

13

제 4 권 4 호  
1 9 9 9  
December

# Life Science & Biotechnology

**TaKaRa**  
BIOMEDICALS

# Life Science & Biotechnology

제 13호  
(제 4권 4호)

1999년 12월 1일  
편집인 이제현  
발행인 이제현  
발행처 보한바이오메디칼(주)  
강남구 도곡 2동 451-3

11월 1일 창립 4주년을 맞이하였습니다. 4주년 전진대회로 산정호수 및 명성산에서 심신을 단련하였고 또 연구자 여러분을 위해 저희가 해야 할 일을 다시 한번 생각해 보았습니다.

새 천년이 한달 남짓 남았습니다. 설레이시죠? 무슨 일들이 일어날지 무척 궁금합니다. 하지만 변하지 않는 건 보한은 늘 여러분 곁에 있을 것이라는 겁니다.

뉴 밀레니엄을 축하하기 위해 인터넷 쇼핑 대축제도 마련하였습니다. 새해에도 계획하신 바대로 모든 일들이 잘 진행되기를 바랍니다.

올 겨울은 비교적 포근하답니다. 그러나 그럴수록 감기에 유의하시고 건강하게 잘 지내시기 바랍니다.

2000년에 보다 충실한 모습으로 다시 뵙겠습니다.



Technical Support Line

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



전문대리점

(주)녹십자양행 L/S 사업팀

Tel.02-581-0131~5 Fax.02-581-0137  
E-mail : gmate@chollian.net

(주)코아바이오시스템

Tel. 02-841-7530 Fax.02-841-7531  
E-mail : corebio@hitel.net

· 찾 · 아 · 보 · 기 ·

## 특집 1

TaKaRa DNA Chip(IntelliGene™) 2

## 특집 2

Retrovirus Vector -pDON-AI을 이용한 유전자 도입과 발현 6

## 연재기획 - PCR 기초강좌 12 -

in situ PCR -원리, 문제점 및 분자생물학에의 응용- 9

## 특별논단

신생혈관형성 연구의 동향 및 전망 14

## Technical Tips

1. Anti-human fibronectin antibody를 이용한 면역조직염색의 예 22

2. 진핵세포용 유전자도입 시약 Trans IT® Polyamine Transfection Reagents 25

3. 효소면역법에 의한 유전자변형 대두의 검정수탁서비스 개시 27

## 주목 상품

1. Pyrobest® DNA Polymerase 28

2. Influenza A Virus EIA Kit 30

3. Influenza Virus Typing Set 32

4. Cyclooxygenase(COX) 관련제품 34

5. Sure-RACE™ Multi-Tissue RACE Panels 35

## 실험강좌

Cell line(주세포)의 유지 36

Novagen사 제품 안내 38

FMC사 제품 안내 39

BioWhittaker사 제품 안내 40

보한 소식 42

TaKaRa 소식 45

뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제 46

Q&A 50

신제품 안내 51

# TaKaRa DNA Chip(IntelliGene™)

유전자의 발현 pattern 해석과 기능해석을 체계적으로 하고 SNPs 등의 변이해석을 위한 대량처리 방법으로 DNA chip(DNA microarray)은 현재 비상한 주목을 받고 있다. TaKaRa는 이미 Genetic MicroSystems사의 DNA Chip 제작장치(GMS 417 Arrayer : TaKaRa Code GM100)과 DNA Chip 해석장치(GMS 418 Array Scanner : TaKaRa Code GM200)를 공급하고 있으나, 이번에 기능과 목적에 따른 ready-made 형태의 DNA Chip을 신 발매하였다. 본 고에서는 신발매한 DNA chip 및 그 관련제품을 소개한다.

## ■ DNA Chip

### Cyano CHIP Version 1.0(그림1)

CyanoCHIP은 광합성 gram negative bacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 주의 genome상의 추정 단백질 coding 영역(open reading frame)의 DNA 단편을 정렬·고정화(array)한 것이다. Version 1.0은 90%이상에 해당하는 약 3,000종류의 DNA 단편을 정렬·고정화한 것이다. *Synechocystis* sp.의 total RNA로부터 표식 cDNA probe를 조제하고 본 chip에 hybridization함으로써 이들의 유전자발현을 한번에 해석할 수 있다.

### Human Apoptosis CHIP Version 1.0

사람유래의 기지유전자중 apoptosis에 관련한 약 160종류의 cDNA 단편을 정렬한 DNA chip이다. 사람 세포에서 얻은 RNA(total RNA 또는 polyA<sup>+</sup> RNA)로부터 표식 cDNA probe를 조제하고 본 chip에 hybridization함으로써 각 유전자의 발현을 해석할 수 있다.

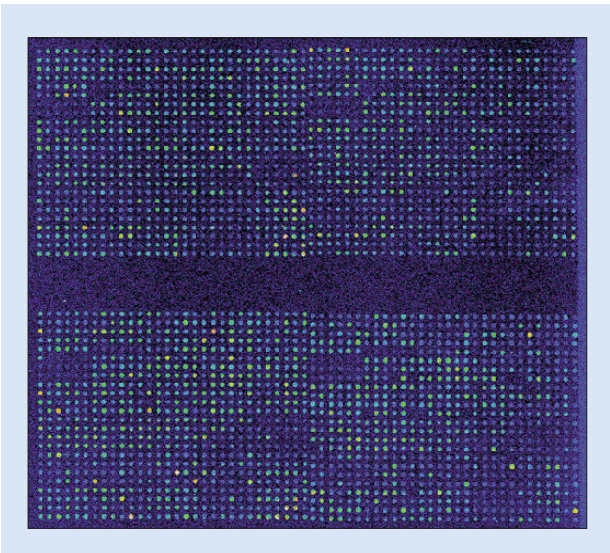


그림 1 CyanoCHIP Version 1.0

### Human Cancer CHIP version 1.0

사람유래의 기지 유전자 중 암에 관련한 약 390종류의 cDNA 단편을 array한 DNA chip이다. 사람 세포에서 얻은 RNA(total RNA 또는 polyA<sup>+</sup> RNA)로부터 표식 cDNA probe를 조제하고 본 chip에 hybridization함으로써 각 유전자의 발현을 해석할 수 있다.

### TestARRAY

DNA chip을 처음 사용하는 연구자들을 위한 조작연습용 chip이다. 사람유래의 기지유전자 39종류와 광합성 gram negative bacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 유래 유전자의 48종류의 DNA 단편을 정렬한 것이다.

## ■ 시약, Kit, 소모품

### Control mRNA λ for DNA Chip

3' 말단에 polyA를 부가한 약 1000 base의 λ RNA이다. DNA chip을 이용한 발현비교실험에 있어서 시료 mRNA를 형광 표식할 때 internal control로 사용한다. 이 λ RNA를 시료에 일정량 첨가하여 표식반응을 함으로써, 2종류 형광물질(Cy3™과 Cy5™)의 반응차와 형광강도차를 보정할 수 있다.

### Control λ DNA PCR Set for DNA Chip

Internal control 실험용 λ DNA를 PCR로 제작하기 위한 template와 primer set이다. 본 set를 이용하여 만든 DNA는 Control mRNA λ와 hybridize하기 때문에, slide glass에 spot하여 DNA chip을 제작하면 Control mRNA λ와 병용함으로써 internal control 실험을 할 수 있다.

### mRNA Fluorescence Labeling Core Set for DNA Chip

AMV RTase XL을 이용하여 mRNA를 주형으로 형광표식 probe를 만들기 위한 core kit이다. 본 kit에 Cy3™-dUTP나 Cy5™-dUTP를 첨가하여 반응함으로써 효과적으로 형광 probe를 만들 수 있다.

### TaKaRa Slide Glass for DNA Chip

DNA chip 제작용으로 개발한 slide glass이다. 균일하고 높은 효율로 DNA를 고정화할 수 있도록 특수 coating을 하였다.

### TaKaRa Cover Glass for DNA Chip

DNA chip상에서 hybridization을 실시하기에 적절한 크기로 만든 cover glass이다.

## ■ 사용례

### CyanoCHIP Version 1.0

광을 이용한 독립영양증식(명 조건)의 경우와 glucose를 이용한 증식(암 조건)에서의 *Synechocystis* sp. PCC6803 주의 유전자 발현을, CyanoCHIP Version 1.0을 이용하여 비교하였다. 먼저 균주를 BG-11 배지로 OD<sub>730</sub>=0.6까지 배양하였다. 배양액 중 하나에 glucose(최종농도 5 mM)과 광합성저해제 3-(3', 4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea(최종농도 5 $\mu$ M)를 첨가하고 차광조건에서 6시간을 더 배양했다. 각각의 배양액으로부터 균체를 회수하고 각 균체로부터 total RNA를 추출하였다. 다음에 각 RNA 15  $\mu$ g을 AMV RTase XL을 이용하여 형광물질 Cy3™(명조건) 또는 Cy5™(암조건)으로 각각 표식하여 probe를 제작하였다.

두 probe를 혼합하여 CyanoCHIP상에서 65°C, 12시간 hybridization한 뒤 세정을 하였다. GMS 418 Array Scanner를 이용하여 각각의 형광신호를 scanning하고, 해석 software ImaGene™을 이용하여 data를 해석하였다. 암조건 배양균체에서 유래한 probe의 hybridization 결과와 두 조건(명, 암)의 영상을 중첩한 결과 및 ImaGene™으로의 해석결과(scatter plot)를 그림 2에 나타내었다.

### Human Apoptosis CHIP Version 1.0

배양세포 HL60에 actinomycin D를 처리하여 apoptosis를 유도하고, 처리전후에서의 유전자 발현을 Human Apoptosis CHIP Version 1.0을 이용하여 비교하였다. HL60을 RPMI1640 (10% FBS함유) 배지로 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml까지 배양한 후 최종농도 1 $\mu$ g/ml의 actinomycin D를 첨가하고, 4시간후 sampling하였다. 각각의 시료로부터 total RNA를 추출하고 각 total RNA 50  $\mu$ g을 AMV RTase XL을 사용하여 형광물질 Cy3™(0시간) 또는 Cy5™(4시간)으로 형광표식하여 probe를 제작 하였다. 두 probe (0시간의 시료와 4시간의 시료에서 유래한 probe)를 혼합하여 Human Apoptosis CHIP상에서 65°C, O/N hybridization한 다음 세정하였다. GMS 418 Array Scanner를 이용하여 각각의 형광신호를 scanning하고 해석 software ImaGene™을 이용하여 data를 해석하였다. 0시간과 4시간째 시료의 hybridization 영상 overlay와 ImaGene™으로의 해석결과(scatter plot)를 그림 3에 나타내었다.

