Capacity/run
His · Bind Quick 300 Cartridge	0.5 mg protein
His · Bind Quick 900 Cartridge	2 mg protein
His · Bind Quick Column	5 mg protein

(보다 상세한 내용에 관해서는 98/99 Novagen Catalogue 112페이지를 참조해 주시기 바랍니다)

pET Dsb Fusion System 39b and 40b

두 개의 새로운 vector로 pET cloning vector의 선택의 폭을 더욱더 넓혔다. pET-39b(+)와 pET-40b(+) vector는 용해성 증가와 periplasm에서의 folding을 위한 Dsb 융합체를 생산하는 새로운 형태의 고발현 T7 promoter vector이다.

DsbA와 DsbC는 disulfide bond의 형성과 이성체화를 각각 촉매하는 periplasmic enzyme이다. Cytoplasm에서 용해성을 증가시켜 주도록 고안한 pET-32 Trx・Tag 시리즈에 비하여 DsbA・Tag과 DsbC・Tag vector들은 잠재적인 periplasmic localization을 수행할 수 있어 용해성을 증가시켜 주며, 비환원성 환경에서 적절한 folding이 가능하다.

신제품 pET-39와 pET-40 vector는 완전한 fusion tag의 제거를 위한 protease cleavage site, 효율적인 정제를 위한 His・Tag sequence 그리고 감도 높은 단백질의 정량과 비방사성 탐지 및 효율적인 정제를 위한 S・Tag sequence 등을 갖는 단백질을 발현한다.

■ 특징

1. Periplasm에서의 용해성 증가와 folding을 위한 Dsb와의 융합
2. Fusion tag의 완전한 제거를 위한 protease cleavage site
3. 단백질 정제를 용이하게 해 주는 His・Tag sequence
4. 고감도의 단백질 정량, 비방사성 탐지 및 효율적 정제를 위한 S・Tag sequence
   (보다 상세한 내용에 관해서는 98/99 Novagen Catalogue 51페이지를 참조해 주시기 바랍니다.)

pET Host strain Competent Cells

pET vector system은 bacteriophage T7 transcription과 translation signals로 강력하고 엄격하게 조절되는 원핵 단백질의 발현시스템으로 정평이 나 있다. 이 시스템은 선택 단백질의 적절한 발현과 정제를 위하여 각각 다른 *E. coli* bacterial host strain을 선택할 수 있다는 장점이 있다.

Novagen사는 pET vector들과 함께 흔히 사용되는 competent cell의 combination set를 신제품으로 출시하였다. 다수의 host strain이 최적화 실험에서 자주 같이 사용하고 있는 조합을 중심으로 사용하기 쉽게 같이 포장되었다. 고효율의 competent cell을 몇 개의 200 μl aliquot으로 구성된 set로 포장하였는데, 각 vial은 10회의 transformation에 사용할 수 있다. 각각의 package에는 test plasmid, SOC medium 및 protocol 정보를 첨부한다. 6개의 competent cell set는 λ(DE3) lysogen strains, nonlysogen control strains, (DE3)pLysS strains의 각기 다른 조합으로 구성되어 있다.

■ 특징

1. Frozen 0.2 ml-aliquot으로 공급
   : 각 vial로 transformation을 10회 실시할 수 있다.
2. Test plasmid, SOC medium, protocol 첨부
3. 재현할 수 있는 고효율성
4. Expression strains(λDE3 lysogen)과 isogenic control strains(nonlysogens)의 선택
   (보다 상세한 내용에 관해서는 98/99 Novagen Catalogue 53~54페이지를 참조해 주시기 바랍니다.)

Singles™ Competent Cells

여러분의 transformation을 Novagen사의 신제품 Singles™ Competent Cells로 !! ready-to-use형의 50 μl aliquot으로 준비

신제품인 single-use형의 competent cell을 사용하면 불필요한 pipetting 및 freezing-thawing 과정을 생략할 수 있어 시간이 절약되고 실험과정이 신속해진다. 또 높은 재현성과 효율성도 얻을 수 있다.

신제품 Singles™ Competent Cells는 test plasmid 및 SOC medium과 함께 frozen 50 μl aliquot의 형태로 공급된다. λDE3 expression strain BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS 및 Novablue cell에 한해서 이용할 수 있으며 각각 11회와 22회 반응분의 kit으로 준비하였다.
(보다 상세한 내용에 관해서는 98/99 Novagen Catalogue 53~54페이지를 참조해 주시기 바랍니다.)

FMC

PAGEr™ precast gels

본 제품은 FMC사의 제품입니다.

A포장(10매 입)/B포장(20매 입)

7.5% (TaKara Code F59501A/B)
10% (TaKara Code F59502A/B)
12% (TaKara Code F59503A/B)
15% (TaKara Code F59504A/B)
4-20% (TaKara Code F59505A/B)
10-20% (TaKara Code F59506A/B)

본 제품은 단백질 전기영동용을 위한 polyacrylamide gel이다. 광범위한 분자량 범위의 미변성 또는 변성단백질을 정확하고 간단하게 분리할 수 있다. PAGEr™은 SDS를 함유하지 않은 Tris-Glycine계의 gel로서 영동 버퍼를 변화시켜 줌으로써 변성단백질 및 비변성단백질의 전기영동이 가능하다. 또 독자적인 packaging으로 buffer가 샐 염려가 없다. 4종류의 농도의 gel 및 2종류의 gradient gel을 준비해 놓았다. 따라서 시료에 맞는 최적의 gel을 사용하면 된다.

■ 특징

- Gel 제작시 번잡한 조작이 필요 없다
- Well을 쉽게 볼 수 있어 시료의 주입이 용이하다.
- 높은 분리능과 재현성을 갖는다.
- 대부분의 전기영동장치로 사용할 수 있다.
- 인체에 유해한 acrylamide monomer를 흡입하지 않아 안전하다

■ 제품사양

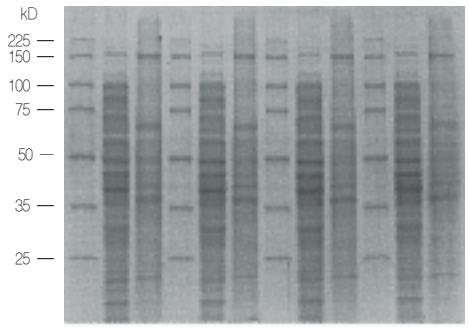
Cassette size : 10×10 cm

Well 수 : 12

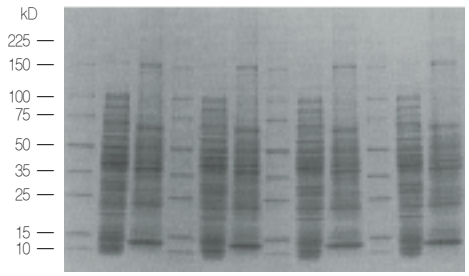
* 8×10 cm의 cassette size도 가능하므로 당사로 문의를 해 주시기 바랍니다.

