DNA Chip의 응용

- 제 2 편 -

현재약 20여 종의 생물에 대한 전체 genome의 염기서열이 결정되었고, 사람을 비롯한 다수의 생물종에 대한 해석이 진행중이다. 그러나 전체유전자가 밝혀진 생물 중에서도 가장 잘 연구된 대장균의 전체약 4,200개 유전자 중에서 아직도 많은 수가 그 기능이 밝혀져 있지 않다. Genome project 종료 후 전체 유전자 정보를 효과적으로 이용하여 각 유전자의 기능을 해명하고, 의료분야에 적용하기 위한 기술로서, 또는 SNPs 등의 변이해석 대량처리 도구로서 비상한 주목을 받고 있는 것이 DNA chip(DNA microarray)이다. 당사는 Genetic MicroSystems사의 DNA chip 제작장치(GMS 417 Arrayer™ : TaKaRa Code GM100)와 DNA chip 해석장치(GMS 418 Array Scanner™ : TaKaRa Code GM200)를 공급하고 있으며, 지금까지 본지를 통해 꾸준히 응용데이터들을 소개하였다. 이번 호에는 주변시약을 활용한 응용데이타를 소개한다.

● *TaKaRa Z-Taq*™을 이용한 DNA chip 시료의 조제

DNA chip을 제작하기 위하여 시료를 조제할 때는 통상 PCR을 이용한다. DNA chip 위에 spotting할 다수의 시료를 PCR로 조제해야 하는데 상당한 시간이 소요된다.

TaKaRa Z-Taq™은 그 반응속도가 종래의 *Taq* DNA polymerase보다 약 5배 이상 빠르므로 시료조제에 소요되는 시간을 대폭 단축할 수 있다.

[실험방법]

Bacteria의 각종 ORF(open reading frame) 500 bp~1,000 bp를 증폭하기 위한 primer를 준비한 후 genome DNA를 주형으로 *TaKaRa Z-Taq*™을 사용하여 PCR 반응을 실시하였다.

[반응액 조성] (반응액량 : 150 μl)

- 1× *Z-Taq* Buffer
- 0.2 mM dNTP Mixture
- 37.5 pmol each primers
- 3.75 U *TaKaRa Z-Taq*™
- Genome DNA 10 ng

[반응조건]*

94℃, 1 min
98℃, 1 sec ┐
55℃, 1 sec ┘ 35 Cycles
72℃, 1 min
전체반응시간 : 59분

* Tube는 TaKaRa PCR Tube Plate-96(TaKaRa Code 9069) 및 TaKaRa PCR Tube Plate Caps-8(TaKaRa Code 9050)을, thermal cycler는 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(TaKaRa Code TP3000)을 사용.

[결과]

종래의 *Taq* DNA polymerase를 이용한 통상의 PCR에서는 3시간 이상 걸렸던 반응시간이 *TaKaRa Z-Taq*™을 이용함으로써 대폭 단축되어 *TaKaRa Z-Taq*™이 DNA chip의 제작에 매우 효과적이었다.

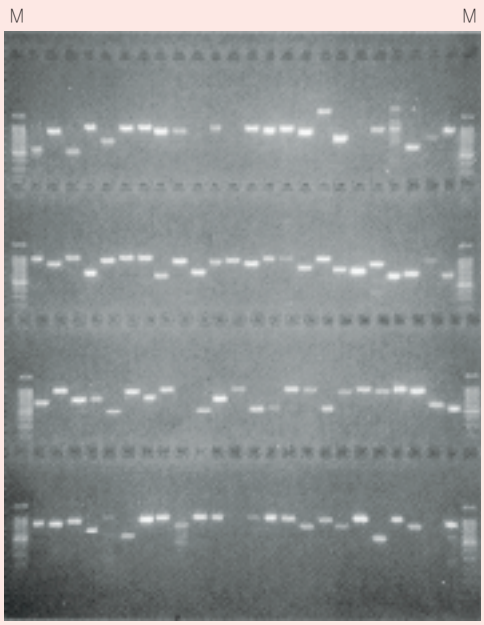


그림 1 *TaKaRa Z-Taq*™에 의한 bacterial genome ORF의 PCR 산물
M : Molecular Weight Marker

● *Label* IT®를 이용한 형광표식과 SBH(Sequence by Hybridization)

DNA chip을 이용한 발현해석이나 변이해석에는 형광색소로 표식한 시료를 흔히 사용한다. 발현해석을 위해서는 역전사효소를 이용한 dNTP 형광 analog의 삽입에 의한 표식법을 보편적으로 사용하나, 반응작업이 번거롭고 형광 primer를 준비해야 한다는 단점이 있다. *Label* IT®는 post labeling용 형광표식 시약으로 single strand 및 double strand DNA나 RNA, 그리고 oligonucleotide를 intact한 상태로 표식할 수 있고 단순히 핵산과 혼합하는 것만으로 표식할 수 있어(본지 11호 36페이지 참조) DNA chip을 이용한 실험에 아주 유용하다. 시료를 *Label* IT®로 형광표식한 후 DNA minichip상에서 SBH를 실시한 예를 다음에 소개한다.

[실험방법]

ras Mutant Set c-Ki-*ras* codon 61(TaKaRa Code 7243)에 포함된 wild type DNA를 주형으로 128 bp의 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물을 정제한 후 400 ng의 정제물을 *Label* IT® Cy5™로 형광표식하였다.

반응액 조성 및 반응조건(반응액량 4 μl) :

- PCR 산물(wild type 128 bp) 400 ng
- Mirus Labeling Buffer A 0.4 μl
- *Label* IT® Reagent 0.4 μl

37℃, 1시간 반응

반응 후 Microspin Column으로 정제하여, 1/10 양의 Mirus Denaturation Buffer D1으로 alkali 변성, 1/10 양의 Mirus Neutralization Buffer N1으로 중화하여 probe로 사용하였다. 이 Cy5™ 표식 probe를 65℃에서 SBH용 DNA minichip에 hybridization한 후 GMS 418 Array Scanner™로 scanning하였다(SBH의 원리에 대해서는 본지 11호 4페이지 참조).

[결과]

Label IT® Cy5™ Labeling Kit으로 형광표식한 probe를 사용하여, human c-Ki-*ras*/61의 wild type 서열을 DNA chip 상에서 읽을 수 있었다(그림 2).

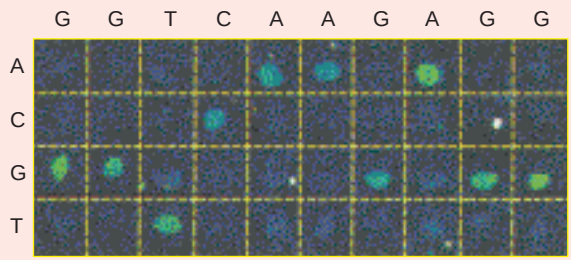


그림 2 *Label* IT® Cy5™을 사용하여 형광표식한 human c-Ki-*ras*/61의 SBH

● cDNA Library Chip을 이용한 발현해석

어떤 조직에 특이적으로 발현하는(혹은 특이적으로 발현하지 않는) 유전자를 screening하는 방법으로는 각 조직의 cDNA library를 DNA chip으로 제작하고, 그 DNA chip에 각 조직의 mRNA 시료에서 유래한 cDNA를 hybridization한 후 발현량의 차이가 있는 clone을 선별하고 sequencing하여 data base와 비교해 보는 방법이 있다.

[실험방법]

Human brain cDNA library와 liver cDNA library로부터 각각 192종과 96종의 clone을 무작위로 선택한 다음 universal primer로 PCR을 실시하였다. 과잉량의 primer와 dNTP mix를 제거한 PCR산물을 GMS 417 Arrayer™을 이용하여 slide glass에 spotting(spot size: 직경 150 μm)하고 고정화 처리하여 cDNA library minichip을 제작하였다. 동일한 chip상에 β-actin 등의 positive control과 negative control도 고정하였다.

Normal human brain과 liver mRNA 각 2 μg을 역전사반응한 다음 Cy3™-dUTP(brain) 또는 Cy5™-dUTP(liver)를 삽입하여 labeling하였다. 이 2종류의 시료를 혼합하여 cDNA library minichip에 hybridization하고 GMS 418 Array Scanner™로 scanning하였다. Scanning data는 해석 software [ImaGene™]으로 해석하였다. 해석시 Cy3™와 Cy5™의 시그널 강도를 β-actin의 시그널 강도로 보정하여 해석결과에 따라 brain 또는 liver에서 많이 발현하는 유전자 clone을 선별하였다.

[실험결과]

Scanning 결과를 그림 3에, 해석결과를 그림 4 및 5에 나타내었다. 그림 4의 a와 c는 human brain cDNA library clone의 spot이고, b는 human liver cDNA library clone의 spot이다. Liver cDNA의 아랫쪽 spot은 control cDNA이다. Negative control의 hybridization은 관찰되지 않아, 여기서 얻은 시그널은 특이적인 것으로 생각된다. Cy3™ 시그널(brain mRNA)은 주로 brain cDNA spot에서 강하게 보이며, 반대로 Cy5™ 시그널(liver mRNA)은 주로 liver cDNA spot에서 강하게 관찰되어 liver와 brain은 유전자의 발현 양상에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 해석 결과로부터 brain 또는 liver에서 특이적으로 발현하는 유전자 clone(그림 4에서 사각형으로 표시한 clone)을 선별하였다. 현재, 이들의 서열해석을 통하여 유전자를 동정하는 중이다.

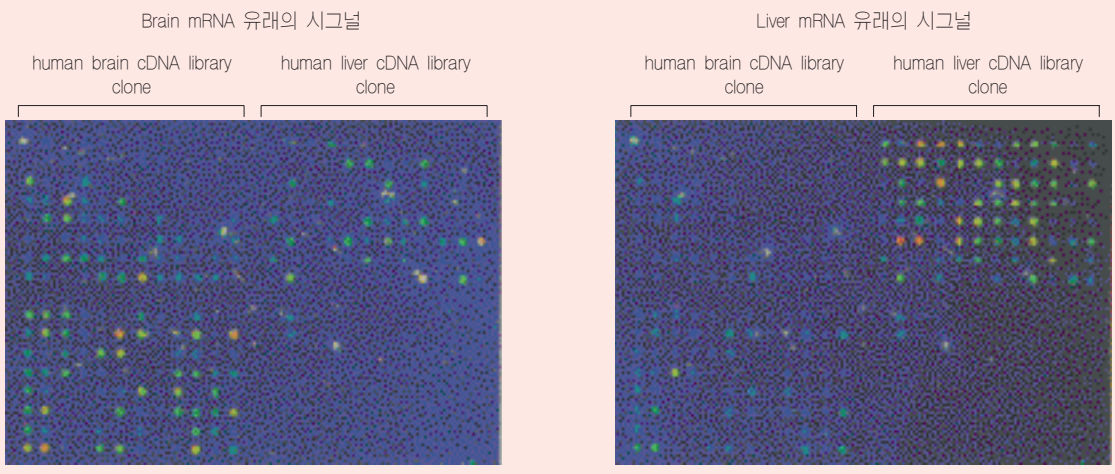


그림 3 Hybridization 결과

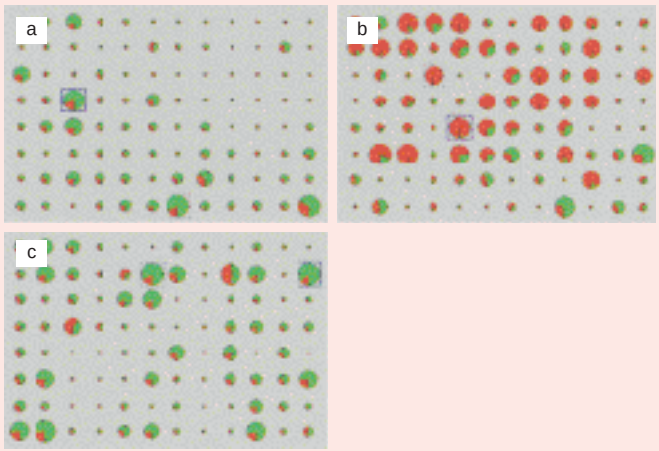


그림 4 해석결과(GenePie Plot)
각 Pie(원그래프)는 각 spot에 대응.
Pie의 크기는 형광 시그널 강도를 나타내고, Pie 내의 적/녹색 비율은 발현비율을 나타낸다.
(적색 : liver 녹색 : brain)

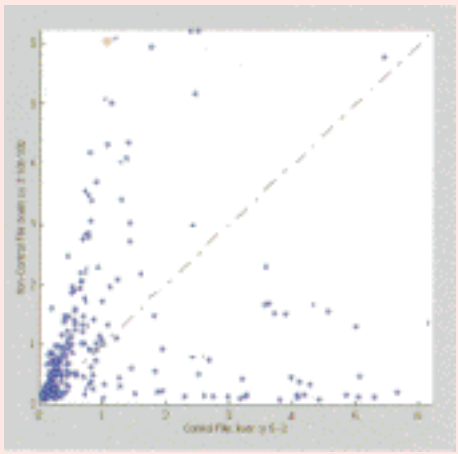


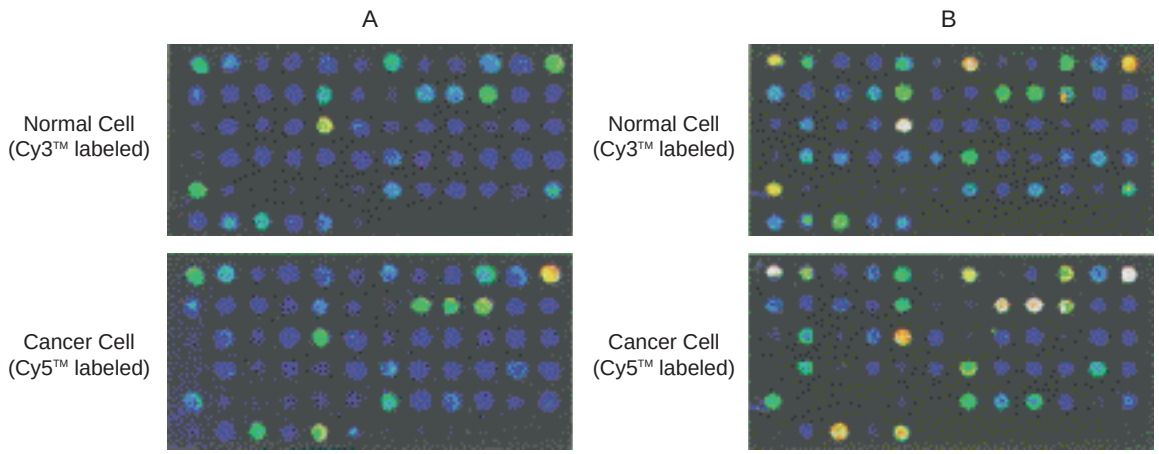
그림 5 해석결과(Scatter Plot)
X축 : liver, Y축 : brain

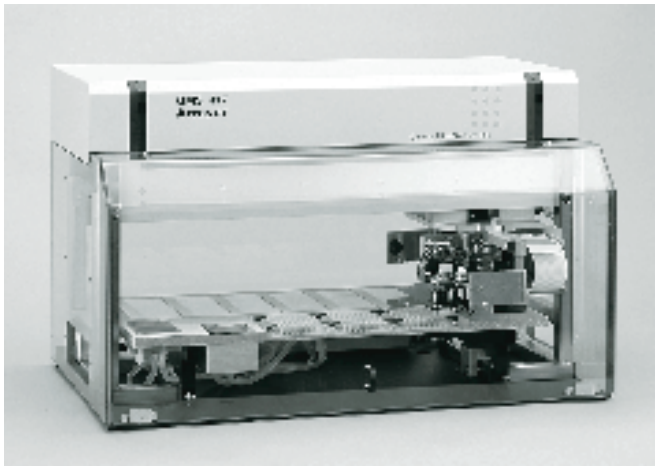
[관련제품]

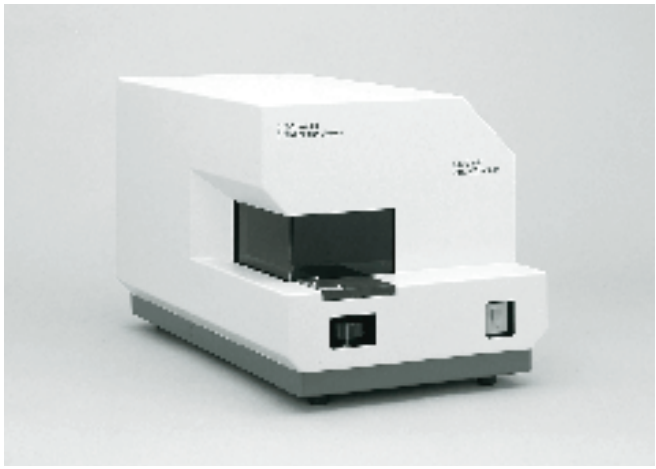
제품명	TaKaRa Code	포장량
발현 데이터 해석 소프트웨어 ImaGene™ Version 2.0	BD001	
고속 PCR용 DNA polymerase *TaKaRa Z-Taq*™	R006A	200 U
	R006B	800 U
핵산표식용 시약 *Label* IT® Cy3™ Labeling Kit	V3625	1 Kit(25 μg용)
	V3600	1 Kit(100 μg용)
핵산표식용 시약 *Label* IT® Cy5™ Labeling Kit	V3725	1 Kit(25 μg용)
	V3700	1 Kit(100 μg용)

발현 해석 응용례

Human cDNA와 negative control을 포함하는 65종류의 유전자를 PCR로 증폭하였다. 이 시료를 GMS 417 Arrayer™을 사용하여 2종류(아래 그림 A 및 그림 B) slide glass에 spotting한 뒤 고정화 처리하여 DNA microarray를 제작하였다. 한편, 정상세포 및 암세포에서 각각 RNA를 추출하고 정상세포 유래 RNA를 Cy3™-dUTP로, 암세포 유래 RNA를 Cy5™-dUTP로 각각 표식하였다. 이 2종류의 probe를 혼합하여 1장의 microarray에서 65℃, 16시간 동안 hybridization하였다. Microarray를 scanner로 해독한 결과 정상세포와 암세포간의 발현차이를 볼 수 있었다.







● 표준사양

DNA Chip 제작장치 [GMS 417 Arrayer™]

TaKaRa Code	GM100
Spot size	100, 150, 200 ㎛(표준사양 : 150 ㎛)
Spot size 오차	±10%
Spot 간격	10 ㎛ 단위로 자유 설정
Spot 속도	4 spot/초
사용 slide glass	표준 size : 25.4 mm × 76.2 mm set 매수 : 1~42매(표준 slide glass 사용시)
사용 microplate	96 well 또는 384 well set 매수 : 3매
외형치수	80 cm(W) × 53 cm(D) × 50 cm(H)
중량	65 kg
사용전력	90~250 VAC, 50~60Hz(자동변환 방식) 600 W 이하
사용 컴퓨터	IBM 호환, Pentium®급 RAM 16 MB 이상, 10 MB 이상의 빈 Hard Disk 용량

DNA Chip 해석장치 [GMS 418 Array Scanner™]

TaKaRa Code	GM200
해석 시료	표준 slide glass(mm size, inch size)
해석 범위	22 mm × 75 mm
해상도	10 ㎛
Scanning 속도	3분 이하/22 mm × 75 mm/파장 (30 lines scanning/초)
여기 파장	532 nm 및 635 nm
검출 방식	광전자 증배관
외형치수	38 cm(W) × 61 cm(D) × 38 cm(H)
중량	25 kg
사용전력	90~250 VAC, 50~60Hz(자동변환 방식) 500 W 이하
출력 file	TIFF(16 bit), BMP
사용 컴퓨터	IBM 호환, Pentium®급 RAM 64 MB 이상, 100 MB 이상의 빈 Hard Disk 용량, 빈 PCI Slot × 1

* 본 사양은 개량을 위하여 예고없이 변경될 수 있습니다.

여러분의 귀중한 유전자 재료를 DNA Chip으로 만들어드립니다.

당사는 연구자가 갖고 있는 EST, SNP, cDNA Clone, cDNA Library 등을 DNA Chip으로 제작하여 대량해석에 이용할 수 있도록 Custom DNA Chip 제작 및 해석업무를 수행하고 있습니다.
자세한 내용은 당사 기술지원팀으로 문의하여 주시기 바랍니다.

보한바이오메디칼(주)
Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691
URL www.bohan.co.kr E-mail bohan@bohan.co.kr

재조합 Fibronectin 단편의 유전자 치료에의 응용

- 조혈모세포에의 유전자 도입 -

Kato, Ikunoshin
TaKaRa 바이오연구소장

조혈모세포는 VLA-4와 VLA-5라는 2종류의 integrin을 발현하는데, 이들은 각각 재조합 fibronectin(rFN)의 CS1 부위와 cell-binding domain에 특이적으로 상호작용한다. 한편, retrovirus vector는 rFN의 heparin-binding domain과 반응한다. 따라서, 이 3종류의 binding ligand를 동시에 가지는 rFN(CH-296)은 조혈모세포와 같은 target 세포와 retrovirus vector에 대하여 근접 상호작용이 가능하도록 "반응의장"을 제공한다. 그 결과 종래에는 불가능해 보였던 높은유전자 도입 효율을얻을 수 있게 되었다.

● 서론

유전자 치료는 세포가 갖는 유전자 정보의 오류에 기인하는 유전병이나 암 등의 난치병을 "바른 유전자 정보"를 도입함으로써 세포의 기능을 수정하거나, 세포가 본래 갖고 있지 않은 새로운 "보호 유전자"를 도입하여 병을 치료하거나 예방하기 위한 새로운 치료법이다. 암치료의 예를 들면 전자는 *p53*과 같은 필수 유전자의 오류를 "바른 유전자"를 도입함으로써 치료하는 경우이고[1], 후자는 암치료에 이용되는 항암제의 부작용으로부터 정상 혈액세포를 보호하기 위해 그 항암제를 분해·제거하여 무해화하는 능력을 가진 "보호유전자"를 도입하는 경우이다[2]. 또, virus의 세포내 증식을 억제하는 능력을 가진 항체 유전자를 도입하여 AIDS와 같은 감염성 질병을 예방하고자 하는 시도도 후자에 속한다[3].

병의 종류에 따라 전술한 바와 같은 다양한 종류의 유전자 치료 전략을 구사할 수 있으나, 현실적으로 아직 해결하지 못한 기술적 문제들이 산적해 있으므로 앞으로도 많은 연구가 진행되어야 한다. 해결해야 할 기술적 문제의 중점은 target 세포에 특이적인 유전자를 도입하는 방법의 개발과 유전자 도입의 효율성 증진이라는 기본적인 것들이다. 필자 등의 그룹은 최근까지도 매우 어려운 것으로 여겨졌던 조혈모세포에의 유전자 도입 효율을 extracellular matrix의 대 target 인 구성성분인 fibronectin의 단편을 이용함으로써 현저히 높일 수 있다는 사실을 미국 인디아나 의과대학과의 공동연구를 통해 발견하였다[4].

본 고에서는 이 방법과 그 주변의 문제점 등에 대하여 설명한다.

I. 유전자도입의 기술적 문제점

유전자 도입법은 virus를 vector로 사용하는 "virus vector법"과 liposome을 이용하는 "lipofection"법 등 크게 2가지로 분류된다. 많은 종류의 target 세포에 고효율로 유전자를 도입할 수 있는 "adenovirus vector법(AV법)"은 도입효율을 고려하면 매우 우수한 방법이다. 그러나 목적 유전자를 세포의 genome에 재조합하는 능력이 없으므로 target 세포에 유전자가 도입되더라도 세포가 증식분열함에 따라 희석되어 치료효과는 일회적이다. 한편, "retrovirus vector법(RV법)은 증식중인 세포에만 유전자가 도입되므로 유전자 도입효율이 매우 낮으나, target 세포의 genome에 목적유전자를 재조합할 수 있으므로 도입된 유전자가 target 세포군에서 영구적으로 유지되어 지속적인 치료효과를 기대할 수 있다. 특히, lymphocyte에서 발병하는 adenosine deaminase 결손증(ADA 결손증)의 유전자 치료의 경우, 끊임없이 lymphocyte를 만들어 내는 조혈모세포에 바른 ADA 유전자를 RV법으로 도입하는 방법이 가장 이상적인 전략이다. "Lipofection법"은 virus를 사용하지 않으므로 안전하다는 점에서 많은 연구가 진행되었으나 이 방법도 목적 유전자를 genome에 재조합할 수 없을 뿐만 아니라 유전자 도입 효율도 매우 낮다. 그러나 근육세포에 이 방법으로 항원단백질의 유전자를 도입하면 근육세포의 긴 수명으로 인하여 그 사이에 미량의 목적항원이 발현한다. 이것을 이용한 "DNA vaccine"의 연구개발이 진행중이다[5]. 이상의 여러 사항들을 고려하고 바른 유전자를 지속적으로 유지 발현하도록 하여 치료하자는 관점에서는 RV법에 의한 치료가 가장 바람직하다는 결론을 내릴 수 있다. 또 RV법은 미국에서 실시한 다수의 임상시험에서도 그 안정성이 확인되었으며 남은 문제는 RV법의 유전자 도입 효율을 높이는 것이다.

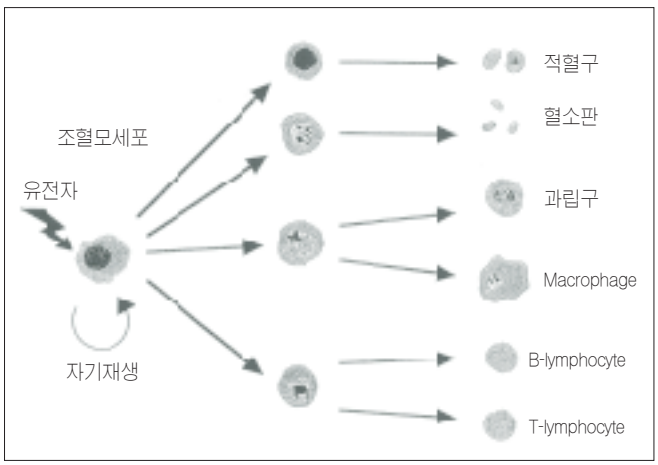


그림 1 혈구의 분화

II. Target 세포로서의 조혈모세포

유전자치료의 실제 치료방법에는 목적 유전자를 생체에 직접 주입하는 "생체법(*in vivo* 법)"과 생체외로 일단 추출한 target 세포를 체외에서 배양하여 목적유전자를 도입한 뒤 도입이 확인된 세포만을 배양증식하여 다시 생체 내로 되돌려 주는 "체외법(*ex vivo*법)"등 2가지가 있다. 체내법을 이용하는 경우, 현재 개발된 virus vector는 기관 또는 조직을 특이적으로 targeting하는 능력이 없으므로 암 발생 부위에 국소적으로 투여한다. 한편, 체외법에서는 당연히 target 세포 이외의 세포에는 유전자 도입이 일어나지 않으며 또 target 세포의 환경을 자유로이 바꿀 수 있으므로 유전자 도입효율을 높이기 위한 여러 가지 조작이 가능하다.

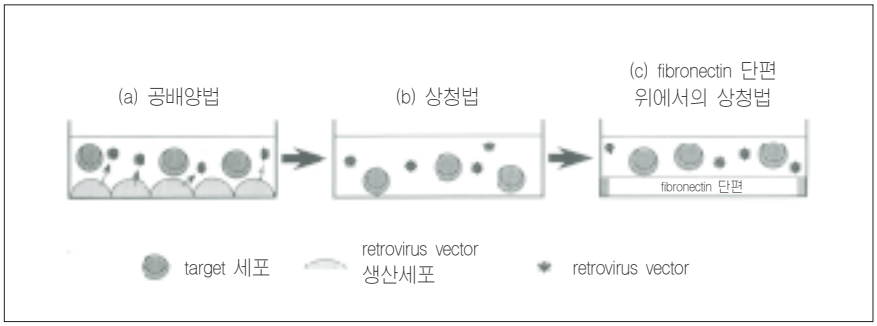


그림 2 Retrovirus vector를 이용한 유전자 도입법

이상의 여러 사실을 고려하면 현 시점에서 유전자치료를 응용하기에 가장 쉬운 영역은 혈액세포 유래의 유전자병을 RV와 체외법을 조합하여 실시하는 것이다. 사실 세계 최초의 유전자 치료예는 백혈구의 ADA 결손증 치료이며, target 세포로서 선택된 것은 lymphocyte였다[6]. 그러나 lymphocyte의 수명은 약 2개월로 짧아 "바른 ADA 유전자"가 발현하더라도 유전자 도입 조작을 몇 번씩이나 반복하지 않으면 안 되었다.

모든 혈액세포는 다능성(pluripotent)의 조혈모세포에서 분화유도되며 조혈모세포 그 자신도 자기재생을 일생동안 반복한다. 만약 이러한 능력을 가진 조혈모세포에 RV로 목적유전자를 재조합하면 적혈구, macrophage, T 세포 등 사람의 혈액 유전자병과 연관된 거의 대부분의 세포에서 일생동안 치료유전자를 유지할 수 있으므로 가장 이상적인 치료법이 될 것이다(그림 1).

III. 유전자 도입 효율을 어떻게 올릴 수 있을까?

조혈모세포와 같은 target 세포와 virus vector 생산세포를 함께 공배양하면 50% 수준에 달하는 고효율의 유전자도입이 일어남은 이미 알려져 있는 사실이다(그림 2a)[7]. Vector 생산세포 뿐만 아니라 골수의 stroma 세포(간극세포)와 공배양해도 도입효율은 증대한다. 그러나 이 방법을 이용한 실제 유전자 치료는 불가능하다. 왜냐하면 유전자를 도입한 virus 생산세포를 완전히 분리하기 어렵기 때문이다. 실제로 미국 식품의약품국(FDA)도 이와 관련한 protocol은 인가하지 않는다. 결국 virus vector 생산세포로부터 생산한 vector를 함유하는 상청과 target 세포를 배양하여 유전자를 도입하는 방법을 이용해야 하며 이것을 상청법이라 한다(그림 2b). 이 방법에서는 치료상의 위험성은 없으나 어느 정도 virus의 titer를 올려도 유전자 도입 효율은 겨우 수 %밖에 기대할 수 없는 실정이었다[8~10]. 세포와 공배양하여 target 세포로의 유전자 도입 효율이 상승하는 현상은 그 세포표면이 target 세포와 virus 간의 반응의 "장"을 제공함을 시사한다. 또 조혈모세포의 골수에 있어 그 미세환경을 조사해 본 결과 stroma 세포상에 extracelluar matrix의 일종인 fibronectin(FN) 분자가 발현하여 조혈모세포와 상호작용하고 있슴을 알 수 있었다[11~14].

반응의 "장"을 제공한다는 관점에서 다양한 FN 단편을 배양기에 coating해 놓고 유전자 도입 실험을 하였다. 그 결과 FN의 chymotrypsin 분해단편을 coating하는 경우 도입효율이 꽤 상승함을 확인하였다(그림 2c)[15].

한편 필자 등은 수년전부터 human FN의 다양한 재조합 단편을 개발하여 암세포의 전이억제실험을 해왔다[16~21]. 이러한 재조합 단편(그림 3)은 우연하게도 미국 인디아나 대학이 발견한 유전자 도입효율의 증강 효과를 가진 FN의 chymotrypsin 분해물(30K, 35K, 42K)과 일부 겹치는 것으로 밝혀졌다(그림 4).