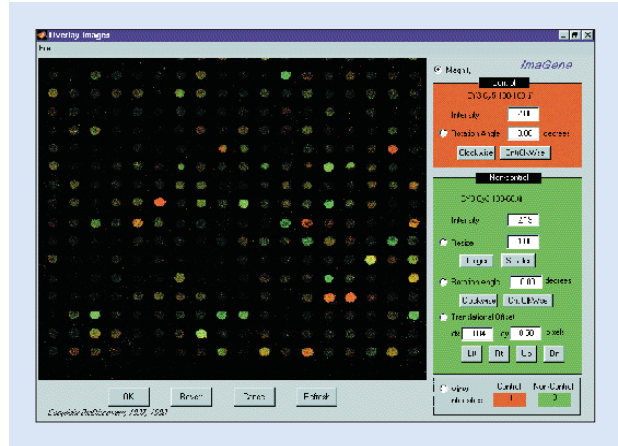


그림 2-1 CyanoCHIP 실험례

각 조건(명암)으로 6시간 배양한 균체에서 유래한 Cy3™(명) 및 Cy5™(암) 표식 probe를 혼합하고, CyanoCHIP상에서 hybridization하였다. 두 형광 신호를 scanning하고, 해석 software를 이용하여 두 영상을 중첩하였다(그림은 그 일부). 빨간 spot는 암조건에서 발현이 증가함을 나타내고, 녹색의 spot는 반대로 감소함을 나타낸다.

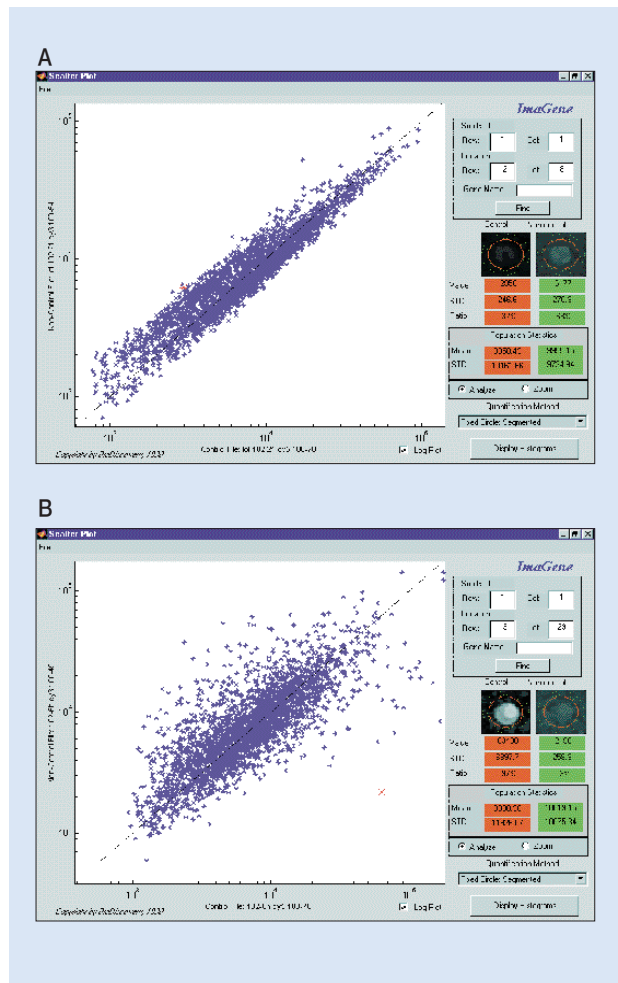


그림 2-2 CyanoCHIP 실험례

각 조건에서 6시간 배양한 균체의 유전자 발현 Scanning Plot(X축은 암조건, Y축은 명조건의 결과를 나타낸다). 0 시간(A)과 비교하면, 암조건으로 옮김으로서 상당수 유전자의 발현이 변화함을 알 수 있다.

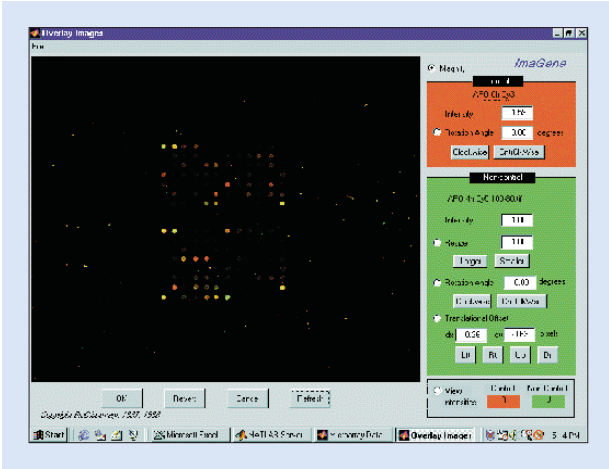


그림 3-1 Human Apoptosis CHIP의 실험례

Actinomycin D 첨가 전(0시간) 및 첨가 4시간후의 probe를 Human Apoptosis Chip상에서 hybridization하고 scanning한 후 해석 software를 이용하여 화상을 중첩하였다. 빨간 spot는 Actinomycin D 첨가 후에 발현이 감소하였음을 보여 준다.

### Human Cancer CHIP

정상인의 말초혈관 단핵세포(HPBMC : TaKaRa Code C2702)와 주세포 K-562(사람 만성골수성 백혈병세포)에 있어서의 유전자발현을 Human Cancer CHIP을 이용하여 비교하였다. HPBMC를 LGM-3 배지(TaKaRa Code : B3215)로 K-562 세포를 RPMI1640 배지(10% FBS함유)로 배양하여 세포를 얻었다. 각각  $3 \times 10^6$  cells와  $5.6 \times 10^6$  cells의 세포로부터 total RNA를 추출하고 각 50  $\mu$ g을 Cy3™(정상인 말초혈관 단핵세포) 또는 Cy5™(K-562 세포)로 형광표식하여 probe를 제작하였다. 두 probe를 혼합하여 Human Cancer CHIP상에서 65°C, O/N hybridization하고 세정하였다. GMS 418 Array Scanner를 이용하여 각각의 형광신호를 scanning하고, 해석 software ImaGene™으로 data를 해석하였다. 두 세포에서 유래한 probe의 hybridization 결과와 ImaGene™을 이용한 유전자발현 해석결과(GenePie와 Scatter plot)를 그림 4에 나타내었다.

앞으로도 TaKaRa는 유전자의 수를 더욱더 늘린 Human Chip과 기타 생물의 DNA Chip을 개발하여 판매할 예정이다.

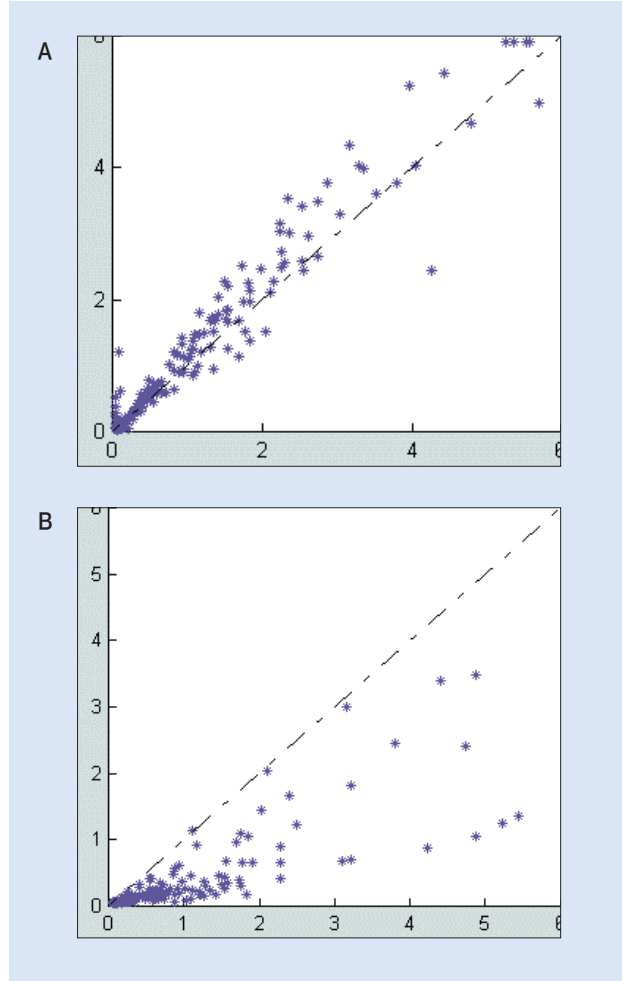


그림 3-2 Human Apoptosis CHIP의 실험례

Actinomycin D 첨가 전(0시간) 및 첨가 4시간후의 발현변화를 ImaGene™으로 해석 한 그림(Scatter Plot). 첨가전(X축)에 대한 첨가후(Y축) 0시간(A)과 4시간(B)의 발현량 Plot.

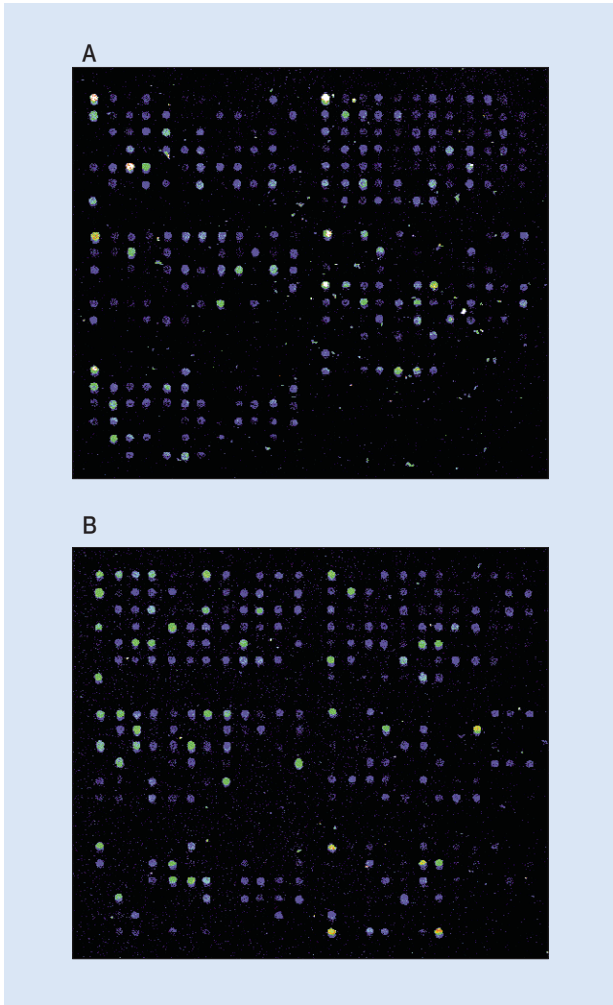


그림 4-1 Human Cancer CHIP 실험례  
 정상인 말초혈관 단핵세포와 주세포 K-562(사람 만성골수성 백혈병 세포)에서 유래한 probe를 혼합하여 Human Cancer CHIP상에서 hybridization하고 scanning한 결과(A: 정상인 말초혈관 단핵세포, B: K-562).