[적합 전기영동장치]

제품명	Casette size 8×10 cm	10×10 cm
NOVEX™ Xcell I & II™		○
Bio-Rad Mini-PROTEAN® II	○	
Hoefer™ Mighty Small® (SE260)		○
Hoefer™ Mighty Small® (SE250)	○	
Sigma-Aldrich mini Techware	○	○
Life Technologies™ Mini V	○	
CBS Scientific (for PAGEr™)	○	○
Owl Scientific Penguin™	○	○
ISS	○	○
Zaxis System 2000	○	○
Daiichi 2-and 6-gel systems	○	○



10% Tris-Glycine gel



4-20% Tris-Glycine gel

그림 PAGEr™ precast gel에 의한 단백질의 전기영동

Lane 1, 4, 7, 10 : ProSieve® protein marker
Lane 2, 5, 8, 11 : 대장균 추출물
Lane 3, 6, 12 : 사람 간장 추출물
Coomassie blue로 염색

GelStar® Nucleic Acid Gel Stain

모든 형태의 핵산에 사용할 수 있는 고감도의 형광 염색제

GelStar® Nucleic Acid Gel Stain은 핵산염색에 대한 최신 기술을 대표하는 것이다. 이 high-performance dye를 사용하면 전기영동 후 표준적인 300 nm UV transilluminator를 이용하여 고감도로 DNA 및 RNA를 형광 검출할 수 있다. Gel을 Polaroid film이나 CCD-based system으로 촬영하거나 문서화한다.

■ GelStar Stain의 잇점(EtBr과의 비교)

1. 염색법을 유연하게 선택할 수 있다-casting전 agarose 용액에 직접 첨가하거나 전기영동 후의 염색이 모두 가능하다.
2. dsDNA의 경우 20 pg까지 검출
3. RNA(nondenaturing gel에서)의 경우 3 ng까지 검출
4. Glyoxalated RNA의 경우 10 ng까지 검출
5. MDE gel에서의 SSCP 분석을 위한 DNA 염색
6. destaining 이 필요없다.
7. 두껍거나 고농도의 agorose gel에서도 검출 가능

FMC 전제품 가격 대폭 인하

30년 전통의 FMC Agarose를 비롯한 전기영동제품은 실험목적에 맞추어 최상의 결과를 보증합니다. 금번 환율의 안정과 당사의 원가절감 노력으로 가격을 대폭 인하합니다. FMC로부터의 도입 가격이 전년에 비하여 약 15% 이상 인상되었기 때문에 실제 인하율은 30% 정도에 상당합니다.

▶ 주요제품 안내

Code No.	제품명	규격	기존가격	인하가격	인하율
F50000	SeaKem LE Agarose	125 g	252,000	223,000	12%
F50001	SeaKem LE Agarose	25 g	60,000	54,000	10%
F50010	SeaKem ME Agarose	125 g	285,000	247,000	13%
F50011	SeaKem ME Agarose	25 g	72,000	64,000	11%
F50021	SeaKem HE Agarose	25 g	78,000	71,000	9%
F50031	SeaKem HEEO Agarose	25 g	87,000	76,000	13%
F50041	SeaKem HGT Agarose	25 g	87,000	69,000	21%
F50070	SeaKem GTG Agarose	125 g	369,000	323,000	12%
F50071	SeaKem GTG Agarose	25 g	81,000	74,000	9%
F50080	NuSieve GTG Agarose	125 g	483,000	394,000	18%
F50081	NuSieve GTG Agarose	25 g	150,000	115,000	23%
F50090	NuSieve 3:1 Agarose	125 g	462,000	394,000	15%
F50091	NuSieve 3:1 Agarose	25 g	144,000	118,000	18%
F50101	SeaPlaque Agarose	25 g	171,000	162,000	5%
F50111	SeaPlaque GTG Agarose	25 g	264,000	191,000	28%
F50152	SeaKem GOLD Agarose	25 g	162,000	140,000	14%
F50181	MetaPhor Agarose	25 g	165,000	154,000	7%
F50513	SYBR GREEN I	10 X 50 μl	300,000	191,000	36%
F50611	50% Long Ranger Solution	250 ml	255,000	154,000	40%
F50615	50% Long Ranger Solution	1 l	702,000	559,000	20%
F53440	GELBOND FILM 0.1 mm	102 mm X 16.5 m	246,000	162,000	34%
F53734	GELBOND FILM 0.2 mm	85 X 100 mm (100매)	123,000	86,000	30%
F54711	GELBOND PAG FILM 0.2 mm	138 X 158 mm (50매)	183,000	120,000	34%

Q&A

Q1 제한효소 *Acc* I의 인식서열을 카탈로그에는 GT(A/C)(G/T)AC로 기재하였는데 이는 실제로 어떠한 서열을 표시하는 것인가?

A1 예를 들면 (A/C)라고 기재한 것은 A와 C 모두 인식함을 의미합니다. 따라서 *Acc* I의 경우 GTAGAC, GTATAC, GTCGAC, GTCTAC 등 4종류의 모든 염기서열을 인식합니다.

Q2 합성 DNA를 인산화할 때의 반응조건은?

A2 반응 버퍼의 조성은 50 mM Tris-HCl(pH9.5), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1 mM ATP가 최적입니다. 1~50 pmol의 합성 DNA에 대하여 5~20 U의 T4 Polynucleotide Kinase를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켜 주시기 바랍니다. 또 그 반응버퍼는 T4 Polynucleotide Kinase에 첨부되어 있는 버퍼와는 pH가 다릅니다. 첨부버퍼로 반응하면 효율이 떨어지므로 주의해 주시기 바랍니다.

Q3 Agarose gel에서 DNA를 회수할 때의 주의점은?

A3 아래의 사항에 주의하세요.

1) 염색시간은 15~20분으로 한다.
2) 멸균증류수로 20분씩 2회에 걸쳐 탈색한다.
3) DNA에 UV광을 조사하는 시간은 1분 이내로 한다. UV광을 장시간 조사하면 DNA에 nick가 생기므로 주의한다.
4) Gel과 영동버퍼에 1 mM의 guanosine 또는 cytidine을 첨가해 두면 UV에 의한 손상으로부터 DNA를 보호하는 효과가 있다.
(Gründemann, D. (1996) *BioTechniques* **21**, 893-903)
5) Gel은 가능한 한 작게 자른다. 또 시료가 소량인 경우는 아래의 방법이 좋다.
Molecular weight marker에 이웃한 lane에서 시료를 전기영동한다. Marker lane과 시료 lane의 일부를 함유하는 영역을 gel에서 잘라내어 EtBr로 염색한 후 UV를 조사하여 목적 시료의 위치를 확인한다. 잘라낸 gel 단편을 원래의 위치에 배열하여 염색하지 않은 gel로부터 목적 DNA를 잘라낸다(FMC사의 보고).