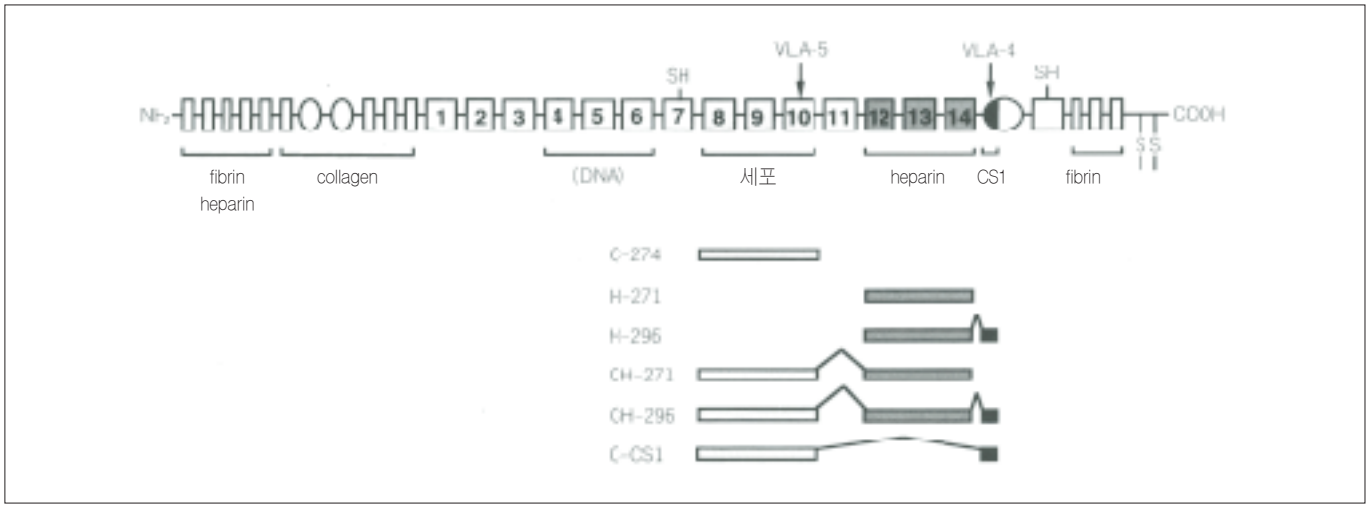


그림 3 Fibronectin A chain의 domain 구조와 재조합 fibronectin 단편

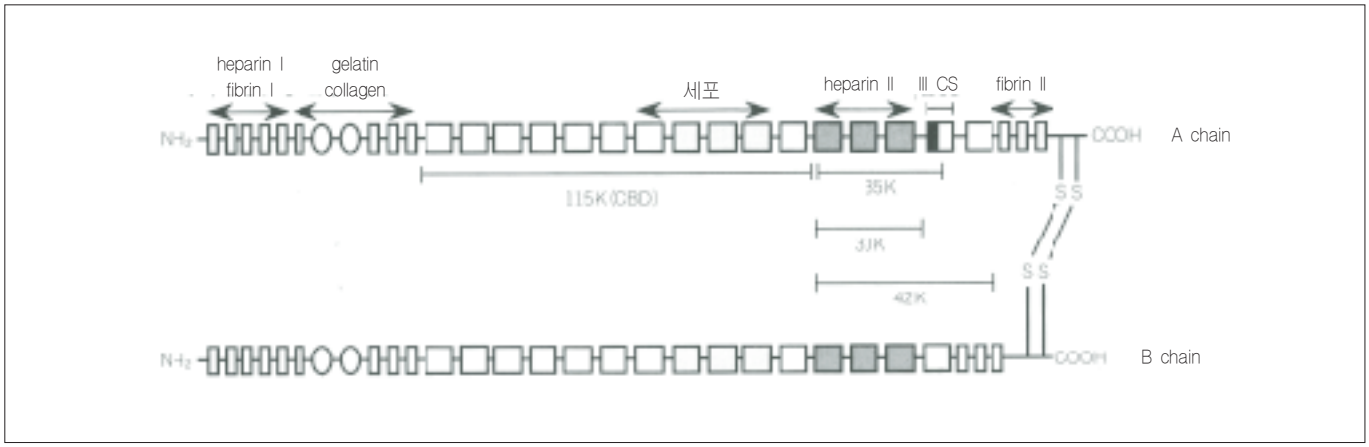


그림 4 Fibronectin 분자

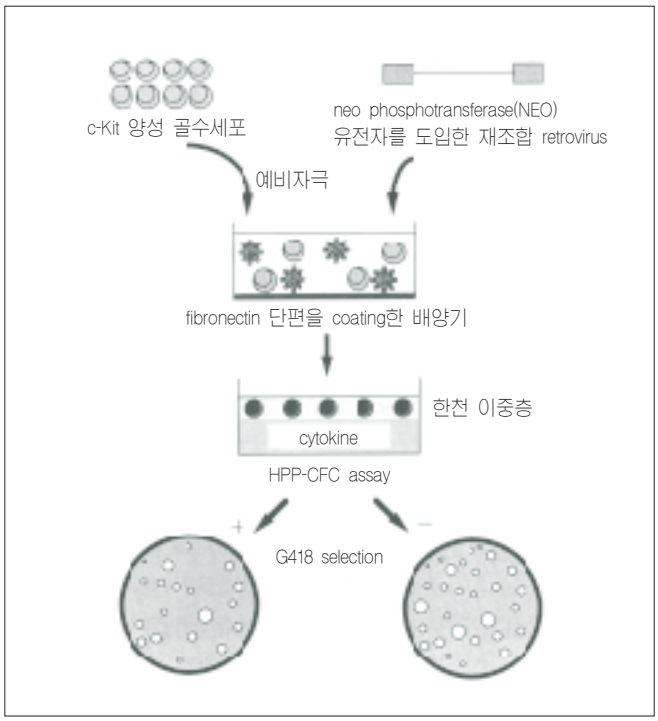


그림 5 고증식능 colony 형성세포로의 유전자 도입

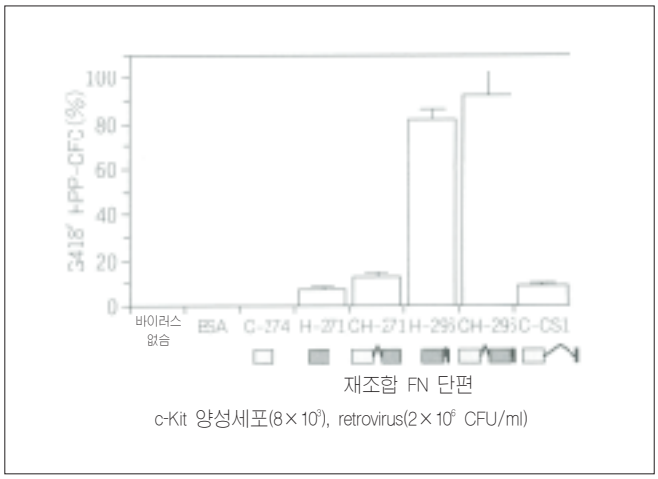


그림 6 Fibronectin 단편을 이용한 c-Kit 양성 골수세포로의 유전자 도입

임상실험에 사용하는 사람 유래 FN은 혈액의 오염을 방지한다는 측면에서 혈액에서 유래한 FN보다 재조합 단편을 사용하는 것이 바람직하다. 이렇게 하여 필자 등과 인디아나 대학 그룹과의 공동연구가 개시되었고 그 결과 다음과 같은 전혀 예견치 못했던 중대한 발견을 하였다.

IV. 재조합 사람 FN 단편

인디아나 대학 그룹이 발견한 FN chymotrypsin 단편(그림 4)은 heparin binding domain(heparin II)와 III형 cohesion segment(III CS)를 포함한다. 필자 등이 재조합한 FN 단편은 6종류이며, cell-binding domain(Cell), heparin-binding domain(heparin II), III CS의 일부인 CS1 domain등 3종류 domain의 조합체로 구성되어 있다(그림 3). Mouse의 조혈모세포를 함유하는 c-Kit 양성 세포군을 IL-6와 SCF(stem cell factor)로 활성화 한 후 NEO(neo phosphotransferase) 유전자를 가진 retrovirus vector와 전술한 FN단편을 coating한 배양기에서 함께 배양한 후에 HPP-CFC(high proliferative potential colony forming cells) assay 하였다.

NEO 유전자를 도입한 세포는 G418 항생물질에 대한 내성을 갖게 되므로 내성세포의 colony 수를 비교함으로써 NEO 유전자의 도입효율을 산정할 수 있다(그림 5)[4]. 그 결과를 나타낸 것이 그림 6이다. Mouse의 c-Kit 양성세포에 거의 100%의 효율로 유전자를 도입한 것은 cell-binding domain(C domain), heparin-binding domain(H domain), CS1 domain의 3종을 직렬로 연결한 CH-296 분자였다. 그 다음의 높은 효율은 H domain과 CS1 domain을 연결한 H-296 분자가 나타내었다. C domain과 H domain은 각각 단독으로는 유전자를 도입할 수 없고, C domain과 H domain을 연결한 CH-271이나 C domain과 CS1 domain을 연결한 C-CS1 단편 등에서도 의미를 부여할 만한 수준의 유전자 도입은 일어나지 않았다. 이 결과는 mouse의 조혈모세포에 효과적으로 도입하기 위해서는 H domain과 CS1 domain이 필요함을 시사한다. 이 FN 단편의 작용기작을 밝히기 위해 NIH3T3를 target 세포로 하여 동일한 실험을 하였다. 사용한 실험 protocol은 그림 7에 나타내었으며, 여기서 중요한 점은 FN 단편을 coating한 배양기에 virus vector를 첨가한 후 잘 씻어주어 결합하지 않은 vector를 제거해야 한다는 것이다.

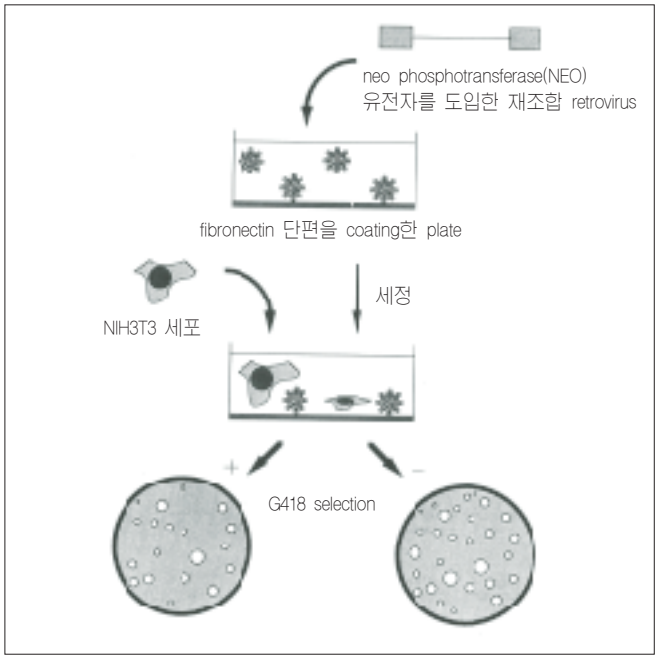


그림 7 NIH3T3세포에의 유전자 도입

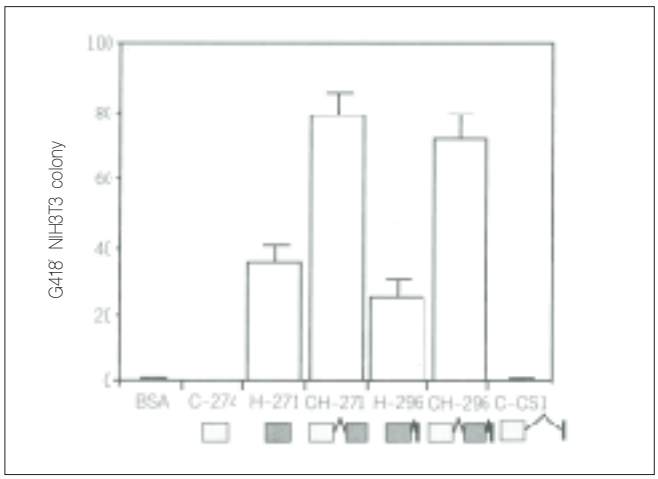


그림 8 Fibronectin 단편과 retrovirus의 결합

따라서 coating한 FN 단편에 virus vector가 접착하지 않은 경우는 계속해서 target 세포를 첨가하고 배양하여도 유전자 도입이 일어나지 않으므로 유의해야 한다. 이 실험 결과(그림 8), NIH3T3 세포를 target으로 한 경우에서 특징적인 것은 H domain을 포함하지 않는 FN 단편에서는 유전자 도입이 거의 일어나지 않는다는 것이다. 오히려 H domain과 C domain을 동시에 가지는 FN 단편쪽이 매우 높은 효율을 나타내었다. 이용한 실험 protocol을 면밀히 살펴보면 H domain이 없으면 virus vector가 FN 단편에 결합하지 않음을 알 수 있다. 따라서 도입효율이 가장 높았던 CH-271의 H domain을 heparin과 반응하여 blocking한 후 유전자 도입 효율을 조사하였다. 예상한 바와 같이 heparin의 농도가 높을수록 유전자 도입 효율이 낮아지므로 virus vector는 H domain에 결합하고 있음을 알 수 있었다.

V. 세포 수용체와 FN ligand와의 상호작용

FN 단편의 C domain은 세포표면에서 발현하는 VLA-5(very late antigen-5) 수용체에 대한 ligand로서 RGDS motif를 갖는다[22]. 한편, CS1 domain은 세포의 VLA-4 수용체에 대한 ligand인 EILDVPST motif를 갖는다[23]. FN 단편을 이용한 유전자 도입 실험(그림 8)을 세포 수용체 VLA-5, VLA-4와 FN 단편에 대응하는 각각의 ligand와의 상호작용이라는 관점에서 보면 다음의 기작으로 설명할 수 있다. 우선 두 실험계에서 H domain이 존재하지 않는 경우에는 아주 중요한 retrovirus vector가 결합할 수 없으므로 유전자 도입이 일어나지 않는다. NIH3T3 세포는 수용체 VLA-5 수용체를 발현하므로 CH-271과 CH-296을 coating해 놓으면 유전자 도입 효율이 현저히 상승함을 확인하였다(그림 8). 조혈모세포를 함유하는 c-Kit 양성세포는 VLA-5와 VLA-4 둘 다 발현하므로 양 수용체에 대한 ligand를 가진 CH-296을 coating하였을 때 가장 높은 효율로 유전자를 도입할 수 있다.

이 기작을 다시 확인하기 위해 VLA-5와 VLA-4 모두를 발현하는 HEL세포로 NGF 수용체(NGF-R) p75의 유전자 도입실험을 실시하였다(그림 9). 그림 9a는 HEL 세포와 각 FN 단편과의 접착반응을 나타낸다. 양 수용체에 대한 ligand를 각각 가지고 있는 C domain과 CS1 domain은 각각 단독으로 또는 복합적으로 HEL 세포와 접착하나, 당연히 양 ligand를 가지지 않는 BSA와 H-271은 접착하지 않는다. 그런데 FACS를 이용하여 도입 유전자의 발현을 조사해 보면(그림 9b~d), H domain을 갖지 않는 C-CS1 이외에 어느 쪽이든 한 쪽의 ligand만 갖고 있음에도 불구하고 CH-271과 H-296 각각은 NGF-R p75의 의미있는 발현을 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 보면 그림 10에 나타낸 것과 같은 기작으로 고효율의 유전자 도입을 설명할 수 있다. FN의 heparin-binding domain에 결합한 retrovirus vector를 VLA-5, VLA-4의 ligand와 target 세포의 사이에 둔 상태를 만들어냄으로써

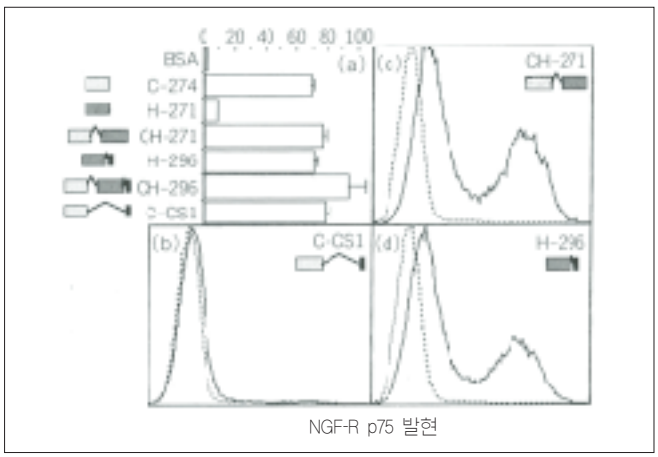


그림 9 HEL세포로의 유전자 도입
(b)~(d)의 실선은 각 단편을 넣었을 때의 결과를, 점선은 대조군를 나타낸다.

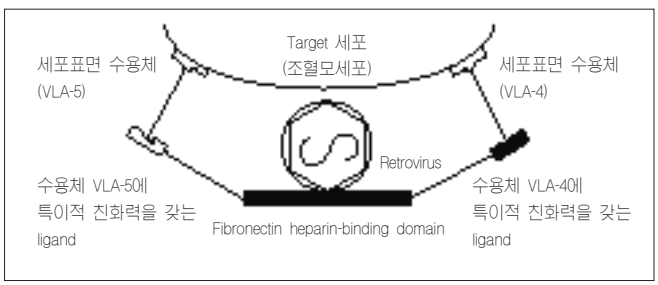


그림 10 Fibronectin에 의한 유전자 도입 촉진 기작(가설)

고효율의 유전자 도입을 일으키는 것이다. 필자 등은 이것을 virus vector와 target 세포가 FN 단편 분자상에서 "공배치"한다는 의미에서 "공배치(colocalization)" 가설이라 부른다.

이 가설에 최적인 FN 단편 CH-296은 모든 target 세포에 대하여 가장 높은 유전자 도입효율을 보였다. 이 단편을 coating하여 사람의 골수 유래 $CD34^+$ 세포와 제대혈 유래 $CD34^+$ 세포에 각각 유전자를 도입한 결과를 그림 11에 나타내었으며 양자 모두 70% 전후의 놀라운 수준의 도입효율을 나타내었다[4]. 여기서 CH-296이라는 FN 단편 대신에 왜 native한 FN을 사용하지 않는지 의문이 생길 것이다. 이미 서술한 바와 같이 FN의 cell binding domain 내에 존재하는 RGD motif는 폭넓게 분포하는 $\alpha_5\beta_1$ integrin 등에 의하여 인식된다[22].

그러나 이 RGD motif는 FN의 conformation에 따라 표면에 노출되지 않는 경우가 많다. FN 분자에 존재하는 또 하나의 중요한 접착영역은 heparin II(여기에서는 H domain으로 표기)의 C말단측의 약 120 아미노산 서열에 포함되는 소위 III CS segment이다[24]. 이 segment는 mRNA가 splicing될 때 생성되는 것으로 FN의 A chain(그림 4)에만 존재하며, 이 III CS segment에 $\alpha_4\beta_1$ integrin과 접착하는 CS1 아미노산 서열이 존재하고(그림 3), CS1 부위는 $\alpha_4\beta_1$ integrin을 발현하는 B세포, T세포 등의 lymphocyte에도 접착한다[25,26]. 그러나 $\alpha_4\beta_1$ integrin을 발현하는 세포는 실제로 가용성 plasma FN과 거의 반응하지 않으며[27], 가용성의 FN은 CS1 함유 peptide 단편과 반응하는 B세포나 T세포의 접착을 저해할 수 없다[28]. 이러한 사실은 CS1 영역이 native FN의 conformation에 따라 지배됨을 암시한다. Ugarova 등은 native FN의 CS1 부위(III CS 영역의 아미노산 잔기 1~25)는 소수성이 매우 강해 수화표면에 거의 노출되지 않는다는 사실을 증명하였다[29]. 플라스틱 등의 표면에 native FN을 coating하여도 마찬가지였으나, catepsin D나 B protease로 native FN을 분해하면 CS1 부위는 거의 완전히 노출되었다.

이상과 같이 세포와 가장 큰 접착성을 나타내는 III CS 영역은 native FN의 세포접착에는 기여하지 못하는 것으로 밝혀졌으며 필자 등의 결과에서도 native FN을 coating한 경우는 대조군 BSA(bovine serum albumin)와 동등한 수준인 재조합 CH-296의 1/5 이하의 유전자 도입 효율을 나타내었다.

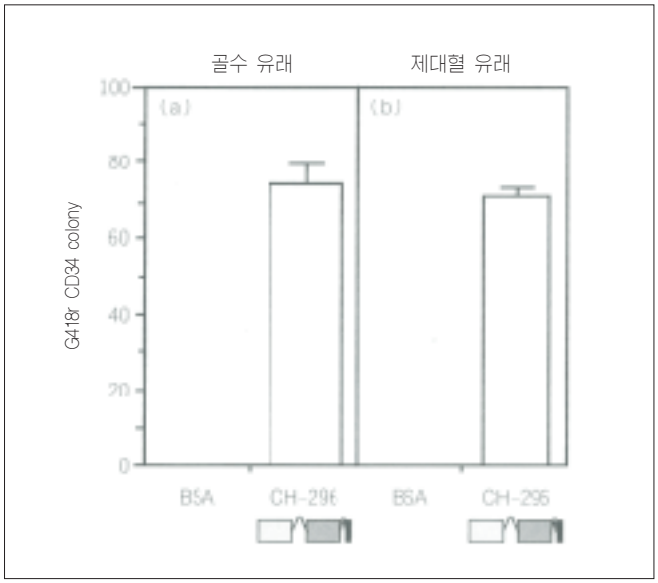


그림 11 CD34 양성세포로의 유전자 도입

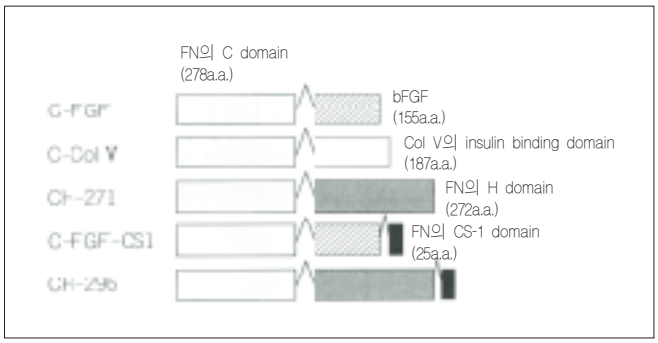


그림 12 FGF, Col V(insulin binding domain)과의 재조합 단편

한편 mouse의 조혈모세포를 target으로 한 경우에서는 CH-296과 C-FGF-CS1은 큰 차이를 보이는데, 이는 mouse의 모세포가 FN의 H domain과 어떠한 상호작용의 가능성을 시사해 준다(그림 13b). V형 collagen의 insulin binding domain을 이용한 경우에서도 거의 동등한 결과를 얻었다. 어느 쪽이든 NIH3T3 세포를 이용한 결과로 retrovirus vector는 FGF나 V형 collagen Col V의 insulin binding domain과 결합함을 확인할 수 있었고, 금후 다양한 chimera형 단편을 개발할 수 있다.

VI. Virus vector binding domain의 다양성

전술한 바와 같이 retrovirus vector는 재조합 FN의 H domain에 결합한다. 이 상호작용의 기작을 이해하기 위해 H domain 대신 FGF[30,31]나 V형 collagen의 insulin binding domain[32] 재조합 단편(그림 12)을 사용하여 유전자 도입 실험을 하였다. NIH3T3 세포를 target 세포로 선택한 경우 H domain과 FGF domain의 도입효율에는 큰 차이가 없었다(그림 13a).

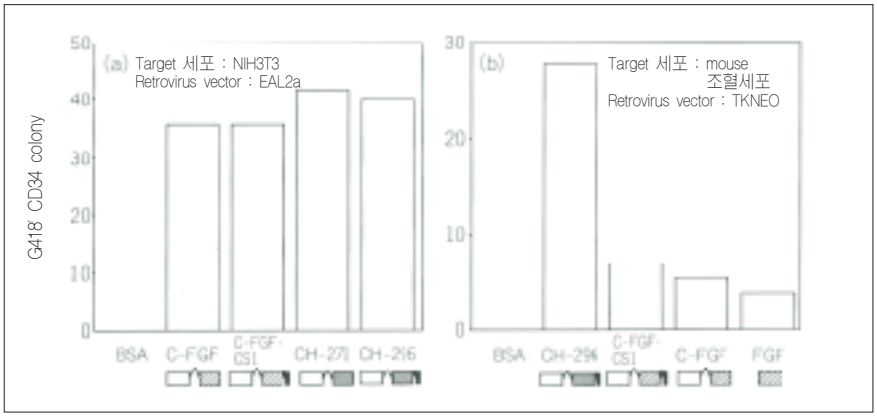


그림 13 재조합 단편을 이용한 유전자 도입

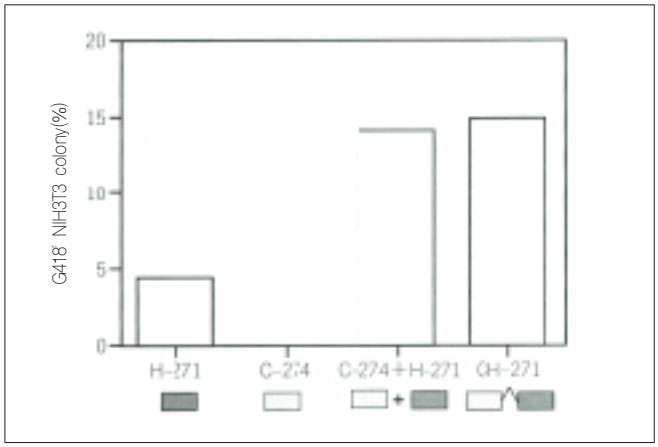


그림 14 Cell binding domain과 heparin binding domain을 이용한 유전자 도입

VII. 유전자 도입을 증강하는 polypeptide의 다양성

이상의 실험에서 target 세포 표면의 수용체와 반응하는 한 개 또는 복수의 ligand와, virus vector와 반응하는 ligand에 의한 "target 세포와 vector의 공배치 효과"에 따라 유전자 도입 효율이 상승함을 밝혔다. 다음의 의문점은 이러한 ligand가 CH-296이나 CH-271과 같이 상호간의 공유결합으로만 연결이 되어 있는가 하는 점이다. 요컨대 각각의 ligand를 포함하는 peptide 단편을 cocktail처럼 혼합한 후에 coating하여도 유전자 도입 효율이 상승하는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 실험을 간단히 하기 위해 VLA-5만을 발현하는 NIH3T3 세포를 target 세포로 선택하였다. 그림 14에 나타낸 바와 같이 VLA-5에 대한 ligand를 함유하는 C-274 단편과 virus에 결합하는 H-271 단편의 혼합물을 culture dish에 coating한 경우와 양 단편이 직렬로 공유결합한 CH-271을 coating한 경우의 양자 모두에서 거의 동등한 수준의 유전자 도입 효율을 얻었다. 결국 양 ligand 간의 공유결합은 불필요하다는 결론에 도달한다. 필자 등은 이 방법을 "Cocktail 도입법"이라 한다[33]. Cocktail 도입법이 의미하는 바는 매우 크다고 생각한다. 이는 virus vector와 결합하는 단편을 기초로 하여 target 세포 표면의 특이적인 수용체와 특이적으로 반응하는 항체나 당쇄 등을 cocktail함으로써 모든 종류의 target 세포에 대한 유전자 도입 효율이 상승할 수 있음을 나타낸다. 이상의 개념을 정리한 것이 그림 15이다.

결론

재조합 FN, 특히 3개의 domain을 포함하는 CH-296과 retrovirus vector에 의한 유전자 치료 실험법의 유용성이 확인되었고, 결과적으로 미국 인디아나 대학 병원의 3그룹에 대하여 미국 FDA는 FN을 이용한 암환자의 유전자 치료에 대한 임상시험을 허가하였다. TaKaRa는 이 그룹에 GMP에 대응할 수 있는 CH-296 단편을 공급하고 있다. 필자 등은 수 년전부터 "암의 전이 억제 연구"를 위하여 개발해 온 재조합 FN을 실질적인 유전자 치료에 응용할 수 있다는 사실에 대해 매우 기쁘게 생각하며, 이러한 임상시험이 성공하기를 기원한다. 현재 TaKaRa에는 전세계적인 유전자치료 연구그룹(약 100 그룹)으로부터 CH-296 단편을 제공해 달라는 요청이 쇄도하고 있어 금후 이 분야의 큰 발전을 기대하고 있다.