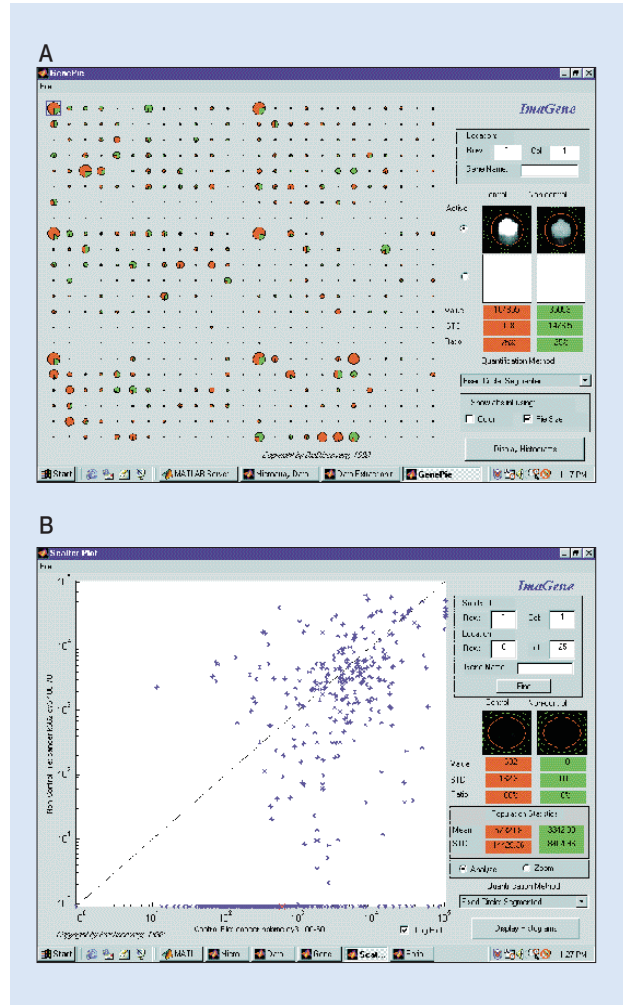


그림 4-2 Human Cancer CHIP 실험례  
 여러 가지 발현 변화를 ImaGene™으로 해석 한 그림 (A: GenePie, B:Scatter Plot)

**【DNA CHIP 관련제품】**

제품명	TaKaRa Code
DNA Chip 제작장치(GMS 417 Arrayer)	GM100
DNA Chip 해석장치(GMS 418 Array Scanner)	GM200
발현 Data 해석 Software(ImaGene™ Version 3.0)	BD001

# Retrovirus Vector- pDON-AI을 이용한 유전자 도입과 발현

동물세포로의 유전자 도입방법에는 virus vector를 이용한 생물학적 방법, liposome과 DEAE-dextran, 인산칼슘 등을 이용한 화학적 방법, electroporation 등의 물리적 방법이 있는데, 각 방법은 일정 일단을 가진다. 표적 세포로의 유전자 도입 효율면에서는 virus vector를 이용하는 방법이 다른 방법보다 우수하다. 특히 retrovirus vector는 표적세포의 genome내에 외래유전자를 용이하고 안정하게 도입할 수 있다. TaKaRa는 retrovirus vector의 일종인 pDON-AI을 공급하고 있다(본지 10호 11페이지 참조). 본 vector는 종래의 것과 달리 5' 측 LTR의 U3영역에 HCMV IE promotor를 가지고 있어 vector의 전사효율이 높고 고역가의 vector virus를 얻을 수 있다. 본고에서는 pDON-AI을 이용하여 clone 유전자를 동물세포에 도입하고 유전자 산물의 발현을 해석한 실험예를 소개한다. 발현 model로서 HER2/neu을 이용하였는데 HER2/neu 유전자산물은 185 kDa의 막관통 당쇄단백질로 세포외부에는 ligand 결합영역을 세포내에는 tyrosine kinase 영역을 가진다.<sup>2,3)</sup>

## ■ 실험례 1 : Vector virus의 조제

### 【조작】

HER2/neu 발현용 vector virus를 만들기 위해 그림 1에 나타난 것처럼 HER2/neu cDNA(4.6 kbp)를 pDON-AI의 Hpa I부위에 삽입한, vector plasmid pDON-AI:HER2/neu를 제작하였다. 이 vector plasmid를 인산칼슘법으로 packaging 세포 BOSC23에 도입하였다. 도입세포의 배양상청액을 0.45µm의 filter로 여과하여 ecotrophic virus액을 얻었다(vDON-AI/eco:HER2/neu).

Ampotrophic vector(vDON-AI/am:HER2/neu)는 앞에서 기술한 ecotrophic vector vDON-AI/eco:HER2/neu를 polybrene의 존재하에서 packaging세포 293CRIP에 감염시켜 조제하였다. 얻은 virus액의 역가는 아래와 같이 측정하였다. 즉, 감염조작 전 날에 미리 5×10<sup>4</sup> cell/well이 되도록 gelatin coated 6-wells plate에 접종한 NIH/3T3세포에, 10~10<sup>6</sup>으로 희석한 상기 virus액(7.5 µg/ml의 polybrene을 포함)을 well당 1 ml 첨가한 후 2시간 배양하였다. 다음에 2 ml/well로 배지를 첨가하여 하룻밤 더 배양하였다. 감염 후 0.75 mg/ml의 G418을 함유한 배지에 세포를 10~14일간 배양하고 생육한 G418내성 clony 수를 측정하였다.

### 【결과】

표 1에 나타난 것처럼 ecotrophic virus의 역가는 1.4×10<sup>6</sup> cfu/ml이었고 ampotrophic vector의 역가는 6.2×10<sup>6</sup> cfu/ml이었다. 또 ampotrophic virus의 경우에 있어서 G418 선별후의 역가는 선택전에 비하여 약 60배에 이르렀다(표 2).

표1 획득한 virus 역가

Vector virus	역 가
vDON-AI/eco : HER2/neu	1.6 × 10 <sup>6</sup> cfu/ml
vDON-AI/am : HER2/neu	6.2 × 10 <sup>6</sup> cfu/ml

표2 G418 선별전후의 ampotrophic virus의 역가 비교

	역 가
선택 전	1.0 × 10 <sup>4</sup> cfu/ml
선택 후	6.2 × 10 <sup>6</sup> cfu/ml



그림 1 Vector plasmid pDON-AI : HER2/ neu의 구조

### ■ 실험레 2 : Vector virus vDON-AI/eco : HER2/neu에 의한 HER2/neu 유전자의 세포내 도입과 발현

#### 【조작】

실험레 1에서 조제한 ecotrophic vector virus vDON-AI/eco:HER2/neu에 의한 유전자 도입에는 NIH/3T3세포를 표적세포로 이용하였다. 즉 미리  $5 \times 10^4$  cell/well이 되도록 gelatin coated 6-wells plate에 접종한 NIH/3T3세포에,  $1 \times 10^4$  cfu/ml의 vDON-AI/eco:HER2/neu 및  $7.5 \mu\text{g/ml}$ 의 polybrene을 포함한 배지를 well당 1 ml씩 첨가하고, 실험 1과 동일한 순서로 vector virus를 감염시켰다. 감염후 세포를  $0.75 \text{ mg/ml}$ 의 G418 함유배지로 배양하고 유전자 도입세포를 선별하였다. 유전자 도입세포내에서의 HER2/neu 유전자산물의 발현은 1차 항체로 p180HER-2 monoclonal Ab(clone No. 2G11, TaKaRa Code H120)을, 2차 항체로 anti-mouse IgG-FITC labeled Ab를 이용하여 FACS로 해석하였다.

#### 【결과】

vDON-AI/eco:HER2/neu를 도입하여 neomycin 내성이 된 NIH/3T3세포의 75%이상에서 HER2/neu의 발현을 확인할 수 있었다(그림 2).

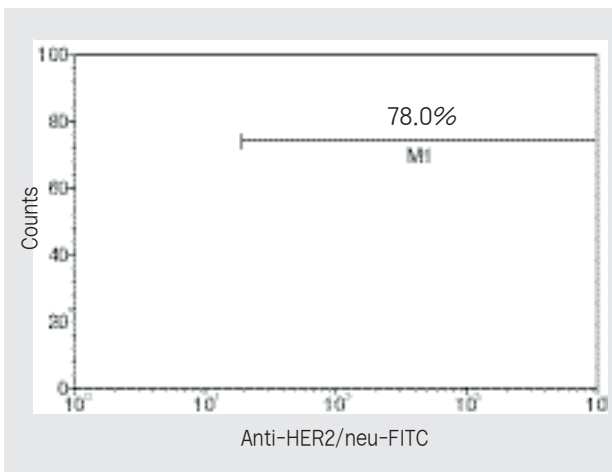


그림 2 Vector virus vDON-AI/eco : HER2/neu로 유전자를 도입한 NIH/3T3 세포의 HER/neu의 발현

### ■ 실험레 3 : Vector vDON-AI/am : HER2/neu에 의한 HER2/neu 유전자의 세포내 도입과 발현

#### 【조작】

실험레 1에서 조제한 amphotrophic vector virus vDON-AI/am:HER2/neu에 의한 유전자 도입에는 사람 암세포주 HSC3 및 MKN1 세포를 표적세포로 이용하였다.  $1 \times 10^4$  cfu/ml의 vDON-AI/am:HER2/neu를 함유하는 배지로  $2 \times 10^4$  cell/ml이 되도록 이들 세포를 현탁한 후, RetroNectin<sup>4-7</sup> coated 6-well plate에 1 ml/well이 되도록 첨가하여 하룻밤 감염시켰다. 감염후 G418 함유배지로 14일간 배양하여 유전자 도입 세포를 선별하였다. 선별후의 세포는 실험레 2와 동일하게 FACS로 HER2/neu의 발현을 분석하였다.

#### 【결과】

HSC3 세포의 경우 neomycin 내성을 가지는 80%이상의 세포에서, MKN1 세포의 경우는 70%이상의 세포에서 HER2/neu의 발현을 확인할 수 있었다(그림 3-A 및 3-B).