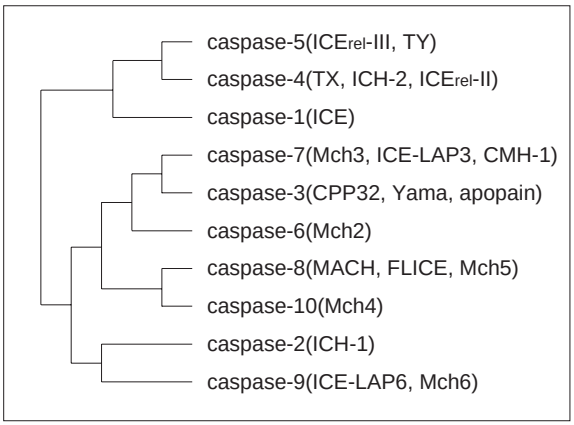
Q4 Verocytotoxin을 PCR법으로 보다 고감도로 검출하기 위한 시료의 조제법은?

A4 통상의 경우보다 검출감도를 높이고자 하는 경우는 아래의 방법을 시도해 보시기 바랍니다.

1) 균체배양액 1 ml을 eppendorf tube에 분주한다.
2) 4℃, 5,000 rpm으로 5분간 원심분리한다.
3) 상청을 버리고 침전에 100 ㎕의 증류수를 첨가하여 현탁한다.
4) 95℃에서 5분간 열처리한다.
5) 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상청을 회수한다. 100 ㎕의 PCR 반응계에 대하여 10~50 ㎕의 상청을 첨가한다.

Q5 Apoptosis 연구분야에서 최근 커다란 주목을 받고 있는 caspase란 무엇인가?

A5 최근 apoptosis의 분자기구에 관한 연구가 급속히 진행됨에 따라 ICE/CED-3 protease family의 각 명칭의 통일이 이루어져 Asp의 후미를 절단하는 cystein protease라는 의미로 caspase라는 명칭이 사용되고 있습니다. 사람의 caspase family는 아래의 그림처럼 10종류로 분류됩니다(Alnemri, E. S. *et al.* (1996) *Cell* **87**, 171).
또 최근 mouse로부터 새로운 caspase-11, -12가 보고되었습니다(Van de Crean, M. *et al.* (1997) *FEBS Letter* **403**, 61). 이에 따라 apopain(TaKaRa Code SP015, SP022, SP023)은 caspase-3으로, ICE(TaKaRa Code SP011~014, SP016~021)은 caspase-1으로 불립니다.



Q6 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System은 종래의 MTT와 어떻게 다른가?

A6 원리는 동일하나 각각의 tetrazolium salt로부터 생성하는 formazan 색소의 물에 대한 용해성이 틀립니다. MTT는 물에 녹지 않는 formazan 색소의 침상결정을 형성하므로 계면활성제나 유기용매로 가용화하는 조작이 필요합니다. Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System의 경우는 수용성의 formazan 색소가 형성되므로 이러한 번잡한 조작이 필요하지 않습니다.

Q7 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System으로 측정한 값이 배지성분이나 첨가약제에 의해 영향을 받는가?

A7 배지 속에 환원성의 물질이 존재하면 발색이 일어납니다. 이러한 경우에서는 측정값이 본래의 값과 달라질 수 있습니다. 이런 현상이 일어날 가능성이 있는 경우는 세포를 PBS로 한번 세정하거나 세포를 넣지 않은 negative control로 동시에 측정해 볼 것을 권장합니다.

Q8 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System을 사용한 후 폐액의 처리방법은?

A8 사용 후의 반응액은 차아염소산 나트륨으로 탈색한 다음 pH7 정도로 조정한 후 폐기하여 주시기 바랍니다.

Q9 "제한효소의 methyl화에 의한 영향"에 기재되어 있는 CG methylase, dam methylase, dcm methylase의 영향이란?

A9 일반적으로 포유류 유래의 genome DNA는 CG methylase에 의해 CG의 배열이 methyl화 되어 ^{5m}CG로 됩니다. 또 일반적으로 자주 사용하는 JM109나 HB101은 dam methylase와 dcm methylase를 가지므로 이러한 숙주로부터 조제한 plasmid는 GATC, CCWGG의 배열이 methyl화 되어 각각 G^{6m}ATC, C^{5m}CWGG가 됩니다. Methyl화의 영향을 받는 제한효소는 그 인식배열 중에 이러한 부위가 methyl화 된 DNA는 절단할 수 없습니다. 반응에 사용한 DNA의 유래에 따라서는 절단할 수 없는 것도 있으므로 methyl화의 영향은 확인해 주시기 바랍니다.

Q10 37℃ 이외의 반응온도를 권장하는 제한효소들의 37℃에서의 활성은?

A10 각 효소의 권장 반응온도[( )내에 기재]에서의 활성을 100%로 한 경우, 37℃에서의 상대활성을 아래에 나타내었습니다. 단 장시간 반응을 실시하는 경우에는 효소의 안정성이 저하되는 것도 있으므로 주의해 주시기 바랍니다.

Acc III (60℃)	＜10%
BamH I (30℃)	100%
Bsp1286 I (30℃)	100%
BssH II (30℃)	60%
BstP I (60℃)	20%
BstX I (40℃)	60%
Cla I (30℃)	100%
Cpo I (30℃)	60%
Fse I (30℃)	50%
Sfi I (50℃)	30%
Sma I (30℃)	100%
Tth111 I (65℃)	10%

Q11 Poly (A) Polymerase (TaKaRa Code 2180A/B)의 반응버퍼 조성은?

A11 1×농도 버퍼조성은 50 mM Tris-HCl(pH7.9), 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $MnCl_2$, 250 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.05% BSA입니다. 시약을 전부 첨가한 상태로 반응버퍼를 보존하면 착색되므로 $MnCl_2$를 제외한 5× 농도의 버퍼를 보존하고 사용시에는 $MnCl_2$를 첨가하여 반응액을 조제해 주시기 바랍니다.

Q12 TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)(TaKaRa Code RR024A/B)을 사용할 때의 주의점은?

A12 본 kit에는 한 개의 tube에 조제한 반응액으로 역전사반응과 PCR반응을 연속적으로 실시합니다. Downstream primer로 역전사반응을 실시하므로 downstream primer를 antisense strand의 배열로, upstream primer를 sense strand의 배열로 할 필요가 있습니다. Downstream primer를 sense strand의 배열로 하면 산물이 얻어지지 않으니 주의해 주시기 바랍니다.

Q13 핵산염색시약 GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (TaKaRa Code F50535)과 SYBR® Green(TaKaRa Code F50512 외)의 차이점은?

A13 아래와 같은 차이점이 있습니다.

1) Gelstar®로는 single strand, double strand의 핵산 모두를 염색할 수 있으나 SYBR® Green으로는 사용하는 시약의 종류에 다라 각각 다릅니다(SYBR Green I 및 II).
2) 최적의 여기파장은 Gelstar®의 경우는 300 nm 근방이고, SYBR® green은 254 nm입니다.
3) Gelstar®로는 희석한 염색액을 적어도 3일간 보존할 수 있으나 SYBR® Green은 사용시 조제해야 합니다.

Q14 GelStar® Nucleic Acid Gel Stain Filter(TaKaRa Code F50536)의 사용법은?

A14 GelStar® Filter는 길이 7.5 cm의 정사각형 황색 gelatin filter(Wratten Filter No. 9)로 사진촬영시의 background를 낮춰주기 위해 사용합니다. 카메라의 종류에 따라서는 이 filter를 사용할 수 없는 경우도 있으므로 주의해 주시기 바랍니다.