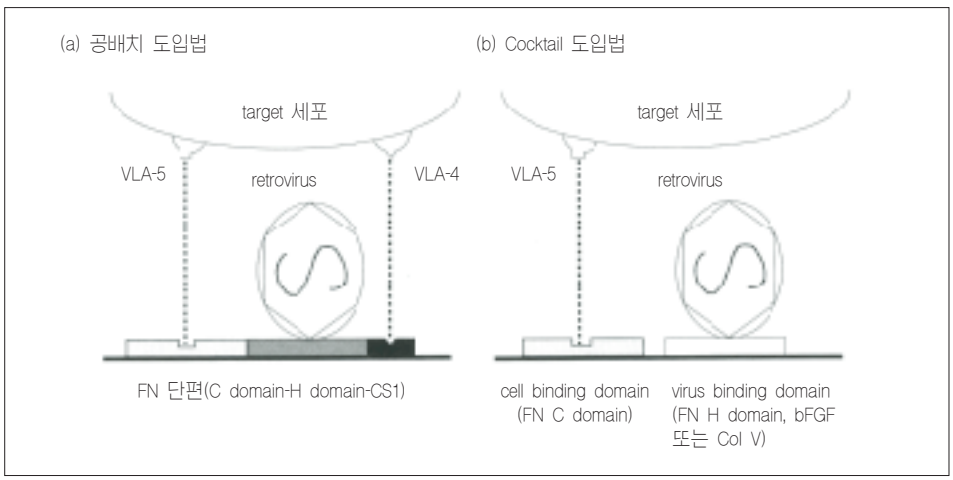


그림 15 Fibronectin 단편에 의한 유전자 도입법

참고문헌

1) Roth, J. A., Nguyen, D., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carraseo, C. H., Ferson, D. Z., Hong, W. K., Komaki, R., Lee, J. J., Nesbitt, J. C., Pisters, K. M. W., Putnam, J. B., Schea, R., Shin, D. M., Walsh, G. L., Dolormente, M. M., Han, C.-I., Martin, F. D., Yen, N., Xu, K., Stephens, L. C., McDonnell, T. J., Mukhopadhyay, T., Cai, D. : *Nature Med.*, **2**, 985-991 (1996)
2) Pastan, I., Gottesman, M. M., Ueda, K., Lovelace, E., Rotherford, A. V., Willinghan, M. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4486-4490 (1988)
3) Maciejewski, J. P., Weichold, F. F., Young, N. S., Cara, A., Zella, D., Reitz, M. S. Jr., Gallo, R. C. : *Nature Med.*, **1**, 667-673 (1995)
4) Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., Williams, D. A. : *Nature Med.*, **2**, 876-882 (1996)
5) Hsu, C.-H., Chua, K.-Y., Tao, J.-H., Lai, T.-L., Wu, H.-D., Huang, S.-K., Hsieh, K.-H. : *Nature Med.*, **2**, 540-544 (1996)
6) Anderson, W. F. : *Science*, **256**, 808-813 (1992)
7) Bordignon, C., Notarangelo, L. D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., Ugazio, A. G., Mavilio, F. : *Science*, **270**, 470-475 (1995)
8) Brenner, M. K., Rill, D. R., Holladay, M. S., Heslop, H. E., Moen, R. C., Buschle, M., Krance, R. A., Santana, V. M., Anderson, W. F., Ihle, J. N. : *Lancet*, **342**, 1134-1137 (1993)
9) Dunbar, C. E., Cottler-Fox, M., O'Shaughnessy, J., Doren, S., Carter, C., Berenson, R., Brown, S., Moen, R. C., Greenblatt, J., Stewart, F. M., Leitman, S. F., Wilson, W. H., Cowan, K., Young, N. S. : *Blood*, **85**, 3048-3057 (1995)

10) Kohn, D. B., Weinberg, K. I., Nolta, J. A., Heiss, L. N., Lenarsky, C., Crooks, G. M., Hanley, M. E., Annett, G., Brooks, J. S., El-Khoureiy, A., Lawrence, K., Wells, S., Moen, R. C., Bastian, J., Williams-Herman, D. E., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Hershfield, M. S., Mullen, C. A., Blaese, R. M., Parkman, R. : *Nature Med*., **1**, 1017-1023 (1995)
11) Yonder, M. C., Williams, D. A. : *Exp. Hematol*., **23**, 961-967 (1995)
12) Williams, D. A., Rios, M., Stephens, C., Patel, V. P. : *Nature*, **352**, 438-441 (1991)
13)Verfaillie, C. M., McCarthy, J. B., McGlave, P. B. : *J. Exp. Med*., 174, 693-703 (1991)
14)Verfaillie, C. M., Benis, A., Iida, J., McGlave, P. B., McCarthy, J. B. : *Blood*, **84**, 1802-1811 (1994)
15) Moritz, T., Patel, V. P., Williams, D. A. : *J. Clin. Invest*., **93**, 1451-1457 (1994)
16) Yoneda, J., Saiki, I., Igarashi, Y., Kobayashi, H., Fujii, H., Ishizaki, Y., Kimizuka, F., Kota, I., Azuma, I., : *Exp. Cell Res*., **217**, 169-179 (1995)
17) Saiki, J., Yoneda, J., Kobayashi, H., Igarashi, Y., Komazawa, H., Ishizaki, Y., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res*., **84**, 326-335 (1993)
18) Matsumoto, Y., Saiki, I., Makabe, T., Yoneda, J., Murata, J., Kimizuka, F., Ishizaki, Y., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res*., **82**, 1130-1138 (1991)
19) Saiki, I., Makabe, T., Yoneda, J., Murata, J., Ishizaki, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res*., **82**, 1112-1119 (1991)
20) Kimizuka, F., Taguchi, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Hashino, K., Kato, I., Sekiguchi, K., Titani, K. : *J. Biochem*., **110**, 284-291 (1991)
21) Saiki, I., Matsumoto, Y., Murata, J., Makabe, T., Yonea, J., Okuyama, H., Kimizuka, F., Ishizaki, Y., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res*., **82**, 1120-1129 (1991)
22) Ruoslahti, E. : *J. Clin. Invest*., **87**, 1-5 (1991)
23) Komoriya, A., Green, L. J., Mervic, M., Yamada, S. S., Yamada, K. M., Humphries, M. J. : *J. Biol. Chem*., **266**, 15075-15079 (1991)
24) Kimizuka, F., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Taguchi, Y., Hashino, K., Goto, S., Hashi, J., Kato, I., Sekiguchi, K., Titani, K. : *J. Biol. Chem*., **266**, 3045-3051 (1991)
25) Gismondi, A., Morrone, S., Humphries, M. J., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. : *J. Immunol*., **146**, 384-392 (1991)
26) Wayner, E. A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A., Carter, W. G. : *J. Cell Biol*., **109**, 1321-1330 (1989)
27) Molnar, J., Hoekstra, S., Ku, C. S.-L., Alten, P. : *J. Cell Physiol*., **131**, 374-383 (1987)
28) Ferreira, O. C. Jr., Garcia-Pardo, A., Bianco, C. : *J. Exp. Med*., **171**, 351-356 (1990)
29) Ugarova, T. P., Ljubimov, A. V., Deng, L., Plow, E. F. : Biochemistry, 35, 10913-10921 (1996)
30) Dilber, M. S., Bjökstrand, B., Li, K. J., Smith, E., Xanthopoulos, K. G., Gahrton, G. : *Exp. Hematol*., **22**, 1129-1133 (1994)
31) Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J., Rees, D. C. : *Science* **271**, 1116-1120 (1996)
32) Yaoi, Y., Hashimoto, K., Koitabashi, J., Takahara, K., Ito, M., Kato, I. : *Biochem. Biophys. Acta*, **1035**, 139-145 (1990)
33) Asada, K., Uemori, T., Ueno. T., Hashino, K., Kato, I. : The Second Annual Meeting, The Japan Society of Gene Therapy, p. 106 (1996)

TaKaRa Taq 가격 대폭 인하

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

PCR을 이용한 해석을 중심으로

RT-PCR법

1. RT-PCR

역전사효소 반응(RT)을 PCR과 조합함으로써 mRNA를 고감도로 검출하고 그 존재의 유무, 길이의 이상, 또는 발현량에 관한 정량적인 정보를 얻을 수 있다(RT-PCR법). 이 방법은 검출감도, 조작의 용이함, 속도 등에서 종래의 다른 방법보다 압도적으로 우수하여 각종 임상진단에도 이용되고 있다. 또한 SSCP법을 RT-PCR법과 조합함으로써 미량으로 존재하는 mRNA의 염기서열의 이상도 간편하게 검출할 수 있다.

서론

RNA 검출법으로는 RT-PCR법이 개발되기 이전부터 Northern blot analysis, dot blot analysis, nuclease protection method, *in situ* hybridization법 등을 이용하여 왔다. RT-PCR법은 미량 분자의 검출 감도면에서 Northern blot analysis, dot blot analysis, nuclease protection method 보다 우수하고, 조작이 빠르고 간편하다는 점에서 *in situ* hybridization보다 우수하다. 특히 미량으로 존재하는 여러 종류의 시료를 동시에 해석하는 경우에 유용하므로 임상진단에도 폭넓게 응용하고 있다. 또한 RT-PCR법을 SSCP와 조합함으로써 mRNA의 미세한 구조이상을 고감도로 검출할 수 있어 이 방향의 임상응용도 시험되고 있다. RT-PCR법은 RNA 조제, 역전사 효소반응(RT), PCR 등의 3단계로 나뉘어 진다. 검출감도는 1세포당 10분자 정도이지만, 실제는 상기의 3단계에 대응하는 RNA의 회수율, RT반응의 효율, PCR의 효율, 그 중에서도 시료의 DNA 혼입에 의한 증폭반응의 저해 유무등에 의해 최종산물량이 정해진다.

따라서 특히 미량의 RNA분자를 검출하거나 정량 해석을 목적으로 할 때에는 각 단계에 있어 효율을 가능한 한 높이는 노력이 필요하다. 본 고에서는 RNA의 조제법, RT-PCR법, RT-PCR-SSCP법에 대하여 순서대로 설명한다. 보다 상세한 설명을 필요로 하는 경우는 다른 서적을 참고한다[1~3].

I. RNA의 조제

1. 일반적인 주의사항

RNA를 분해되지 않은 상태로 추출하기 위해서는 추출조작 과정에서 ribonuclease(RNase)의 혼입을 피하는 것이 필수조건이다. RNase는 극히 안정한 효소로 고온에서도 실활되지 않고, 보효소가 없거나 넓은 pH 영역에서도 활성을 유지하므로 혼입되지 않도록 충분한 주의를 기울여야 한다. 외부로부터의 RNase 혼입을 막기 위해서는 ① 가능한한 멸균한 기구를 사용할 것 ② Eppendorf tube나 pipette tip은 건열멸균한 것을 사용할 것 ③ 유리기구를 이용하는 경우는 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC) 용액을 처리하여 사용할 것 ④ 조작중에는 고무장갑을 착용할 것 등의 주의가 필요하다.

한편 RNase는 세포 내에도 존재한다. RNA 추출 조작시 세포 구조를 파괴하면 세포내 RNase가 RNA 분자와 접촉하여 이것을 분해한다. 이 내인성 RNase 활성을 제거하기 위해서는 단백질 제거 조작으로 RNase 자체를 제거하거나 RNase 활성을 저해해야 한다. 통상의 RNA 추출조작에 있어서는 내인성 RNase 활성을 제거할 목적으로 세포를 강력한 변성제인 guanidium thiocyanate와 환원제 2-mercaptoethanol로 융해하여 phenol로 추출한다. 이 때 phenol만으로 추출하면 pH7.6 이하의 조건에서는 대부분의 poly(A)$^+$ RNA가 phenol 층으로 소실되어 버리므로, phenol에 chloroform을 첨가하고 또 SDS를 사용함으로써 RNA를 수층에서 보존할 수 있다. 아래에 그 두가지 방법을 소개한다.

2. Acid · guanidium thiocyanate/phenol/chloroform 추출법 (AGPC법)[3, 4]

이 방법은 1987년에 Chomczynski와 Sacchi에 의해 개발된 방법으로 고순도의 완전한 RNA를 비교적 단시간에 얻을 수 있다. 이 방법은 동물배양세포나 동물조직 등의 각종 재료에 응용할 수 있고, 또 비교적 소량의 재료에서도 RNA를 추출할 수 있어 가장 보편적으로 이용되고 있다.

A. 준비

[세포 융해용액 D]

4 M guanidium thiocyanate
25 mM sodium citrate(pH7.0)
0.5% sarcosyl
0.1 M 2-mercaptoethanol

Guanidium thiocyanate는 인체에 유해하므로 개봉한 병에 직접 dH_2O, sodium citrate 용액 및 sarcosyl을 첨가하여 65℃에서 용해하도록 Chomczynski는 권장하였다. 이 용액은 실온 보존으로 최소 3개월동안 사용할 수 있다. 2-mercaptoethanol은 사용시에 첨가한다.

[포화 phenol]

RNA grade phenol(Gibco-BRL)을 사용하는 것이 바람직하다. 탈이온수로 포화한 후 사용한다.

[Diethyl pyrocarbonate(DEPC)]

비특이적인 RNA 저해제이다. 유리기구를 세정할 때에는 0.1% 용액을 사용한다. 또 dH_2O에 첨가하여 RNA를 용해하는 경우도 0.1% 농도의 용액으로 한다.

B. 방법

아래의 모든 조작은 eppendorf tube에서 하면 간편하다.

(1) 조직의 경우는 적출 후 재빨리 얼음위에서 잘게 나누고, 조직 50 mg에 대해 500 ㎕의 비율로 융해 용액을 첨가한 후 glass/teflon homogenizer로 파쇄한다. 융해 용액은 eppendorf tube 1개당 500 ㎕씩 분주한다. 배양 세포의 경우는 우선 원심분리(300~400×g, 3~5분)를 하여 세포를 1개의 eppendorf tube에 최대 5×10^6개 정도 모으고, 5×10^6개의 세포당 500 ㎕의 비율로 융해 용액 D를 첨가한다.
(2) 세포융해액을 vortex로 재빨리 혼합하여 완전히 균질화한다.
(3) 가볍게 원심분리하여 용액을 tube의 기저부위에 모은다.
(4) 50 ㎕의 2 M sodium acetate(pH4.0)를 첨가하여 vortex하고 원심분리를 반복한다.
(5) 500 ㎕의 RNA grade phenol(포화한 것)과 100 ㎕의 chloroform/isoamyl alcohol(49:1) 혼합액을 첨가한다.
(6) Vortex로 완전히 혼합하고 얼음에서 15분간 정치한다.
(7) 10,000×g에서 4℃, 20분간 원심분리한다.
(8) 상층을 주의를 기울여 새로운 micro tube로 옮긴다. 이 때 경계층은 절대 피한다.
(9) 1 ml의 ethanol 또는 500 ㎕의 isopropyl alcohol을 첨가하여 부드럽게 섞은 후 -20℃에서 1시간 동안 침전한다.
(10) 10,000×g에서 4℃, 20분간 원심분리한다.
(11) 상청을 제거하고 침전물을 300~400 ㎕의 4 M 세포 융해용액 D로 용해한다.
(12) 1 ml의 ethanol 또는 500 ㎕의 isopropyl alcohol을 첨가하여 부드럽게 섞은 뒤 -20℃에서 1시간 동안 침전한다.
(13) 10,000×g에서 4℃, 15분간 원심분리한다.
(14) 상청을 제거하고 침전물을 75% cold ethanol로 씻은 후 5분간 원심분리한다.
(15) 50 ㎕의 0.1% DEPC 용액 또는 0.5% SDS 용액을 첨가하여 65℃에서 10분간 용해한다.
(16) 이 상태로 -70℃에서 보존하거나 또는 ethanol 침전 상태로 -20℃에서 보존한다.

3. 미량 시료에 대한 Guanidium/Cessium Chloride(CsCl) 추출법[3,5]

Rappolee가 보고한 방법으로 수천개 이하의 세포로도 RNA를 추출할 수 있다. 이 때 미량의 RNA를 높은 효율로 침전하기 위해 적당량의 대장균 ribosomal RNA를 담체로 이용하는 것이 좋다.

(1) Eppendorf tube에 침전한 미량의 세포에 100 ㎕의 세포 융해용액 D를 첨가한 후 재빨리 vortex로 혼합한다.
(2) Beckman TL-100용의 원심튜브에 100 ㎕의 5.7 M CsCl을 주입한다.
(3) 여기에 (1)에서 얻은 세포 융해액을 조심스럽게 중층한다.
(4) 80,000 rpm으로 2시간 동안 원심분리한다.
(5) Guanidium/cessium chloride를 주의하여 흡인한다.
(6) 침전을 0.1% DEPC 용액 100 ㎕으로 용해한다.
(7) 10 ㎕의 2.5 M ammonium acetate, 200 ㎕의 ethanol을 첨가하여 -20℃에 1시간 동안 침전한다.
(8) 10,000×g에서 4℃, 15분간 원심분리한다.
(9) 침전을 70% ethanol로 2번 세정한다.
(10) 침전을 약 1 ㎍/㎕의 농도가 되도록 적정량의 0.1% DEPC 용액으로 용해한다.

II. 역전사효소 반응

1. 역전사효소(reverse transcriptase; RTase)

mRNA 자체는 PCR의 기질이 될 수 없다. 따라서 RT반응으로 mRNA로부터 cDNA를 합성할 필요가 있다. RTase는 RNA-dependent DNA polymerase 활성을 가져 mRNA를 주형으로 상보적인 cDNA를 합성(1st strand 합성)하고 동시에 DNA-dependent DNA polymerase 활성을 가져 합성된 cDNA의 complementary strand를 합성할 수 있다(2nd strand 합성). RT반응에는 통상 avian myeloblastosis virus (AMV) 유래와 molony murine leukemia virus(MoMLV) 유래의 2종류 RTase가 이용된다. AMV 유래 RTase는 상기의 2개 활성뿐만 아니라 mRNA:cDNA hybrid를 강력하게 분해하는 RNase H 활성을 가지므로, 1st strand 합성이 저해되어 긴 cDNA를 합성할 수 없다는 단점을 가진다. 한편, MoMLV 유래 RTase는 RNase H 활성이 비교적 약하므로 이론적으로는 긴 DNA 합성이 가능하지만, 반응의 최적온도가 37℃로 AMV 유래 RTase의 42℃보다 낮으므로 주형 mRNA가 복잡한 고차구조를 가지는 경우에는 cDNA의 신장반응이 저해된다. 이와 같이 AMV 유래 RTase와 MoMLV 유래 RTase는 모두 일장일단을 가지나 필자는 MoMLV 유래 RTase를 선호한다. 또 두 효소는 최적 pH, 최적 염농도 등에서도 차이가 나므로 주의해야 한다. 최근 Myers 등은 RTase 활성과 PCR 활성 모두를 가지는 *Tth* polymerase를 보고하였다[6]. RT-PCR 반응

을 1개의 효소로 수행하면 RT반응을 고온에서 할 수 있으므로 주형 mRNA의 고차구조의 영향을 줄일 수 있다는 점 등의 장점이 있으며 종래의 방법보다 감도가 약 100배 더 증가한다는 보고도 있다. 그러나 RT반응에 Mn^{2+} 이온을 필요로 함에 따라 반응의 정확도(fidelity)가 낮아지는 것이 단점이다.

2. RT반응에 사용하는 primer

RT반응의 primer는 목적에 따라 ① oligo(dT)$_{12\sim18}$ primer, ② 특정 염기서열에 대한 상보적인 primer, ③ random 6 mer primer 등의 3종류를 이용할 수 있다.

Full-length cDNA를 얻고자 하는 경우는 oligo(dT)$_{12\sim18}$ primer가 유용하다. Target mRNA의 양이 극히 적을 것으로 예상되는 경우에도 oligo(dT)$_{12\sim18}$ primer는 동일 mRNA분자의 poly(A)$^+$의 다양한 부위와 결합하여 복수의 신장반응을 개시할 수 있다. 또 RT-PCR법에 기초한 DDA(differential display analysis)를 할 때는 RT 산물을 일차 정제분획하는 목적으로 oligo(dT)$_{12\sim18}$ primer의 3' 말단에 A, G, C, (T)를 다양한 조합으로 2염기 정도 붙인 primer를 이용한다.

이에 반해 임상진단이나 정량적 RT-PCR법 등의 경우에는 보다 선택적으로 특정의 염기서열을 증폭할 필요가 있으므로 특정염기 서열에 대한 상보적인 primer를 이용한다. 필자 등은 20염기 정도의 길이를 가진 primer를 이용하여 양호한 결과를 얻었다. 또 random 6 mer primer는 mRNA의 5' 말단 등과 같이 oligo(dT)$_{12\sim18}$ primer를 이용한 RT 반응으로 신장되기 힘든 영역의 해석이나 임상진단에 있어 target으로 하는 염기서열이 짧아야 좋은 경우 등에 자주 이용된다.

3. DNA의 혼입에 대한 대책

미량의 mRNA를 검출하는 경우 또는 정량적인 해석을 하는 경우에 가장 큰 문제점은 시료에 genome DNA가 혼입되는 것이다. 일반적으로 2개의 primer를 다른 exon상의 염기서열과 상보적으로 설정하면 설사 혼입한 genome DNA가 cDNA와 함께 PCR의 주형으로 작용하더라도 genome DNA의 경우는 intron도 동시에 증폭되므로 단편의 길이가 다른 mRNA 유래의 RT-PCR 산물과 구별할 수 있고, genome DNA 유래의 intron을 함유하는 단편은 cDNA 유래의 단편보다 길기 때문에 증폭효율이 낮을 것으로 예상한다. 그러나 genome DNA 유래의 단편이 원하는 cDNA 유래의 단편과 길항적으로 증폭하므로 반응의 정량성에 장애가 된다. 한편, intron을 결실한 유전자나 pseudo 유전자가 존재하는 경우에는 혼입한 genome DNA 유래의 단편과 mRNA 유래 단편의 길이 차이를 구별할 수 없다. 따라서 RNA용액에 DNase 처리하여 혼입한 genome DNA를 완전히 제거할 필요가 있다.

4. 방법

A. 준비

- Reverse Transcriptase
- RNase Inhibitor
- 10× RT buffer

750 mM	KCl
500 mM	Tris-HCl(pH8.3)
30 mM	$MgCl_2$

B. RNA 시료의 deoxyribonuclease(DNase) 처리[7]

1. 아래의 용액을 혼합한다

Total RNA(20 μg)	16.0 μl
10× DNase buffer	2.0 μl
RNase Inhibitor	1.0 μl
DNase(RNase free)	1.0 μl
Total	20.0 μl

2. 37℃에서 1시간 반응시킨다.
3. 90℃에서 5분간 가열한다.
4. 원심분리하여 얼음위에 정치한다.

이 용액은 직접 RT 반응에 이용할 수 있으나, phenol/chloroform 추출, ethanol 침전으로 RNA를 회수해도 좋다.

C. 역전사효소 반응

(a) Annealing : 특정 염기서열에 대한 상보적 primer를 이용하는 경우

1. 아래의 용액을 혼합한다.

RNA 용액(1 μg/μl)	1.0 μl
RT Primer(50 nM)	1.0 μl
10× RT buffer	1.4 μl
dH_2O	6.6 μl
Total	10.0 μl

2. 혼합액을 95℃에서 2분간 가열한다.
3. 55℃에서 1시간 반응한다.
4. 원심분리한다.

oligo(dT)$_{12\sim18}$ primer를 이용하는 경우에는 동일한 반응계에 40~100 pmol 첨가한다.

(b) Primer 신장반응

1. 아래의 용액을 혼합한다.

Primer와 annealing한 RNA 혼합액	10.0 μl
Dithiothreitol(100 mM)	1.4 μl
dNTPs mixture(각 5 mM)	1.4 μl
RNase Inhibitor	0.7 μl
Reverse transcriptase(200 units/μl)	0.5 μl
Total	14.0 μl

2. 37℃에서 1시간 반응시킨다.
3. 80℃에서 5분간 가열한다.
4. 원심분리하여 얼음위에 정치한다.

III. PCR

RT반응으로 얻은 cDNA를 주형으로 PCR을 실시함으로써 mRNA를 검출할 수 있다. mRNA를 고감도로 검출하고자 하는 경우는 방사성 동위원소를 이용한 PCR을 한다. 여기에는 표식 primer를 이용하는 경우와 표식 nucleotide를 이용하는 경우의 2가지 방법이 있다.

일반적으로 방사성동위원소를 이용한 PCR은 검출감도가 높으므로 반응을 아주 소량으로도 할 수 있어 방사성 동위원소나 효소, 기질을 최소량으로 할 수 있다. 필자 등은 5 μl 용량의 PCR로도 양호한 결과를 얻었다[8, 9]. mRNA 검출을

목적으로 하는 경우는 통상 30 cycle의 PCR을 이용한다. 한편 mRNA의 정량을 목적으로 하는 경우에는 PCR 산물이 지수함수적으로 증가하는 cycle수를 단편별로 예비실험을 통해 결정할 필요가 있으나 통상 21~25 cycle이 적당하다.

1. 준비

- T4 polynucleotide kinase
- *Taq* polymerase
- 10× polynucleotide kinase buffer

500 mM	Tris-HCl(pH8.3)
100 mM	$MgCl_2$
50 mM	Dithiothreitol

- 10× *Taq* polymerase buffer

500 mM	KCl
100 mM	Tris-HCl(pH8.3)
15 mM	$MgCl_2$
0.1%(w/v)	gelatin

- [γ-^{32}P] ATP(7,000 Ci/nmol, 160 mCi/ml, ICN Biochemicals)
- [α-^{32}P] dCTP(3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
- dNTP Mixture(각 1.25 mM)
- 합성 oligonucleotide

2. 방사성 동위원소(RI)를 이용한 PCR법

mRNA를 고감도로 검출할 필요가 있는 경우, 특히 염기서열의 이상을 검출하기 위해 SSCP 해석을 하고자 하는 경우는 primer를 방사선표식하여 PCR에 이용한다. 이 경우는 ^{32}P를 기질로 하여 T4 polynucleotide kinase로 primer의 5' 말단을 표식한다.

RT-PCR 산물을 SSCP로 해석하는 경우에는 양측의 primer를 표식하는 것이 mRNA 구조의 이상을 검출하기 위해 반드시 필요하지만 양 primer를 동등한 강도로 방사성표식을 하기 위해서는 좌우 primer 각각에 대하여 별개의 kinase 반응을 해 줄 필요가 있다. 특히 표식한 primer는 정제할 필요가 없고, T4 polynucleotide kinase 반응액의 일부를 직접 PCR 반응액에 첨가한다. 단 kinase 반응액의 성분이 PCR을 저해하지 않도록 kinase 반응은 PCR의 최적 pH인 8.3에서 수행하고, 반응 후 가능한 한 소량의 dH_2O로 희석한다. SSCP 해석에서 명료한 시그널을 얻기 위해서는 최소량의 PCR 산물을 비변성 polyacrylamide gel로 분리하는 것이 가장 바람직하다. 이를 위해 PCR에 이용하는 primer가 높은 방사활성을 가지도록 표식해야 한다. A, B에 소개하는 것은 PCR 산물을 SSCP 해석하는 것을 염두에 둔 protocol이다.

A. Primer 5' 말단의 RI 표식 (30시료 동시 분석의 경우)

1. 다음의 용액을 첨가한다.

sense 또는 antisense primer(150 μM)	1.0 μl
10× kinase 완충액(pH8.3)	0.3 μl
[γ-^{32}P] ATP	1.3 μl
dH_2O	1.0 μl
T4 polynucleotide kinase(10 unit/μl)	0.3 μl
Total	4.0 μl

2. 37℃, 30분간 반응한다.
3. 80℃, 2분간 가열한다.
4. 원심분리하여 얼음위에 정치한다.
5. dH_2O 12.0 μl를 첨가하여 primer 농도를 10 μM로 조정한다.

B. RI 표식 primer를 이용한 PCR (1시료 해석의 경우)

Primer 신장반응으로 얻은 cDNA 용액의 일부(1 μl)를 PCR 주형으로 직접 이용한다.

1. 아래의 용액을 혼합한다.

Primer 신장반응 용액의 일부	1.0 μl
10× *Taq* polymerase buffer	0.5 μl
dNTP Mixture(각 1.25 mM)	0.4 μl
RI 표식 sense primer(10 μM)	0.5 μl
RI 표식 antisense primer(10 μM)	0.5 μl
dH_2O	1.6 μl
Taq polymerase(0.25 unit/μl*)	0.5 μl
Total	5.0 μl

* *Taq* polymerase는 1× PCR buffer로 희석한다.

2. PCR thermal cycler로 증폭반응을 실시한다.
   초기 열변성 : 94℃, 1분
   cycle 반응 : 94℃, 30초 : 55℃, 30초 : 72℃, 1분
   cycle 수 : 30 cycles(검출을 목적으로 하는 경우),
   21~25 cycles(정량을 목적으로 하는 경우)
   최종신장반응 : 72℃, 7분

편법으로 94℃, 20초 : 60℃, 1분의 2단계를 1 cycle로 해도 좋다. 또 annealing 온도는 primer에 따라 차이가 나므로 최적조건을 검토해야 한다.

C. RI 표식 nucleotide를 이용한 PCR (1시료 해석의 경우)

1. 아래의 용액을 혼합한다.

Primer 신장반응액의 일부	1.0 μl
10× *Taq* polymerase buffer	0.5 μl
dNTP Mixture(각 1.25 mM)	0.4 μl
sense primer(10 μM)	0.5 μl
antisense primer(10 μM)	0.5 μl
[α-^{32}P dCTP]	0.2 μl
dH_2O	1.4 μl
Taq polymerase(0.25 unit/μl*)	0.5 μl
Total	5.0 μl

* *Taq* polymerase는 1× PCR 완충액으로 희석한다.

2. Cycle 반응은 B-2와 동일하게 실시한다.

D. Polyacrylamide gel 전기영동에 의한 분리

1. PCR 반응액의 일부(1 μl)를 9 μl의 10% glycerol, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.
2. 5~6% polyacrylamide gel(90 mM Tris-borate pH8.3, 4 mM EDTA)에 1 lane 당 1 μl씩 loading하고 실온에서 전기영동한다.
3. Gel을 여과지상에서 건조한 후 실온에서 X-ray film에 30~60분간 노광하여 시그널을 얻는다.

3. Primer를 방사성 표식하지 않은(non-RI) PCR법

PCR 산물을 RI 표식할 필요가 없는 경우에는 아래의 protocol에 따른다. RI 표식의 경우와 비교하면 검출감도가 떨어지나 간편한 조작으로 다양한 목적에 이용할 수 있다.

1. 아래의 용액을 혼합한다.

Primer 신장반응액의 일부	1.0 μl
10× *Taq* polymerase buffer	1.0 μl
dNTP Mixture(각 1.25 mM)	1.6 μl
sense primer(10 μM)	1.0 μl
antisense primer(10 μM)	1.0 μl
dH_2O	3.9 μl
Taq polymerase(0.25 unit/μl*)	0.5 μl
Total	10.0 μl

* *Taq* polymerase는 1× PCR 완충액으로 희석한다.

2. B-2와 동일한 cycle로 PCR 한다.
3. PCR 반응액을 2 μl의 25% glycerol, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.
4. 3~4% Nusieve:SeaKem(3:1) agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색하여 증폭단편을 검출한다.

IV. SSCP(single strand conformational polymorphism) 해석법

mRNA에 점 돌연변이를 가지는 미세한 구조이상을 검출하기 위해서는 RT-PCR-SSCP법을 이용한다[8~10]. Ⅲ-2-A, B에서 얻은 RI 표식 PCR 산물의 일부를 그대로 해석에 이용할 수 있다. cDNA의 SSCP해석은 원리적으로 genome DNA의 SSCP 해석에 준한다[11,12].

1. PCR 반응액의 일부(1 μl)를 9 μl의 0.1% SDS, 10 mM EDTA 용액과 혼합한다.
2. 1 μl를 취해 100 μl의 formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.
3. 이 희석액을 80℃에서 3분간 가열하여 변성한다.
4. 5~6% polyacrylamide gel(45 mM Tris-borate pH8.3, 4 mM EDTA)에 1 lane 당 1 μl씩 loading한다. 통상 5~10% glycerol을 첨가한 gel과 첨가하지 않은 gel 2종류로 분리한다.
5. 냉각식 정온 전기영동장치를 사용하여 통상 25℃, 40W에서 2~5시간동안 영동한다.
6. Gel을 여과지상에서 건조한 후 -80℃에서 X-ray film에 1~12시간 노광한다.

V. 실험례[8,10]

RB 유전자는 사람의 망막아세포종(retinoblastoma)에서 분리된 암 억제유전자로 골육종, 폐암, 유방암, 방광암, 전립선암 등에서도 2개의 대립유전자 모두에 구조이상이 일어남으로써 비활성화되는 것으로 알려져 있다. 그림 1은 사람의 각종 종양 유래 배양세포에 대하여 RT-PCR로 RB mRNA를 검출한 예이다. 배양세포로부터 조제한 total RNA를 주형으로 RB cDNA의 특정 염기서열에 상보적인 20염기의 oligonucleotide를 primer로 하여 역전사반응을 통해 cDNA를 제작하였다. 이 cDNA를 주형으로 *RB* 유전자의 exon 1과 exon 3의 염기서열에 상보적인 20염기의 합성 oligonucleotide를 primer로 하여 그 5' 말단을 방사성 표식한 후 PCR 하였다. 획득한 증폭단편을 polyacrylamide gel로 분리하였다. 그림 1에 나타낸 것처럼 모든 종양세포에서 RB mRNA의 230 bp 단편이 검출되었지만 폐 거세포(giant cell) 암세포 Lu65에서는 230 bp band가 극히 약하게 나타났으며, 크기가 작은 또 하나의 band가 강하게 검출되었다. 또한 이 짧은 단편은 splicing의 이상에 의해 exon 2의 염기서열이 결실되고 exon 1과 exon 3의 염기서열이 직접 연결하여 생긴 단편이라는 사실을 염기서열 결정을 통해 밝혔다.

그림 2는 그림 1에서 확인한 230 bp 단편을 SSCP로 해석한 결과이다. 폐거세포 암세포 Lu65의 230 bp 단편을 single strand로 분리한 2개의 band 모두가 사람의 태반 mRNA의 것과 다른 이동도를 나타내어 단편 내의 염기서열의 변화를 암시하였다. 염기서열 결정으로 이 이동도의 차가 RB mRNA의 codon 82의 위치에 종결 코돈을 도입하는 점 돌연변이에 의해 생긴 것임을 밝혔다. 또 정상적인 이동도를 나타내는 단편이 확인되지 않음으로써 정상 mRNA가 발현되지 않는다는 사실도 동시에 나타내었다.