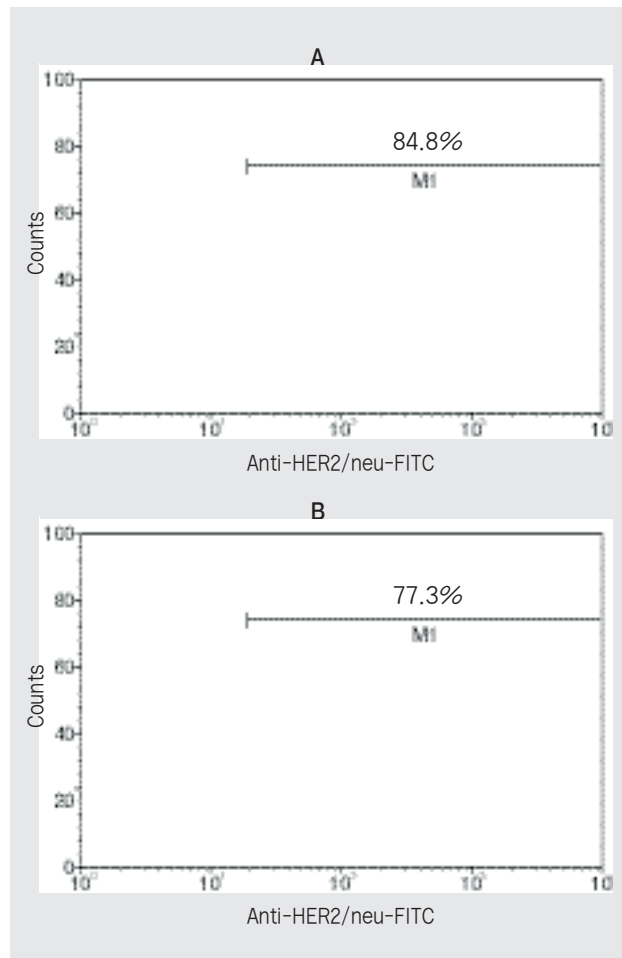


그림 3 Vector virus vDON-AI/am : HER2/neu에 의해 유전자를 도입한 NIH/3T3 세포의 HER/neu의 발현

A : HSC3 세포의 경우  
B : MKN1 세포의 경우



■ 고찰

pDON-AI plasmid vector(그림 4)는 5'-LTR중에 HCMV·IE promoter을 가지므로<sup>1)</sup> 실험체 1에서 BOSC23 세포를 이용한 것처럼 과량의 virus 생산에 의해 고역가의 virus액을 조제할 수 있다. 이는 동일한 실험체 1에서와 같이 amphotrophic virus의 조제에 유리한 조건이 된다. 본 예의 경우, 표 2에 나타난 것처럼 G418 선별후의 또는 polyclonal한 세포집단으로부터 약 6×10<sup>5</sup> cfu/ml의 virus액을 조제할 수 있었다. 이와 같이 집단을 구성하는 clone의 평균치는 10<sup>5</sup> cfu/ml order에 이르렀다. 이 예에서는 그 이상의 mono clone화를 진행하지는 않았지만 그 집단 중에서 고역가주가 clone화될 가능성은 매우 높다. Retrovirus vector의 경우 표적세포에 감염하면 genome의 integration 과정에서 3'-LTR배열의 5' 쪽으로의 jump에 의해 5'-LTR은 3'-LTR로 자리바꿈을 한다. 따라서 본 실험에 이용한 pDON-AI의 경우 그 vector virus가 감염된 표적세포에서 HER2/neu 유전자는 HCMV·IE promoter을 포함하지 않고 본래의 LTR이 가지는 promoter의 활성화에 의해 발현된다. 한편 neomycin 내성유전자는 SV40 promoter에 의해 발현된다. 본 실험체에서는 G418내성을 가진 세포중 적어도 70% 이상이 HER2/neu 단백질을 발현하였다. 이것은 vector내에 있는 HER2/neu와 neomycin 내성 유전자를 동시에 높은 효율로 발현할 수 있음을 의미한다. 또 FACS 해석 결과를 보면 HER2/neu 발현세포의 histogram이 control 세포의 histogram과 잘 구분되어(강형광쪽으로 shift), 다량의 HER2/neu 단백질이 발현하고 있음을 알 수 있다.

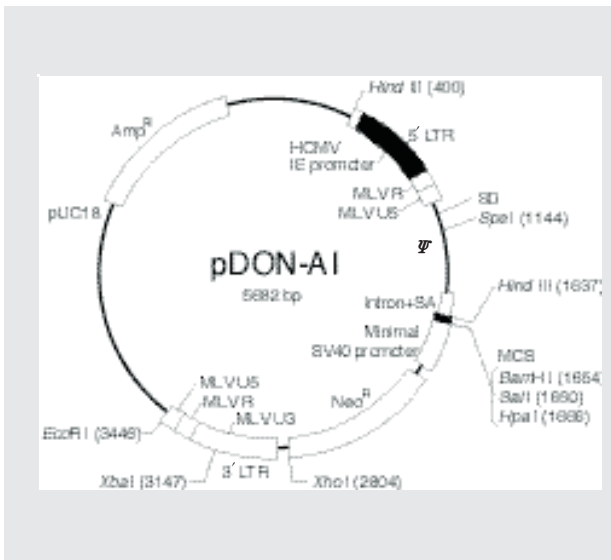


그림 4 pDON-AI DNA

■ 참고문헌

- 1) BIOVIEW 27, 7-9
- 2) Slamon, D.J., Godolphin, W., Joes, L.A, Holt, J.A, Wong S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ulrich, A., and Press, M.F(1989) *Science* **244**, 707.
- 3) Thompsos, J.A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991) *J. Clin. Lab. Anal.* **5**, 344.
- 4) BIOVIEW **21**, 2-4
- 5) BIOVIEW **22**, 2-4
- 6) Hanenberg, H., Xiao, X.L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D.W. (1996) *Nature Medicine* **2**, 876.

■ 제품목록 및 관련제품

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

■ 본 제품 사용상의 주의점

본 제품을 이용한 실험에서는 아래의 사항에 주의하여 주시기 바랍니다.

- 사용시 관할 기관 및 안전위원회의 재조합 실험지침에 따라 실시해야 합니다.
- 본 제품은 연구목적 이외에는 사용할 수 없습니다. 사람, 동물의 치료 및 임상진단에는 사용하지 않도록 주의하여 주시기 바랍니다.  
(또한 본 제품에 의해 획득한 생물 재료는 제 3자에게 양도할 수 없습니다)
- 본 제품을 연구목적이외에 사용하는 경우는 사전에 당사로부터 문의하여 주시기 바랍니다.

# *in situ* PCR

## -원리, 문제점 및 분자생물학에의 응용- Aoyagi Kazuko

*In situ* PCR은 종래의 *in situ* hybridization이 가진 세포 수준에서의 해석력과 PCR의 고감도성을 겸비한 기술이다. 이 기술로 단일 또는 극히 적은 copy수의 유전자를 검출할 수 있다. 여기서는 *in situ* PCR법의 원리 및 문제점을 소개함과 동시에 분자생물학에의 응용에 관하여 소개한다.

### 서론

*in situ* hybridization이 가지는 세포 수준에서의 유전자 해석력에 PCR이 갖는 고감도성을 가미함으로써 *in situ* PCR이라는 새로운 기술이 탄생했다(그림 1).<sup>2,3)</sup> 종래의 *in situ* hybridization에 의한 검출에서는 세포에 따라 10~20 copy의 표적유전자 서열이 필요하였다. 그런데 최근 주목을 받고 있는 AIDS(후천성 면역결핍증)의 원인인 HIV(human immunodeficiency virus) 등의 retrovirus는 감염후에 세포내에 존재하는 HIV genome의 copy수가 극히 적어 종래의 *in situ* hybridization으로는 검출이 불가능하였다. 따라서 조기 진단과 치료를 위해서는 고감도의 검출방법이 필요하고, *in situ* PCR에 의한 증폭으로 1개 또는 copy수가 적은 유전자서열의 검출도 가능해졌다. 이 기술은 앞으로 병리학뿐만 아니라 분자생물학의 여러 분야에도 응용 되리라는 것은 의심할 여지가 없다. 본 고에서는 *in situ* PCR 기술의 원리를 소개함과 동시에 그 문제점 및 응용의 장래성에 대해 서술한다.

### 1. *in situ* PCR의 원리 및 방법

*In situ* PCR은 고정된 세포 또는 조직의 절편상에서 PCR을 하는 것이다. 표적유전자 서열을 증폭한 후에는 *in situ* hybridization(간접법)을 하거나 또는 PCR 중에 유입한 표식된 염기를 항체법(직접법)을 이용하여 검출한다. 그림 1은 slide glass 상에서 *in situ* PCR을 실시하는 조작법을 나타낸 것이다. 이 밖에 tube내에서 PCR을 한 후에 형광표식을 이용하여 flowcytometry로 검출하는 방법도 있다.<sup>4)</sup>

#### 1. 시료의 제작

### A. 고정

세포나 조직의 형태 보존을 위하여 여러가지 고정액을 이용하고 있다. 일반적으로 널리 이용하는 고정액은 cross-link계의 paraformaldehyde(1~4%)와 10% 완충 formalin액이다. 이외에 cross-link계(알코올, 초산, 아세트도 이용되고 있다)중에서는 STF(STreckK, fixative : 미국 Streck Laboratories사 판매)를 사용하기도 한다.<sup>1)</sup> *in situ* PCR에 부적당한 고정액으로서는 pyricinic acid를 함유하는 고정액외에 철 또는 수은 등의 증금속을 함유하는 것들을 들 수 있다. 고정 시간은 시료의 크기와 종류에 따라 다르다. 예를 들어 배양세포에서는 단시간(20분 정도) 고정시키는 경우와 8~24시간 또는 장시간 고정하는 경우가 있고, 조직표본의 경우는 1~수일간 고정할 필요가 있다. 연구자에 따라 시료를 제작하는 방법에는 상당한 차이가 있다.<sup>5)</sup> 단, 장시간 고정시킬 경우에는 PCR 시약이나 primer가 세포내의 주형배열에 침투할 수 있도록 효소로 전처리 해 주는 것이 좋다.<sup>6)</sup>

### B. Protease 분해

단시간 고정하는 경우에는 protease 분해가 반드시 필요한 것은 아니지만 장시간 고정하는 경우에는 필요하다. 이에는 proteinase K, pepsin, trypsin 등을 흔히 사용한다. 소화에 필요한 시간은 고정시간에 비례한다. Protease의 농도 또는 분해 시간을 변화시켜, 시료마다 최적조건을 검토할 필요가 있다. 고정과 분해의 최적화가 *in situ* PCR의 성공여부를 가름해 준다.<sup>6)</sup> 분해가 충분치 않으면 Taq polymerase나 표식물질을 함유하는 기타 시약이 세포내의 DNA에 도달할 수 없다. 그러나 그림 2에서 나타낸 것처럼 amplicon이 작은 경우에는 과잉 소화되면 증폭된 DNA가 세포 밖으로 유출해 버린다(그림 2 참조). 시약중의 primer, 염기, 효소를 침투하면서 그

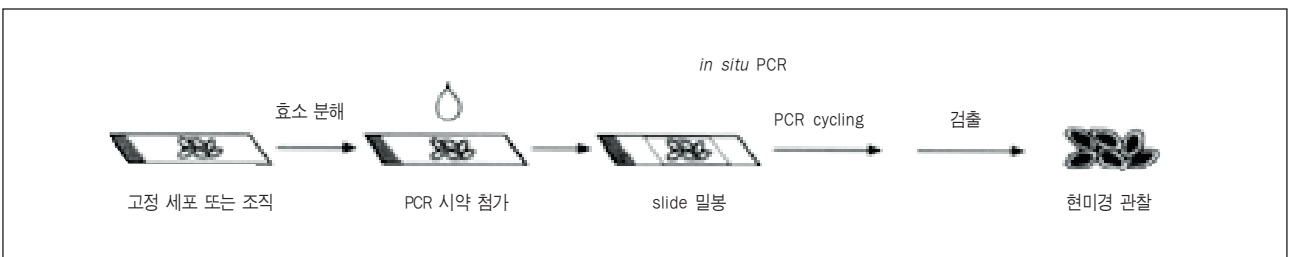


그림 1 *in situ* PCR

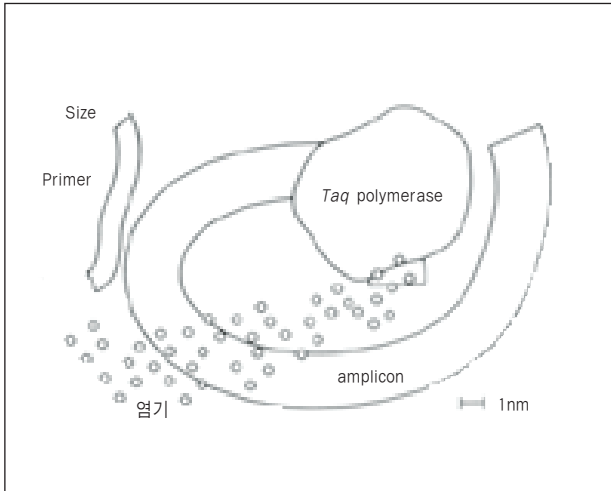


그림 2 증폭 배열과 PCR 시약의 크기 비교

보다 크게 증폭된 DNA를 유출시키지 않도록 하는 것은 상당한 경험이 필요하다.