Q15 GFP, BFP vector(TaKaRa Code 3131～3136)를 사용하여 reporter 유전자의 하류측에 목적의 유전자를 삽입할 수 있는가?

A15 할 수 없습니다. 본 vector는 *Nhe* I site에 목적의 유전자를 cloning하도록 설계되었으므로 목적의 유전자의 하류측에 reporter 유전자의 배열이 이어지도록 되어 있습니다.

Q16 5' 말단에 제한효소 site를 부가한 primer로 증폭한 PCR 산물을 그 제한효소로 절단하고 싶다. 높은 효율로 절단하기 위해서는 제한효소 site의 외측에 몇 개의 base가 필요한가?

A16 *Apa* I, *Bam*H I, *Bst*X I, *Cla* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hin*d III, *Not* I, *Pst* I, *Sac* I, *Sal* I, *Sma* I, *Spe* I, *Xba* I, *Xho* I에 대해서는 제한효소 인식배열 외에 5' 측에 3 base가 있다면 절단할 수 있다는 보고가 있습니다. 상세한 내용에 대해서는 Zimmermann, K. (1998) *BioTechniques* **24**, 582-584를 참고해 주시기 바랍니다.

Q17 pAUR vector의 배열은?

A17 GeneBank의 Accession No.는 아래와 같습니다.

pAUR101 AB012282
pAUR112 AB012283
pAUR123 AB012284

pAUR224의 경우는 아직 등록되지 않았습니다. 양해해 주시기 바랍니다.

Q18 *TaKaRa LA Taq*™은 dUTP를 기질로 사용할 수 있는가?

A18 Incorporation 효율이 상당히 낮으므로 권장할 수 없습니다. 표식된 dUTP를 기질로서 사용하는 PCR 산물을 labeling할 때에는 dTTP와 혼합해 줄 필요가 있습니다. 또한 이 경우의 혼합비율은 조건검토가 필요합니다.

Q19 mRNA Selective PCR Kit으로 증폭한 PCR 산물을 제한효소로 절단할 수 있는가?

A19 본 kit은 dNTP analogue를 기질로 사용하므로 이 analogue가 들어가 있는 부위는 절단할 수 없는 경우가 있습니다. 제한효소로 PCR 산물을 절단하는 경우는 analogue를 함유하지 않는 dNTP mixture를 사용하여 재증폭을 해 주시기 바랍니다.

Q20 *Label* IT™의 표식효율은 어느 정도인가?

A20 *Label* IT™를 이용하면 guanine 잔기가 표식됩니다. 통상의 조건으로 double strand DNA를 표식하면 20~60잔기당 1개의 비율로 표식됩니다. 표식효율을 높일려면 반응액에 첨가하는 *Label* IT™ Reagent의 양을 늘려 주시기 바랍니다.

Q21 *Label* IT™로 oligonucleotide를 표식할 수 있는가?

A21 가능하지만, 이 경우는 DNA 1 μg에 대하여 *Label* IT™ Reagent를 통상의 1 μl에서 3 μl로 늘려서 표식하는 것이 좋습니다.

Q22 *Label* IT™ Rhodamine Labeling Kit과 *Label* IT™ Fluorescein Labeling Kit으로 labeling할때의 여기파장 및 형광파장은?

A22 Rhodamine(5-carboxy-X-rhodamine)의 여기파장은 576 nm이고, 형광파장은 597 nm입니다.
Fluorescein(5-carboxyfluorescein)의 여기파장은 492 nm이고, 형광파장은 518 nm입니다.

Q23 Dr. GenTLE(효모・그램양성균 용)을 사용하여 효모의 plasmid를 회수할 수 있는가?

A23 가능합니다.

Q24 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480이나 2000을 사용하여 *TaKaRa Z-Taq*™으로 증폭할 때의 PCR 조건은?

A24 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480이나 2000을 사용하는 경우도 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP의 PCR 조건으로 반응하여 주시기 바랍니다.
단, denature 시간은 통상 1초이나 긴 strand를 증폭할 경우에는 1~10초로 연장하여 주십시오. 한편 주형량이 적은 경우 또는 증폭효율이 나쁜 경우에는 annealing시간을 0.5~1분까지 연장한 3단계의 PCR조건을 권장합니다.

Q25 *TaKaRa Z-Taq*™(TaKaRa Code R006A/B)의 PCR조건은 어떻게 설정하면 좋은가?

A25 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP를 사용하여 50 μl의 반응계에서 PCR할 경우 우선은 98℃에서 1초, 60~68℃ X초의 shuttle PCR로 시험합니다. 이 때 annealing & extension 시간(X)은 10~20초/kbp를 기준으로 설정하십시오. 한편 이용하는 primer의 *Tm*값이 낮은 경우에는 primer에 적합한 annealing 온도(Y)를 설정하여 다음과 같은 3단계의 PCR 조건으로 할 것을 권장합니다.

98℃	1초	┐
Y℃	1~10초	├ 30 cycles
72℃	X초	┘

Q26 *TaKaRa Z-Taq*™으로 증폭한 PCR 산물의 말단 형상은?

A26 대부분의 PCR산물은 A가 1염기 부가되어 있으므로 TA cloning을 실시할 수 있습니다.

Q27 BioWhittaker사의 Normal Human Cell은 어느 정도 계대할 수 있는가?

A27 통상 동결 vial 중의 모든 세포를 10 cm ϕ dish 1~2장에 접종합니다. 70~90% confluent에 도달하면 dish 3~4장에 계대합니다. Dish에서 dish로의 계대는 약 4회까지 가능하므로 세포를 모두 계대하였을 경우 계산상으로는 최종적으로(1~2) × $(3\sim4)^4$=81~512장분의 petri dish 10 cm ϕ에 상당하는 세포를 얻은 셈이 됩니다. 한편 접종밀도, 계대시간이 세포에 따라 다르므로 이에 대해서는 첨부설명서를 참조하여 주시기 바랍니다.

Q28 BioWhittaker사의 Normal Human Cell을 배양할때 어떤 배양용기를 사용하는가?

A28 통상 멸균처리한 접착세포 배양용 flask나 dish를 사용합니다. Collagen 등의 접착인자로 표면처리한 flask나 dish 또는 초대배양용 petri dish도 권장합니다.

Q29 BioWhittaker사의 정상 사람세포를 계대하고자 한다. 계대할 때 어떤 시약으로 세포를 떼어내면 좋은가?

A29 Reagent Pack(TaKaRa Code B5034)을 이용하십시오. 본 제품은 Normal Human Cell에 최대한 손상을 주지 않도록 Trypsin 농도가 낮게 설정되어 있는 subculture용 시약으로 품질이 확인된 제품입니다.

Q30 BioWhittaker사의 Normal Human Cell은 어느 정도 계대할 수 있는가?

A30 본 세포의 보증 분열횟수는 15회입니다. 접종 후 3~4회의 분열로 100% confluent가 되므로 약 4회의 계대가 가능합니다.