그림 1 RB mRNA의 RT-PCR 해석
10종류의 사람 종양 유래의 배양세포(Lane 1~10 : Y79, Lu65, Lu99, C1, PLC/PRF/5, W2, PSN1, HL60, Colo320 HSR(+), Colo320DM(+))과 정상사람 태반에서 전체 RNA를 추출한 후, RB cDNA의 exon 1~3에 상당하는 영역을 PCR로 증폭하여 미변성 6% polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

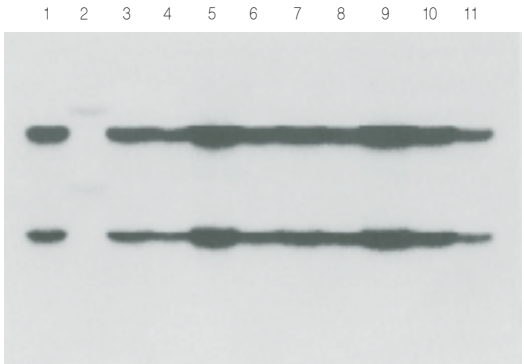


그림 2 RB mRNA의 RT-PCR-SSCP 해석
그림 1과 동일한 단편을 가열하여 변성한 후, 10% glycerol을 첨가한 6% polyacrylamide gel에서 30W로 25℃, 5시간 동안 전기영동하였다. Lane 1~11은 그림 1과 동일.

참고문헌

1) Larrick, J. W., Siebert, P. D. : Reverse Transcriptase PCR, Ellis Horwood Ltd., London (1995)
2) Mullis, K. B., Ferre, F., Gibbs, R. A. : The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser, Boston (1994)
3) Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber-Rolfs, I. : PCR Clinical Diagnostics and Research, Springer-Verlag, Berlin (1992)
4) Chomczynski, P., Sacchi, N. : *Anal. Biochem*., **162**, 156-159 (1987)
5) Rappolee, D. A., Wang, A., Mark, D., Werb, Z. : *J. Cell. Biochem*., **39**, 1-11 (1989)
6) Myers, T. W., Gelfand, D. H. : *Biochemistry*, **30**, 7661-7666 (1991)
7) Makino, R., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, **2**, 295-301 (1990)
8) Murakami, Y., Katahira, M., Makino, R., Hayashi, K., Hirohashi, S., Sekiya, T. : *Oncogene*, **6**, 37-42 (1991)
9) Murakami, Y., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Cancer Res*., **51**, 3356-3361 (1991)
10) Murakami, Y., Sekiya, T. : *in* Reverse Transcriptase PCR (d. Larrick, J. W., Siebert, P. D.), pp. 308-318, Ellis Horwood Ltd., London (1995)
11) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989)
12) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Genomic*., **5**, 874-879 (1989)

2. Oligo Cap법에 의한 mRNA 5' 말단의 Cloning

mRNA의 5' 말단을 분리하는 방법으로서 Oligo Cap법을 소개한다. Oligo Cap법은 mRNA의 cap을 TAP으로 떼어내고 여기에 합성 oligonucleotide를 ligase로 결합하여 5'을 mark한 후 합성 oligonucleotide에 대응하는 서열과 분리하고자 하는 mRNA의 서열을 이용한 PCR로 5' 말단을 증폭하는 것이다. 이 방법은 RNA를 직접 조작해야 하므로 기술적으로 어려운 점이 있으나 원리적으로는 mRNA의 5' 말단을 분리할 수 있다.

서론

mRNA의 5' 말단을 cloning하는 방법으로는 RACE법 등 몇 가지가 있다. 이 중 필자가 개발한 합성 Oligo Cap법은 지금까지는 없었던 원리를 응용한 것이다. RACE법 등 종래의 방법은 기본적으로 존재하는 cDNA 중에서 가장 긴 것을 분리하기 위한 방법이라 할 수 있다. 역전사 효소는 mRNA의 5' 말단을 넘어가는 신장반응은 할 수 없다고 생각되므로(실제로는 hair pin 구조를 이용하여 더 신장하는 경우도 있지만) 가장 긴 cDNA는 5' 말단까지 신장한 것이라 생각할 수 있다. 이 원리는 기본적으로 매우 짜임새 있어 보이지만, 실제에 있어서는 cDNA가 제대로 합성되었는지를 조사하는 것이 불가능하므로 획득한 clone이 정말로 5' 말단까지 신장되었다는 확신을 할 수 없다. 특히 개시암호라 생각하는 서열 전에 in frame의 종지암호가 없는 경우 등 매우 불안한 사례가 많다.

이에 반해 Oligo Cap법은 mRNA의 5' 말단에 존재하는 cap 구조를 target으로 합성 oligonucleotide로 cap 구조를 치환하는 것이 기본원리이다. cDNA가 5' 말단을 가지는지의 판단은 cDNA의 길이가 아니라 oligo cap에 이용한 oligo 염기서열의 cDNA 말단 존재여부를 기준으로 한다. 따라서 이 경우 oligo에 이어지는 염기가 mRNA의 전사개시점에 해당하는 염기라 생각한다. 이 방법으로 mRNA의 5' 말단을 가진 clone을 분리하면, 종래의 방법보다 대체로 긴 것을 잡을 수 있지만 때로는 짧은 경우도 있다. 이 경우에는 복수의 전사개시 부위가 존재하는 것으로 생각해도 좋다.

Oligo Cap법은 RNA를 조작해야 하고 또 필요한 효소도 보다 양질의 것을 사용해야 하므로 널리 사용되지는 않는 방법이다. 그러나 위와 같이 종래의 방법과는 다른 장점이 있으므로 kit화 등의 노력으로 많은 연구자들이 사용할 수 있는 시스템으로 구축하고자 한다.

I. Oligo Cap법의 원리

그림 1에 Oligo Cap법의 원리를, 또 그림 2에 이 방법에 의한 mRNA 5' 말단의 cloning에 대한 전체 흐름을 나타내었다. Oligo Cap법은 본래 mRNA의 개시염기를 결정할 때에 이용하는 Post Labeling법을 근간으로 한 것이다. 즉, acidic pyrophosphatase(TAP)로 cap을 떼어낸 후(그림 3 참조) 노출된 5' 말단의 인산기에 합성 oligonucleotide를 RNA ligase로 연결한다. 단, 세포에서 분리한 mRNA[poly(A)$^+$ RNA]에는 분해된 RNA나 mitochondria 유래의 mRNA 등, cap을 가지지 않는 것도 다수 존재한다. 따라서 cap에 특이적인 결합을 하

기 위해 cap을 가지지 않은 RNA의 5' 말단에 존재하는 인산기를 phosphatase(BAP)로 미리 떼어 둔다.

RNA ligase는 single strand RNA 또는 DNA를 연결할 수 있다. 단, RNA-RNA의 경우에 비해 DNA-RNA간의 연결효율은 1/10로, DNA-DNA의 경우는 1/100로 떨어진다.

실제로 oligo cap의 oligo로서 DNA를 사용해 보았지만, 잘 되지 않는 경우가 많았다. 지금은 RNA와 DNA의 chimera 분자를 제작할 수 있으므로 DNA oligo의 3' 말단에 1~3 염기의 RNA를 결합시킴으로써 RNA oligo와 동등한 효율로 RNA와 결합할 수 있다(Kato *et al.* : personal communication).

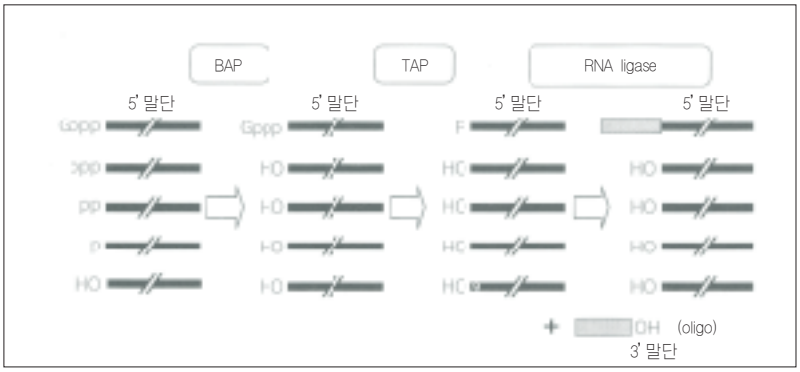


그림 1 Oligo-Cap법의 개요
: RNA, BAP: bacterial alkaline phosphatase, TAP: tobacco acidic pyrophosphatase.

II. Oligo Cap법을 실시하기 전에 고려할 점

1. RNA

RACE법 등은 cDNA로 전환된 것을 조작하는 것에 반해 Oligo Cap법은 RNA를 조작해야 한다. 따라서 RNA를 조작해 본 경험이 있어야 하며 특히 cDNA library를 제작한 경험이 있는 것이 바람직하다. 또 실험실에 RNA 조작 시스템이 갖추어져 있어야 하며 여러 사람들이 RNase를 사용하지 않는 편이 좋다. 또 RNA에 여러 단계에 걸쳐 효소처리를 해야 하므로 RNA를 다량 확보해 두어야 한다. 배양세포 유래의 RNA로 목적실험을 하는 것은 좋으나 특수한 조직이나 세포의 것은 충분한 양을 확보하기가 매우 어렵다.

2. 효소

효소는 물론 RNase free인 것을 사용하여야 한다. 구체적인 protocol에는 필자 등이 사용하는 효소를 소개해 놓았으며 다른 것은 시험해 보지 않은 것도 있으므로 개별적으로 점검해 볼 필요가 있다. 특히 TAP는 양호한 것이 없어 직접 정제하였다. 필자 등이 정제한 것은 보통 사용하는 농도의 10배를 total RNA와 37℃에서 2시간 반응하여도 28S, 18S ribosomal RNA는 거의 변하지 않았다. 최장 20시간을 반응하면 28S, 18S는 분해되고 이 경우 RNase는 RNasin에 의해 부분적인 저해를 받는다.

현재 TAP는 일본의 Wako가 공급하고 있다(TAP HG, Wako). RNA ligase도 lot에 따라 품질의 차이가 많이 나므로 주의해야 한다.

3. RT-PCR

무사히 oligo cap을 만들었으면 RT-PCR을 실시한다. Oligo dT 또는 목적 mRNA에 특이적인 primer로 cDNA를 제작하고 oligo cap에 사용한 oligo의 염기서열과 목적 mRNA의 기지 부분의 염기서열을 이용하여 PCR을 한다. RACE법의 경우와 마찬가지로 5' 말단의 GC함량이 높으면 증폭할 수 없다. GC 함량이 높다고 생각되면 DMSO를 넣는 등 여러 가지 실험조건을 검토해야 하나 여기에 대해서는 다른 해설서 등을 참고하기로 하고 본 고에서는 Oligo Cap법 고유의 문제

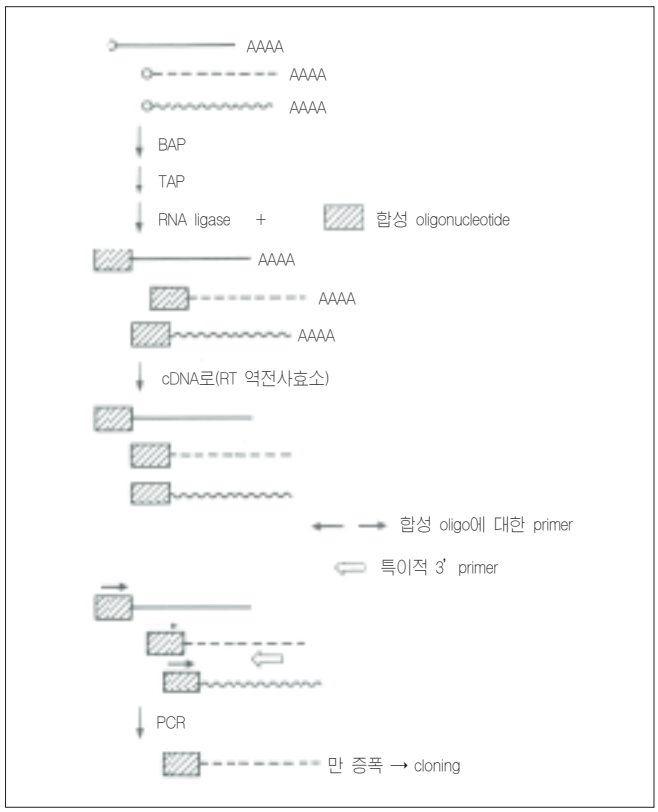


그림 2 Oligo Cap법에 의한 5' 말단 cloning의 전체 흐름

점을 지적하고자 한다.

Oligo Cap법으로 수~수십%의 cap을 oligo로 치환할 수 있다. 따라서 통상의 RT-PCR보다 1~2배 더 많은 RNA를 사용하거나 cycle을 증가시켜야 한다. 한편 PCR의 특이성은 5' primer(oligo cap에 사용한 oligo 염기서열에 대응)이 아니라 전적으로 3' primer에 의존한다. 그래서 3' primer는 여러 개를 합성해 둘 필요가 있다. 또 5' primer도 복수로 준비해 두는 것이 좋다.

또 5' primer나 oligo cap에 사용하는 oligo의 염기서열도 문제가 될 수 있다. 첫번째로는 특이적인 primer와의 상호성이 나쁜 경우이다. 두번째로 비특이적인 증폭이 일어나는 경우이다. RNA oligo가 고가라는 것도 필자 등은 충분히 검토하지 않았다. 현재 필자 등이 사용하고 있는 염기서열도 약간 낮은 온도에서 PCR을 하면 비특이적인 산물이 생겨 이상적이지 않은 상태이다.

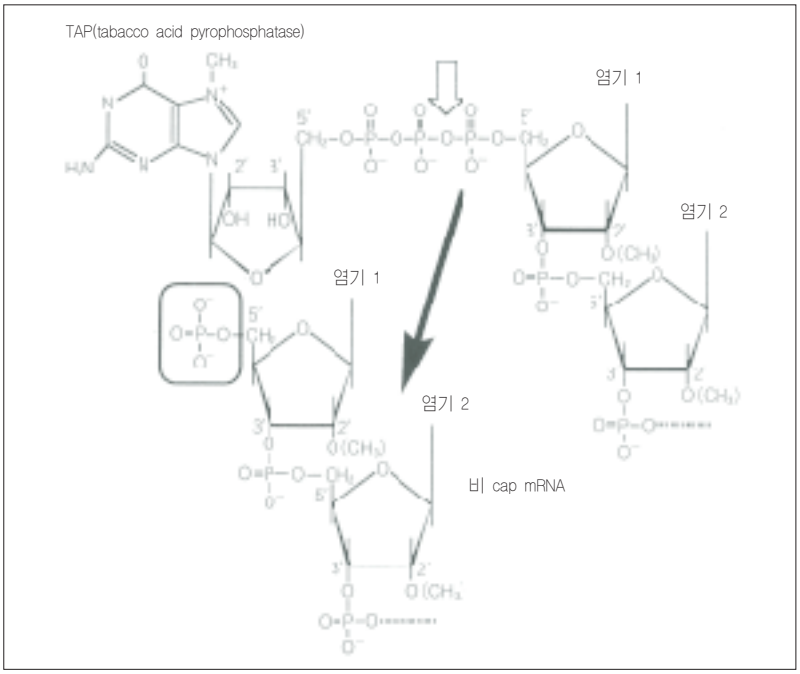


그림 1 mRNA cap 구조의 TAP에 의한 절단

III. protocol

1. BAP처리

1. 5~10 ㎍의 poly(A)$^+$ mRNA에 대하여 반응용액 100 ㎕ [1 M Tris-HCl(pH7.8) 10 ㎕, 1 M DTT 1 ㎕, RNase inhibitor(40 U/㎕) 2.7 ㎕]를 얼음 위에서 준비한다.
2. BAP(TaKaRa Code 2110, RNase free)(0.4 U/㎕) 3 ㎕를 첨가하여 37℃에서 40분간 보온한다.
3. Phenol/chloroform 추출을 2회 실시하여 BAP을 완전히 제거하고, 그 다음 TAP 처리로 완전한 mRNA의 5' 말단에서도 인산기가 제거되는 것을 막는다. 또 ethanol 침전을 한 후 70% ethanol로 세정하여 건조한다. 이때 ammonium ion은 T4 RNA ligase의 활성을 저해하므로 ligation 전의 ethanol 침전에는 ammonium acetate를 사용하지 않는다.

2. TAP 처리

1. BAP 처리한 mRNA에 대해 반응용액 100 ㎕[0.5 M sodium acetate(pH5.5) 10 ㎕, 50 mM EDTA 10 ㎕, 100 mM 2-mercaptoethanol 10 ㎕, RNase inhibitor(40 U/㎕) 2.7 ㎕]를 얼음 위에서 준비한다.
2. Tobacco 배양세포로부터 정제한 TAP(Wako, TAP HG를 사용 가능)을 사용직전에 반응용액으로 20 U/㎕까지 희석하여 그 중 2 ㎕를 첨가한 후 20℃에서 30분간 정치한다.
3. Phenol/chloroform 추출한 후 ethanol 침전하고, 70% ethanol로 세정하여 건조한다.

3. RNA Ligation

1. BAP/TAP 처리한 mRNA에 대해 반응용액 100 ㎕[0.5 M Tris-HCl(pH7.8) 10 ㎕, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM 2-mercaptoethanol 10 ㎕, 5 mM ATP 10 ㎕, capping에 이용할 RNA oligonucleotide 400 ng, RNase inhibitor (40 U/㎕) 2.5 ㎕]를 얼음 위에서 준비한다.
2. T4 RNA Ligase(TaKaRa)(50 U/㎕)를 5 ㎕ 첨가한 후 50% PEG8000 50 ㎕를 첨가하여 잘 혼합하고 20℃에서 3시간 정치한다.
3. 200 ㎕의 물을 첨가한 후 phenol/chloroform 추출하고 ethanol 침전을 한다. 단 이 때 미반응의 oligonucleotide를 제거하기 위해 높은 염농도(ammonium acetate의 최종농도는 2.5 M)에서의 ethanol 세정을 3회 반복한다.

4. 1st strand cDNA의 합성과 RNA의 제거

1. 시판하는 cDNA 합성 킷트를 사용하여 oligo dT 또는 목적 mRNA의 5' 말단 근방의 기지 염기서열을 primer로 하여 1st strand cDNA를 합성한다.
2. 반응 후 반응용액에 물을 100 ㎕가 되도록 첨가하고 phenol/chloroform 추출을 한다.
3. 0.5 M EDTA 2 ㎕를 첨가한 후 0.1 M NaOH 15 ㎕를 첨가하여 65℃에서 1시간 정치함으로써 주형 RNA를 완전히 가수분해한다.
4. 20 ㎕의 1 M Tris-HCl(pH7.8)을 첨가하여 반응을 정지하고 미반응 primer 및 분해된 RNA를 제거하기 위해 높은 염농도에서의 ethanol 침전을 2회 반복한다.

5. PCR

1. 5' 말단의 표식에 사용한 RNA oligonucleotide에 대응하는 DNA oligonucleotide를 5' 측 primer로, 그리고 기지의 염기서열에 제한효소 인식부위를 부가한 것을 3' 측 primer로 하여 1st strand cDNA의 1/20 정도에 대해 PCR을 한다. 또 그 때 5'/3' 측 primer 및 cDNA(-) 대조군을 두어 반응조건이 적당한지 검토한다.

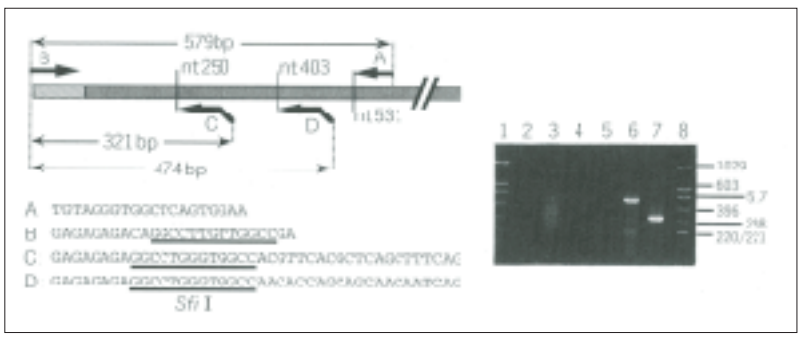


그림 4 EF1-α mRNA의 5' 말단의 증식
상세한 내용에 대해서는 본문 실험례를 참조.

IV. 실험례

Oligo Cap법을 이용하여 사람 배양세포(MDA-MB453)에서 정제한 poly(A)$^+$ mRNA의 5' 말단을 표식하고 다음으로 사람의 elongation factor 1-***α*** (EF1-***α***)의 전사개시 부위에서 하류쪽으로 531 염기 위치를 3' 말단으로 하는 oligonucleotide A를 primer로 하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 얻은 1st strand cDNA에 대해 oligo capping에 이용한 nucleotide에 대응하는 primer B와 EF-1***α***에 특이적인 2종류의 primer C 및 D와의 조합으로 PCR을 하였다. 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 예상하는 길이의 DNA 단편을 cloning하여 염기서열을 결정한 결과 21 clone 중 11 clone이 이미 보고된 것과 일치하는 전사개시점을 갖고 있고 1~6 염기가 긴 것으로 6 clone을, 2~3 염기가 짧은 것으로 3 clone을 확인하였는데 이는 전사개시점이 복수로 존재한다고 생각되며 모두가 full length mRNA에서 유래하는 clone이라 생각된다(그림 5).

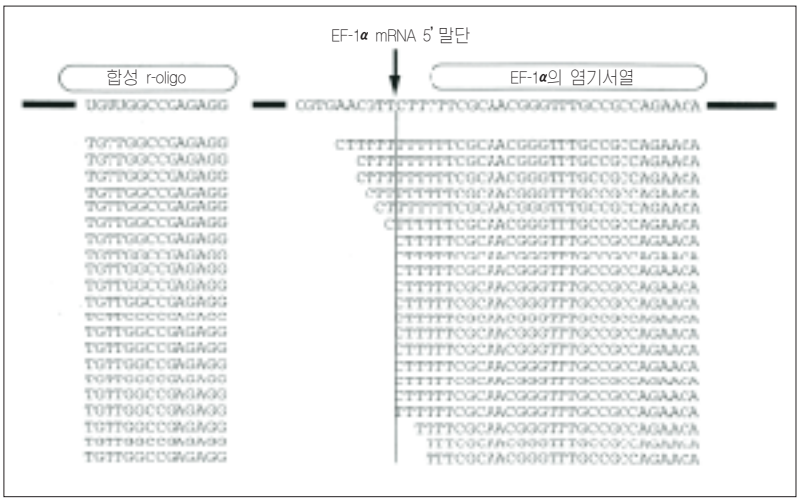


그림 5 EF-1-***α*** mRNA 5' 말단의 구조
그림 3에서 보여준 약 320 bp band를 cloning 하여 그 말단 부분의 염기서열을 결정하였다.

결론

Oligo-Cap법은 실험례에서 알 수 있는 바와 같이 단독으로 5' 말단을 고정할 수 있을 뿐만 아니라 전사개시 부위의 미세한 구조도 볼 수 있게 해 준다. 이렇게 실시한 해석으로부터 전사의 개시에 대한 새로운 지식을 얻을 수 있고 새로운 기능의 해명도 할 수 있으리라 기대한다.

'99 TaKaRa Symposium

한국 분자생물학회와 공동으로 네번째 맞는 TaKaRa Symposium을 다음과 같이 개최합니다.
많은 참여를 바랍니다.

일시 : 1999년 10월 25일 (월) 오후 3시
장소 : 서울 교육문화회관
주제 : Trends in Life Science & Biotechnology
좌장 : 변시명 교수(KAIST) 이제현 박사(보한바이오메디칼(주))

▶ Program
- 동물 복제의 최근 동향
  황우석 교수(서울대 수의대)
- 유전자 변형작물의 현황과 검사 방법
  Kato, Ikunoshin 소장(TaKaRa 바이오연구소)
- 유전자 치료의 현황 - 기초부터 임상까지
  김선영 교수(서울대 유전공학연구소)
- DNA Chip의 개발 - Cyanobacterium DNA Chip의 응용
  Asada, Kiyozo 부소장(TaKaRa 바이오연구소)

'99 TaKaRa Symposium은 한국분자생물학회 추계학술대회의 공식행사입니다.

인간유전체 프로젝트의 진행상황 및 전망

송규영
울산대학교 의과대학
kysong@www.amc.seoul.kr

▶ 인간유전체 프로젝트의 진행상황

1953년 제임스 왓슨과 프란시스 크릭에 의하여 생명체 유전의 신비를 간직한 DNA의 이중 나선구조가 밝혀진 이래 인간을 위시한 여러 생명체들의 모든 유전정보를 규명하는 것은 생명과학의 숙원이었다.

생명체가 가지고 있는 유전자를 포함한 모든 DNA를 통틀어서 유전자(gene)와 염색체(chromosome)의 합성어인 "유전체(genome)"라고 부른다. 인간의 유전체를 모두 규명하겠다는 대담한 계획이 바로 "인간유전체 프로젝트(Human Genome Project; HGP)"이다. 인간유전체 프로젝트는 1985년 미국 에너지부(Department of Energy, DOE)가 제출했던 "인간의 유전적 돌연변이를 검출하는 기술들(Technologies for Detecting Heritable Mutations in Human Beings)"라는 보고서로부터 유래하였다. 이 보고서는 대규모 예산지원을 받는 거대하고 복합적이며 획기적인 계획 없이 기존의 방법만으로는 돌연변이 측정에 한계가 있다고 지적함으로써 인간유전체 프로젝트라는 착상을 낳게 하는 계기가 된다.

1986년 에너지부는 Santa Fe에서 국제회의를 열어 인간유전체 프로젝트의 실행 가능성을 타진하였다. 그 결과 그것이 실현가능하며 생물학의 뛰어난 업적이 될 것이라는 데는 이견이 없었다. 그러나 그 프로젝트를 시행하는 것에 대한 회의론도 있었다. 인간유전체 3×10^9 bp 중 발현되는 유전자는 약 2% 정도로 예상되었는데, 그렇게 많은 돈을 투자하여 유전체의 염기서열을 모두 규명하는 것을 무모하게 여기는 학자들도 있었고, 발현되는 모든 유전자를 찾더라도 각각의 기능 연구가 상당히 어려운데 우선 그 모든 염기서열부터 규명하려는 대단위 생물학 연구를 달가워하지 않던 학자도 상당히 있었다. 그럼에도 불구하고 미국내 과학자들과 심도 있는 토론을 거친 에너지부는 1987년에 "인간유전체 계획 추진에 관한 보고서(Report on the Human Genome Initiative)"를 발표하였다. 그때 제시된 세 가지 목표는

1) 인체염색체의 정교한 물리적 지도(physical map) 작성,

2) 인간유전체 연구를 위한 제반기술 및 설비개발,

3) 정보통신망과 데이터베이스 수용량의 확장

이었다.

1988년에 미국 과학기술분석과(US Office of Technology Assessment)와 국립 연구 위원회(National Research Council)의 보고가 나왔고, 미국립보건원(NIH)은 국내의 다른 기관들과 유전체 연구를 통합조정하기 위하여 인간유전체 연구과(Office of Human Genome Research; National Human Genome Research Institute의 전신)를 개설하였다. 그 해 미국회는 1990년 10월 1일 시작하는 총 예상비용 30억 달러가 소요되는 15년 계획의 유전체 프로젝트를 승인하였다. 이 프로젝트의 주요 목표는,

1) 인체 및 소수 모델 생명체의 유전체 염기서열 규명,

2) 연구결과의 수집, 저장, 분배 및 분석 능력 개발,

3) 상기목표 달성에 필요한 제반 기술개발

등이었다.

이 프로젝트가 시작된 지 9년 째 되는 현재 이미 *E. coli*, *Helicobacter pylori*를 비롯한 20종의 미생물과 효모, 그리고 다세포 생물인 *Caenorhabditis elegans* 등 모델 생물체들의 전체 염기서열이 밝혀져 그 결과가 공공 데이터베이스에 등장하였다.

인간유전체 프로젝트도 개발된 제반기술을 바탕으로 급속히 추진되어 제 1차(1991~1995), 2차(1993~1998) 5개년 계획에서 제시된 목표들을 모두 달성하거나 초과달성하기에 이르렀다. 이미 인체염색체 24개에 대한 염색체 및 물리적 지도 작성이 완료되었으며, 제반기술들도 모두 갖추어져서 현재 이 프로젝트는 절정에 다다른 상태이다. 예를 들면 1998년까지 염기서열 해석 예상목표는 주로 다른 생물들의 유전체 8천만 bp였으나, 현재 이미 인간유전체 염기서열 1억 8천만 bp를 비롯하여 대략 그 3배에 달하는 염기서열이 데이터베이스에 등장하였다. 1998-2003년까지 제3차 5개년 계획은 민족들간의 인체 DNA염기서열의 차이가 특정 질병의 발병 및 보호에 미치는 영향, 개체 단위에서의 유전자 기능연구를 위한 신기술 및 전략 개발, 개인의 신원과 민족적 배경과 유전학의 연결, 그리고 그런 사항들의 철학적, 종교적인 의미 연구 등의 새로운 방향을 포함한다.

인간유전체 프로젝트의 급속한 변화는 1998년 5월에 미국 유전체연구소(TIGR) 소장 크레이그 벤터(J. Craig Venter) 박사와 퍼킨 엘머사(Perkin-Elmer Corporation)가 새로운 회사

를 설립하여(Celera Genomics Corporation, Web: //www.celera.com) 인간유전체 염기서열 규명을 3년 안에 완료하겠다는 담대한 계획을 발표함으로써 시작되었다. 이에 영국의 웰컴사(Wellcome Trust)도 생거연구소(Sanger Center)에 대한 지원액을 당초 계획의 두 배로 늘려서 인간유전체 중 1/3의 염기서열을 규명하겠다고 발표하였다. 그러자 미 국립 인간유전체 연구소(NHGRI)도 프로젝트 완료시기를 예정보다 2년 앞당긴 2003년으로 수정 발표하였다가, 최근에는 다시 이것을 18개월이나 앞당긴 2000년 3월까지 90%를 완료할 계획이라고 발표하였다. 새로운 계획을 위하여 전에는 유전체 염기서열을 대부분 10번씩 sequencing하던 것을 이제는 5번씩만 하여 90% 초안을 완성하고자 한다. 찬성하지 않는 연구자도 있었지만 공개적인 반대는 없었으므로 99년 Cold Spring Harbor 회의에서 인간염색체를 염기서열 센터 별로 나누는데 합의하였으며 그 내용은 다음과 같다: Baylor 대학(3, 12, X), MIT(17, 나머지 필요한 부위), 생거연구소(1, 6, 9, 10, 13, 20, 22, X), 미국 에너지부(5, 16, 19), 워싱톤대학(2, 3, 7, 11, 15, 18, Y), 프랑스(14), 독일(8, 21), 일본(8, 18, 21, 22).

인간유전체 염기서열규명 완료목표인 서기 2003년은 제임스 왓슨과 프란시스 크릭이 DNA의 이중나선구조를 발견한 50주년이 되는 해이기도 하다. 왓슨은 1989년부터 1992년까지 국립보건원의 인간유전체 프로젝트 첫 책임자로 근무하기도 했었다. 미국과 영국은 바로 그때에 맞추어 인간의 유전체 염기배열규명을 완성함으로써 그 기념비적 업적을 축하하고 역사적으로 한 획을 그으려고 서두르고 있는 것이다.