## 2. in situ PCR에 의한 증폭

### A. 반응액과 PCR조건

Slide glass 상에 고정된 세포 또는 조직으로 PCR을 할 경우 액상 PCR과 같이 반응액의 최적화가 중요하다. 주형의 배열을 기준으로 몇 개의 primer를 만들어 시험해 보는 것이 좋다. 필자의 연구실에서는 1× in situ PCR core buffer II (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2.5~4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM 각 염기, 0.5 μM primer와 10 U Taq polymerase를 섞어 사용한다. Glass slide 상에서 실시하는 in situ PCR은 plastic tube내에서 실시하는 액상 PCR과 여러가지 면에서 근본적인 차이점이 있다.

첫째, cover slip의 표면적과 체적 비율은 tube보다 약 10배 더 크다. 따라서 효소나 magnesium이 glass의 표면에 비특이적으로 부착하여 소실될 가능성이 있다.<sup>7)</sup> 이를 고려하여 액상 PCR보다 많은 양의 효소를 첨가해 준다.

둘째, 세포의 용적은 tube보다 1/10000 정도 작다. 이론적으로는 단일 copy수의 유전자의 경우 액상 PCR보다 훨씬 적은 cycle 수(약 10회)로 검출할 수 있다(표 1 참조). 표 1에 나타

낸 것처럼 1 copy를 주형으로 한 경우 약 11회 cycle 동안 2,000 copy가 핵내에 축적된다. 이것은 hybridization으로 용이하게 검출할 수 있는 수이다. 그러나 실제로 in situ PCR에서는 액상 PCR 보다 낮은 증폭효율을 가짐이 보고되었다.<sup>12)</sup> Cycle 수를 늘리면 세포조직의 형태 보존성이 저하하고 증폭된 DNA가 세포밖으로 유출할 가능성이 있다. PCR 조건을 최적화하여 최소의 cycle수로 높은 효율로 증폭함이 중요하다. 셋째, 조직형태를 보존하기 위해 PCR 조건의 간소화가 필요하다. 일반적인 3단계(예를 들어, denaturation, annealing, extension)을 열변성 93°C 10초, annealing 55°C 1분(primer의 길이, GC함량등을 디자인할 때 고려하는 것이 필요)의 2단계 반응으로 줄임으로써 전체적으로는 PCR의 소요시간을 단축하는 것이 좋다. 그러나 이 경우는 slide 전용의 thermal cycler가 필요하다.

### B. PCR Thermal Cycler

Slide glass상에 PCR 시약을 첨가한 후, cover slip으로 절편을 덮는다. 열에 의한 시약의 증발을 막기 위해 메니큐어 또는 rubber cement등으로 cover slip을 밀봉한다. 종래의 block방식의 cycler을 사용 할 경우 mineral oil을 이용하여 열전도를 개량할 필요가 있다.

### C. 대조(Control)

PCR은 고감도이므로 매회 대조반응을 실시 하는 것이 중요하다.

음성대조(negative control)의 예로서 아래의 것들을 들 수 있다.

- 1) 1 쌍의 primer의 한쪽 부분만을 사용한다.
- 2) 효소를 첨가하지 않는다.
- 3) 아무 관련 없는 primer를 사용한다.
- 4) Primer 없이 한다.
- 5) 표적 DNA 또는 RNA를 함유하지 않은 조직을 사용한다.
- 6) mRNA가 표적인 경우 RNase 또는 DNase를 처리한다.

양성대조(positive control)의 예로서는 아래의 것들을 들 수 있다.

- 1) 표적 DNA나 RNA를 다량 함유한 조직을 사용한다.
- 2) 시료 제작과 분해에 성공하였는지 여부는 사람조직의 경우 Alu 서열<sup>11)</sup>이나 핵내에 다수의 copy가 존재하는 배열을 증폭한다.

표 1 Plastic tube내와 세포내에서의 copy 수 비교

	직경 (μm)	용적 (μm <sup>3</sup> )	copy 수 (1 × 10 <sup>7</sup> M 상당)	1 copy를 주형으로 하는 경우 필요한 cycle 수
세포질	9	348	20,961	15
핵	4	34	2,071	11
소핵	1	1	32	5
plastic tube	4.6 mm	50 μl	3 × 10 <sup>12</sup>	42

\*1 사람의 DNA에 함유된 약 300 염기쌍으로 구성되어 있는 약 30만 copy의 반복 염기서열

표 2 in situ PCR 응용

목적	시료	검출법	연구자(문헌)
<b>A. 외래성</b>			
Lentivirus DNA	양 맥락망상세포	간접	Haase 등(3)
HPV DNA	사람자궁경 조직	간접	Nuovo 등(15)
	SiHa 세포	직접	Zehbe 등(16)
HIV-1 DNA	Caski, SiHa 세포	간접	O'Leary 등(14)
	SUP-T1세포	간접	Begasra 등(2)
	HUT78 세포	직접	Spann 등(17)
	백혈구	직접	Nuovo 등(18)
HIV-1 mRNA	단핵구	간접	Bagasra 등(19, 20)
	임파구, 임파절	간접	Embretson 등(21, 22)
HIV-1 mRNA	뇌세포, T세포	간접	Patterson 등(4)
유종양 virus DNA	유선조직	간접	Chiu 등(23)
C 형 간염 virus RNA	간장조직	직접	Nuovo 등(24)
CMV DNA <sup>a)</sup>	MRC5 세포	간접	Komminoth 등(10)
	폐조직	간접	Long 등(25)
B형 간염 virus DNA	간장조직	간접	Long 등(25)
	<i>Helicobacter pylori</i> <sup>b)</sup>	소화기관	직접
<b>B. 내인성</b>			
VH <sup>c)</sup> 유전자 전위 DNA	혈액	간접	Komminoth 등(10)
VH mRNA	Mouse hybridoma 세포	간접	Embieon 등(26)
염색체의 전자	Hybridoma 세포	간접	Long 등(25)
염색체 mapping	중기 염색체	직접	Gosden 등(27)
뇌성장요인 RNA	뇌조직	직접	Staecker 등(28)
포포린 RNA	임파구	직접	Chen 등(29)
EGP receptor RNA	표피조직	직접	Heniford 등(30)
P53 암유전자	암종양 세포	직접	Pestaner 등(31)
억제인자			

a) Cytomegalo virus (CMV), b) *Helicobacter pylori* ; 세균의 일종, c) VH immunoglobulin의 heavy chain의 가변영역

### 3. 검출방법

검출방법에는 간접법(*in situ* hybridization)과 직접법(표식한 염기 또는 primer을 이용하여 PCR로 증폭한다)이 있다. 직접법은 간접법에 비하여 비특이적으로 유입된 표식으로 인해 noise가 많은 것이 문제이다. 시료의 제작방법 특히 고정 방법에 따라 signal과 noise의 비를 조절할 수 있다는 학설도 있다. 영국 Leed 대학의 Lewis 박사는 microwave oven을 이용하여 특수한 고정법을 실시하는 직접검출법을 사용하고 있다. 미국 뉴욕시립대의 Nuovo 교수는 *Taq* polymerase 효소는 수복능력을 가지고 있으며, 이 작용에 의해 genome DNA의 GAP이나 절단된 곳이 수복될 때 비특이적으로 표식한 염기를 incorporation 하는데 이것이 noise의 원인이 된다고 한다. 모든 genome DNA를 DNase로 처리하면 RT-PCR의 경우에는 직접법을 이용할 수 있다.<sup>6)</sup> 그러나 일반적으로는 간접법이 신뢰성이 있다. Hybridization의 probe로서는 biotin,

digoxigenin<sup>2)</sup> 등을 이용한 비방사성 동위원소계를 추천한다. Probe는 안정하여 몇 개월동안 냉동실에 보존할 수 있을 뿐만 아니라 signal의 고감도성과 해상력도 방사성 동위원소보다 우수하고, 취급면에서도 안전하고 신속하다.

### 4. in situ PCR법의 현재 상황

*in situ* PCR법은 과거 5년간 몇몇 연구실에 의하여 개발되었다. 대상 유전자가 다를 뿐만 아니라 시료, 고정, PCR의 protocol을 비교하여도 두가지 이상 같은 것이 없다. 따라서 분자생물학분야에 사용되고 있는 "Molecular Cloning"<sup>9)</sup>과 같은 protocol집이 유감스럽게도 존재하지 않는다. *In situ* PCR을 할 때에는 많은 parameter를 고려해야 한다.

아래에 그 예를 들었다.

- 1) 시료 (배양세포, 조직절편, cytospin 등)
- 2) 유전자서열과 그 copy수(외래 또는 내재)

<sup>2)</sup> digoxigenin-11-dUTP, Boehringer Mannheim사

- 3) PCR primer (1 쌍 또는 복수쌍)
- 4) PCR Thermal Cycler
- 5) 증폭 profile
- 6) 시료의 고정(포르말린, 열, 알코올 등)
- 7) 시료의 protease 분해 처리
- 8) PCR 방법(tube 내, slide glass 상)
- 9) 검출방법(직접법과 간접법)
- 10) 적당한 control

위에서 설명한 바와 같이 그 방법이 복잡하기 때문에 초심 연구자는 좋은 결과를 얻기 위해 어느 정도의 인내력을 가져야 한다.