Q31 BioWhittaker사의 정상사람기관지/기관상피세포(NHBE)에 retinoic acid를 함유하는 제품(TaKaRa Code C2540)과 retinoic acid를 함유하지 않는 제품(TaKaRa Code C2541)이 있는데 이들은 어떻게 다른가?

A31 Retinoic acid를 함유하고 있으면 정상사람기관지/기관상피세포(NHBE)의 분화가 억제됩니다. 따라서 목적으로 하는 물질의 assay에 retinoic acid가 영향을 주지 않는 경우는 retinoic acid 함유 type을 권장합니다.

Q32 신발매한 정상 사람 신장 상피세포(HRE)(TaKaRa Code C2556)는 근위뇨세관 상피세포(RPTEC)(Code C2553) 및 신피질 상피세포(HRCE)(Code C2554)와 어떻게 다른가?

A32 정상 사람 신장 상피세포(HRE)는 신장 전체를 homogenize한 후 선택배지에서 상피세포만을 selection한 것입니다. 신장의 일부의 조직에서 상피세포를 조제한 근위뇨세관 상피세포(RPTEC) 및 신피질 상피세포(HRCE)는 조제방법이 다릅니다.

Q33 *Pyrobest*™ DNA Polymerase(TaKaRa Code R005A/B)로 증폭한 PCR 산물의 말단형상은?

A33 대부분이 평활말단으로 되어 있습니다. 따라서 PCR 산물을 그대로 또는 필요에 따라 인산화한 후 평활말단의 vector에 subcloning할 수 있습니다.

Q34 *Pyrobest*™ DNA Polymerase의 정확성(fidelity)은 *Taq* DNA Polymerase와 비교하여 어느 정도 높은가?

A34 Cline 등의 방법이나 Kunkel 등의 방법으로 *Taq* DNA Polymerase와 비교한 결과, 약 10배 정도 높은 것으로 확인되었습니다.

Q35 *Pyrobest*™ DNA Polymerase로 증폭가능한 strand의 길이는 어느정도인가?

A35 Human genome의 경우 약 5 kbp, λDNA의 경우 12 kbp의 증폭에 성공하였습니다(TaKaRa data).

Q36 *TaKaRa LA Taq*™ with GC Buffer(TaKaRa Code R002AG/BG)의 buffer 사용법은?

A36 GC Buffer I과 II의 조성을 밝힐 수는 없지만 GC Buffer I보다는 II가 강한 DNA 변성 효과를 갖고 있습니다. 따라서 처음에는 GC Buffer I을 사용하고 증폭이 안되는 경우에 II를 사용해 보시기 바랍니다.

Q37 *TaKaRa LA Taq*™ with GC Buffer로 Long PCR이 가능한가?

A37 *TaKaRa LA Taq*™은 Long PCR용 효소이므로 물론 가능합니다. GC 함량이 50%인 주형의 경우 *LA Taq*™ with GC Buffer I을 이용하여 human genome의 경우 17.5 kbp, λDNA의 경우 35 kbp의 증폭이 가능합니다. 또한 GC 함량이 높은 주형의 경우(GC 함량: 약 70%)에는 최소한 약 2 kbp 이상의 증폭이 확인되었습니다.

Q38 *TaKaRa LA Taq*™ with GC Buffer를 사용하여 GC 함량이 높은 주형에 도전하고 싶다. 주의하여야 할 점은 무엇인가?

A38 통상의 PCR을 실시할 때보다는 *Tm*값이 높은 primer를 사용할 것을 권장합니다. 따라서 길이는 30 mer 이상의 것을 사용하십시오.

Q39 Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150) 내의 cosmid vector의 sequence는?

A39 유감스럽게도 GeneBank 등의 database에는 아직 등록되어 있지 않습니다. 희망하시는 분께는 e-mail로 보내드리겠사오니 당사로 연락하여 주십시오.

Q40 TaKaRa RECOCHIP(TaKaRa Code 9039)으로 회수한 DNA는 그대로 다음 조작에 사용할 수 있는가?

A40 Ethanol 침전이 필요합니다. Ethanol 침전 후 회수한 DNA는 제한효소 절단, ligation, sequencing에 사용할 수 있습니다.

Q41 pET System을 이용하여 단백질을 발현시키기 위한 plasmid를 구축할 때에 사용하는 숙주는 어떤 것을 권장하는가?

A41 Plasmid를 구축할 때에 사용하는 숙주는 T7 RNA polymerase 유전자를 갖고 있지 않고 형질전환 효율이 좋은 균주를 사용할 필요가 있습니다. DE3을 갖지 않는 *recA*⁻주(JM109, DH5α, HB101, NovaBlue 등)의 사용을 권장합니다.

Q42 Calbenicillin(TaKaRa Code NV633)과 Ampicillin의 차이는?

A42 Calbenicillin은 Ampicillin과 마찬가지로 Ampicillin 내성 plasmid의 selection 약제로 사용할 수 있습니다. 균이 증식함에 따라 수반되는 배지 pH의 저하와 대량으로 분비되는 β-lactamase에 의하여 Ampicillin은 분해됩니다. 그러나 Calbenicillin은 Ampicillin에 비하여 배지의 pH 저하에 강하고 또 β-lactamase에 대한 감수성이 약간 떨어지기 때문에 장시간 안정하게 활성이 지속됩니다. Calbenicillin을 사용하면 plate 상에서의 selection이 정확하고 또 액체배양에서는 대장균 균주로부터의 Ampicillin 내성 plasmid의 탈락을 방지할 수 있습니다("The Current Protocols in Molecular Biology"및"Molecular Cloning"에서).

보한 소식

서울대학교 유전공학연구소 김선영 교수팀의 retrovirus vector 공급개시

TaKaRa는 서울대학교 유전공학연구소 바이러스학 연구실의 김선영 교수팀과 유전자치료 제품을 전문적으로 개발하는 생명공학 벤처기업 바이로메디카 패시픽(주)가 개발한 유전자치료 연구용 벡터의 전세계 공급에 관한 계약을 체결하고 지난 12월부터 본격 판매에 들어가 한국은 당사의 대리점을 통하여 공급하게 되었습니다. 유전자치료는 유전성 난치질환, 암, 에이즈 등의 치료에 획기적인 기여를 할 것으로 기대되는 최첨단 차세대 의료기술로 미국을 비롯한 선진국을 중심으로 활발하게 연구가 진행되어 이미 수백건 이상의 임상실험이 실시되고 있습니다.