▶ 인간유전체 프로젝트 이후 전망

Functional Genomics

인간유전체 프로젝트 완료, 즉 인간유전체 전체 염기서열 결정이 완료된 후의 나아갈 길을 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 하나는 functional genomics(기능유전체학)로 유전자의 발굴 및 기능연구이고 또 다른 하나는 comparative genomics(비교 유전체학)로 인간의 표준 염기서열 결과를 바탕으로 인종, 질병의 발병, 의약품에 대한 개개인의 차이를 규명하는 것이다. Functional genomics는 유전자와 유전자 산물의 기능연구로 유전자가 발굴되어야 하는데, 임의적으로 전체 cDNA를 분리하여 염기서열을 결정하거나 중요한 유전자의 발굴을 위하여 기능이 잘못된 동물로부터 관련유전자를 분리할 수 있다. 대부분의 사람들이 인간유전체의 전체 염기서열을 얻음으로써 10만개로 추정되는 인간의 모든 유전자를 찾을 수 있을 것으로 예상하는데 실은 그렇지가 않다. 인간유전체는 다른 모델 생명체의 유전체보다 훨씬 복잡하며, 유전자로 추정되는 부분은 전체의 2% 정도에 지나지 않는데다가 거의 모든 유전자가 exon과 intron으로 이루어져 있어 genomic DNA의 염기서열 결과로부터 유전자를 발굴하는 것이 쉬운 일이 아니다. Exon trapping과 direct cDNA selection으로 유전자를 찾을 수 있고 혹은 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 유전체의 염기서열부터 유전자의 존재를 예측하는 것도 가능하나, 어떤 방법을 이용하더라도 완벽하지 않으며 설사 유전자를 찾았다 하더라도 그 유전자에서 여러 개의 전사물이 생성되는 경우 그 모든 전사물의 발굴이 어렵다. 따라서 아무리 인간유전체의 전체 염기서열을 가지고 있다고 하여도 발현되는 유전자를 찾는 cDNA 프로젝트의 도움 없이는 모든 유전자 발굴은 어려울 것으로 예상된다.

이런 이유로 미국, 일본 등 선진국은 인체의 full-length cDNA 발굴 및 염기서열 결정에 주력하고 있다. 눈부신 분자생물학 기술 발달에도 불구하고 cDNA 프로젝트의 문제점은 시료확보 및 방법에 모두 존재한다. 우선 인체 조직에서 발현되는 전사물을 얻은 후 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하기 때문에 구하기 어려운 조직이나 혹은 특정 조직에서 발생과정 중에 잠시 발현되는 유전자의 발굴은 어렵다. 게다가 cDNA 합성은 RNA 분리, 클로닝 벡터 및 고열에 안전한 역전사효소 등 여러 단계에 의존하므로 길이가 긴 전사물의 full-length cDNA 합성 효율이 낮다. 따라서 선진국에서는 현재 우선 크기가 작은 인체 cDNA 발굴 및 염기서열 결정에 주력하고 있다. 인체뿐 아니라 유전체 구조가 복잡한 동물의 유전자 발굴은 유전체 전체 염기서열에만 의존할 수 없고, 발현유전자 발굴을 목표로 하는 cDNA 프로젝트와 병행해 나아갈 것으로 예상된다. 무작위적인 cDNA 염기서열 결정 및 유전자 발굴 방법은 유전자목록을 작성하는데는 유용하나 기능연구에는 어려움이 따른다. 일부에서는 포유류 생물학의 중요한 유전자를 발굴 동정하기 위하여 쥐, 초파리, zebrafish에 화학적 돌연변이(chemical mutagenesis)와 gene trapping 기술을 이용하여 유전체 전체에 돌연변이(genome-wide saturation mutagenesis)를 일으키고 이들 돌연변이 동물의 결함 관련 유전자를 위치적 클로닝(positional cloning)하기도 한다. 현재까지 이 방법으로 진행된 가장 좋은 예는 zebrafish의 ENU를 이용한 돌연변이 양산으로 zebrafish 연구자들에게 귀중한 자료를 제공하였다. 초파리와 쥐에도 이 방법으로 돌연변이를 양산하는 일이 시도되고 있다.

모든 유전자를 얻게 되면 그 다음은 각각의 기능을 연구할 차례이다. 유전자의 기능연구는 곧 생물학 자체로 많은 노력과 시간을 요구하는데, 유전체의 기능적 연구(functional genomics)란 한 유전자의 기능연구를 지칭하는 것이 아니라 신기술과 전략을 이용한 대규모의 유전자 기능 연구를 말한다. 여러 가지 방법의 접근이 가능한데 크게 나누면 여러 상황에서 유전자의 발현양상을 DNA chip을 이용하여 대단위로 비교 분석하거나 생물체 생물학으로 인간보다 단순한 모델 생명체를 이용하여 유전자 돌연변이 혹은 소실된 생명체를 만들어 그 표현형을 분석함으로써 생명체 내에서의 유전자 기능을 연구하는 것이다. 전자는 생리적 유전체학(physiological genomics)으로 조직이나 기관의 생리학적 상태의 기능 연구로 정상과 질병상태에서의 유전자의 역할을 조사하는 것으로 예로 미국 정부의 CGAP(Cancer Genome Anatomy Project)과 BMAP(Brain Molecular Anatomy Project)을 들 수 있다. 이들 프로젝트의 두 가지 결정적인 공통 요인은 유전자 발굴과 유전자 발현양상 조사이다. 유전자 발굴(gene discovery)은 정상과 암 조직(CGAP), 성인과 발달과정의 뇌의 여러 부위에서(BMAP) 발현하는 모든 유전자의 목록을 만드는 것이 목표이다.

cDNA library 구축, 3'과 5' EST sequencing과 EST clone들을 중복되지 않는 유일한 클론으로 clustering하여 주어진 조직에서 발현되는 Unigene의 목록을 만들 수 있을 것이다. 그 다음은 유전자 발현 양상을 결정하고 발생, 전이 및 다른 병리 상태에서의 유전자 발현 윤곽(profile)의 변화를 추적하는 것이다. Laser-Capture Microscopy, cDNA microarray, 대단위 염기서열 결정 기술은 이들 프로젝트의 진행을 돕는데 모두 중요한 도구이며 기술이다. 이들 연구를 통하여 10만개에 달하는 인간유전자 각각의 기능은 상세히 알 수 없어도 화학의 주기율표와 같이 인간 유전자의 분류가 가능할 것으로 예상된다. 실제로 cDNA microarray 기술의 발전으로 효모뿐 아니라 인간의 암 진단에 이 방법을 적용하는 시도가 이미 있었고 현재 이 기술의 문제점이 해결 되는대로 이들 분류는 질병의 예후를 예측하거나 치료 방법을 선택하는데 유익한 정보를 제공할 것이다.

Comparative Genomics

인간유전체 전체 염기서열이 결정되면 또 다른 중요한 과제는 비교유전체학(comparative genomics)으로 표준 염기서열결과를 바탕으로 인종, 질병발병, 의약품에 대한 개개인의 차이를 규명하는 것이다. 유전학의 최고의 목표는 표현형이 다른 것을 DNA 상의 차이와 연결하는 것이다. 즉 사람마다 모습이 다른 것은 어떤 유전자 때문인가? 또한 각종 유전병들은 어떻게 발생하고 유전되며, 장수하는 집안과 단명하는 집안 사이의 차이점은 무엇인가? 현재까지 알려진 유전질환은 5,000여종에 이르지만, 그 중에서 관련 유전자가 분명히 밝혀진 것은 15%에 지나지 않는다. 나머지 대부분은 유전성향은 의심되지만 관련 유전자가 여러 개이거나 아직 밝혀지지 않은 질환들이다. 어째서 생명과학이 눈부시게 발달하고 있는 요즘에도 아직 그렇게 모호한 부분이 많이 남아 있을까? 그것은 생물학의 중요한 기본 개념인 중복성과 다양성을 고려하면 쉽게 이해할 수 있다.

1997년 9월에 4.6 Mb에 이르는 *E. coli*의 전체 유전체 염기서열이 밝혀졌다. 비교적 단순한 미생물인 *E. coli*는 모두 4,288개의 유전자를 갖고 있으며 그 중 38%는 그 기능이 전혀 알려지지 않았다. 유전자를 찾는 것보다 그 기능을 밝히기가 더 어려운 것이다. 어쨌든 적게는 4,000여 개의 유전자로도 생명체를 유지할 수 있는데, 무엇 때문에 인간에겐 10만 개나 되는 유전자가 필요한 것일까? 물론 단세포 생물인 박테리아에 비해서 다세포 동물인 인간에게는 세포들 사이의 관계를 형성하고 조절하는데 많은 유전자들이 필요할 것이다. 그뿐이 아니다. 고등생물에는 한가지 기능을 수행하는 유전자가 여러 개 존재하는 경우가 많이 있다(중복성). 또한 한 유전자가 여러 기능을 수행하기도 한다(다양성). 그러면 한 유전자에 이상이 생겨도 그 기능을 다른 유전자들이 떠맡게 된다. 생명체는 자연의 보이지 않는 손으로 보호받고 있는 것이다. 그러므로 대부분의 질병에 관련된 유전자가 여러 가지라는 것도 놀랄 일이 아니며, 그래서 그 유전자를 모두 발굴하는 것이 쉽지 않은 것이다.

현재까지 유전질환의 유전자를 찾는 방법은 두 가지로 기능적 클로닝(functional cloning)과 위치적 클로닝(positional cloning)이 있는데 전자는 질환 유전자의 기능을 예측하고 유전자를 발굴하는 것이고 후자는 질환 유전자에 관한 정보가 전혀 없이 전 염색체에 존재하고 멘델유전 하는 개인 구별이 가능할 정도로 다양성을 가진 지표(polymorphic marker)를 이용하여 관련 유전자의 대략의 위치를 찾고 그 부위에 존재하는 여러 유전자를 각각 분리한 후 돌연변이 여부를 분석 조사하여 질병 유전자를 찾는 것이다. 실제로 현재까지 발굴된 유전질환 유전자는 대개 위치적 클로닝 방법을 이용하였고 따라서 유전자가 발굴되었더라도 그 기능에 관한 정보가 없는 것이 단점이었다. 위치적 클로닝에 사용한 지표(maker)를 유전적지표(genetic marker)라하고 이들의 위치를 보여주는 지도를 유전적지도(genetic map)하는데 현재 가장 최근에 발표된 지도(Dib *et al.*, 1996)는 5,264개의 microsatellite 지표를 이용하였으며 평균 간격은 1.6 cM으로 상당히 자세한 것이었다. 그러나 microsatellite 지표는 특정부위에 존재하는 두 개 염기의 반복수의 다양성으로 개인을 구별하는 것으로, 그 빈도 및 안정성에 대한 정보가 부족할 뿐 아니라 시료 DNA를 각 지표로 PCR하고 그 산물의 크기를 비교 분석하여 개인을 구별한다.

최근에 DNA chip 기술이 개발되어 이를 이용한 돌연변이 genotyping과 다양성 발굴이 가능한데, 유전자 발현을 조사하는 cDNA microarray와는 달리 genotyping chip이라 한다. 원리는 cDNA microarray와 유사하게 핵산의 hybridization에 의존하며 다양성 발굴에 이용되는 genotyping chip은 1.28 cm^2 단위 면적에 25 mer 크기의 oligonucleotide를 고밀도(400,000개)로 놓고 분석할 유전체의 DNA로 hybridization하여 염기서열 변이를 발굴한다. 고등동물 유전체의 복합성 때문에 cDNA와는 hybridization 역학이 달라, 유전체 DNA를 그대로 이용하려면 보다 나은 기술의 발전이 요구된다(Lander, E., 1999). 더우기 반복되는 두 염기의 수가 다른 microsatellite marker를 chip에 얹어 분석할 수 없으므로 DNA chip이 개발된 이후 단일염기 다형성에 관심이 모아지고 있다. 염기서열 변이는 모든 유전체에 존재하는데 인간유전체에서 가장 흔히 발견되는 다형성(polymorphism)은 단일염기 다형성으로 single-nucleotide polymorphisms(SNPs)이라고 불리운다. SNP는 1,000 b마다 하나씩 발견되는데 그 빈도가 높고 안정하며 유전체 전체에 골고루 잘 분포되어 있어 자동화로 대단위 발굴이 가능하다. SNP는 발현되는 유전자 뿐 아니라 유전자가 아닌 부위에도 존재하는데, 유전자의 SNP을 cSNP(coding SNP)이라 한다. 유전자의 cSNP를 기능과 관련지을 수 있다면 훨씬 더 유용하지만 유전자에 따라 SNP의 수가 몇에서 몇백 개까지 존재하기도 하고, 변이에 따라 단백질산물 기능에 영향을 미치는 것과 아닌 것이 있으므로 그 구별이 어렵다. 인간 유전자 약 200개 cSNP 발굴 논문에 의하면 cSNP를 이용하는 일이 만만치 않을 것으로 밝혀지고 있다(Cargill *et al.*, 1999; Halushka *et al.*, 1999). 또한 유전자는 진화적으로 selection pressure를 견딘 만큼 cSNP 발굴보다는 전체 유전체에 일정간격으로 존재하는 SNP를 발굴하여 더욱 촘촘한 지도를 작성하면 인간 유전체에서 개개인의 차이(variation)를 발견하기 위한 유용한 단일 염기차원의 유전적 지표로써 genome-wide association study에 이용되어, 복합 형질인 암, 당뇨, 정신질환등 질병 관련 유전자 발굴에 사용될 뿐 아니라 학제간 연구를 통하여 유전적 변이와 의약품에 대한 개

개인의 차이를 예견하는데도 사용될 것으로 예상된다. 이 분야의 선두주자는 미국 MIT의 Whitehead 연구소의 Eric Lander박사 팀으로 이미 인간 유전체 전체에 3,000여 개의 SNP를 발굴하고 2,000여 개의 SNP 지표로 이루어진 유전적 지도도 작성 발표하였다(Wang *et al*, 1998). 일찌기 DNA 염기서열 변이에 관한 정보가 질병의 분석, 진단, 치료 및 예방 등 다양한 분야에 이용될 수 있는 잠재력을 인지한 미국립보건원은 98년부터 3년간 100,000개의 SNP발굴을 목표로 3,000만 달러를 투자하였고, 99년 4월에는 전세계 유수 제약회사 10개가 SNP Consortium(TSC)을 구성하여 다음 2년간 300,000개의 SNP 데이터베이스 구축을 시도하고 있다.

인간 유전체 염기서열 결정의 완성을 앞두고 그 결과가 가져올 파급효과를 몇 가지로 나누어 예측해보고자 한다. 첫째, 유전자에 이상이 생겨서 발생하며 자손에게 유전되는 유전질환들의 경우, 유전자 검색을 통하여 이상 유전자의 보유여부를 미리 알아내어 자손에게 나타날 수 있는 유전병의 발생빈도를 줄일 수 있게 될 것이다. 또한 태아와 신생아의 유전자 검색을 통하여 초기에 유전자 이상 여부를 조사하여 가능한 한 유전병을 예방하고 장래에 일어날 상황에 미리 대비할 수 있다. 뿐만 아니라 유전 성향이 있는 것으로 보이는 질환들도 그 보인자를 검색하여 발생 빈도를 줄일 수 있다. 현재까지 알려진 5,000여 가지의 유전질환 중 검색 가능한 유전질환의 수는 아직 100가지를 넘지 않지만, 인간 유전체 프로젝트가 완료되면 검색 가능한 질환의 숫자는 기하급수적으로 늘어날 것으로 기대된다. 같은 기능을 수행하는 유전자들이 다수인 경우(이런 현상을 유전자의 중복성이라고 부른다)가 종종 있는데, 그럴 때에는 관련 유전자만으로는 질병의 발병시기와 증상을 예측하는 것이 불가능하다. 이럴 때 모든 유전자의 성향을 살펴보는 전체 유전체 분석이 가능할 것이다. 둘째로 프로젝트가 완료되면 인간의 표준 염기서열 결과를 바탕으로 인종, 질병발병, 의약품에 대한 개개인의 차이를 규명하는 것이 가능해 질 것이다. 셋째로 21세기는 유전체 서열연구에 이어 본격적으로 유전체 기능연구가 활발해져서 의료 및 산업분야 응용에 기여할 것이다. 인간유전체 프로젝트가 완료되면 신기술과 새로운 정보를 접목한 대단위 유전자 검색이 가능하게 되어, 머지않아 사람마다 각각 유전자 신분증을 소지하며, 그것을 바탕으로 배우자도 앞으로 태어날 아이가 유전병의 영향을 받지 않도록 선택할 수 있게 될 것이다.

송 규 영
이학박사
울산대학교 의과대학 생화학교실 부교수

1975~1979 연세대학교 생물학과
1979~1981 연세대학교 대학원 생물학과(석사)
1983~1987 미국 일리노이 주립대학교 의과대학 유전학과(이학박사)
1987~1988 Postdoc. 미국 일리노이 주립대학교 유전학과
Postdoc. EMBL(European Molecular Biology Loboratory) 하이델베르그, 독일
1989~1990 연구원, 서울대학교 의과대학 암연구소
현재 울산대학교 의과대학 생화학교실 부교수

종합 고객지원 서비스 Bio21

Bio21은 당사가 제공하고 있는 모든 고객지원 활동의 총칭입니다.

새로운 천년 21세기는 생명과학의 시대가 될 것입니다.

당사의 기술지원과 고객서비스를 생명과학의 세기를 상징하는 Bio21로 명명하여 수준 높은 토탈 서비스를 통해 연구자 여러분과 함께 생명과학의 시대를 선도하고자 합니다.

Bio21을 통하여 신제품 정보, 각종 행사 안내, 최신 바이오 뉴스, 기술 정보지 Life Science & Biotechnology 발행, 각종 기술자료 및 기술지원 서비스 등 고객의 불편하고 가려운 곳을 적극적으로 찾아서 해결하고자 합니다.

Bio21 주요 사업내용

Home Page에 의한 정보검색
Bio21 클럽 운영 및 E-Mail 정보제공 서비스
기술지원서비스
TaKaRa Symposium 개최
Technical WorkShop 개최
기술자료 및 판촉자료 제작 보급
학회 학술활동 지원

본 서비스는 철저한 회원제로 무료 제공합니다. 당사 홈페이지(www.bohan.co.kr)에 접속하여 Bio21 회원에 가입하시면 즉시 혜택을 받으실 수 있습니다.

당사의 축적된 정보들을 연구자 여러분들이 쉽게 접할 수 있도록 지금도 다양한 방법들을 고안 중이며 이를 홈페이지나 e-mail 등의 매체를 통해 꾸준히 나누어 드릴 것입니다.

SCDase(Sphingolipid ceramide *N*-deacylase)를 이용한 2층계에 의한 lysosphingolipid의 고효율 생산

SCDase(Sphingolipid ceramide *N*-deacylase) TaKaRa Code 4462 250 mU

● 서론

최근 sphingolipid는 세포분화나 apoptosis의 신호전달에 관여하는 등 다양한 기능을 가진 분자로서 주목받고 있다. 이 sphingolipid로부터 지방산을 분리한 것을 lysosphingolipid(lyso체)라 하는데 sphingolipid의 lyso체는 그 자신의 생리활성 연구 뿐만 아니라 lyso체가 가지는 유리 아미노산을 이용하여 sphingolipid의 표식화, 고정화 등을 할 수 있고, 수식 sphingolipid의 원료로서도 대단히 유용하다. Lyso체의 생산을 SCDase의 가수분해 반응을 통해 부산물 없이 간편하게 실시할 수 있다. 그러나 종래의 방법에서는 SCDase 자신이 강한 역반응 활성을 가지기 때문에 높은 수율의 lyso체를 조제하기가 곤란하였다. 여기에서는 유기용매-물의 2층계로 sphingolipid를 가수분해함으로써 lyso체를 높은 효율로 생산하는 방법을 소개한다.

● 방법

SCDase는 각종 sphingolipid를 특이적으로 가수분해하여 그 lyso체와 지방산을 생성한다. 게다가 SCDase는 lyso체와 지방산으로부터 sphingolipid를 생성하는 가수분해의 역반응 및 sphingolipid의 지방산을 교환하는 반응을 높은 효율로 매개한다(그림 1)[1~4].

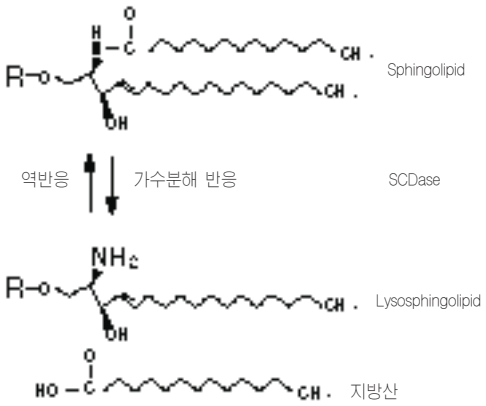


그림 1 SCDase의 반응

가수분해 반응에 특정 유기용매를 첨가하면 수층으로부터 지방산을 제거하는 역반응이 억제되므로 lyso체의 효율을 상승시킬 수 있다. Small scale 및 large scale에 있어서 이 2층계의 실제 조작과 주의점을 각각 그림 2 및 그림 3에 나타내었다.

2층계로 사용할 수 있는 유기용매는 몇 가지 존재하나 반응촉진 효율이 높고 비활성 형태로 사용하기 쉬운 지방족 탄화수소를 권장한다. 이 경우 용매의 탄소수가 많을 수록 기질의 가수분해 효율은 높아진다.

용매	분해율(%)
n-decane	95
n-dodecane	95
n-pentadecane	97
n-heptadecane	97
n-octadecane	97

(GM1을 기질로 사용할 때, small scale로 반응을 한 경우)

그러나 탄소수가 많을 수록 융점 및 비점이 상승해 반응종료후의 취급이 곤란해 진다. 통상은 *n*-decane을 사용하는 것이 편리하다. 유기용매로서 *n*-decane을 이용한 경우에서 각종 기질의 분해율은 아래와 같다(그림 2의 *2조건하에서).

기질	분해율(%)
Gal-Cer	82
Sulfatide	93
GM1	96
GM3	97
GD1a	95
GT1b	71
Asialo・GM1	93
Sphingomyelin	48

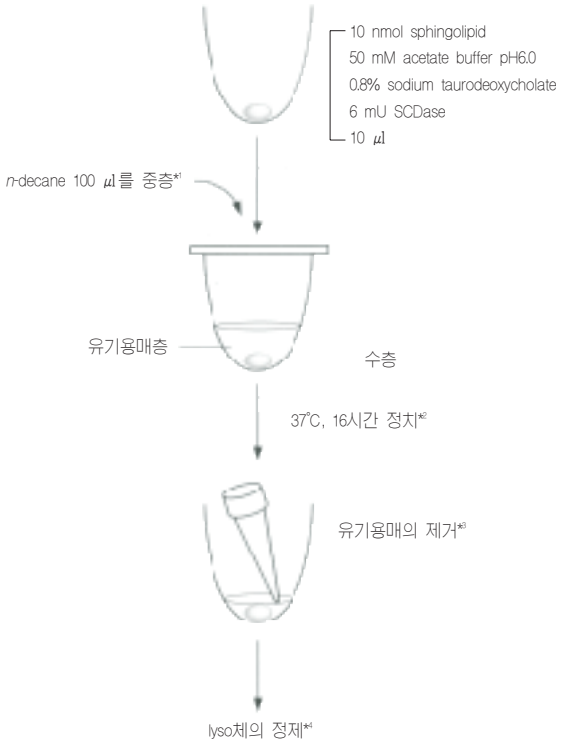


그림 2 Small scale에서의 각종 sphingolipid의 가수분해
*1~4 : 본문 참조

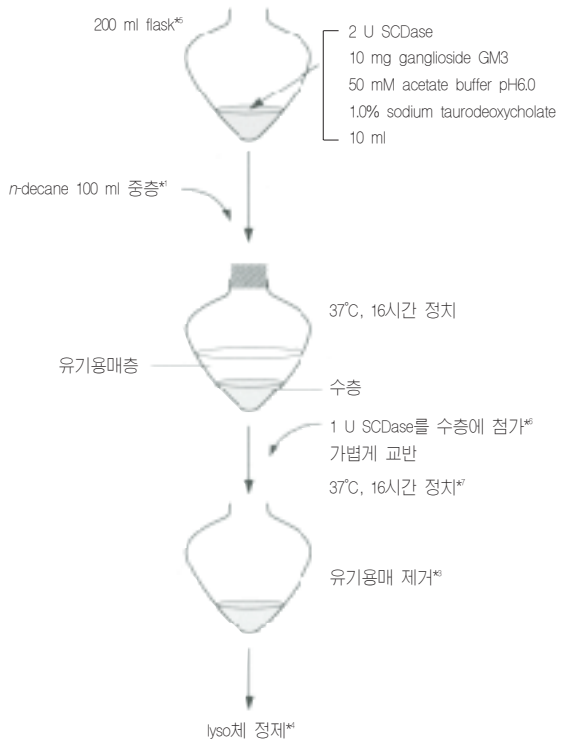


그림 3 Large scale에서의 ganglioside GM3의 가수분해
*1~4 : 본문 참조
*5 : 반응용기로 유리 용기를 사용하는 경우는 미리 silicon을 처리하는 것이 좋다. 표면 처리하지 않은 것을 사용하면 lyso체의 회수율이 급격히 저하되는 경우가 있다.
*6 : 16시간 반응 후 반응액의 일부를 취해 가수분해 반응의 진행 여부를 확인한다. 미반응물이 많은 경우 SCDase를 추가하여 회수율을 높일 수 있다.
*7 : 가수분해율 95%(GM3을 기질로 한 경우)

유기용매를 제거(그림 2, 3의 *3)하는 방법은 사용하는 유기용매의 성질에 따라 다소 차이가 난다. *n*-decane을 이용한 경우에서는 pipette 등으로 가능한 한 제거하여 감압농축함으로써 완전히 제거할 수 있다. *n*-decane처럼 탄소수가 많은 것은 실온에서는 고형화를 위한 감압농축이 곤란하다. 이러한 용매를 이용한 경우는 pipette 등으로 가능한 한 제거하여 *n*-decane이나 chloroform과 같은 휘발성의 용매로 세정한 후에 감압농축함으로써 제거할 수 있다. 이 때 lyso체가 세정용매로 옮겨지지는 않는지 확인할 필요가 있다. 얻은 lyso체의 정제(그림 2, 3의 *4)는 TLC나 reverse chromatography로 할 수 있다.

● 결론

SCDase를 이용한 유기용매-물 2층계에서의 sphingolipid의 가수분해로 간단하게 lyso체를 제작할 수 있다. 특히, 화학적 가수분해로는 얻을 수 없었던 poly-sialoganglioside의 lyso체나 천연형과 동일한 sphingosine 구조(D-erythro)를 가진 lysosphingomyelin도 소량에서 대량에 이르기까지 제작할 수 있다. 얻은 lyso체는 SCDase의 역반응을 이용한 RI 표식을 비롯하여 다양한 용도로 이용할 수 있다(그림 4).

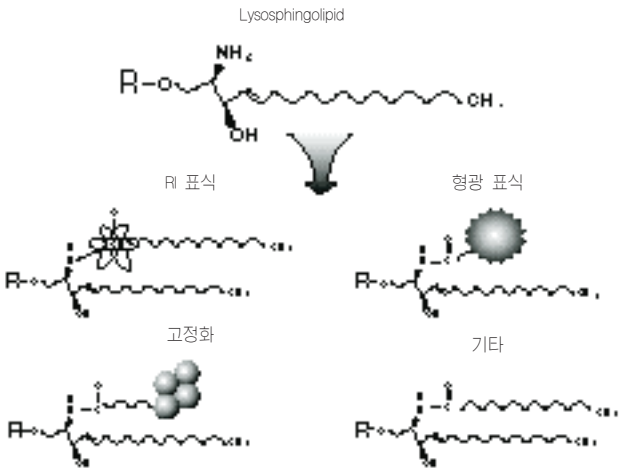


그림 4 Lyso체의 용도

참고문헌

1) Ito M., Kurita T., and Kita K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24370-24374.
2) Sueyoshi N., Izu H., and Ito M. (1997) *J. Lipid Res.* **38**, 1923-1927.
3) Mitsutake S., Kita K., Okino N., and Ito M. (1997) *Anal. Biochem.* **247**, 52-57.
4) BIO VIEW **24**, 31-32.

▶ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Lyso-GM1	4351	1 mg
Lyso-GM2	4352	0.1 mg
Lyso-GM3	4353	0.1 mg
Lyso-GD1a	4354	0.1 mg

효모 세포벽 용해효소 Westase™를 이용한 각종 효모 protoplast의 조제

Westase™(효모세포벽 용해효소) TaKaRa Code 9005 1 g

본 제품은 大蓮주식회사에서 제조한 것입니다.

효모세포벽 용해효소 Westase™(TaKaRa Code 9005)는 *Streptomyces rochei* DB-34의 배양액 상청에서 조제한 것으로 β-1, 6 glucanase 및 β-1, 3 glucanase 활성을 주로 갖는 복합효소제이다. 본 효소는 다양한 효모의 protoplast 조제에 유용하다. Westase™를 이용하면 *Saccharomyces cerevisiae* 등의 자낭균 효모 뿐만 아니라 종래의 Zymolase 처리만으로는 protoplast를 조제할 수 없는 분열효모 *S. pombe*나, 거의 protoplast 조제가 불가능한 *Ustilago maydis*, *Phaffia rhodozyma*, *Cryptococcus albidus* 등의 담자균 효모나 불완전 효모에도 작용하여 대부분의 경우 효율적으로 protplast를 만들 수 있다. 여기서는 Westase™에 의한 각종 효모의 protplast 형성률(표 1)과 기본적인 조제조건(표 2)을 중점적으로 소개한다.

참고문헌

1) Yoshida, *et al.* (1997) *생물공학*, **75**, 229-238.
2) Nishi, *et al.* (1999) *생물공학*, **77**, 60-65.
3) Kumaya, *et al.* (1999) *생물공학*, **77**, 137-146.

표 1 각종 효모에 대한 protoplast 형성률 (Westase™와 Zymolase의 비교)

균주	protoplast 형성률(%)	
	Westase™	Zymolase
Schizosaccharomyces pombe IFO 0351	○	△
Saccharomyces cerevisiae X2180-1A	○	○
Zygosaccharomyces rouxii IFO 1130	×	○
Hansenula mrakii RIB 5226	○	○
Kluyveromyces lactis IFO 0433	○	○
Pichia anomala IFO 10213	○	○
Lipomyces starkeyi IFO 10381	○	△
Filobasidium floriforme IFO 1915	○	×
Ustilago maydis IFO 5346	○	×
Rhodosporidium toruloides IFO 10512	×	×
Tremella mesenterica IFO 9310	○	×
Graphiola phoenicis IFO 9100	○	×
Sporobolomyces roseus IFO 1105	×	×
Brettanomyces bruxellensis IFO 0797	○	○
Candida colliculosa IFO 0663	○	○
Candida tropicalis IFO 1400	△	○
Candida utilis IFO 0639	○	○
Kloeckera apiculata IFO 0865	○	○
Rhodotorula glutinis IFO 1125	×	×
Trigonopsis variabilis IFO 0755	○	○
Cryptococcus albidus IFO 0612	○	×
Phaffia rhodozyma IFO 10129	○	×

protoplast 형성률 ○ : 80% 이상 △ : 50% 이상 × : 0%

표 2 Protoplast 조제 조건의 예

균주	배지	배지조건	Protoplast 조제 조건
Saccharomyces cerevisiae *Trigonopsis viriabilis*	YPG	25℃, 1 day Shake culture(reciprocate at 120 rpm)	0.5% Westase solution, 0.5 M Na-tartrate, McIlvain buffer(pH6.0), 30℃, Reciprocal shaking, 1-2 hr
Lipomyces starkeyi *Candida utilis*	YPG	25℃, 1 day Shake culture(reciprocate at 120 rpm)	0.5% Westase solution, 0.4 M Na-tartrate, McIlvain buffer(pH6.0), 30℃, Reciprocal shaking, 1-2 hr
Schizosaccharomyces pombe *Hansenula mrakii* *Kluyveromyces lactis* *Pichia anomala* *Filobasidium floriforme* *Candida colliculosa*	YPG	25℃, 1 day Shake culture(reciprocate at 120 rpm)	0.5% Westase solution, 0.4 M Na-tartrate, McIlvain buffer(pH6.0), 30℃, Reciprocal shaking, 3-4 hr
Kloeckera apiculata *Cryptococcus albidus*	YPG	25℃, 1 day Shake culture(reciprocate at 120 rpm)	0.5% Westase solution, 0.3 M Na-tartrate, McIlvain buffer(pH6.0), 30℃, Reciprocal shaking, 1-2 hr
Ustilago maydis *Graphiola phoenicis* *Brettanomyces bruxellensis* *Phaffia rhodozyma*	YPG	25℃, 2 day Shake culture(reciprocate at 120 rpm)	0.5% Westase solution, 0.5 M Na-tartrate, McIlvain buffer(pH6.0), 30℃, Reciprocal shaking, 1-2 hr
Tremella mesenterica	YPG	25℃, 2 day Shake culture(reciprocate at 120 rpm)	0.5% Westase solution, 0.4 M Na-tartrate, McIlvain buffer(pH6.0), 30℃, Reciprocal shaking, 1-2 hr

YPG : 0.5% yeast extract, 1.0% polypeptone, 1.0% glucose, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH5.5 McIlvain buffer(pH6.0) : 0.1 M citrate 용액과 0.2 M 인산수소나트륨 용액을 적당한 비율(36.8 : 63.2)로 혼합하고 pH6.0으로 조정한다.