### 5. in situ PCR의 문제점

PCR은 감도가 높기 때문에 적절한 control 실험을 행하지 않으면 신뢰할 만한 결과를 얻을 수 없다. False signal의 원인으로서는 DNA의 확산 및 유실, DNA 수복과 내인성 priming(후술)을 들 수 있다<sup>10, 11</sup>. 유출에 의한 오염은 배양세포의 DNA가 인접세포내에 침투하여 false signal을 만드는 경우이다. 그러나 이 문제점은 세포의 고정과 효소분해의 최적화, 증폭 cycle수의 감소에 의한 형태 보존으로 상당히 억제할 수 있다. 이 밖에 biotin<sup>10</sup>, digoxigenin<sup>11</sup> 등을 PCR 반응에 첨가함으로써 PCR로 증폭된 DNA(amplicon)의 유실을 방지할 수 있다. Amplicon의 길이를 길게 함(400 bp에서 1 kb)으로써 유실을 억제할 수 있다.<sup>3, 12</sup> 직접적으로 표식한 염기를 이용하여 검출하는 경우 Taq polymerase 효소의 수복 기능에 의해 표식이 DNA 배열의 gap에 비특이적으로 유입되므로 noise가 높아진다. 이 밖에 내인성 DNA 또는 cDNA 단편이 primer가 되어 single strand에 표식을 유입하는 것을 “내인성 priming”이라 한다.<sup>13</sup> 잘못된 음성결과를 유발하는 원인 중 한 가지는 slide glass상에서 반응을 하기 때문에 PCR 증폭의 효율이 나빠진다는데 있다. 또 열전도성이 떨어지고 PCR 시약이 cover slip 아래에서 대류하기 어려운 점도 원인으로 들 수 있다. 이 밖에 DNA polymerase나 시약의 일부가 glass 표면에 비특이적으로 흡착하여 소실되어 버리기도 한다.<sup>7</sup> PCR 증폭이 일어나지 않는 예로서는 시료에 효소활성을 억제하는 물질이 함유되어 있는 경우, 또는 시료의 분해정도가 부적당하여 DNA에 시약이 도달할 수 없는 경우이다. 반대로 과잉분해가 일어나면 amplicon이 세포밖으로 유출되어 signal을 전혀 볼 수가 없다.<sup>6</sup>

### 6. in situ PCR의 응용과 장래성

in situ PCR의 응용이 특히 기대되는 분야는 감염증의 진단, 예를 들어 HIV, HSV(herpes simplex virus), HPV(human papilloma virus) 등의 검출이다. 종래의 항체를 이용한 검출법에서는 감도가 너무 낮아 검출할 수 없을 정도의 virus도 이 기술에 의해 조기검출이 가능하게 되었다.<sup>10</sup> 응용은 병리학에 한하지 않고 발생 및 유전학, 세포학, 법의학, 혈액학과 모든 생물학 분야에도 확대될 것이다. 지금까지의 연구는 동물세포가 대상이었기에, 아직 식물을 재료로 하는 protocol은 확립되지 않았지만 이것도 시간문제일 것이다.

### 결론

현재 시점에 있어서 in situ PCR은 기술적으로 여러 가지 문제점을 가진다. 장래에 개선이 기대되는 것은 시료 조제와 처리의 일반화이다. 기본적으로 고정과 분해의 문제이지만 여러 가지 세포나 조직에서의 경우를 protocol집으로 정리하는 것이 이상적일 것이다. 덧붙여 in situ PCR 전용으로 개발된 특별한 고정액이나 embedding 용 재료가 판매되어 단 시간내에 시료의 준비가 가능해지길 바란다. 동결된 절편의 이용도 크게 연구될 것으로 기대된다. PCR 산물의 검출법도 형광 primer 또는 형광표식한 염기를 이용하여 동시에 복수의 유전자배열을 해석할 수 있을 것으로 기대된다. 한편 절편의 유전자 판단에서 특히 중요한 것은 정량적인 해석이다. 적당한 내부 control을 이용하여 외래성 virus의 DNA 또는 RNA를 정량적으로 검출할 수 있게 된다면 신뢰성있는 진단 방법이 될 것이다. in situ PCR에서는 액상 PCR의 경우처럼 DNA를 추출하지 않고 실험을 하기 때문에 재료적인 면에서도 미량의 시료로도 충분하다. 장래에는 오히려 액상 PCR보다도 우수한 방법으로 모든 분야에 응용될 가능성도 있다. in situ PCR법이 분자생물학의 발전에 크게 공헌할 것을 바라는 마음 간절하다.

### ■ 참고문헌

- 1) Saiki, R., Scarff, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. : *Science*, **230**, 1350-1354 (1985)
- 2) Bagasra, O. : *Amplifications*, **4**, 20-21 (1990)
- 3) Haase, A., Retzel, E., Staaskus, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4971-4975 (1990)
- 4) Patterson, B., Till, M., McBride, L., Wolinsky, S. : *Science*, **260**, 970-979 (1993)
- 5) Bagasra, O., Pomerantz, R. : *Clin. Lab. Med.*, **24**, 351-365 (1994)
- 6) Nuovo, G. : *PCR in situ hybridization, protocols and applications*, 2nd ed., Raven Press, N. Y. (1994)
- 7) Atwood, J., Nuovo, G. : in *PCR in situ hybridization*, pp.403-416, Raven Press, NY (1994)
- 8) Lewis, F., Holt, A., Cross, D., Quirke, P. : *J. Pathol.*, abstract : 171st Meeting of the Pathological Society of Great Britain and Ireland
- 9) Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (ed.) : *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)
- 10) Komminoth, P., Long, A., Ray, P., Wolfe, H. : *Diagn. Mol. Pathol.*, **1**, 85-97 (1992)
- 11) Sallstrom, J., Zehbe, I., Alermi, M., Wilander, E. : *Anticancer Res.*, **13**, 1153 (1993)
- 12) Retzel, E., Staskus, K., Embretson, J., Hasse, A. : in *PCR strategies* (ed. Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J.), pp.199-212, Academic Press, San Diego (1995)
- 13) Komminoth, P., Heitz, P., Long, A. : *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, **78**, 146-152 (1994)

14) O'leary, J., et al. : *J. Clin. Pathol.*, **47**, 933-938 (1994)

15) Nuovo, G., MacConnell, P., Forde, A., Deovenne, P. : *Am. J. Pathol.*, **139**, 847-854 (1991)

16) Zehbe, I., Hacker, G., Rylaner, E., : *Anticancer Res.*, **12**, 2165-2168 (1992)

17) Spann, W., Pachmann, K., Zabnienska, H., Pielmeier, A., Emmerich, B. : *Infection*, **19**, 242-244 (1991)

18) Nuovo, G., Margiotta, M., MacConnell, P., Becker, J. : *Diagn. Mol. Pathol.*, **1**, 98-102 (1992)

19) Bagasra, O., Hauptman, S., Lischner, H., Sachs, M., Pomerantz, R. : *N. Engl. j. Med.*, **326**, 1385-1391 (1992)

20) Bagasra, O., Seshnamma, T., Pomerantz, R. : *J. Immunol. Methods*, **158**, 131-145 (1993)

21) Embretson, J., Zupanic, M., Beneke, J., Till, M., Wolinsky, S., Ribas, J., Burke, A., Hasse, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 357-361 (1993 a)

22) Embreston, J., Zupanic, M., Ribas, J., Burke, A., Racz, P., Tennerracz, K., Haase, A. : *Nature*, **362**, 359-362 (1993 b)

23) Chiu, K-P., Cohen, S., Morris, D., Jordan, G. : *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 333-341 (1992)

24) Nuovo, G., Lidonnici, K., MacConnell, P., Lane, B. : *Am. J. Surg. Pathol.*, **17**, 683-690 (1993)

25) Long, A., Komminoth, P., Wolfe, H. : *Histochem.*, **99**, 151-162 (1993)

26) Embletin, M., Gorochov, G., Jones, P., Winter, G : *Nucl Acids Res.*, **20**, 3831-3837 (1992)

27) Gosden, J., Hanratty, D. : *Biotechniques*, **15**, 78-80 (1993)

28) Staecker, H., Cammer, M., Rubinstein, R., Vandewater, T. : *Biotechniques*, **16**, 76-80 (1994)

29) Chen, R., Fuggles, S. : *Am. J. Pathol.*, **143**, 1527-1534 (1993)

30) Heniford, B., Shum-Siu, A., Leonberger, M., Hendler, F. : *Nucl Acids Res.*, **21**, 3159-3166 (1993)

31) Pestaner, J., Bibbo, M., Bobroski, L., Seshamma, T., Bagasra, O. : *Acl. Cyologica*, **38**, 676-680 (1994)

32) Komminoth, P., Long, A. : *Virchows Archiv B Cell Pathol.*, **64**, 67-73 (1993)

## Bio 21

### 인터넷 쇼핑몰(www.bohan.co.kr)을 이용하시면

TaKaRa Taq	250 U	111,000원	등
TaKaRa Ex Taq	250 U	138,000원	

제한효소, 수식효소, 유전공학키트 류의 제품을 20% 저렴하게 구입할 수 있습니다.

(2000년 2월 말일까지)  
\* 본지 46~49페이지 참조

# 신생혈관형성 연구의 동향 및 전망



장수익/ 충북대학교 생명과학부

## 1. 신생혈관형성이란?

1998년 5월 초, “미국 하버드 의과대학의 Judah Folkman박사팀이 개발한 신생혈관형성 (angiogenesis) 억제제 엔지오스테틴(angiotatin)과 엔도스테틴(endostatin)이 쥐에 투입시 모든 암이 박멸되었다”라는 기사가 뉴욕 타임스의 1면에 소개되었고, 이어서 국내외의 주요 언론사에서 이를 대대적으로 발표하였다. 이에 따라 “신생혈관형성”이라는 용어는 모든 사람들에게 익숙하게 되었고, 이제는 “신생혈관 형성을 차단하면 암을 치료할 수 있다”는 아이디어를 일반인들도 쉽게 받아들이고 있는 것 같다. 그러면, 이러한 신생혈관형성은 어떻게 일어나는가?

아직 그 작용 기작이 완전히 규명되지는 않았지만, 암의 신생혈관형성은 신생혈관형성유도인자(angiogenic factor)에 의해 일어나며, 그림 1과 2에 주어진 일련의 과정을 거쳐 일어

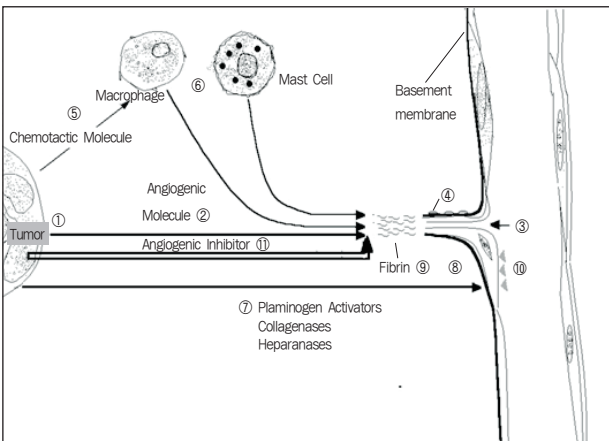


그림 1 암의 신생혈관형성 작용기작.

신생혈관형성 유도인자가 암세포로부터 분비된다. 신생혈관형성 유도인자가 조직을 통해 확산된다. 일부 신생혈관형성 유도인자에 의해 내피세포의 이동이 촉진된다. 신생혈관형성 유도인자에 의해 내피세포가 콜라젠분해효소와 플라즈미노젠 활성제의 생산을 촉진한다. 암은 매크로페이지와 메스트 세포를 유인하여, 신생혈관형성을 유도한다. 매크로페이지는 TNF- $\alpha$ 와 같은 신생혈관형성 유도인자를 분비한다. 암세포 스스로 콜라젠분해효소, 헤파린분해효소, 플라즈미노젠 활성제를 분비한다. 세포의 매트릭스에 저장된 bFGF가 동원된다. VEGF에 의해 모세관의 투과력이 증가하여 피브린 생성물이 세포의 공간으로 새어나온다. ⑩특정암의 경우, bFGF가 암세포보다 내피세포에 더 많이 함유되기도 한다. ⑪암세포가 신생혈관형성 억제제를 분비한다. 신생혈관형성이 일어나거나 또는 억제되는 것은 신생혈관형성 유도인자와 신생혈관형성 억제제간의 균형에 의존한다. 즉, 이 둘이 서로 균형을 이루다가, 만약 한 쪽으로 균형이 쏠리면(예를 들어, 신생혈관형성 억제제가 업-레귤레이션(up-regulation)되면) 신생혈관형성이 억제되는 것이다 (Folkman, J. and Shing, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 10931-10934).