유전자 치료분야에서 가장 널리 사용하고 있는 retrovirus vector는 도입한 유전자와 함께 염색체에 삽입되므로 유전자 치료에 사용하면 반영구적으로 치료할 수 있습니다. 그러나 지금까지는 retrovirus vector를 이용하여 조혈모세포에 유전자를 도입하는 경우에 그 도입 효율이 아주 낮기 때문에 충분한 치료효과를 발휘할 수 없었습니다. 당사는 이미 미국의 인디아나대학과 공동으로 retrovirus를 비약적으로 조혈모세포에 도입할 수 있는 recombinant fibronectin법을 개발하였습니다. 이 방법을 전세계에 보급하기 위하여 상품명 RetroNectin™을 이미 발매하였고 현재 이 제품을 이용한 유전자 치료의 임상시험연구가 미국 인디아나대학을 비롯한 세계의 유수 기관에서 실시되고 있으며 성공적인 결과를 얻고 있습니다. 이와 같은 retrovirus vector에 의한 유전자 치료 연구에 능동적으로 대응하고자 우리나라의 생명공학 벤처기업인 ViroMedica Pacific Ltd.가 개발한 임상적으로 안전성이 높은 retrovirus vector를 Takara의 전세계 판매조직을 통하여 공급하게 된 것입니다. 당사는 앞으로도 우리의 연구자나 기업에서 개발한 신기술이나 제품을 세계에 공급하는데 보다 적극적으로 기여할 뿐만 아니라 당사의 일본 본사 연구소와의 국제 공동연구 등을 통하여 우리나라의 생명과학 연구자와 협력해 나갈 예정입니다.

인터넷 홈페이지 새단장

당사는 동종업계로서는 처음으로 인터넷에 의한 정보서비스를 1997년 1월 부터 실시하여 연구자 여러분께 적극적으로 유용정보를 보다 신속하게 제공하고자 노력하여 왔습니다. 제품 찾아보기, 신제품정보, 회사안내, 최신바이오뉴스 등을 통하여 연구자에게 다양한 정보를 제공하여 왔으나 최근 인터넷 서비스의 기술이나 관리시스템이 획기적으로 개발되어 가고 있어, 금번 대대적인 재정비를 통하여 보다 이용하기 쉬우면서도 정리된 정보, 편리한 기능을 추가 하도록 하였습니다. 특히 금년 5월 부터는 인터넷에 의한 주문서비스를 본격적으로 실시하여 전자상거래 시스템을 도입하므로서 빠르고 정확한 제품공급 시스템을 구축할 예정입니다. 이번에 추가되는 주요기능은 제품검색기능 보완, 게시판, 방명록, e-mail에 의한 정보제공서비스(Bio21) 등입니다

(자세한 내용은 본지 40페이지 참조).

URL www.bohan.co.kr

인터넷정보제공서비스 Bio21 회원등록및 경품잔치실시

당사는 금번 인터넷 정보제공 서비스의 개시와 함께 Bio21 클럽을 운영합니다. 회원제로 운영되는 이 서비스의 특징은 신제품정보, 신기술정보, 각종행사, 캠페인 등의 안내를 e-mail에 의하여 신속하게 제공한다는 점입니다. 또한 본 서비스의 개시와 함께 5월 15일 까지 회원으로 가입하는 분 중 추첨으로 총 126명에게 경품(1등 휴대용 컴퓨터 1명, 2등 *Taq* polymerase 5명, 3등 제한효소 10명, 4등 기념우산 30명 5등 UV scale 80명)을 증정하고 가입자 모두에게는 기념품을 증정할 예정입니다.

(자세한 내용은 본지 41페이지 참조)

TaKaRa Taq 가격 대폭인하 (3월 2일 부터)

당사는 연구자 여러분의 커다란 호응을 받아온 *TaKaRa Taq*™의 가격을 대폭 인하하였습니다. PCR에 의한 유전자 해석법은 극히 일반화되어 전문가 뿐만 아니라 비전공자, 병원의 임상검사 담당자에 이르기까지 아주 널리 사용하게 되었습니다. 당사의 *Taq*류는 효소의 품질 뿐만 아니라 반응용 버퍼와 dNTP mix가 첨부되어 있어 누구나 편리하게 사용할 수 있으며, 사용목적에 맞추어 선택할 수 있는 5종으로 구성되어 있습니다. 최근 3년간 고객의 성원에 힘입어 국내 공급업체중 가장 많은 양의 제품을 공급하기에 이르렀습니다. 금번 고객 여러분의 성원에 보답하고자 TaKaRa 본사의 지원을 받아 가격을 대폭 인하하게 되었습니다.

(자세한 내용은 본지 28페이지 가격인하 안내 참조)

FMC 전제품 가격 대폭인하 (3월 2일 부터)

세계적으로 최고급 품질로 명성을 얻고 있는 미국 FMC사의 전기영동용 아가로스를 비롯한 전제품의 가격을 대폭인하합니다. 최근 환율의 안정 등으로 제품도입가격이 점차 안정되어감에 따라 가격을 인하하여 고객에게 환원하고자 합니다. 당사는 환율이 1600원대 이상의 초고가였을 때도 1300

원대를 기준으로 공급가격을 설정하였습니다. 99년도 도입가의 인상(달러가격), 재고의 부담 등으로 인하요인은 크지는 않으나 현재는 1200원대로 안정되었고, 고객여러분께 보다 저렴한 가격에 공급하고자 평균 18% 정도 인하하기로 하였습니다.

DHCP 함유 다시마 처리물을 양어사료로 개발

TaKaRa는 천연 DHCP를 함유하는 다시마 처리물의 양어사료로서의 유용성을 확인하여 혼합사료 "어황"을 개발하였습니다.

어황은 항바이러스 기능을 갖는 4, 5-dihydroxy-2-cyclopentene(DHCP)을 풍부하게 함유하는 다시마 처리물을 양어사료로 개발한 것으로 생균제 PSB, 진주양식용 외음막 처리제 Takara FN에 이은 3번째 수산용품입니다. 생먹이나 배합사료에 혼합하여 주므로서 광어 등의 고급어종을 비롯하여 양식어류의 건강을 유지하여 줍니다. 현재의 양식어업이 안고 있는 건강유지, 환경오염, 항생물질 등의 약제 투여 등의 심각한 문제를 해결하는 천연유래의 사료로서 기대됩니다.

■ 개발경위

TaKaRa의 바이오연구소는 최근 10년간의 당쇄공학연구를 근간으로 의식품의 연구에 주력하여 왔습니다. 예로부터 불로장수약 및 장수식으로 민간에서 전해 내려오는 생약이나 곰국은 장시간 우려낸 것이 많은데 이 과정에서 DHCP로 불리는 항암, 항바이러스, 특이면역 증강작용을 갖는 물질이 자연적으로 생성된다는 사실을 발견하였습니다. 이들 결과를 이미 2년전부터 일본암학회, 일본생화학회 등을 통하여 발표하였으며 현재 의약품 및 건강보조식품 재료 등으로 개발을 진행하고 있습니다.

DHCP가 양어의 건강 유지에도 유효하다는 사실을 야외실험에서 확인하였습니다.

■ 야외실험의 결과

DHCP를 함유하는 다시마 처리물을 양어체중 1 kg당 1일 0.1에서 1 g을 통상 2주간 사료에 혼합하여 투여하므로서 이리도바이러스(전갱이 2800마리에 실시), 린호스치스바이러스(광어 3000마리 실시), 복어바이러스(복 2000마리에 실시)에 감염된 양어의 폐사율을 대조군에 비하여 거의 100% 감소시킬 수 있었습니다.