NEW

Insert Check PCR Mix

One Shot Insert Check PCR Mix — TaKaRa Code RR010A
PerfectShot™ Insert Check PCR Mix(dye 첨가) — TaKaRa Code RR020A

Insert의 확인이 빠른 Premix PCR 반응액!!

DNA 단편을 plasmid(또는 phage)에 subcloning할 때 번거로운 점이 있다면 얻은 clone에 목적 DNA 단편이 삽입되어 있는지를 확인하는 것(insert check)인데 최근에는 일반적으로 PCR을 이용한다. 이 방법에서는 plasmid(또는 phage) vector의 multi-cloning site 양 말단에 상보적인 내부 primer를 이용하여 PCR을 수행하고, 그 산물을 전기영동함으로써 확인한다. Insert가 삽입되어 있는 경우는 insert multi-cloning site에 해당하는 길이의 DNA가 증폭되고, insert가 들어있지 않는 경우는 multi-cloning site 부분만이 증폭된다. 본 킷트는 M13 primer를 함유한 premix type의 PCR 반응액(전용 buffer와 필요한 시약을 모두 포함)을 0.2 ml PCR tube에 각각 분주한 것으로 주형 DNA를 첨가하여 PCR을 고속으로 수행함으로써 insert의 확인을 보다 신속하게 할 수 있다. 또한 색소(dye)가 첨가된 제품도 있으므로 PCR 종료 후 전기영동에 그대로 사용함으로써 보다 신속하게 확인할 수 있다.

● 특징

- 전용 buffer(Insert Check PCR Buffer)의 채용으로 보다 빠른 속도로 PCR할 수 있다.
- 2× One Shot Insert Check PCR Mix(2× PerfectShot™ Insert Check PCR Mix)에는 DNA Polymerase, dNTPs, Primer, Buffer가 들어 있어 주형을 첨가하고 fill up하는 것만으로 간단하게 PCR 할 수 있다.
- Primer로서 널리 쓰이는 M13 primer가 각각 들어 있어 pUC, pBluescript®, pT7Blue, pGEM®, λZAP® Ⅱ 등을 사용할 수 있다.
- 2× PCR Mix를 0.2 ml PCR tube에 분주해 놓아 다수의 시료를 처리하는 경우에 편리하고 cross contamination의 위험성도 감소한다.
- PerfectShot™ Insert Check PCR Mix에는 전기영동용 loading dye가 들어 있어 PCR 종료후 바로 전기영동 할 수 있다.
- 신장반응(extension)에 걸리는 시간은 약 10초/kb이므로 1 kbp 이하의 insert인 경우는 25～40분(thermal cycler의 기종에 따라 다름), 8 kbp의 경우에도 약 1～1.5시간이라는 아주 짧은 시간에 PCR을 종료할 수 있다.

● 내용

One Shot Insert Check PCR Mix (TaKaRa Code RR010A)
2× One Shot Insert Check PCR Mix : 25 μl × 48개

PerfectShot™ Insert Check PCR Mix (TaKaRa Code RR020A)
2× PerfectShot™ Insert Check PCR Mix : 25 μl × 48개
(색소 maker : Orange G/Bromophenol Blue)

(PerfectShot™ Insert Check PCR Mix를 사용하면 DNA 증폭 후 반응액을 그대로 전기영동 gel에 loading할 수 있다.)

● 보존

수송, 보존시 -20℃

● 방법예 1: *E. coli* plasmid의 insert check

(A) 균체현탁액을 반응액에 첨가하는 경우

1) 1.5 ml tube에 100 μl의 멸균수를 넣어 둔다.
2) 이쑤시개 또는 tip으로 colony를 가볍게 찌르고, 묻은 균체를 1)의 멸균수에 현탁한다.
3) 융해시킨 2× PCR Mix*에 2)의 균체현탁액을 1～10 μl 첨가한다.
4) 최종량이 50 μl가 되도록 3)의 반응액에 멸균수를 첨가한다.
5) 바로 PCR 반응을 수행한다.
6) 반응후 각 PCR 반응액의 일부를 전기영동한다.

[Dye가 첨가된 type(PerfectShot™ Insert Check PCR Mix)의 경우는 loading dye를 첨가하지 않고 PCR 반응액을 그대로 전기영동한다]

* 2× PCR Mix : 2× One Shot Insert Check PCR Mix 또는
2× PerfectShot™ Insert Check PCR Mix

⑻ 균체를 반응액에 직접 첨가하는 경우

1) 융해한 2× PCR Mix에 25 μl의 멸균수를 첨가한다.
2) 이쑤시개 또는 tip으로 colony를 가볍게 찔러, 묻은 균체를 1)의 반응액에 현탁한다.
3) (A)의 step 5), 6)을 실시한다.

[주의: 균체성분에 의한 PCR 저해를 최소화 하기 위하여 colony는 가볍게 취한다. 또한 이쑤시개를 오랫동안 반응액에 담가두면 반응액이 흡수되어 균체내의 protease 등에 의한 영향을 받을 수도 있으므로 현탁 후에는 바로 이쑤시개를 제거하고 반응을 시작한다.]

● 방법예 2: Phage의 insert 확인

1) 1.5 ml tube에 100 μl의 MS buffer를 넣어 둔다.
2) Tip으로 plaque를 취한 후, 1)의 SM buffer에 현탁한다.
3) 융해한 2× PCR Mix에 2)의 phage 현탁액을 1 μl 첨가한다(주의: 이때 agar가 반응액에 혼입하지 않도록 한다).
4) 최종량이 50 μl가 되도록 3)의 반응액에 멸균수를 첨가한다.
5) 바로 PCR 반응을 실시한다.
6) 반응후 각 PCR 반응액의 일부를 전기영동한다.

[Dye가 첨가된 제품(PerfectShot™ Insert Check PCR Mix)인 경우는 loading dye를 첨가하지 않고 PCR 반응액을 그대로 전기영동한다.]

● PCR 조건

최적 parameter를 설정한다(반응액 50 μl)

98℃,	1(~5)초*	25~30 cycles
55℃,	1~10초	
72℃,	X초	

X : 증폭 크기에 따라 조절. 10초/kb가 적당(1 kbp 이하의 경우는 1초).
* : 변성시간

TaKaRa PCR Thermal Cycler MP의 경우	1초
TaKaRa PCR Thermal Cycler SP(NORMAL MODE)의 경우	1초
GeneAmp® PCR System 9600의 경우	1초
TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL(FAST MODE)의 경우	5초

PCR 조건의 예:

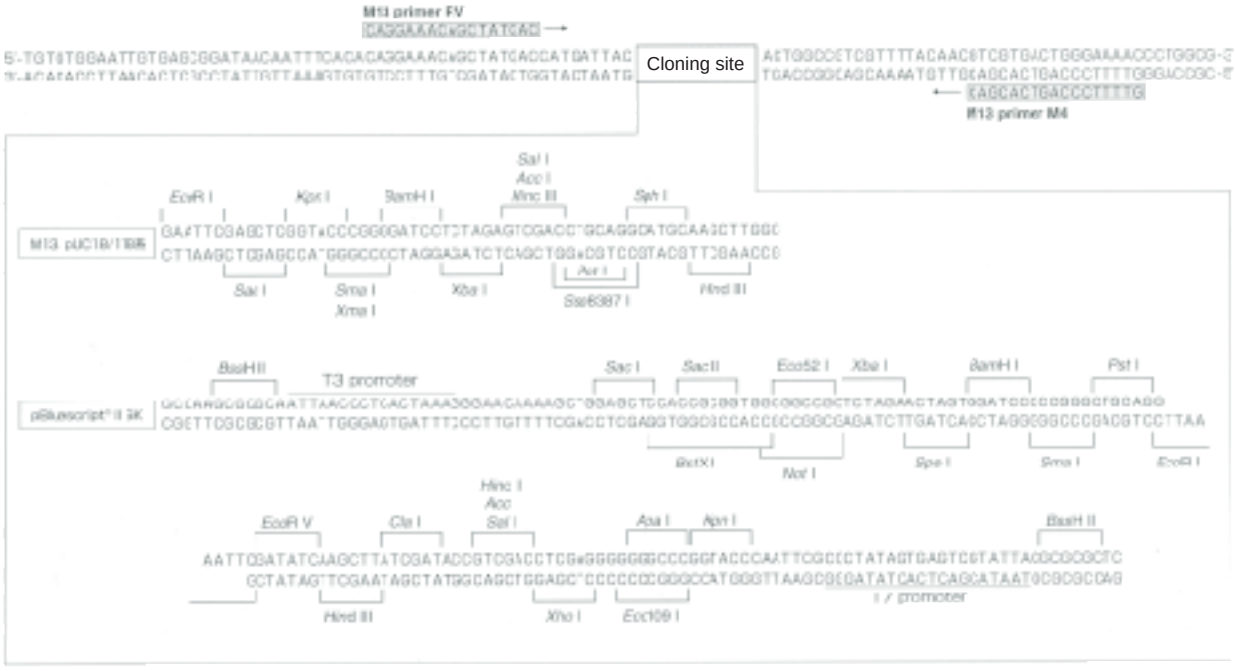
[1 kbp]	98℃, 1초	25 cycles
	55℃, 1초	
	72℃, 1초	
[4 kbp]	98℃, 1초	25 cycles
	55℃, 1초	
	72℃, 40초	
[8 kbp]	98℃, 1초	25 cycles
	55℃, 1초	
	72℃, 80초	

TaKaRa PCR Thermal Cycler MP 사용

● 각 vector의 Insert가 없는 경우 PCR 산물의 크기

Vector	크기(bp) M4/RV
M13mp계, pUC18/118 계	123 bp
pBluescript® II계	249 bp
pT7Blue	174 bp
pT7Blue-2	390 bp
pT7Blue-3	234 bp
pGEM®-11zf(-)	204 bp
λZAP® II	249 bp

● Multi-cloning site 주위의 염기서열과 primer 서열 M13mp계, pUC18/118계, pBluescript® II계



● 실험예 : *E. coli* colony의 insert 확인

1 kbp, 4 kbp, 8 kbp 단편을 삽입한 pUC계 vector를 가지고 있는 *E. coli* colony의 insert를 확인하였다.

[주형]

상기의 *E. coli* colony를 이쑤시개로 가볍게 찔러 묻은 균체를 100 μl의 멸균수에 현탁하고, 이 현탁액 1 μl를 주형으로 사용한다[방법예 1의 (A) 참조].

[반응액]

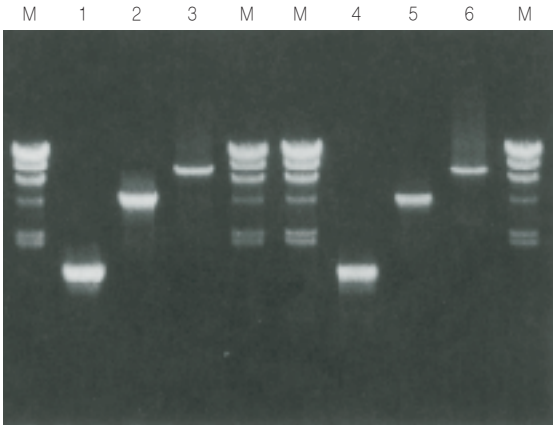
2× PCR Mix	25 μl
주형	1 μl
dH_2O	up to 50 μl

[PCR 조건]

98℃, 1초
55℃, 5초
72℃, X초
] 25 cycles

X: 1 kbp 1초
4 kbp 40초
8 kbp 80초

[TaKaRa PCR Thermal Cycler MP 사용]



그림

Lane	용액	크기
M	: λ-*Hin*d III digest(TaKaRa Code 3403)	
1	: One Shot Insert Check	1 kbp
2	: One Shot Insert Check	4 kbp
3	: One Shot Insert Check	8 kbp
4	: PerfectShot™ Insert Check	1 kbp
5	: PerfectShot™ Insert Check	4 kbp
6	: PerfectShot™ Insert Check	8 kbp

5 μl/50 μl loading
1% agarose gel(Agarose LO3 「TAKARA」: TaKaRa Code 5003)

● Trouble Shooting

[전혀 증폭이 되지 않거나 증폭효율이 낮다]

예상 원인	대응
신장시간이 짧다	10~20초/kb로 설정
Annealing 온도가 높다	2℃씩 낮춘다
증폭단편의 GC함량이 높거나, 2차구조가 강하게 형성되었다	변성온도를 높이거나 변성시간을 늘린다
변성조건이 부적당	98℃에서 1~10초 또는 94℃에서 10~30초
주형량이 적다	주형량을 늘린다
주형량(균체, 배지의 혼입)이 많다	균체, 배지의 혼입량을 줄인다
Cycle 수가 적다	~35 cycles로 설정한다

[목적외의 밴드가 나타난다]

예상 원인	대응
Annealing 온도가 낮다	2℃씩 높인다
주형량(균체, 배지의 혼입)이 많다	균체, 배지의 혼입량을 줄인다

[Smear로 나타난다]

예상 원인	대응
신장시간(extension time)이 길다	~10초/kb로 설정한다(1 kbp 이하의 경우는 1초)
Cycle 수가 많다	~25 cycles로 설정한다
주형량(균체, 배지의 혼입)이 많다	균체, 배지의 혼입량을 줄인다

NEW

Differential Display Kit Series

TaKaRa는 Differential Display법을 이용하여 다양한 조건의 세포에서 발현량의 차이를 보이는 유전자를 고효율로 탐색하기 위하여 아래의 제품을 공급한다. 이번에 형광 및 RI용 Differential Display Kit을 TaKaRa가 직접 제작하게 되어 일부 변경된 내용을 소개하고자 한다.

● 형광검출용

Fluorescence Differential Display Kit

Fluorescence Differential Display Kit Fluorescein version
TaKaRa Code 6625 1 Kit

Fluorescence Differential Display Kit Rhodamine version
TaKaRa Code 6626 1 Kit

▶ 내용

형광 Downstream primer(9종류) (5' 말단이 형광표식되고 3' 말단의 anchor 서열로 2염기를 가진 Oligo(dT) primer)	각 10 μM	각 120 μl
Upstream primer(24종류)	각 2 μM	각 500 μl
비표식 cloning primer	20 μM	120 μl

본 제품은 5' 말단을 형광표식한 하류 primer와 image analyzer를 이용하여 non-RI 조건에서 DD법을 수행하기 위한 킷트이다. 방사성 동위원소를 이용하여 검출하는 종래의 DD법에서의 문제점인 primer의 misannealing에 의한 background (genome DNA와 ribosmal RNA 유래 단편에서 기인)를 가능한 한 감소하도록 특별히 설계한 primer를 사용한다.

본 제품을 이용한 DD법에는 Enzyme Set-FDD(TaKaRa Code R025A/C) 및 형광 image analyzer가 필요하다.

최적 반응을 수행하기 위한
Fluorescence Differential Display Kit용 효소셋트

Enzyme Set-FDD

TaKaRa Code R025A 1 Set
TaKaRa Code R025C 3 Sets

고효율로 재증폭한 후 Direct Sequencing하기 위한

Cloning-Sequencing Primer Set for FDD

TaKaRa Code 6622 1 Set

● RI검출용

Differential Display Kit(for RI)

TaKaRa Code 6624 1 Kit

▶ 내용

Upstream primers(24종류)	각 2 μM	500 μl
Downstream primers(9종류)	각 25 μM	400 μl

본 제품은 Differential Display법에 사용하기 위한 하류 primer(9종류) 및 상류 primer(24종류)를 포함하고 있다. 최적 반응조건과 정확한 primer의 설계로 DD법에 있어서의 문제점인 false positive를 감소시켰다. 본 제품을 이용한 DD법을 수행하기 위해서는 Enzyme Set-DD(TaKaRa Code R024A/C) 및 방사성 동위원소([α-^{32}P] dATP 또는 [^{35}S] dATP 등)가 필요하다

최적 반응을 수행하기 위한
Differential Display Kit(for RI) 용 효소셋트

Enzyme Set-DD

TaKaRa Code R024A 1 Set
TaKaRa Code R024C 3 Sets

또한 DD법으로 display된 밴드는 1개로 관찰되지만 복수의 cDNA 단편을 포함하는 경우가 많으므로 번거로운 sub-cloning을 해야 한다. 이에 TaKaRa는 vector에 subcloning하지 않고 재증폭 단편을 분리하는 방법을 개발하였다. 상세한 내용은 Analytical Biochemistry Vol. 256 (1998), p82~91을 참조한다.

▶ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
H.A.-Yellow	HA001/HA002	500 U/1,000 U
H.A.-Red	HA004/HA005	500 U/1,000 U
NuSieve® 3:1 Agarose	F55180/F50090	25 g/125 g
Long Ranger™ Gel Solution	F0611 등	

NEW

세포증식 측정용 ELISA Kit
DNA·IdU Labeling and Detection Kit

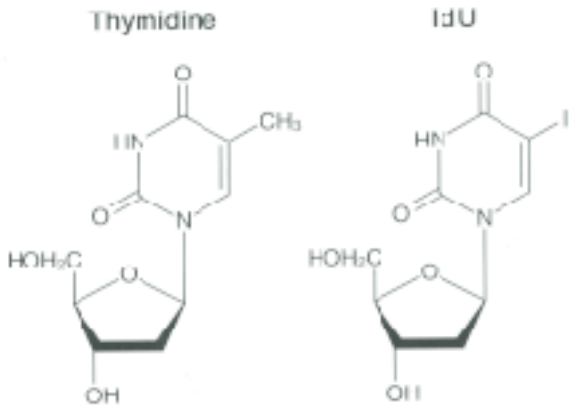
TaKaRa Code MK420　960 tests

TaKaRa는 세포증식을 측정하기 위한 ELISA Kit, DNA・IdU Labeling and Detection Kit을 발매하였다. 본 제품은 RI를 사용하지 않으며 세포증식과 세포주기의 연구에 이용할 수 있다. 또한 킷트에 첨가된 발색기질 대신 DAB 등의 불용성 발색기질을 사용함으로써 조직절편을 염색할 수 있다.

● 서론

세포증식의 측정법에는 여러가지가 있으나 그 중 하나는 DNA 합성량을 지표로 하여 간접적으로 세포증식을 측정하는 방법이다. 이 방법에는 일반적으로 [^{3}H] thymidine을 이용하나 RI이므로 취급이나 안전성, 폐기에 있어서 문제가 있었다.

한편 thymidine analog인 5-iodo-2'-deoxyuridine(IdU)은 thymidine과 마찬가지로 분열중인 세포의 DNA로 유입되며, 유입된 IdU를 anti-IdU monoclonal antibody를 이용하여 ELISA로 측정할 수 있다. 본 킷트는 이 IdU 원리를 이용한 세포증식 측정용 ELISA Kit으로서 세포증식과 세포주기의 연구에 유용하다. 표지시약으로 IdU를 사용하고 고정화 시약으로 세포의 고정과 DNA의 single strand화를 수행한 후, anti-IdU monoclonal antibody로 DNA strand 중의 IdU를 검출하여 효소표식 2차항체로 기질을 가시화한다. 또한 이 제품은 RI를 이용하지 않으므로 안전하다.



1-(2-deoxy-β-ribofulanosyl)-5-methyluracil　5-Iodo-2'-deoxyuridine

그림 1　Thymidine 및 5-iodo-2'-deoxyuridine(IdU)의 구조

● 내용

20 mM IdU[sodium carbonate 용액(pH9.5)]	250 μl	1개
고정화 시약(ethanol, 0.1 N NaOH, stabilizer)	110 ml	2개
Block & 희석용 시약(Blockase™)	250 ml	1개
Block & 희석용 시약 첨가방부제(PROCLIN™)	250 μl	1개
Anti-IdU monoclonal antibody(1 mg/1 ml PBS, 방부제 함유)	550 μl	1 개
Rabbit anti-mouse IgG-POD 표식항체(보호제, 방부제 함유)	110 μl	1 개
발색시약(TMBZ)		

(킷트 이외에 필요한 시약 및 장치)

- 반응정지액(1 N 황산)
- 희석액 및 세정액(PBS)(PBS Tablets: TaKaRa Code T900)
- 배양관련제품 및 기구류(37℃ CO_2 incubator)
- Microplate reader(450 nm 정도의 filter를 사용할 것)

● 측정순서

1) IdU 삽입반응	3～48시간
2) 세포고정/DNA single strand화	37℃, 15분
3) Blocking 반응	37℃, 30분
4) Anti-IdU monoclonal antibody 반응	37℃, 30분
5) Anti-mouse IgG 효소 표식항체 반응	37℃, 30분
6) 발색시약(TMBZ) 반응	20～30℃, 15분 정도

● 배양세포의 조제

[접착세포(adhesion cell)의 경우]

96 well microplate에서 IdU 함유배지 100～200 μl/well로 세포를 배양한다. IdU 유입시간은(3～24시간) 세포의 종류에 따라 최적의 조건을 선택하는 것이 좋으며 1 well에 필요한 최저 세포수는 약 100～300개이다(세포의 증식속도에 따라 다르다). Control blank로서 세포(+)IdU(-), 세포(-)IdU(+)의 조건을 반드시 설정한다. 유입이 종료된 후 배양상청을 제거하고 PBS로 1회 세정하며 세포중 접착력이 약한 것은 세정조작 과정에서 떨어져 나올 우려가 있으므로, 이 경우는 세정하지 않는다. 이후 액을 완전히 제거한 다음 고정화 시약을 첨가한다.

[부유세포(suspension cell)의 경우]

Labeling 및 배양은 접착세포의 경우와 같은 방법으로 정치한다. Plate 원심분리기가 있는 경우는 500×g로 10분간 원심분리하여 세포를 well의 바닥면에 모은 후 상청을 제거한다. Plate 원심분리기가 없는 경우는 세포가 바닥면으로 가라앉은 후 조심스럽게 상청을 제거한다. Dryer(온풍가능) 등으로 건조시킨 세포가 흘러내리지 않도록 고정화 시약을 첨가한다. 이 경우 blank IdU(-)의 흡광도가 약간 높으므로 반드시 blank를 설정해야 한다.

● 검토예 1: A431 세포(사람 편평상피암 세포)의 검출한계 세포수에 대한 검토

4×10^4개의 A431 세포를 2^0~2^{10}배 희석하여 96 well microplate에 분주하고(100 μl/well), IdU를 20시간 동안 유입하였다. 킷트에 첨부한 설명서에 따라 반응을 실시하고 세포수에 대한 발색, 흡광도를 plotting하였다(그림 2).

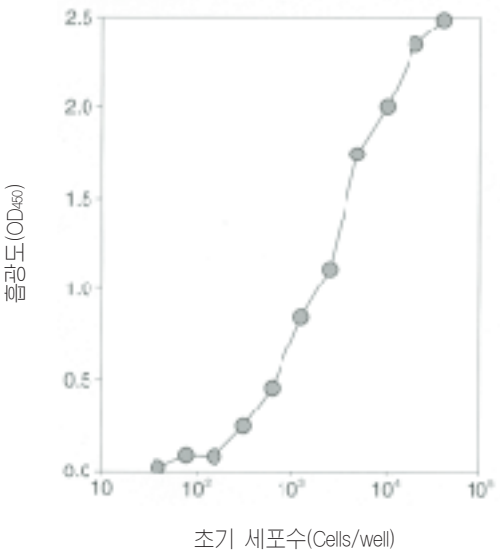


그림 2 A431세포의 초기 세포수와 흡광도와의 관계

● 검토예 2 : NHLF 세포(사람 정상 폐섬유아세포)의 검출한계 세포수에 대한 검토

4×10^4개의 NHLF세포를 2^0~2^{10}배 희석하여 96 well microplate에 분주하고(100 μl/well), IdU를 20시간 동안 유입하였다. 킷트에 첨부한 설명서에 따라 반응을 수행하고 세포수에 대하여 발색, 흡광도를 plotting한다(그림 3).

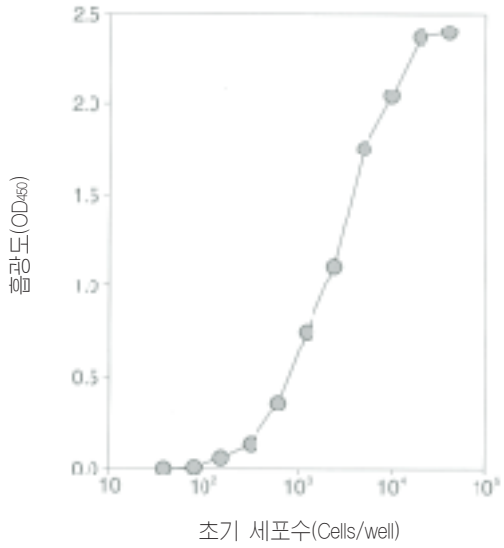


그림 3 NHLF 세포의 초기 세포수와 흡광도와의 관계

● 검토예 3 : IdU 유입시간에 대한 검토

A431 세포(사람 편평상피암 세포)에 대한 IdU의 유입시간을 변화시켜(유입시간 이외는 검토예 1과 동일), 검출계의 변화를 조사하였다. 그림 3에서 알수 있듯이 세포의 종류 및 증식속도에 따라 최적의 유입시간을 선택할 필요가 있다(그림 4).

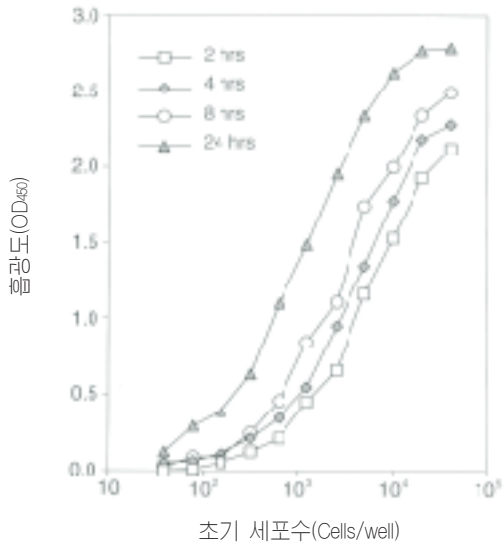


그림 4 A431 세포의 IdU 유입시간과 흡광도의 관계

● 킷트의 응용례: *in vivo* labeling

킷트에 첨부된 발색기질 대신 불용성의 발색기질(DAB 등)을 사용하여 *in vivo* 표식으로 조직절편을 조제함으로써 조직 중의 증식세포를 염색할 수 있다.

[*in vivo* 표식에 필요한 것]

- 킷트 내의 20 mM IdU(7.08 mg/ml)
- Mouse(BALB/c)
- 75% Ethanol
- 95% Ethanol
- Syringe
- Needle

[준비시약]

- Xylene
- Ethanol(100%, 90%, 80%)
- 증류수
- 10 mM citrate buffer(pH6.0)
- Washing buffer(PBS 또는 TBS)
- H_2O_2
- 킷트 내의 항체(anti-IdU monoclonal antibody, anti-mouse IgG 효소 표식 2차항체)
- 킷트 내의 항체 희석액
- 발색기질(DAB)
- 대비염색(hematoxylin 또는 methyl green 등)
- Mount medium

[준비 기구 및 기기]

Koplin jar(slide 염색 bath), micropipet, microtube, 습윤상자, cover slip, cover glass, 핀셋, 현미경, 전자레인지(가정용)

[방법]

1) 20 mM IdU를 PBS로 7배 희석하여 0.22 ml을 BALB/c mouse(8주령, 몸무게 22 g)의 복강 내에 투여한다(표준 투여량 10 mg/kg).
2) 1.5시간 후 mouse의 십이지장을 적출하여 바로 75% ethanol로 2시간 동안 고정한 다음 95% ethanol로 바꾸어 고정하고 다음날 통상적인 방법으로 paraffin embedding & slicing을 한다.
3) 통상의 방법으로 탈 paraffin 조작을 수행한 후, paraffin slice를 10 mM citrate buffer에 담가 5분동안 전자레인지로 가열한다.
4) 킷트 중의 고정액을 절편에 50~100 ㎕(절편이 감추어질 정도) 첨가하고 cover slip을 덮어 건조를 방지하면서 실온에서 15분간 방치한다.
5) PBS로 가볍게 세정한 후, 절편 slide를 3% H_2O_2 용액에 담가 내인성 peroxidase의 blocking을 실온에서 5분간 수행한다.
6) PBS로 가볍게 세정한 후, 킷트 중의 blocking 용액으로 비특이적 반응의 blocking을 실온에서 20분간 실시한다.
7) PBS로 가볍게 세정한 후, 킷트 중의 anti-IdU monoclonal antibody를 설명서에 따라서 희석하고 그 희석한 항체액을 절편에 50~100 ㎕(절편이 감추어질 정도) 첨가한 후 습윤상자 안에서 37℃, 60분간 반응한다(건조의 우려가 있는 경우는 cover slip을 덮는다).
8) PBS로 5분씩 3회 세정한 후 킷트 내의 anti-mouse IgG POD 표식 2차 항체액을 절편에 50~100 ㎕(절편이 감추어질 정도) 첨가하고 습윤상자 안에서 37℃, 30분간 반응한다.
9) PBS로 5분씩 4회 세정한 후 DAB 기질용액을 절편에 첨가하여 발색반응 한다. 현미경으로 발색이 충분히 일어난 것을 확인한 후 증류수로 반응을 정지한다. 다음에 hematoxylin으로 핵을 염색한다.
10) 흐르는 물에 탈색하여 탈수·투철하고 mount medium에 봉입한 다음 건조하여 현미경으로 관찰한다.

[결과]

IdU Kit을 이용한 상기의 방법으로 mouse 정상 십이지장 조직절편을 염색한 결과를 그림 1에 나타내었다. 또한 비교를 위해 *In situ* Apoptosis Detection Kit(TaKaRa Code MK500)을 이용한 apoptosis 세포의 DAB염색 결과를 그림 2에 나타내었다.

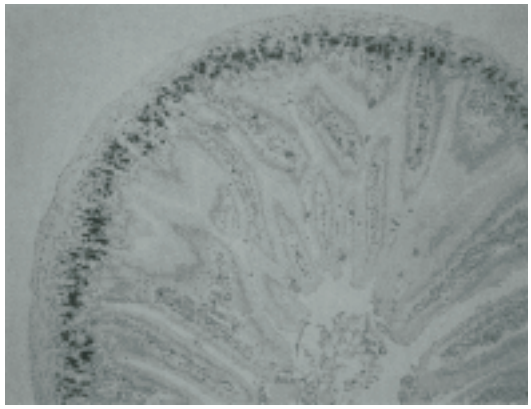


그림 1 Mouse 정상 십이지장의 IdU 염색(DAB 발색)
DNA 복제중인 세포는 증식대에서 관찰된다.