난다고 기술할 수 있다. 먼저 암세포는 신생혈관형성 유도인자를 분비하며, 이것이 내피세포에 존재하는 수용체에 결합을 하면서 새로운 혈관의 형성과정이 시작된다(그림 1 ①, ②, ③). 자극된 내피세포는 성장하기 시작하면서 단백질가수분해효소(protease)를 분비한다. 이로써 기존의 세정막에 있는 기저막(basement membrane)의 지엽적인 분해가 일어나고, 내피세포가 신생혈관형성 유도인자가 나오는 곳을 향하여 움직인다(그림 1 ④). 이후, 이동한 내피세포들이 서로 연결되어 solid sprout가 생기고, 각각의 내피세포들에 만곡(cuvature)이 일어나면 루멘(luman) 길이가 증가된다. 끝으로 2개의 속이 빈 sprouts의 끝이 결합하면 루프(loop)가 형성되고 이곳으로 혈액이 들어오게 된다(그림 2 ⑤, ⑥).

한편 배성장, 생식(reproduction), 발달(development), 상처 회복(wound repair)과 같은 정상적인 과정에서는 신생혈관형성이 잘 조절되면서 일어난다.

그러나 이러한 신생혈관의 형성이 잘 조절되지 않으면 다음과 같은 여러 가지 질병이 발생하게 된다. 즉, 당뇨병환자의 망막에 새로 형성된 모세 혈관이 유리질에 침투하여 눈을 멀게하는 당뇨병성 망막증, 각막이식 후 거부반응의 일종으로써 각막의 신생혈관생성, 방수의 배출경로에 신생혈관이 형성되어 나타나는 신생혈관성 녹내장(neovascular glaucoma),

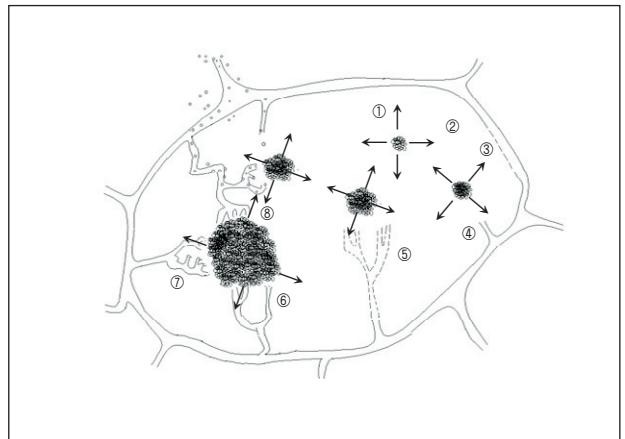


그림 2 암의 신생혈관형성을 억제할 수 있는 8개의 표적.

신생혈관형성 유도인자의 생산, 신생혈관형성 유도인자의 수용체 결합, 기저막의 가수분해, 내피세포의 이동, 내피세포의 증식, 모세관의 형성, 기저막의 합성, 전이 (Tai-Ping, D, Jagggar, R. and Bicknell, R. (1995) *TIPS* 16, 57-66).

모세 혈관이 관절에 침투하여 연골을 파괴시키는 류마티스성 관절염, AIDS 환자에게 자주 나타나는 카포시육종(kaposi's sarcoma), 건선(psoriasis), 허파의 기도(airway)를 막아 생명에 위협을 주는 혈관종(hemangiomas)등이다. 이외에 특히 암종양은 자신의 성장을 위해 영양분을 흡수하고 노폐물을 배출하는 통로로서 새로운 모세혈관을 계속적으로 유도하므로, 암종양의 전이(metastasis)도 신생혈관형성에 의존한다.

## 2. 신생혈관형성 유도인자

신생혈관형성 유도인자를 발견하고 이의 작용기구를 밝힐 수 있다면, 불필요한 신생혈관형성에 기인하는 여러 질병을 치료할 수 있는 계기가 된다. 이에 1970년대부터, 국외에서는 많은 과학자들이 신생혈관형성 유도인자를 발견하려고 노력하였다. 1985년 하버드의과대학의 Bert L. Vallee 박사 연구실에서 최초로 신생혈관형성 유도단백질인 엔지오제닌(Angiogenin)을 발견하였으며, 그 이후 여러 다른 신생혈관형성 유도단백질이 또한 발견되었다(표 1).

표 1. 여러 신생혈관형성 유도인자\*

직접 유도 인자	Angiogenin
	Basic fibroblast growth factor
	Acid fibroblast growth factor
	Vascular endothelial growth factor
	Hepatocyte growth factor
	Transforming growth factor- $\alpha$
	Epidermal growth factor
	Platelet-derived endothelial cell growth factor (thymidine phosphorylase)
	Platelet activating factor
	Granulocyte-colony stimulating factor
	Placental growth factor
	Proliferin
	B61
	Soluble vascular cell adhesion molecule-1
	Soluble E-selectin
	12-hydroxyeicosatetraenoic acid
Tat protein of HIV-1	
Interleukin-8	
Angiopietin-1	
간접 유도 인자	Tumor necrosis factor- $\alpha$
	Transforming growth factor- $\beta$
	Cu2+ -binding peptide within SPARC protein
	Prostaglandin E1/E2
	Fas ligand

\* Bussofino, F., Mantovani, A. and Persico, G. (1997) *TIBS* 22, 251-256.

불필요한 암의 신생혈관형성은 억제하여야 하지만, 신생혈관형성이 일어나면 우리에게 유익한 경우가 있다. 예를 들어 수술 및 사고에 의해 깊게 손상된 조직을 치유하고자 할 때, 심장공격(heart attack)이 있은 후 손상된 심장부위를 조기치유하고 재발을 방지하고자 할 때, 손상입은 신경을 재생하고자 할 때, 정형수술 후 회복을 촉진하고자 할 때, 혈은 위벽이나 십이지관양을 치료하고자 할 때 등의 경우이다. 특히, 노인, 당뇨병환자, 방사선 치료중인 환자등의 경우, 상처부위의 회복이 정상인들 보다 훨씬 느리게 일어나므로, 이들에게

신생혈관유도를 통해 상처회복을 촉진시키는 것이 더욱 필요하다.

## 3. 신생혈관형성 유도인자 엔지오제닌

엔지오제닌은 사람의 결장선암세포(colon adenocarcinoma HT-29 cell)가 성장하는 배양액으로부터 분리되었다. 분리된 엔지오제닌은 닭의 용모막(chorioallantonic membrane), 토끼의 각막(cornea) 및 인체의 메니스쿠스(meniscus)에서 신생혈관을 유도하는 활성(angiogenic activity) 즉, 생물학적 활성(biological activity)을 가지고 있다.

### 3.1 구조

엔지오제닌은 정상인의 혈장에서도 이후 발견되었으며, 123개의 아미노산을 가진 단일사슬로 존재하는 단백질로서 6개의 시스테인(cystein)을 가진다. 잘 알려져 있는 췌장 리보뉴클레아제 A(pancreatic RNase A)와 아미노산서열이 35% 동일하며, 특히 활성자리의 아미노산으로 알려진 RNase A의 His-12, Lys-41, His-119가 엔지오제닌의 경우에도 잘 보존되어 있다. 참고로 RNase A는 신생혈관을 유도하는 생물학적 활성이 없다. 한편, 사람의 다른 동물의 혈장에서도 엔지오제닌이 존재할 가능성이 있는데, 실제로 소의 혈장에서도 확인, 분리 되었다. 이 보바인(bovine) 엔지오제닌은 앞의 휴먼(human) 엔지오제닌과 같은 생물학적 활성을 가지며, 125개의 아미노산을 갖는 단일 사슬로 된 단백질로서, 휴먼 엔지오제닌의 아미노산과 64% 동일하다. 휴먼 엔지오제닌의 대략적인 3차구조가 이론적으로 계산되었는데, 그 구조가 전체적으로 RNase A의 X-선 결정 구조와 유사하지만 아미노산서열의 58-70번 째에 해당하는 부분은 상당히 차이가 있음을 알 수 있었다. 이 부분은 RNase A의 경우 disulfide 결합이 존재하지만, 휴먼 엔지오제닌의 경우 이 결합이 존재하지 않는다. 개략적인 휴먼 엔지오제닌의 X-선 결정구조가 발표되었으며, 최근 휴먼 엔지오제닌과 보바인 엔지오제닌의 최종 X-선 결정구조가 확인되었다. 따라서, 이 결과를 활용하면 엔지오제닌의 생물학적활성을 구조와 연관시킬 수 있을 것이며, 더우기 항암제로 사용가능한 엔지오제닌의 억제제 개발에 크게 기여하리라 기대된다.

### 3.2 기능

#### 3.2.1 효소 활성

이미 앞에서 엔지오제닌이 RNase A 와 아미노산서열이 서로 유사하다고 언급하였는데, 실제 엔지오제닌에도 RNase A 처럼 RNA를 가수분해 시키는 효소활성(enzymatic activity)이 있다. 그러나 엔지오제닌의 효소 특이성과 활성도는 여러 면에서 RNase A와 상이하다. 예를 들면, 첫째로 휴먼 및 보바인 엔지오제닌은 28S 와 18S rRNA 를 가수분해하는 효소 활성이 있는데, 최종 생성물이 100-500 뉴클레오티드의 크기를 갖는다. 반면 RNase A의 경우에는 이 rRNA가 완전히 가수분해 된다. 둘째로 보통 RNase A의 기질로 사용되는 3',5'-인산 디뉴클레오티드 경우에, RNase A의 활성도



(kcat/Km)가 CpA > UpA >> CpG > UpG인 반면, 휴먼 엔지오제닌 경우에는 CpA > CpG >> UpA > UpG이고 반응속도도 RNase A보다 십만(10<sup>5</sup>)배 정도 더 느리다. 셋째로 tRNA를 기질로 사용하는 경우, 최적의 pH, NaCl 농도, 온도가 엔지오제닌은 6.8, 15-30 mM, 55 °C이지만, RNase A 경우에는 각각 8.0, 100-200 mM, 65 °C이다. 끝으로 엔지오제닌과 RNase A에 의해 무세포 단백질 합성 (cell-free protein synthesis)이 억제 되는데, 이들의 작용 메카니즘 또한 상이하다. 즉, RNase A의 경우 28S 와 18S rRNA 를 동시에 가수분해 시킨 결과에 의한 것이고, 엔지오제닌의 경우에는 18S rRNA 의 특정 위치만을 제한적으로 가수분해시킨 결과, 무세포 단백질 합성이 억제 되는 것이다.