RetroNectin을 사용한 유전자치료의 안전성과 치료효과의 확인

TaKaRa의 바이오연구소와 미국 인디아나대학 의학부가 공동 개발한 재조합 fibronectin peptide에 의한 고효율 유전자 도입법을 이용하는 유전자치료의 임상시험 연구가 이미 미국 내에서 여러 병원을 대상으로 실시되고 있습니다. 지난 12월 4일부터 8일까지 Florida에서 개최된 제 40회 미국 혈액학회 연차총회에서 발표된 연제중 33 보고가 이 방법을 이용한 유전자 치료이거나 임상실험의 예비시험에 관한 것이었습니다. 여기서는 중간보고로서 6개월에서 1년에 가깝게 실시한 치료효과를 발표한 2건의 유전자 치료에 대하여 소개합니다.

두 치료실험 모두 임상시험연구의 pilot study로 체외에서 유전자를 도입한 세포를 다시 체내로 돌려주는 조작을 하는 therapy protocol의 안전성 확인을 주목적으로 하고 있어 부작용 등의 문제가 없음을 확인하고 있습니다. 또한 이 방법을 사용하여 조혈모세포로의 유전자 도입효율을 현저히 높임으로써 유전자 치료효과가 확실함을 확인하였습니다.

1. 만성 육아종증

X염색체 연쇄의 만성 육아종을 대상으로 한 유전자치료의 임상연구를 작년 3월부터 미국 국립 알러지연구소(NIAID)의 Herry L. Malech 박사팀이 실시하고 있습니다.

X염색체 연쇄의 만성 육아종은 NADPH Oxidase의 생산능력이 결손됨으로써 호중구 등에 의한 살균능력에 선천적으로 결함이 발생하여 세균이나 진균에 의한 심한 감염증이 반복적으로 재발되는 질환으로, 원인으로는 NADPH Oxidase를 구성하는 subunit의 하나인 gp91phox 유전자의 결손이 가장 많은 빈도로 나타납니다.

현재 3명의 환자를 FDA에서 승인한 protocol로 치료하고 있습니다. 이 protocol에서는 결손된 gp91phox 유전자를 retrovirus vector로 환자에서 채취한 조혈모세포에 도입하는데, 이 때 TaKaRa가 제조한 GMP 수준의 recombinant peptide인 Retronectin을 enhancer로서 작용시키므로서 체외에서 무혈청 배지로 배양한 1 - 2 × 10^9개 세포의 50~90%에 정상 유전자를 도입할 수 있었습니다. 이처럼 정상 유전자를 갖는 세포를 대량으로 환자에 되돌려 줄 수 있는 것이 이 protocol의 이점입니다. 50일 간격으로 이 정상 유전자 세포를 3번 반복하여 이식하는데 현재 한 환자는 3회 이식을 종료하였고 나머지 두 환자는 두번 실시하였습니다. 두명의 환자에서는 개시후 6개월 이상 경과한 현시점에서도 유전자 도입의 결과, 정상 유전자를 갖는 호중구가 계속 생산되고 있어 살균력이 있는 과산화수소 생산능력이 꾸준히 검출되고 있습니다.

한편 경과가 좋은 환자에서는 최고시의 혈류중의 호중구 중 0.2%가 정상 유전자를 갖게 되었습니다. 이는 Malech 박사가 RetroNectin을 사용하지 않고 실시한 전회의 임상시험 결과 보다 4배 더 높은 것입니다. 또한 임상시험 개시 때 간농양에 걸려있던 환자의 배농에서 정상 유전자의 호중구가 검출되었는데 이는 감염부위에 호중구가 모여 정상적인 기능을 발휘하고 있슴을 나타내는 것입니다.

현재까지의 연구결과로는 혈류중 호중구의 약 3~5%가 정상 유전자를 갖고 있으면 감염방어가 가능한 것으로 알려져 있어, 금번에 얻은 0.2%라도 장기간 지속할 수 있으면 감염증 환자의 치료에 유용할 것으로 생각됩니다.

2. 난치성 배세포 종양

난치성 배세포 종양을 대상으로 하는 유전자치료의 임상시험연구가 재작년 7월부터 미국 인디아나대학 의학부 조혈모세포연구실 Dr. Rafat Abonour 실장의 총괄로 TaKaRa와 공동 실시하고 있습니다. 이 유전자치료법의 목적은 환자 자신의 말초혈에 동원된 조혈모세포에 약제내성 유전자 MDR-1을 도입하므로서 골수전구세포를 화

학약제의 독성으로부터 보호하는 것입니다.

악성종양의 치료법으로서 화학요법 후에 자가말초혈 중의 조혈모세모를 이식하고 있으나 암의 재발율이 높은 것이 문제였습니다. 이를 막기 위하여 화학요법을 반복하여 잔존 암세포를 제외한 생존율을 높이는 방법이 모색되어 왔으나, 약제독성에 의한 골수세포나 백혈구의 감소가 문제였습니다.

조혈모세포에 약제내성 유전자 MDR-1을 도입하여 세포를 약제에 의한 파괴로부터 보호하므로서 이 문제를 해결할 수 있다고 생각하였습니다.

현재까지 11명의 환자가 약제 내성유전자 MDR-1을 도입한 조혈모세포의 수혈을 받고 있습니다. 우선 미처리의 말초혈 조혈모세포의 이식과 약제내성 유전자 MDR-1을 도입한 조혈모세포 이식에서 항암제 대량투여시 미치는 영향의 차이를 비교하였습니다. 그 결과 혈소판 수나 백혈구수의 회복에 필요한 일수에는 두 그룹에서 차이가 없었으므로 유전자를 도입한 조혈모세포가 정상의 조혈모세포와 동등한 분화능력을 갖는 것으로 확인 되었습니다. 또 도입유전자 세포를 이식 후 28일째의 각 환자의 골수세포에는 7~78%(평균 14%)의 효율로 약제 내성유전자 MDR-1이 도입되었슴을 확인하였습니다.

11명의 환자의 연령은 17세에서 51세로 도입 유전자세포이식후 10개월 동안 관찰한 결과 현재 이 치료를 받은 환자 중 10명은 생존하고 있고, 그 중 8명은 현재 재발없이 치유된 상태입니다.

이상의 결과는 Retronectin을 유전자도입 증강제로 이용한 유전자치료의 유용성을 확실하게 증명한 것입니다.

식물유래의 식품에함유되어있는 flavonoid류와 cadexin류가 여성 호르몬 수용체와결합

TaKaRa 바이오연구소는 식물유래의 식품에 함유되어 있는 flavonoid류와 cadexin류가 여성 호르몬 수용체와 결합함을 밝혀내어 일본 환경호르몬학회에 발표하였습니다.

일상생활에 흔히 사용하는 화학제품에서 유래하는 화학물질이 성호르몬의 수용체와 결합하므로서 사람의 내분비계를 교란하는 것이 아닌가 우려하여 이들 화학물질을 환경호르몬이라 부르고 있습니다. 한편 대두에 함유되어 있는 isoflavon의 일종인 genistein은 확실하게 여성호르몬(estrogen) 수용체와 결합하여 여성호르몬 작용을 나타냄으로써 여성의 갱년기장애 등에 대한 예방과 치료에 유용한 것으로 알려져 있습니다. 당사의 바이오연구소에서는 isoflavon과 구조가 유사하고 인류가 오래전부터 식물유래의 식품에서 섭취한 flavonoid와 cadexin류에 착안하여 여성호르몬 수용체와의 결합능력을 조사한 결과, 녹차에 함유되어 있는 cadexin류나 flavonoid류의 수 종류가 여성호르몬 수용체와 반응함을 밝혔습니다. 또한 그 결합의 강도는 환경호르몬으로서 의심받고 있는 nonylphenol, bisphenol 등의 약물과 거의 같은 정도임을 확인하였습니다.