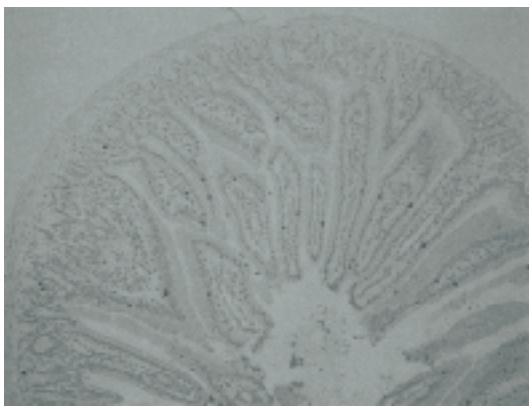


그림 2 Mouse 정상 십이지장의 apoptosis 세포염색
(*In situ* Apoptosis Detection Kit 사용, DAB 발색)
Apoptosis를 일으킨 세포는 관강(管腔) 내부에서 관찰되며, 증식대에서는 관찰되지 않는다.

Q & A

Q1 *세포를 고정하기 전의 세정조작에서 세포가 떨어져 나오는데?*

A1 그러한 경우에는 배지를 제거한 후 세정하지 말고 고정액을 각 well에 첨가하십시요. Blank가 높지 않다면 무방합니다.

Q2 *1 well에 최저 몇 개의 세포가 필요한지?*

A2 그림 2~4의 결과를 참조하시기 바라며, 1 well당 약 100~300개가 적당합니다.

Q3 *이 킷트에서 사용하는 항체는 IdU에 대한 것이지만 BrdU에도 반응하는지?*

A3 이 항체는 IdU, BrdU 양쪽 모두에 반응합니다.

Q4 *세포에 IdU를 유입하는 시기는 언제가 좋을까?*

A4 세포를 접종할 때는 배지 중에 IdU를 미리 넣어 두는 것이 좋고, 또는 세포를 접종한 후 2배 농도의 IdU 용액을 세포현탁액에 동량 첨가하여 유입을 개시하는 것도 좋습니다.

Q5 *Block & 희석용 시약은 모든 EIA에 이용할 수 있는지?*

A5 가능합니다. 또 첨부한 방부제는 HRP의 활성을 방해하지 않으므로 검체의 희석 뿐만 아니라 표식항체의 희석에도 이용할 수 있습니다.

Q6 *WST-1을 이용한 세포증식 검출계와의 비교 data가 있는지?*

A6 검출가능한 최소 세포수는 거의 동등한 수준입니다. WST-1이 mitochondria 내의 대사활성을 측정하는 것에 반하여 IdU kit는 DNA의 분열・증식을 측정합니다.

참고문헌

1) Djordjevic, B. *et al*. (1960) *J. Exp. Med*. **112**, 509-531

● 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System	MK400	2,500 tests
In situ Apoptosis Detection Kit	MK500	20회

NEW

Cayman Chemical사 산화 스트레스, apoptosis 연구용 시약

이번에 TaKaRa는 미국의 Cayman Chemical사와의 제휴로 산화 스트레스, apoptosis 관련 유전자의 발현을 Competitive PCR법으로 간단하게 정량하는 킷트인 Quant-PCR Kit 시리즈 및 산화 스트레스 관련 marker 측정용 킷트를 판매하게 되어 다음과 같이 신제품을 소개한다.

▶ Quant-PCR Kit 시리즈

제품명	증폭단편 크기		TaKaRa Code	포장량
	목적유전자 유래	Internal Standard		
Bcl-2(human) Quant-PCR Kit	801 bp	502 bp	CF012	50회
Bax$_{\alpha}$(human, rat, mouse) Quant-PCR Kit	571 bp	425 bp	CF013	50회
COX-1(rat) Quant-PCR Kit	258 bp	160 bp	CF015	50회
COX-2(human) Quant-PCR Kit	425 bp	325 bp	CF016	50회
eNOS(human) Quant-PCR Kit	512 bp	330 bp	CF018	50회
iNOS(human) Quant-PCR Kit	460 bp	600 bp	CF019	50회
iNOS(rat) Quant-PCR Kit	305 bp	248 bp	CF020	50회
iNOS(murine) Quant-PCR Kit	545 bp	443 bp	CF021	50회

Cayman Chemical사의 Quant-PCR Kit*는 목적유전자 유래의 cDNA 및 Internal Standard를 특이적으로 증폭하는 primer, 동시에 증폭되나 목적 유전자와는 다른 크기의 PCR 산물을 생성하도록 고안된 Internal Standard(Competitor), PCR buffer 및 positive control DNA 등으로 구성된 Competitive PCR Kit이다. 시료 중의 목적유전자 유래의 cDNA와 Internal Standard를 Competitive PCR법으로 동시에 증폭함으로써 목적유전자의 cDNA를 간편하게 정량할 수 있다. Quant-PCR Kit 시리즈로는 산화 스트레스, apoptosis 관련 유전자인 eNOS(human), iNOS(human), iNOS(rat), iNOS(murine), COX-1(rat), COX-2(human), Bcl-2(human) 및 Bax$_{\alpha}$(human, rat, mouse) 등의 각 유전자에 대한 발현정량용 킷트가 있다.

* Quant-PCR Kit에 PCR용 효소는 포함되어 있지 않습니다. cDNA 조제 및 PCR에는 각각 cDNA Synthesis Kit(TaKaRa Code 6120)과 *TaKaRa Taq*™(TaKaRa Code R001A)의 사용을 권장합니다.

▶ 산화 스트레스 관련 Marker 측정용 킷트

8-Isoprostane EIA Kit

TaKaRa Code CF001 96회용

8-Isoprostane(8-*epi* prostaglandin F$_{2\alpha}$)는 산화 스트레스로 인하여 인지질에서 생성되는 지질분해물로, 생체의 항산화능의 결핍과 산화 스트레스를 나타내는 marker로 여겨지고 있다. 본 제품은 anti-8-isoprostane polyclonal antibody에 대한 8-isoprostane과 8-Isoprostane Acetylcholinesterase Tracer(8-isoprostane과 8-isoprostane acetylcholinesterase의 conjugate)의 경합적 결합을 이용하여 8-isoprostane을 정량하는 Competitive EIA Kit이다.

■ 내용

8-Isoprostane Antiserum
8-Isoprostane AChE Tracer
8-Isoprostane Standard
Wash Buffer
EIA Buffer
Tween 20
Ellman's Reagent
Anti-Rabbit IgG Coated Microtiter Plate
Plate Cover

Glutathione Assay Kit

TaKaRa Code CF002 96회용

Glutathione은 생체중에 널리 분포하는 tripeptide로 Glutathione Peroxidase에 의한 H_2O_2 환원반응의 전자공여체로 작용하며, 산화 스트레스에 대한 생체 방어기작에 중요한 역할을 한다. 본 제품은 Ellman 시약(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid: DTNB)과 Glutathione Reductase를 이용한 Enzymatic Cycling에 의하여 시료 중의 total glutathione을 측정하는 킷트이다.

■ 내용

MES Buffer
GSSG Standard
Cofactor Mixture
Enzyme Mixture
Ellman's Reagent
96-well Microtiter Plate
Plate Cover

Lipid Hydroperoxide(LPO) Assay Kit

TaKaRa Code CF003 100회용

과산화지질 분해산물은 단백질의 비효소적 화학수식과 관련한다고 여겨지며, 이 과산화지질의 측정은 산화장애에 의한 질병의 유발 및 해석에 유용하다. 본 제품은 과산화지질과 Fe^{2+}과의 산화환원 반응을 이용하여 과산화지질을 직접 측정하는 킷트이다. 과산화지질 등을 측정하므로 poly unsaturated fatty acid-hydroperoxide의 분해산물인 MDA(malondialdehyde) 및 4-HNE(4-hydroxynonenal)의 정량에 기초하는 종래의 방법보다 특이적으로 측정할 수 있다.

■ 내용

FTS Reagent 1
FTS Reagent 2
Lipid Hydroperoxide Standard
Metaphosphoric acid
Triphenylphosphine

Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit(LDH method)

TaKaRa Code CF004 96회용

NO Synthase(NOS)에 의하여 생성되는 nitric oxide(NO)는 빠른 속도로 nitrate(NO_3^-)와 nitrite(NO_2^-)로 변환되므로 총 NO_3^-/NO_2^-의 측정치를 생체내 nitric oxide 생성의 marker로서 이용할 수 있다. 본 제품은 NO_3^-/NO_2^-를 측정하는 킷트로, Nitrate Reductase를 이용하여 NO_3^- 를 NO_2^-로 환원시킨 후, Griess 시약으로 NO_2^-의 양을 측정한다. Griess 시약을 이용한 발색반응은 NO Synthase와 Nitrate Reductase의 반응에 필수적인 NADPH에 의해 저해되는 것으로 알려져 있으나, 본 제품은 Lactate Dehydrogenase(LDH)를 사용하여 NADPH를 NADH로 변환함으로써 발색반응 저해를 방지하고 NO_3^-/NO_2^-를 측정한다. 특히, NO Synthase의 활성 측정을 목적으로 NO_3^-/NO_2^-를 측정하는 경우에 아주 적합하다.

■ 내용

Assay Buffer
Nitrate Reductase
Co-factors Preparation
Nitrate Standard
Lactate Dehydrogenase
Griess Reagent R1
Griess Reagent R2
96-well Microtiter Plate
Plate Cover

Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit

TaKaRa Code CF005 96회용

본 제품은 총 NO_3^-/NO_2^-를 측정하는 킷트로, Nitrate Reductase를 이용하여 NO_3^-를 NO_2^-로 환원하여 2,3-diaminonaphthalene(DAN)과 반응시켜 생성되는 형광물질인 1(H)-naphthotriazole을 형광측정한다. 일반적인 비색정량법과 비교하여 약 50배의 고감도(10nM)로 측정할 수 있다.

■ 내용

Assay Buffer
Nitrate Reductase
Enzyme Co-factors
Nitrate Standard
Nitrite Standard
DAN Reagent
Sodium Hydroxide
96-well Microtiter Plate
Plate Cover

NEW

Anti-Influenza A형 · B형 항체

Influenza virus의 Typing과 Neutralization Test에 !!

Influenza virus의 표면 단백질은 변이양상이 매우 다양하여 백신접종의 효과를 좌우하는 커다란 요인이 되어왔다. 또한 강한 감염력과 단기간의 확산력을 가지고 있으므로, influenza virus의 신속한 typing은 더욱 중요하다고 할 수 있다. TaKaRa는 influenza virus의 신속한 typing과 neutralization test에 유용한 각종 항체를 신발매하였다.

● Influenza virus형

Influenza virus에는 A, B, C의 3가지 형이 존재한다. 현재 유행하는 influenza virus의 주류는 A형중 H1 및 H3 subtype과 B형의 3 subtype이 있다. virus의 구조를 그림 1에 모식적으로 나타내었다. Influenza virus형은 핵단백질(NP)의 항원성에 따라 분류하는데, 이외에도 virus 표면 단백질의 haemagglutinin(HA)과 neuraminidase(NA)의 항원성에 따라서 subtype을 결정한다. Influenza A형 virus의 HA는 head region과 stem region의 두 부분으로 구성되어 있으며, head region은 target 세포의 receptor와 결합하는 부분을 포함한다. 또한 stem region은 virus 막과 target 세포의 세포막 간의 막융합에 필요한 융합 peptide 서열을 포함한다[1].

그림 1 Influenza virus의 모식도

Influenza HA의 head region은 특히 항원성이 강하여 생산한 항체의 대부분은 head region을 인식하는 것이다. 그러나, 이 영역은 특히 변이가 일어나기 쉬워 백신 접종의 효과를 좌우하는 큰 요인이다. 게다가 influenza는 단기간에 확산되므로 신속하게 typing하는 것이 매우 중요하다[2].

● Anti-Influenza virus 항체

TaKaRa는 influenza virus의 신속한 typing과 neutralization test에 유용한 각종 항체를 준비하였다. 각 항체의 특징을 아래에 나타내었다.

Anti-Influenza A형(H1N1, H2N2) 항체: C179
(TaKaRa Code M145, 0.1 mg)

Influenza A형 virus subtype H1N1과 H2N2의 HA stem region에 공통적으로 보존된 입체구조를 인식하는 항체이다[3]. 항원변이에 좌우되지 않고 subtype H1과 H2에 반응할 수 있으며, 양쪽 subtype 모두에 대하여 강력한 중화(neutralization) 활성을 갖는다[4].

Anti-Influenza A형(H3N2) 항체: F49
(TaKaRa Code M146, 0.1 mg)

Influenza A형 virus subtype H3N2의 HA stem region을 특이적으로 인식하는 항체이다[5]. 중화활성은 갖지 않는다.

Anti-Influenza A형 항체: C111
(TaKaRa Code M147, 0.1 mg)

Influenza A형 virus의 matrix 단백질(M1)을 인식하는 항체이다. A형 virus의 subtype에 관계없이 반응한다[3]. 본 항체는 세포염색 뿐만 아니라 면역침강법(IP), Western blotting에도 사용할 수 있다.

Anti-Influenza B형 항체: 9D6
(TaKaRa Code M148, 0.1 mg)

Influenza B형 virus의 핵단백질(NP)을 인식하는 항체이다. 광범위한 B형 influenza virus에 특이적으로 반응한다[6]. 세포염색, 면역침강법(IP) 및 Western blotting에 사용할 수 있다.

Anti-Influenza A · B형 Rabbit Polyclonal 항체
(TaKaRa Code M149, 0.4 mg)

Influenza virus(A형: 북경 H1N1, 무한 H3N2; B형: 삼중, 광동)의 HA를 포함한 백신을 항원으로 제작한 rabbit 유래의 항혈청이다. Protein A-affinity column으로 정제한 항체로 A형 virus와 B형 virus에 동등한 수준의 반응을 나타낸다.

표 1 각종 influenza A형 및 B형 virus에 대한 각 monoclonal 항체의 반응성

Virus type and strain		C179		F49	C111
		Staining	Neutralizing	Staining	Staining
(H1N1)	A/PR/8/34	+	+	-	+
	A/Bangkok/10/83	+	+	-	+
	A/Yamagata/120/86	+	+	-	+
	A/Osaka/930/88	+	+	-	+
	A/Suita/1/89	+	+	-	+
(H2N2)	A/Okuda/57	+	+	-	+
	A/Adachi/2/57	+	+	-	+
	A/Kaizuka/2/65	+	+	-	+
	A/Izumi/5/65	+	+	-	+
	A/Takatsuki/4/65	+	+	-	+
(H3N2)	A/Aichi/2/68	-	-	+	+
	A/Fukuoka/C29/85	-	-	+	+
	A/Sichuan/2/87	-	-	+	+
	A/Ibaraki/1/90	-	-	+	+
	A/Suita/1/90	-	-	+	+
(H3N8)	A/Budgreiger/Aichi/1/77	-	-	+	+
(H4N6)	A/Duck/Czechoslovakia/1/56	-	-	+	+
(H5N3)	A/Whistling swan/shimane/476/83	+	+	-	+
(H5N9)	A/Turkey/Ontario/7732/66	+	+	-	+
(H6N5)	A/Shearwater/Australia/1/72	+	-	-	+
(H6N6)	A/Whistling swan/shimane/37/80	+	-	-	+
(H7N7)	A/Tufted duck/shimane/124R/80	-	-	-	+
(H8N4)	A/Turkey/Ontario/6118/68	-	-	-	+
(H9N2)	A/Turkey/Wisconsin/66	+	+	-	+
(H10N7)	A/Chiken/Germany "N"/49	-	-	+	+
(H11N6)	A/Duck/England/56	-	-	-	+
(B)	B/Nagasaki/1/87	-	-	-	-

표 2 각종 influenza B형 virus에 대한 monoclonal 항체 9D6의 반응성

Virus type and strain	9D6
	Staining
B/Lee/40	+
B/Osaka/2/70	+
B/Gifu/2/73	+
B/USSR/100/84	+
B/Tokyo/676/84	+
B/Norway/1/84	+
B/Ibaragi/2/85	+
B/Victoria/2/87	+
B/Nagasaki/1/87	+
B/Aichi/5/88	+
B/Honkon/22/89	+
B/Mie/1/93	+
B/Kanton/5/94	+

● C179 : Influenza A형 중화(neutralization) 항체의 유용성

[항체의 인식부위에 대한 연구][3]

C179 항체는 influenza A형(H2N2)인 A/Okuda/57주로 면역한 BALB/c mouse의 비장세포(splenocyte)와 mouse myeloma P3U1의 hybridoma에서 유래한 monoclonal 항체이다. 각 형의 influenza virus를 감염시킨 MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포를 항체로 염색한 결과, A형 H1N1, H2N2 subtype에 특이적으로 반응함을 확인하였다. 또한 본 항체로 염색되는 virus에 대한 중화활성 및 세포융합 저해활성을 가짐을 알게되었다. C179 항체의 인식부위를 조사하기 위하여 C179 항체 존재하에서 A/Suita/1/89와 A/Izumi/5/65 virus를 배양하고 각각으로부터 2종의 변이주를 분리하였다. 변이 virus의 HA code 서열을 원래의 virus주와 비교해석한 결과, HA 단백질분자 내의 2곳에서 아미노산 변이가 일어남을 확인할 수 있었다. 결국 C179와의 반응성 상실은 이 아미노산 변이에서 비롯함을 알 수 있었다. 이에 따라 본 항체의 인식부위는 HA 분자 stem region 내의 2곳의 아미노산 서열, 즉 TGLRN(HA1318-322)와 GITNKVNSNIEK(HA247-58)이고, 이 부위는 virus 사이에서 고도로 보존된 변이가 일어나기 힘든 영역인 것이 판명되었다.

[Influenza virus에 대한 예방효과][4]

Mouse에 대한 influenza virus의 감염실험을 수행하여, C179 항체에 의한 예방효과를 조사하였다. 10마리의 BALB/c mouse의 복강에 3가지 농도의 C179항체를 함유한 PBS(1.0, 0.1, 0.01 mg/ml)를 개체당 각 1 ml씩 투여하고, 하루 뒤 A/FM/1/47 virus(subtype H1N1) 25 ㎕(200 FFU 함유)를 비강을 통해 감염시켰다. 또한 12마리의 BALB/c mouse에는 virus만을 감염시키고 대조군으로 삼았다. 그 결과, 대조군에서는 12마리 중 8마리가 사망(5일째에 2마리, 6일째에 5마리, 8일째에 1마리)한 것에 비하여, C179 항체를 0.1 mg 이상 투여한 mouse는 14일 후에도 정상이었다. 이에 따라 C179 항체가 예방효과를 나타낸다고 할 수 있다.

● Anti-Influenza 항체를 이용한 virus의 Typing

[C179, F49 및 9D6 항체를 이용한 influenza virus의 Typing]

문헌 2와 5에 상세한 방법과 결과가 소개되어 있으므로 본고에는 방법의 개략만 소개한다. 96-well microtiter plate에 단층배양한 MDCK 세포에 환자의 체액으로부터 분리한 virus를 3 well씩 접종하여 35℃에서 16시간 배양한다. 상청을 제거하고 PBS로 세정한 후, 99% ethanol로 10분간 고정하고, 1% BSA로 blocking한다. 다음에 각 항체(최종 농도 1 ㎍/ml), rabbit anti-mouse IgG 항체 및 peroxidase-mouse anti-peroxidase complex를 순차적으로 반응한다(PAP법). 각각의 반응은 37℃에서 30분간 실시하며 반응 후에는 PBS로 세정한다. 마지막으로 diaminobenzidine(DAB)을 첨가하여 발색한 후 현미경으로 관찰한다. 이 3 well을 염색한 결과(표 3)로 influenza virus를 typing할 수 있다.

표 3 PAP법에 의한 Typing

항체			
C179	F49	9D6	Typing
+	-	-	H1N1 또는 H2N2
-	+	-	H3N2
-	-	+	B

참고문헌

1) Wiley (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 365-394.
2) Ueda, M. *et al.* (1997) 일본 흉부임상 56권 11호:S116-S121
3) Okuno, Y. *et al.* (1993) *J. Virol.* **67**, 2552-255.
4) Okuno, Y. *et al.* (1994) *J. Virol.* **68**, 517-520.
5) Ueda, M. *et al.* (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36, 340-344.
6) Nakagawa, N. *et al.* (1997) Osaka에 있어서 일본 뇌염과 불명 바이러스 질환 유행 예측 조사 보고서 p.32-35.

NEW

TaKaRa PCR Thermal Cycler SP

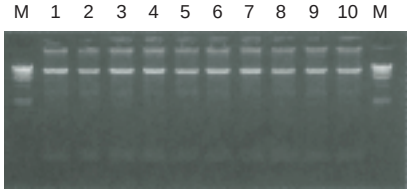
TaKaRa Code TP400(기본사양)

빠르고 정확한 온도제어로 재현성이 높은 PCR 결과를 !!

TaKaRa PCR Thermal Cycler SP는 빠르고 정확한 온도 제어로 특이성, 재현성이 높은 DNA 증폭을 실현하며, LA PCR™과 고속 PCR에도 최적인 thermal cycler이다. TaKaRa의 PCR 관련시약을 사용한 96 시료의 PCR에서는 tube 위치에 따른 증폭효율의 차이가 거의 없으며, 균일성이 높은 결과를 얻을 수 있다.

● 긴 DNA의 증폭

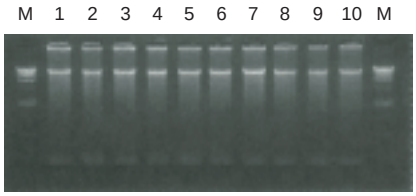
[*TaKaRa Z-Taq*™에 의한 긴 DNA의 증폭]



주형 DNA : λ DNA 2.5 ng/50 μl
증폭 크기 : 15 kb
M : λ-*Hind* III Digest
0.2 ml tube 사용

PCR 조건
98℃, 5 sec
67℃, 2 min
25 cycles
↓
전체 반응시간 약 1.5 hr
(통상의 5배 속도)

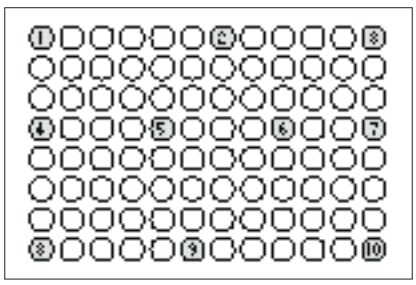
[*TaKaRa LA Taq*™에 의한 긴 DNA의 증폭]



주형 DNA : λ DNA 2.5 ng/50 μl
증폭 크기 : 35 kb
M : λ-*Hind* III Digest
0.2 ml tube 사용

PCR 조건
94℃, 1 min
↓
98℃, 5 sec
67℃, 15 min
30 cycles
↓
72℃, 10 min

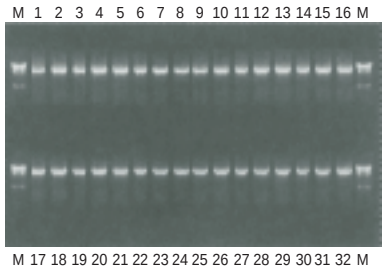
PCR을 수행한 tube의 위치



원내의 숫자는 상기 lane에 대응한다.

● 증폭효율의 비교

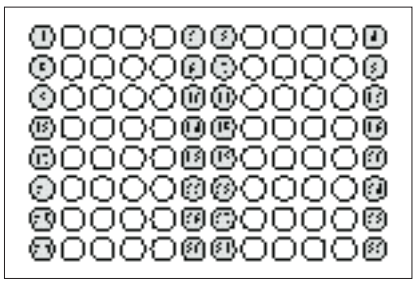
[*TaKaRa Taq*™에 의한 증폭효율의 비교]



주형 DNA : λ DNA 2.5 ng/20 μl
증폭 크기 : 8 kb
M : λ-*Hind* III Digest
96 well tube plate 사용

PCR 조건
94℃, 30 sec
64℃, 10 min
30 cycles

PCR을 수행한 tube의 위치



원내의 숫자는 상기 lane에 대응한다.

TaKaRa PCR Related products are sold under licensing arrangements with Hoffmann-La Roche Ltd., Roche Molecular Systems, Inc. and The Perkin-Elmer Corporation.
The TaKaRa Shuzo Co., Ltd. Thermal Cycler is an Authorized Thermal Cycler and may be used for PCR only with Authorized Reagents under the limited licenses accompanying Authorized Reagents.

배지의 선택

배양계는 인공의 환경에서 세포를 배양하는 것으로서 지금까지 많은 연구를 진행해 왔다. 초기 배양기술의 발달은 배지의 개발에 힘입어 발전하였으며, 배지는 다른 많은 요인과 더불어 배양환경을 지배하여 세포의 생리반응과 표현형을 규정한다[1].

본 고에서는 배지의 선택에 관한 실제 적용례와 방법에 대하여 설명하고자 한다.

1. 배양의 목적

배양계를 이용한 실험의 목적은 기본적으로 증식과 분화의 조절이라 할 수 있다. 예를 들면 배양세포를 생리활성 물질의 기능해석에 이용하는 경우도 목적 형질은 대부분 증식과 분화이다. 또한 생리활성 물질의 근원으로써 세포를 대량배양하는 경우에도 증식이라는 성질과 그 생리활성 물질을 합성하는 일종의 분화성질이 중요하다. 그러나, 종래의 배지는 증식을 지표로 개발되어 왔다. 따라서 종래의 배지가 증식 이외의 형질을 유도하는데 적당한지 확인하는 것이 앞으로의 큰 과제이다. 예를 들면 배양계에서의 분화, 장기생존, 분화형질 유지 등을 현재의 배지로 유도할 수 있는지 고려해야 한다.

2. 세포의 배양

일반적으로 배양용기 안에는 세포와 배지만이 존재하는 것으로 생각한다. 그러나 그림 1에서 보듯이 세포 생성물, 세포간 및 세포와 배양용기 표면의 상호작용 그리고 세포 자체 등이 분비하는 다양한 인자가 배지조성을 변화시킨다. 이러한 배양계의 역동성은 앞서 말한 바와 같이 매우 중요하다고 할 수 있다.

3. 배지교환은 무엇을 의미하는가

배지교환이란 영양소가 고갈된 배지를 영양이 풍부한 새로운 배지로 교환하여 세포의 증식을 촉진하는 것을 의미하나, 실제로는 세포에서 분비된 증식 저해물질과 노폐물을 제거한다는 중요성도 있다. 이러한 관점에서 볼 때 배지의 교환 빈도도 배지선택만큼 중요한 고려 사항이다.

4. 배지의 역할

배지의 역할로는 1) pH, 삼투압 등의 기초적 생리상태를 유지하는 것, 2) 기초영양을 보급하는 것, 3) 적극적으로 세포의 표현형을 지배하여 실험목적에 부합하는 세포의 반응을 얻는 것 등을 생각할 수 있다. 여기서는 편의적으로 분류하였으나, 실제로는 기초적인 생리조건이 세포의 형질, 반응성을 크게 지배하는 경우도 있다.

5. 배지

배지는 기초배지와 첨가물로 구성되어 있다(그림 2). 각각의 기초배지는 개발된 배경에 따라 서로 다른 조성을 가지고 있다.

6. 평형염류 용액

동물세포는 비교적 넓은 pH 범위에서 생존할 수 있으며, 최적 pH는 통상 7.2~7.4이다. 세포는 배양액으로 젖산 등의 산성 대사물질을 방출하여 pH를 떨어뜨리나 평형염류 용액은 그 완충력으로 pH 변화를 억제한다. 평형염류 용액에는 5% CO_2 존재하에 평형상태를 이루는 Earle's 용액과 sodium carbonate의 양을 감소시켜 대기 중에 평형을 유지시키는 Hank's 용액이 있다. 그 외에 HEPES(*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N*'2-ethansulfonate)를 사용하는 경우도 많다(표 1).

배지의 산성화를 방지하기 위하여 독성이 없다면 어떠한 완충계도 사용할 수 있다. 그러나 저렴하고 가장 보편적인 인산완충계는 인산칼슘의 용해도가 낮으므로 칼슘이온의 농도가 높은 통상의 배지에는 사용할 수 없다. 또한 세포가 탄산수소 이온을 필요로 하므로 대부분의 경우에 탄산수소 완충계를 사용한다.

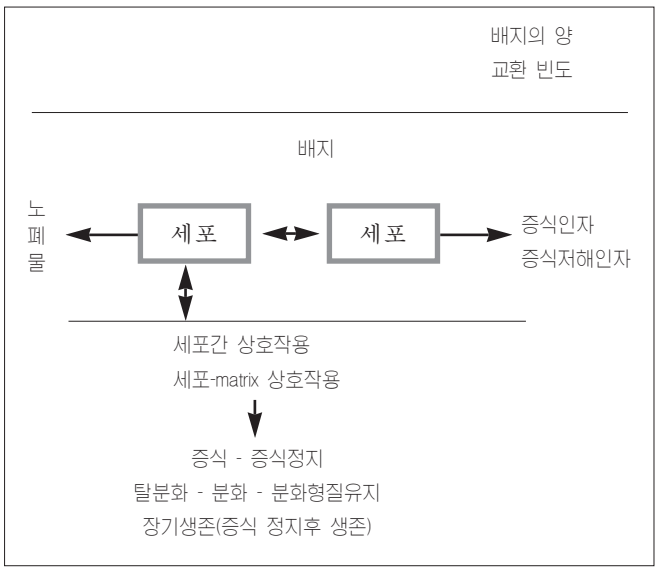


그림 1 배양계의 전체상

7. 배지의 선택

현실적으로 자신의 목적에 맞는 배지에 대하여 근본적인 검토 없이 문헌에 이용한 배지를 그대로 사용하는 경우가 많다. 그러나 동일한 세포를 배양하는 경우에도 목적에 따라 다른 배지를 고안해야 하는 경우도 있다. 증식속도를 추구하

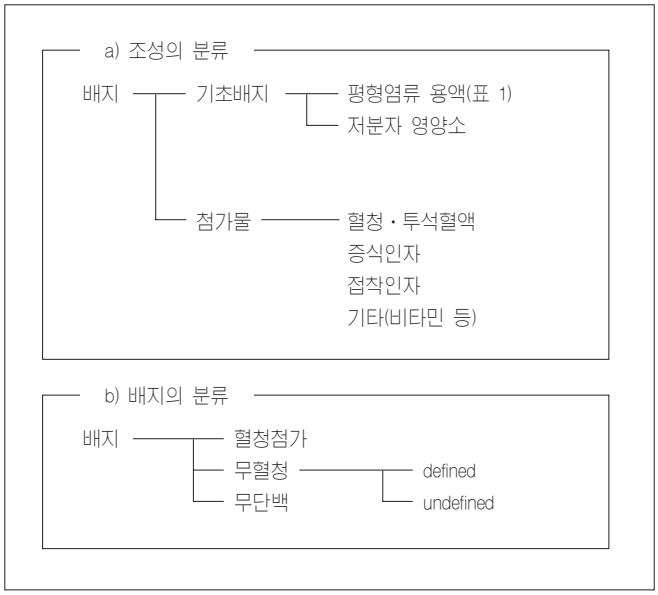


그림 2 배지의 조성과 분류

표 1 대표적인 평형염류 용액

성분	Earle's액 (mg/ℓ)	Hank's액 (mg/ℓ)	PBS* (mg/ℓ)	HBS (mg/ℓ)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	264.9	185.5	(132.5)	-
KCl	400.0	400.0	200.0	149.1
KH_2PO_4	-	60.0	200.0	136.09
$MgSO_4$	97.7	97.7	(59.2)	-
NaCl	6800	8000	8000	7072
$NaHCO_3$	2200	350.0	-	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	140.0	-	-	-
Na_2HPO_4	-	47.5	1150	-
HEPES	-	-	-	7149
Glucose	1000	1000	-	720.64
기체 조건	5% CO_2	대기중	대기중	대기중

*Ca^{2+}, Mg^{2+}를 제거한 것은 PBS(-)로 나타내었다.
PBS : 인산완충 생리식염수
HBS : HEPES 완충 생리식염수

거나, 고포화 세포밀도에서의 안정성을 원하거나, 클론증식, 분화유도를 목적으로 하는 등의 목적에 따라 다른 배지를 선택할 필요가 있다.