미국최대의 Fisher Scientific사가 TaKaRa 유전자 공학 시약 취급

TaKaRa는 제한효소, 수식효소, PCR용 효소를 중심으로 유전공학 시약을 미국 최대의 연구용 시약, 기기 판매회사인 Fisher Scientific사를 통하여 미국시장에 공급하게 되었습니다. Fisher Scientific사는 세계 145개국에 24만종에 이르는 제품을 판매하고 있으며 미국 내에서는 약 2조원의 매출을 일으키는 기업입니다. 특히 연구용 시약부문에서는 미국 내 최고의 매출을 기록하고 있습니다. 금후 Fisher Scientific사는 유전공학에서는 빠뜨릴 수 없는 제한효소 등의 상품군을 TaKaRa의 제품을 중심으로 판매하게 됩니다. 판매는 전미국의 대학과 연구소에 설치한 Fisher Scientific사 소유의 초저온 냉동고(전미에 약 350대)에 제한효소 등의 시약을 저장하여, 연구자가 자유롭게 사용하도록 하고 일정기간마다 정산하는 방식으로 행해집니다. 이로서 미국에서도 TaKaRa의 시약을 보다 편리하게 사용할 수 있게 되었습니다.

<Fisher Scientific사의 개요>

사명 : Fisher Scientific

대표자 : Paul M. Montrone

설립 : 1902년

소재지 : 2000 Park Lane, Pittsburgh, PA 15275, USA

종업원수 : 약 7000명

사업개요 : 연구용 시약, 기구, 비품에서 안전용구, 건강용품 관련제품, 기기 등의 제조 판매

TaKaRa, 5년 연속 일본 바이오기업 Ranking Top에

일본의 유력 경제신문인 니혼게이자이신문(일본경제신문)의 Nikkei Biotech은 해마다 일본내 약 2000개의 바이오기업(의학, 생명과학, 생물공학)을 평가하여 순위를 결정하여 일본전통 씨름인 스모의 ranking과 같은 방식으로 발표하고 있습니다. TaKaRa는 1995년 이래 연속 5년간 최고위의 자리인 요꼬즈나의 위치를 지켰습니다. 2000여 회사 중 요꼬즈나에 있는 기업은 TaKaRa를 비롯하여 기린맥주, 야마노우치제약, 산토리, 일본타바코, 다께다약품, 주가이제약, 일본로슈 등 8사입니다.

TaKaRa는 지난해 미국의 알러지연구소 등과 공동으로 RetroNectin을 이용한 유전차치료에서 유망한 임상시험 결과를 얻었고, protoplast 세포로부터 획득한 Candida의 막항원이 진균증에 대한 유용한 백신임을 동물실험에서 확인하여 주목을 받았습니다. 또한 미국의 Genetic MicroSystems사의 DNA Chip 제작장치의 발매, 초내열성 protease 유전자에 관한 기본특허의 미국에서의 취득 등 연구지원 분야에서의 실적과 Fucoidan 관련제품, Agarooligo당 식품의 실용화도 평가되었으며 유전자 분석기술을 이용한 친자감별, 애완동물의 개체식별서비스의 사업화도 평가 되었습니다.

NEW

전기영동 불필요!!

O-157 One Shot PCR Screening and Detection Kit

TaKaRa Code RR121A	24회

NEW

정확성으로 호평을 받고 있는
Pyrobest™ DNA polymerase로 cDNA를 증폭!

High Fidelity RNA PCR Kit

본지 34페이지 참조

TaKaRa Code R020A	50회
TaKaRa Code R020B	50회×2

NEW

Selection Marker는 AUR1-C 하나만으로 OK !
Aureobasidin A 내성 효모 형질전환시스템

출아효모용 marker 제거용 vector **pAUR135 DNA**

TaKaRa Code 3604	20 μg

NEW

*Aspergillus nidulans*용 vector 신등장 !
Aureobasidin A 내성 효모 형질전환시스템

사상균 *Aspergillus nidulans*용 vector **pAUR316 DNA**

TaKaRa Code 3605	20 μg

사상균 *Aspergillus nidulans* 유래의 Aureobasidin 내성유전자 *aurA*[R] 유전자를 selection marker로, *A. nidulans*를 숙주로 하는 사상균·대장균 shuttle vector이다. *A. nidulans*의 복제개시점 AMA1을 포함하고 있으므로 Aspergillus 균체내에서 plasmid의 상태로 유지된다.

NEW

고효율 유전자 도입용 Retrovirus Vector

pDON-AI DNA

본지 11페이지 참조

TaKaRa Code 3650	20 μg

NEW

Influenza virus의 typing이나
중화실험에 유용 !

항 influenza A형 · B형 항체

Anti-Human Influenza A (H1N1, H2N2)	
TaKaRa Code M145	0.1 mg
Anti-Human Influenza A (H3N2)	
TaKaRa Code M146	0.1 mg
Anti-Human Influenza A (H1, H2, H3)	
TaKaRa Code M147	0.1 mg
Anti-Human Influenza B	
TaKaRa Code M148	0.1 mg
Polyclonal Anti-Human Influenza A, B, Rabbit	
TaKaRa Code M149	0.4 mg

NEW

유전자 재조합 작물 검정용 DNA 추출 · PCR Kit

본지 33페이지 참조

유전자 재조합 작물 검정용 DNA 추출 Kit (DNA Extraction Kit for GMO Detection)	
TaKaRa Code 9092	100회용
유전자 재조합 대두 검정용 PCR Kit (PCR Screening Kit for GM Soybean)	
TaKaRa Code RR201A	48회용
유전자 재조합 옥수수 검정용 PCR Kit (PCR Screening Kit for GM Maize)	
TaKaRa Code RR202A	48회용

NEW

PAGEr™ precast gels

본지 48 페이지 참조

FMC사 제품입니다.

NEW

BioWhittaker사 신제품

정상 사람 신장 상피세포
Human Renal Epithelial Cells(HRE)
TaKaRa Code C2556

정상 사람 수상세포
Normal Human Dendritic Cells(NHDC)
TaKaRa Code C2701

정상 사람 말초혈 단구세포
Human Peripheral Blood Mononuclear Cells(HPBMC)
TaKaRa Code C2702

전용 배지 kit
LGM™-3 Bullet Kit®(B3211+B3212)
TaKaRa Code B3215 1 kit

기본배지
Lymphocyte Growth medium-3(LGM™-3)
TaKaRa Code B3211 500 ml

첨가인자
LGM™ Cytokine SingleQuots®
TaKaRa Code B3212 1 Set

Autologous Human Plasma
TaKaRa Code B4250 5 ml