Cell line과 대부분의 사람, mouse, chicken의 fibroblast 초대배양은 기본적으로 Eagle's MEM에 소혈청을 첨가한 배지로 가능하다(표 2). 그러나 특별한 분화형질을 가진 세포와 정상 상피세포에 있어서는 각각의 문헌을 참조하여 첨가물을 선택, 조합하여 상세한 농도를 검토하는 것이 좋다.

본 고에서는 사람 및 동물의 접착성 cell line과 fibroblast에 대하여 검토한 예를 나타내었다.

전술한 바와 같이 각 연구자가 어떠한 목적으로 배양을 할 것인가에 따라 배지 및 배양조건을 선택하고 어떤 첨가물이 필요한지도 검토하여 결정해야 한다.

준비물

1) 기본 배양기구
   - CO_2 incubator
   - 배양 hood
   - 도립 위상차(inverted phase) 현미경
2) Target 세포
3) 기본배양액#
   - MEM
   - 199
   - Dulbecco's Modified MEM
   - MCDB104
   - Ham's F12
4) 첨가물*
   - 소혈청
   - 소태아혈청
   - 증식인자
5) 배지용 플라스틱 기구

   때에 따라서 배양용기를 바꾸면 증식형태가 변하는 경우가 있으므로 주의가 필요하다. 대량배양의 조건을 96 well plate로 결정하였어도 성공하지 못하는 경우가 있다.

그림 3, 4에는 이러한 대표적인 배지의 검토개발시의 target 세포와 그 배양조건을 나타내었다. 여기서 주의하여야 할 점은 clonal growth와 통상의 세포밀도에서의 증식 간에는 커다란 차이가 있다는 것이다. 그림 1에 나타낸 배양계의 복잡함을 피할 목적으로 clonal growth를 이용하는 배지개발이 이루어졌으나, 이 배지를 통상의 세포밀도에서의 배양에 그대로 적용할 수 있는지는 의문이다.

* 목적에 맞는 증식인자 등 다양한 것을 고려한다. 배양조건을 검토하여 특정한 생리활성 물질의 작용을 연구하는 경우에는 배지중의 첨가물에 따라 그 작용이 masking될 가능성도 있다. 이러한 경우에는 단순한 배지설정이 중요하다.

Types	Cells or cell lines	MEM	DME	F12	RPMI1640	MCDB 104	199	MCDB 153	L15
C	HeLa human cervical carcinoma	S	S	S					
C	L929 mouse fibrosarcoma	S	S				F		
C	NRK normal rat kidney	S	S						
C	BHK baby hamster kidney	S							
C	MDCK dog kidney		S						
C	Lymphoblastoid cell line				S				
C	Mouse myelomas		S		S				
C	Mouse leukemias				S				
C	Mouse erythroleukemia		S	S	S				
PL	Chick embryo fibroblasts	S		S					
PL	Mouse embryo fibroblasts	S							
PL	Human diploid fibroblasts	S				P	S		S
C	CHO Chinese hamster ovary fibroblasts	S		F					
PL	Human tumor	S	S	S			S		S
PL	Hemopoietic cells				S		S		
PL	Human keratinocytes							P	

표 2 각 세포의 배양 보고예(문헌 20에서 인용 정리)
C: cell line, PL: 초대배양, S: 혈청첨가, F: 무혈청, P: define되지 않은 단백질을 함유한 무혈청
MEM: Earle's minimal medium essential, DME: Dulbecco's modified minnimal essential medium
공란: 보고예가 불명확한 것으로 이 기초배지 중에서 세포가 증식하지 않는 것은 표시하지 않았다.

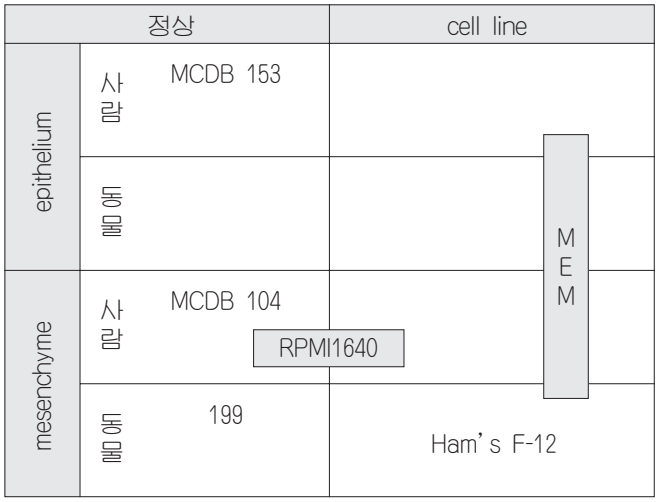


그림 3 기초배지 개발시의 target 세포(문헌 3에서 인용 정리)

	접착		비접착	
	혈청 첨가	무혈청	혈청첨가	무혈청
Colony (초저 세포밀도)		199 F19 MCDB 109 MCDB 153		
통상 세포밀도	MEM		RPMI1640	

그림 4 기초배지 개발시의 배양조건(문헌 3에서 인용 정리)

Protocol 1 세포의 클론 분리조건의 설정

어떤 종류의 cell line은 clonal growth가 되지 않는다.
이러한 경우 clonal growth에 적합한 배지를 선택한다.
〈1일째〉
60 mm dish에 10^2~10^4개의 세포를 넣는다.*주의1
↓
〈2일째〉
검토하고자 하는 배지로 교환한다. 우선 앞서 서술한 기초배지에 여러 농도(0.2%, 2%, 20%)의 소혈청, 소태아혈청, 말혈청의 조합을 검토한다. 이후 목적에 따라 적당한 증식인자 등을 첨가하여 간다.*주의2
↓
〈7일째〉
Formalin 고정, Gimsa 염색

〈결과〉
1) Colony의 수를 세고 colony 형성 효율을 구한다.
2) Colony 당 세포수를 계산하여 세포의 doubling time을 구한다. 필요한 증식지표에 따라 배지를 선택한다.

주의 1 Colony 형성능력은 세포의 종류에 따라 현저하게 다르다. 또한 접종한 세포 수에 따라서 colony 형성율이 변한다. 일반적으로 세포수가 많으면 형성율이 높아지며 조건설정 시 주의가 필요하다.

주의 2 일반적으로 세포는 접종한 초기부터 배지의 영향을 강하게 받는다. 예를 들어 생존률, 접착률 등 증식률 이외의 영향이 크다. 세포를 접종할 때는 표준적인 배지(DMEM + 10% 소태아혈청)을 이용하는 것이 좋다. 이 실험의 경우 기초배지로서 199나 F12가 좋은 경우도 있다.

Protocol 2 고밀도 배양에서의 안정성

다량의 단백질 등을 조제할 때에 다량의 세포를 저렴한 비용으로 배양할 수 있고, 목적 단백질의 회수율을 경비 및 노력에 따라 최적의 조건으로 선택한다.
〈1일째〉
24 well cluster에 10^4개의 세포를 넣는다.
↓
〈2일째〉
검토하고자 하는 배지로 교환한다. 1의 경우와 동일하게 설정한다.
배지교환 빈도를 몇 가지 설정하여(예를 들어 2, 4일 간격) 세포의 형태, 증식 상황과 포화밀도에 가까워졌을 때의 세포 상태를 관찰한다. 예를 들어 배양의 개시시점에서는 높은 혈청농도가 좋았으나 포화밀도에 가까우면 낮은 혈청농도 쪽이 좋다든지, 같은 세포라도 세포밀도에 따라 요구성이 달라질 수 있다는 것에 주의한다. 이 관찰을 통해 100 mm dish 안에서 배지조건을 몇 가지 결정한 후, 그 조건에서의 목적단백질의 양 또는 활성을 측정하여 최종적인 배양조건을 결정한다. 이때 대량정제 계획, 시료보존에 따른 조건도 검토해야 한다. 또한 배지교환의 빈도, 배지의 양도 중요한 고려대상이다.

배지선택에는 모든 상황에서 통상적으로 적용할 수 있는 법칙은 없다. 그러나 경험으로 보았을 때 모든 상황에 쓰일 수는 없지만, 몇가지 표준이라 생각되는 방법은 있다.
여기서는 각각의 경우에 대하여 상세한 설명을 덧붙이지는 않았지만, 실제 조건설정에서 종래의 보고와 약간 다른 배지를 선택할 수도 있다고 생각한다. 여러 가지 정보를 근간으로 각각의 목적에 맞는 배지를 찾을 수 있고, 목적에 맞는 배지의 선택이 중요한 경우가 많고 또한 실험을 제대로 할 수 있도록 해 준다.
특히 전술한 바와 같이 종래의 배지는 증식만을 목적으로 개발된 것이다. 따라서, 분화, 분화형질의 유지 등이 필요한 경우에는 첨가물뿐만 아니라 기초배지에 관해서도 검토를 하는 것이 중요하다.

참고문헌

1) 增井徹: *실험의학*, 8; 865-875, 1990
2) Freshney, R. I.: Culture of aminal cells, Alan Liss, 67-78 1983
3) 管幹雄: 신생화학실험강좌 제18권 세포배양 기술, 동경화학동인, 21-42, 1990

보한 소식

바이오 식품사업 개시

당사는 생명공학 연구 결과로 얻어진 유용한 생물소재를 이용한 바이오식품을 공급하는 바이오 식품 사업을 새로이 시작합니다.

당사의 일본 본사인 Takara Shuzo Co., Ltd. Biomedical 사업부문은 지난 10여년간 당생물학연구에 상당한 투자와 노력을 기울여 왔고 많은 결과를 얻었습니다. 그 중에서 해조류에 많이 존재하는 다당류인 Fucoidan에 관한 연구의 성과로 다시마에서 추출한 U-Fucoidan이 암세포의 세포자살(apoptosis)을 유도하는 것을 발견하여 지난 수년간 관련학회와 논문으로 발표하였습니다. 그 결과에 의하면 U-Fucoidan을 암 세포에 처리하면 암세포의 자살이 유도되어 수일 내에 완전히 사멸하거나 증식할 수 없게 되는 반면에 정상세포에는 전혀 영향을 미치지 않았습니다. 한편 고형 대장암을 누드 마우스에 이식한 경우에도 Fucoidan을 섭식한 경우에는 암이 거의 소실하거나 성장이 멈추는 것을 확인하였습니다.

현재 Takara는 fucoidan의 의약품 개발을 추진하고 있으며, 한편으로는 바이오 식품으로 상품화하여 Apoidan-U라는 상품명으로 지난 1997년부터 일본에서 공급하여 호평을 받고 있습니다. 당사는 이와 같은 생명과학을 기간으로 하는 새로운 사업의 일환으로 바이오식품 사업에 참여하기로 하고 준비를 서두르고 있습니다. 올 가을부터 신제품을 발매할 예정입니다.

'99 TaKaRa Symposium 개최

1996년부터 한국분자생물학회와 공동으로 매년 개최하고 있는 TaKaRa Symposium이 금년으로 4번째를 맞이하게 되었습니다.

금년은 한국분자생물학회 창립 10주년 기념 추계학술대회의 공식 프로그램의 하나로 1999년 10월 25일(월) 오후 3시 30분, 서울 교육문화회관(서울 서초구 양재동)에서 개최됩니다.

금년에도 생명과학 및 생명공학분야에서 가장 화제가 되고 있는 토픽으로 동물복제에 관한 최근의 연구 동향을 서울대학교 수의과대학 황우석 교수께서, 일본의 유전자 변형작물의 현황과 그 검사방법에 관하여 Takara 바이오연구소 가또 이꾸노신 소장이, 유전자 치료의 최근의 동향 및 금후의 전개 방향에 관하여 서울대 유전공학연구소 김선영 교수께서, 또한 Cyanobacterium DNA Chip을 이용한 DNA Chip의 개발과 이용에 관하여 Takara 바이오연구소 아사다 기요조 부소장이 각각 발표할 예정입니다.

새로운 종합카탈로그 Bio21 생명과학 연구용 제품가이드발간

당사의 고객지원사업 중 가장 중요하게 실시하고 있는 종합 카탈로그 Bio21 생명과학 연구용 제품가이드 신판이 발간되었습니다.

95년, 97년에 이어 세번째 발간되는 이번 신판에는 신제품 정보를 추가함은 물론이고 기존의 제품에 관하여도 새로운 정보를 게재하여 보다 알차고 유용하게 이용될 수 있도록 노력하였습니다. 특히 세포생물학 관련제품, 유전자 변형작물 검사용 제품, 유전자 치료 연구용 관련제품, DNA Chip 관련제품, 환경호르몬 관련제품 등이 대폭 강화되었습니다.

카탈로그가 1,000페이지를 넘어 이용에 다소 불편한 점이 있으나 유용한 정보제공을 우선으로 생각하여 간행하였습니다. 내용은 당사의 인터넷에도 게재하도록 하고 계속적으로 내용을 보완하여 CD판으로도 발행할 예정입니다.

제품가이드가 필요하신 분은 전문대리점이나 당사로 연락주시면 무상으로 보내 드립니다.

(주)녹십자양행(02-3471-7437, fax 02-581-0137),

(주)코아바이오시스템(02-841-7530, fax 02-841-7531)

추계학술대회 전시회 참가

당사는 금년에도 예년과 같이 생명과학 관련 학회에서 주관하는 각종 학술대회의 기기 전시회에 참여할 예정입니다.

전시회에서는 최근에 개발된 신제품 정보를 제공하고, 고객과 직접 제품에 관한 상담도 하며 또한 새로 발간한 종합 카탈로그를 무상으로 배포합니다. 또한 전시장 방문 회원에게는 새 천년의 시작인 2000년도 달력을 비롯한 각종 푸짐한 기념품도 증정할 예정입니다.

- IUBMB Seoul Conference
  (한국생화학회, 대한생화학분자생물학회 공동주최)
  10월 10일~14일 서울 힐튼호텔
- 한국분자생물학회
  10월 25일~26일 서울 교육문화회관
- 한국원예학회
  10월 29일~30일 건국대학교(충주캠퍼스)
- 한국생물과학협회(한국미생물학회, 한국동물학회, 한국식물학회, 한국육수학회, 한국생태학회, 한국생물교육학회, 한국동물분류학회, 한국유전학회)
  10월 29일~30일 원광대학교(전북 익산시)

TaKaRa 소식

미국 인디아나 의과대학과 공동으로 추진하는 유전자 치료임상시험연구를 확대

Takara biomedical 사업부문은 recombinant human fibronectin peptide의 일종인 RetroNectin과 retrovirus vector를 이용한 유전자 치료 임상시험 연구에 관한 미국 인디아나 의과대학과의 공동연구계약을 6월 10일자로 갱신하였다. 6명의 시험 실시책임자로 구성된 인디아나대학의 유전자치료 연구그룹이 향후 2년간 실시할 모든 임상시험을 공동연구의 대상으로 포함하였는데, 현재 미국 식품의약품국(FDA)으로부터 뇌종양(Pilot Study), 만성육아종증(Phase I Study), 판코뉴빈혈증(Pilot Study), 배세포종양(Pilot Study), 체외증폭 제대혈 이식(Phase I/II) 등 5가지 임상시험 연구에 관한 승인허가를 받았다. Takara 바이오연구소와 인디아나 의과대학은 세포접착 단백질인 사람 fibronectin의 재조합 펩타이드(RetroNectin)를 culture dish에 coating해 놓은 뒤 조혈모세포와 retrovirus vector를 배양하면 100%에 가까운 유전자 도입이 일어남을 발견하였다(Nature Medicine, 1996).

이 기술은 종래의 조혈모세포에의 유전자 도입이 불가능하다는 대전제를 타파한 큰 발견이었다. 이번 임상시험 연구에 사용하는 GMP 수준의 재조합 사람 fibronectin은 당사의 일본 본사가 가진 특허로 Takara 바이오연구소가 제조하여 인디아나 대학에 무상으로 제공한다. RetroNectin을 사용한 "고효율 유전자 도입법"을 활용한 유전자치료 임상시험 연구는 이외에도 미국 국립알레르기 감염질환연구소(NIAID), 미국 로스엔젤레스 소아병원 등에서 실시하고 있어 그 안전성이나 치료효과를 확실히 인정받고 있다. 앞으로도 Takara biomedical 사업부문은 이 방법을 이용한 유전자치료를 실현하기 위해 계속 노력할 것이다.

유전자 변형 식품의 GMO 함량 정량법을 대두뿐 아니라 두부에도 확립

Takara biomedical 사업부문은 Mitsubishi 상사와 지난 3월 이래 GMO 인증업무를 개시하기 위한 공동검토작업을 하였고, 그 성과의 일환으로 대두 및 두부의 GMO 정량분석 방법을 확립하였다. Takara biomedical 사업부문은 이전부터 일본 생활협동조합 관계 고객들의 강력한 요청에 따라 수탁업무의 일환으로서 정성적 PCR을 이용한 GMO 검사업무를 해왔는데, 근래에 들어서는 이 검사업무가 증가하고 있고 일반 소비자들도 GMO의 사용여부에 대한 명확한 해답을 원하는 욕구가 강해졌다.

대두제품 중에서 DNA가 거의 함유되어 있지 않은 된장, 간장, 청국장 등의 발효제품과 대두유와 같은 것은 검사가 곤란하나, 이 외의 대두제품 중에는 검사가 가능한 것이 많다. 당사는 이번 Mitsubishi사와 협력하에, 미리 GMO 혼합량을 정한 대두와 그 대두를 원료로 만든 두부를 시료로서 GMO 정량분석을 실시하였고, 그 결과로 정확한 정량분석 방법을 확립하였다. 이 방법이 종래의 방법보다 개량된 점은 순도가 높은 DNA를 높은 효율로 추출하는 것, 정확한 정량을 위해 내부 표준물질을 설정하는 것, 정량 PCR법을 사용한다는 것 등의 3가지이다.

Takara는 엄격한 관리에 의한 수송유통 시스템(사회적 검증)의 운용과 정확한 정량 분석법(과학적 검증)을 통해 표시를 함으로써 소비자의 요구에 대응하고자 한다.

다시마에 함유된 다당류의 일종인 「F-Fucoidan」이 생체내에서 간세포증식인자(HGF)의 생산을 유도함을 발견

Takara 바이오연구소는 해조류에 함유되어 있는 기능성 식물섬유에 관한 연구를 10여년간 계속해 왔다. 그 결과 다시마를 비롯한 갈조류에 함유되어 있는 다당류의 일종인 F-Fucoidan이 노화방지에 유효한 것으로 알려진 간세포 증식인자(HGF)의 생산을 생체내에서 현저하게 유도함을 발견하였고 이 성과를 일본 생화학회(10월 6일~9일: 요코하마)에서 발표할 예정이다. 다시마를 비롯한 갈조류는 Fucoidan이라 불리우는 다당류를 건조중량의 약 4% 정도 함유하고 있는데, 이는 L-Fucose의 에스테르화 황산화합물을 주성분으로 분자량이 20만을 훨씬 넘는 거대한 황산화다당이다. 다시마의 끈적끈적한 성질은 주로 이 F-Fucoidan의 물리적 성질에서 유래한다.

놀랍게도 민간에 전해내려 오는 해조식의 효능(①동맥경화, 뇌졸중, 심근경색의 예방 ② 고혈압을 낮춤 ③ 간염에 효능 ④ 항암효과 ⑤ 모발 성장 촉진 등)이 HGF의 효능과 동일함이 밝혀지고 있는데 이는 해조류의 주성분 중 하나인 Fucoidan이 HGF의 생산을 유도한 결과라고 생각한다.

당사는 F-Fucoidan을 함유하는 청량음료 「APOIDAN-U」를 금년 가을부터 국내에 본격적으로 판매 개시할 예정이다. 또 전술한 것처럼 F-Fucoidan의 분해단편(7당 12황산)이 HGF 생산을 유도하는 약품으로 개발될 가능성이 높아졌다. Takara biomedical 사업부문은 HGF 관련특허를 다수 보유하고 있는 (주)소세이와 공동으로 F-Fucoidan을 HGF 생산유도 의약품으로 개발하는 것에 동의하였다. 고령화 사회를 맞이하여 바이오식품부문에서는 건강식품 사업을 「의식품」이라는 컨셉을 토대로 더욱 발전시켜 나갈 계획이다.

한천유래의 agaro-oligo당이 「발암방지 작용」에 이어 「관절염, 류마티스 등 염증성 환자의 예방및치료효과」를 갖는 것을 발견

Takara biomedical 사업부문은 일본인이 항상 즐겨 먹는 해조류에 관심을 가지고 이것에 함유되어 있는 다당류의 화학구조와 그 생리기능의 해명을 위한 연구를 계속해 왔다. 작년, 한천에 함유되어 있는 다당류 agarose로부터 생성되는 「agaro-oligo당」이 사람의 암세포주에 대하여 apoptosis 작용을 일으킬 뿐만 아니라 mouse에 대하여도 경구투여로 암억제작용을 나타냄을 세계 최초로 발견하였다. 그 후 연구를 계속한 결과 한천에서 생성되는 agaro-oligo당이 암의 치료 뿐만 아니라 발암억제(prostaglandin E2 및 TNF-α의 생산 억제)작용 및 관절염 등의 염증성 환자의 예방과 치료에도 효과를 나타낼 수 있다는 기대를 할 수 있게 되었다. 이러한 발견을 금년 일본 암예방연구회(7월 16일~17일 : 동경), 일본 암학회(9월 29일~10월1일 : 히로시마), 일본 생화학회(10월 6일~9일 : 요코하마) 등에서 발표할 예정이다.

Takara biomedical 사업부문은 이러한 연구성과를 토대로 agaro-oligo당이 함유된 청량음료수 "마시는 한천" "마시는 한천-고추" 등을 판매하고 있으며, 공업적으로 agaro-oligo당의 생산체제를 갖추어 전세계에 공급할 예정이다.

Q & A

Q1 *BioWhittaker 사의 정상 사람세포 전용배지의 조제방법은?*

A1 정상 사람세포 전용배지는, 통상 기본배지와 첨가인자 셋트의 조합으로 구성되어 있습니다. 무균적으로 각각의 vial을 열고 셋트에 포함된 모든 첨가인자를 기본배지(500 ml)에 전량 첨가하며, 셋트 중에 FBS가 포함된 경우도 그대로 첨가합니다. 첨가인자를 가한 배지는 2~8℃에서 약 1개월간 안정합니다.

Q2 *Label IT™으로 표식한 핵산을 hybridization의 probe로 사용할 때, probe의 변성방법은?*

A2 DNA의 경우는 킷트에 포함된 Denaturation Buffer를 사용하여 alkali 변성을 수행하고, RNA의 경우 alkali 변성으로는 분해되므로 Denaturation Buffer를 이용하지 않고 55~60℃에서 10분간 열변성합니다. 그 이상의 온도에서는 DNA, RNA 모두가 표식이 되지 않을 가능성이 있습니다.

Q3 *mRNA Selective RNA PCR Kit Ver. 1.1(TaKaRa Code RR025A/B)를 이용하여 증폭한 PCR 산물을 T-vector에 cloning할 수 있는지?*

A3 가능합니다.

Q4 *cDNA library(재조합 균체형)의 보존방법은?*

A4 재조합 균체형 cDNA library는 1회 융해한 후 분주하여 -70℃에 보존하십시요. 수회의 동결융해로 titer가 저하되는 것을 확인한 바 있습니다.

Q5 *Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150)으로 재조합 바이러스를 제조한 경우, 재조합 바이러스를 Cla I 또는 Xho I으로 절단하여 왼쪽 단편을 확인하는 이유는?*

A5 결손 바이러스(삽입유전자를 결손한 mutant)와 야생형 바이러스가 함께 출현하는 경우에, 그들을 구별하기 위해서 입니다. 결손 바이러스는 삽입유전자로부터 왼쪽 말단 사이 서열의 결손이 일어나 있어 왼쪽 단편이 나타나지 않는 경우가 많습니다.

Q6 *In situ Apoptosis Detection Kit(TaKaRa Code MK500) 사용시 methyl green으로 핵염색을 할 때 주의할 점은?*

A6 Methyl green으로 염색한 후에 slide 상의 여분의 methyl green을 가볍게 증류수로 세정한 후, 100% ethanol로 세정하고 탈수조작(10% ethanol→xylene)하여 주십시요. 이 때 80~90% ethanol을 사용하면 methyl green이 탈색할 수 있으므로 주의하시기 바랍니다.

Q7 *pET vector를 발현할 때 비유도조건에서 나타나는 basal level의 발현을 억제하는 방법은?*

A7 pET vector의 발현에 이용하는 숙주는 *lac*UV5 promoter 하류에 T7 RNA polymerase 유전자를 포함하는 λ DE3 용원균입니다. 이 *lac*UV5 promoter는 야생형의 *lac* promoter에 비하여 cAMP/CRP의 자극에 영향을 받지 않는다고 알려져 있습니다. 그러나 최근 λ DE3 숙주를 glucose 미함유 배지에서 stationary phase까지 배양하면 *lac*UV5 promoter에서도 cAMP에 의한 억제해제가 일어남이 보고되었습니다. 따라서 이 상태로 발현하면 pET plasmid가 불안정해 집니다. pET 재조합체를 함유하는 λ DE3 숙주를 stationary phase까지 배양하는 것은 바람직하지 않으며, glucose의 최종농도를 1%가 되도록 배지에 첨가하면(glucose는 cAMP의 생산을 저해) 하룻밤 동안 배양하여도 cAMP에 의한 억제해제 작용을 방지할 수 있습니다. 매우 독성이 강한 목적유전자를 pET로 발현하는 경우에는 glucose를 agar plate와 액체배지 모두에 첨가함으로써 basal level의 발현을 억제할 수 있습니다(*inNovations*, No. 9에서 발췌).

NEW PRODUCTS

NEW

제한효소

Xsp I, *Bsp*T107 I, *Vpa*K11B I

Xsp I(*Bfa* I, *Mae* I)

TaKaRa Code 1095A	500 U
TaKaRa Code 1095B(A×5)	2,500 U

G▏T A G
G A T▕C

농도: 4~12 U/μl
반응온도: 37℃
첨부・활성측정 Buffer: K Buffer
보존: -20℃

[절단부위수]

pUC19	pUC119	pBR322	ϕX174	ColE1	M13mp18	λ	Ad2	pKF3
4	5	5	3	4	5	14	54	5

*Bsp*T107 I(*Hgi*C I)

TaKaRa Code 1223A	1,000 U
TaKaRa Code 1223B(A×5)	5,000 U

G▏G Y R C C
C C R Y G▕G

농도: 4~12 U/μl
반응온도: 37℃
첨부・활성측정 Buffer: K Buffer
보존: -20℃

[절단부위수]

pUC19	pUC119	pBR322	ϕX174	ColE1	M13mp18	λ	Ad2	pKF3
4	5	9	3	2	7	25	57	2

*Vpa*K11B I(*Ava* II)

TaKaRa Code 1196A	300 U
TaKaRa Code 1196B(A×5)	1,500 U

G▏G (A/T) C C
C C (T/A) G▕G

농도: 4~12 U/μl
반응온도: 30℃
첨부・활성측정 Buffer: Basal Buffer
보존: -20℃

[절단부위수]

pUC19	pUC119	pBR322	ϕX174	ColE1	M13mp18	λ	Ad2	pKF3
2	2	8	1	4	1	35	73	1

NEW

Micrococcal Nuclease

TaKaRa Code 2910A	15,000 U

Single strand 및 double strand 핵산에 작용하여 3' P-말단을 생성하는 endonuclease이다.

[용도]
- 세포 조추출액 중 핵산성분의 가수분해
- Nucleosome 제조를 위한 chromatin의 분해

NEW

Insert의 확인을 신속하게 수행하기 위한
Plasmid PCR 반응액

Insert Check PCR Mix

본지 30페이지 참조

One Shot Insert Check PCR Mix

TaKaRa Code RR010A

PerfectShot™ Insert Check PCR Mix(dye 함유)

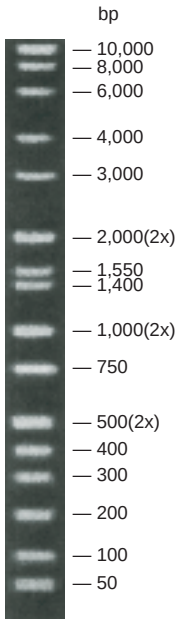
TaKaRa Code RR020A

NEW

Wide-Range DNA Ladder (50~10,000 bp)

TaKaRa Code 3415A	100회

본 제품은 16종의 DNA 단편(50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1,000, 1,400, 1,550, 2,000, 3,000, 4,000, 6,000, 8,000, 10,000 bp)을 함유한 DNA marker이다(그림 참조). 50~10,000 bp의 넓은 범위를 커버하며 각 밴드가 함유하는 DNA 양이 정확하므로, 영동시킨 시료 DNA의 크기결정과 정량을 동시에 할 수 있다. 밴드의 형태를 쉽게 식별하기 위해 500, 1,000, 2,000 bp 밴드는 짙은 농도로 구성하였으며 또한 ladder의 가운데에 1,400 및 1,550 bp의 이중 밴드가 위치하도록 되어 있다.



Wide-Range DNA Ladder의
전기영동 사진(1.2% Agarose Gel)

NEW PRODUCTS

NEW

Human Fetal Brain cDNA Library

plasmid형	
TaKaRa Code 9549	5 μg

재조합 균체형	
TaKaRa Code 9649	500 μl × 2

태아의 뇌에는 비교적 많은 유전자들이 발현하고 있으므로 조직 특이성이 불명확한 유전자를 screening하는데 유용하다. Plasmid DNA형은 PCR로, 재조합 균체형은 colony hybridization으로 screening하는데 적합하므로 용도에 맞추어 사용할 수 있다.

NEW

Differential Display Kit

본지 33페이지 참조

NEW

세포증식 측정용 ELISA Kit

DNA · IdU Labeling and Detection Kit

본지 34페이지 참조

NEW

Cayman Chemical사
산화 스트레스, apoptosis 연구용 시약

본지 38페이지 참조

NEW

BugBuster™
Protein Extraction reagent & Kits

Novagen사의 제품입니다.

BugBuster™ Protein Extraction reagent	
TaKaRa Code NV674	100 ml
TaKaRa Code NV6741	500 ml

BugBuster™ His · Bind Purification Kit	
TaKaRa Code NV675	1 Kit

BugBuster™ GST · Bind Purification Kit	
TaKaRa Code NV676	1 Kit

BugBuster™ Protein Extraction reagent는 대장균의 세포벽을 파괴하고 가용성 단백질을 변성시켜 추출하는 시약이다. 종래에 단백질 추출에 이용했던 기계적인 방법(French press, Sonication)과 비교하여 보다 간단하고 빠르며 비용면에서도 저렴하다. 조작은 원심분리로 집균한 세포를 BugBuster™ Protein Extraction reagent에 현탁하고 incubation한 후, 다시 원심분리하여 불용성 세포잔해를 제거하는 것으로 이루어진다. BugBuster™ Purification Kit에는 BugBuster™ Protein Extraction reagent와 GST · Tag 또는 His · Tag 융합단백질의 정제에 필요한 buffer와 resin이 포함되어 있다.

NEW

BioWhittaker사
사람 초대 조혈세포 시리즈
정상 동물세포 시리즈

본지 48페이지 참조