### 3.2.2 세포와의 작용

엔지오제닌은 내피세포(endothelial cell)와 작용하여 포스포리파아제 C(phospholipase C, PLC)로 하여금 인산지질을 가수분해하여 세포내에 1, 2-디아실글리세롤(DG)을 증가시킨다. 소의 폐동맥 내피세포 (pulmonary artery endothelial cell)가 작용 세포일 경우, 1 ng/mL의 엔지오제닌 농도에서 DG가 최대로 증가하며, 세포와의 반응시간 면에서는 DG가 2.5분 에서 최대로 증가한 뒤 20분 이내에 다시 원래의 상태로 되돌아 간다. 한편 엔지오제닌이 PLA<sub>2</sub>도 활성화시켜 프라스테시클린 (prostacyclin)을 분비한다. 이때 엔지오제닌의 작용농도 범위는 PLC의 경우와 비슷하다. 엔지오제닌의 정상인 혈중농도가 평균적으로 400 ng/mL이므로, 내피세포들은 항상 포화농도의 엔지오제닌과 접촉하고 있다. 그러나, 세포조직내에 상처가 나면 엔지오제닌의 혈중농도가 떨어지게 되므로, 이때 PLC와 PLA<sub>2</sub>가 활성화되리라고 생각할 수 있다. 일반적으로, 조직에 손상이 오면 자연적으로 그 주위에 신생혈관이 형성되어 그 회복을 촉진한다. 특히, 심장에 이상이 생겨 손상이 오면, 측지(collateral)라고 하는 신생혈관이 손상부위에 형성되어 자연치유를 증가시킨다고 알려져 있다. 그러나 PLC와 PLA<sub>2</sub>의 활성화와 신생혈관유도간의 상관관계가 구체적으로 아직 밝혀지지 않은 실정이다.

### 3.2.3 신생혈관유도 활성의 필요 조건

휴먼 엔지오제닌은 RNase A의 효소 활성자리 아미노산 His-12, Lys-41, His-119 에 각각 해당하는 His-13, Lys-40, His-114 를 갖는다. 여기서 Lys-40을 유전자 조작을 통해 다른 아미노산 즉, Gln으로 바꾸어준 결과, 유도체인 K40Q는 원래보다 효소 활성이 99.5% 이상 감소하며 생물학적 활성도 현저하게 감소하였다. 다음으로 His-13, His-114 를 각각 Ala으로 위와 같은 방법으로 바꾸어준 결과, 유도체인 H13A, H114A의 효소 활성이 최소한 만(10<sup>4</sup>)배 정도 감소하였으며, 생물학적 활성도 거의 소멸하였다. RNase A 의 X-선 결정 구조에 따르면 Asp-121이 촉매작용에 관여한다고 알려져 있다. 휴먼 엔지오제닌도 이것에 해당하는 Asp-116이 존재한다. 이 아미노산을 Asp, Ala, His로 각각 치환시킨 유도체 D116N, D116A, D116H 는 각각 효소활성이 8, 15, 18 배 증가 하였으며, 생물학적 활성도 또한 증가하였다. 특히 D116H 경우 원래 휴먼

엔지오제닌보다 신생혈관을 유도하는 생물학적 활성 역가 (potency)가 최대 두자리 수까지 증가함을 보였다. 이상의 결과에서, 엔지오제닌이 최소한 효소 활성을 가지고 있어야 생물학적 활성을 나타내며, 이 두활성이 서로 비례관계에 있음을 알 수 있다.

한편, 화학적 변형(chemical modification)을 이용하여 엔지오제닌의 효소활성을 억제하면 세포와 작용시 PLC가 활성화 되지 않는다. 따라서, 엔지오제닌의 효소활성이 세포와의 작용에서도 필요한 조건임을 알 수 있다.

이미 엔지오제닌의 58-70번째 아미노산 서열 부분의 구조가 RNase A의 구조와 상당히 다름을 언급한 바 있다. 이 부분을 RNase A의 59-73번째의 아미노산서열 부분으로 치환시킨 합성단백질(hybrid protein)을 유전공학적 방법으로 만들 수 있다. ARH-I이라고 명명한 이 합성단백질은 RNA 가수분해 활성도가 엔지오제닌에 비해 13-300배 증가하였으며, 3', 5'-인산 디뉴클레오티드를 기질로 사용시, RNase A와 같은 특이성을 보여준다. 그러나 ARH-I의 생물학적 활성 즉, 신생혈관유도 활성은 현저하게 소멸함을 알 수 있었다. 이것은 엔지오제닌이 신생혈관 유도활성을 갖기 위해서는 효소활성이 필요한 조건이지만, 충분한 조건은 아님을 제시하고 있다.

### 3.2.4 이중자리 및 삼중자리 모형

BHK 세포의 특정효소에 의해 엔지오제닌의 60번째 아미노산 Lys 와 61번째 아미노산 Asn사이의 펩티드결합이 끊어지면, 엔지오제닌-K 라는 “잘린(clipped)” 엔지오제닌이 유도된다. 효소 Lys-C에 의해, 67번째 아미노산 Glu와 68번째 아미노산 Asn사이의 펩티드결합이 끊어지면 엔지오제닌-E 라는 또다른 “잘린” 엔지오제닌이 유도된다. 이 “잘린” 엔지오제닌의 효소활성을 조사한 결과, 엔지오제닌과 거의 같은 활성도를 갖는다. 그러나 신생혈관유도 활성을 조사한 결과, 이 생물학적 활성은 소멸되었고 또 세포와의 작용에서도 DG생성이 현저하게 감소되었다. 이러한 결과는 이 엔지오제닌유도체가 세포와 작용하지 못하며, 적어도 엔지오제닌의 60-68 번째 아미노산들이 세포벽에 존재하는 수용체(receptor)와 결합하는데 중요한 부위임을 제시한다. ARH-I이라는 합성단백질이 신생혈관유도활성을 상실한 것도 이와 같은 이유 때문이라고 사료된다. RNase A의 경우도, 이쪽 부위가 구조적으로 엔지오제닌과 상당히 차이가 있으므로 세포와 직접적으로 작용하지 못하는것 같다. 따라서 엔지오제닌이 생물학적 활성을 갖기 위해서는 효소활성자리뿐만 아니라 세포와 작용하는 자리 즉 수용체 결합자리도 함께 가지고 있어야만 한다. 이것을 엔지오제닌이 신생혈관유도활성을 갖기 위한 이중자리 모형(dual site model)이라고 한다.

최근의 연구결과에 따르면, 엔지오제닌은 증식하고 있는 소의 폐동맥 내피세포로 endocytosis되고 핵으로 들어가 핵인에 축적된다고 보고되었다. 또한, 엔지오제닌의 33번째 아미노산 Arg이 핵 이동에 필수적이며, 31번째 및 32번째 아미노산 Arg이 핵 이동을 조절하는 것으로 보고되었다. 엔지오제닌이 핵으로 이동되는 것은 액틴, 항액틴 항체, 헤파린, 헤파린분해 효소에 의해 저해된다. 이는 세포표면의 엔지오제닌 결합단

백질인 액틴이나 황화 헤파린 프로티오글라이켄이 엔지오제닌의 핵 이동에 관여함을 시사한다. 따라서 엔지오제닌이 신생혈관을 유도하는 활성을 갖기 위해서는 위의 두자리 이외에 핵인까지 이동하는 데에 필요한 핵이동 자리도 있어야만 한다. 이것을 엔지오제닌이 신생혈관유도활성을 갖기 위한 삼중자리 모형 (triple site model)이라고 한다.

### 3.2.5 작용메카니즘

엔지오제닌이 세포벽에 존재하는 수용체와 작용하므로써, 엔지오제닌의 생물학적 활성이 나타나는 작용메카니즘을 제시할 수 있다(그림 3). 이것은 첫째로 엔지오제닌이 내피세포에 결합하는 형태가 특이적 (specific) 이며, 해리상수가  $10^9$  M인 높은 친화도(high-affinity) 를 갖기 때문이다. 둘째로, 엔지오제닌이 내피세포에 결합하면, PLC와 PLA<sub>2</sub> 를 활성화시켜, 2차전령(second messenger)인 1,2-디아실글리세롤과 프라스테시크린을 생성 및 분비하기 때문이다. 셋째로 엔지오제닌의 신생혈관유도활성을 닭의 난각막을 사용하여 관찰할 때, 효소활성이 거의 없는 엔지오제닌 유도체인 H13A와 H114A가 엔지오제닌과 경쟁적인 결합을 한다. 다시말해, H13A와 H114A의 경우, 효소활성자리가 변형되어 효소활성을 잃어버리지만, 여전히 수용체결합자리가 존재하므로 엔지오제닌이 결합하는 수용체에 같이 경쟁적으로 결합함을 의미한다. 마지막으로 효소활성은 있지만 신생혈관유도활성은 상실한 “잘린” 엔지오제닌(엔지오제닌-K 와 엔지오제닌-E)과 합성 단백질 ARH-I은 닭의 난각막에서 엔지오제닌과 경쟁적으로 결합하지 않는다. 이는 이 유도체가 수용체와 결합하는 부위를 소멸하였으므로 수용체에 결합하지 못하기 때문이다. 엔지오제닌과 결합하는 단백질이 소의 정상내피세포 및 암내피세포의 표면으로부터 확인, 분리되었다. 이때 사용한 방법으로는, 먼저 세포표면을 heparin sulfate로 처리하여 세포표면에 붙은 단백질을 약한조건에서 용해시킨뒤, 이것을 <sup>125</sup>I로 표지된 엔지오제닌과 반응시킨다. 이후, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide(EDC)로 가교결합시킴으로써, 분자량이 42 kDa인 엔지오제닌 결합단백질(angiogenin-binding protein, AngBP) 을 확인할 수 있었다. 엔지오제닌은 이 결합단백질과 특이적으로 결합하며, H13A 및 H114A도 이 결합단백질에 경쟁적으로 결합하고 있다. 이 결합단백질이 여러면에서 수용체의 특성을 가지고 있지만, 이것이 엔지오제닌의 수용체로서의 역할을 할지는 앞으로 밝혀져야 할 과제이다. 한편 엔지오제닌과 결합하는 단백질이 내피세포의 내부에서도 존재한다고 보고되었다. 최근 엔지오제닌의 수용체일 가능성이 높은 분자량이 170 kDa인 단백질이 증식하는 내피세포의 표면에서 발견되었다.

### 3.3 응용

엔지오제닌이 생체외(in vitro)에서 단백질 합성을 억제하는 특성이 있으므로, 만약 엔지오제닌을 세포내부로 투입하면 세포의 성장을 억제하게 될 것이다. 엔지오제닌 스스로는 세포내부로 이동하지 못하므로, 이것을 세포내로 이동하는 트란스페린(transferrin) 수용체에 대한 항체분자와 결합시켜 면

역독(immunotoxin)을 만들 수 있을 것이다. 실제로, 이 면역독은 세포표면에 트란스페린 수용체를 갖는 사람의 적백혈병 세포(erythroleukemia K562 cell)의 성장을 특성적으로 억제하였다. 이 면역독이 다른 세포에는 이러한 성장억제 효과가 없고, 또 트란스페린 수용체에 대한 항체 혼자로는 사람의 적백혈병 세포의 성장을 억제시키지 못하므로, 이 효과는 엔지오제닌에 의한 것이라고 할 수 있다. 그동안, 박테리아 또는 식물의 독소(toxin)를 특정 항원에 대한 항체와 융합시켜 이와 같은 용도로 사용하였다. 그러나, 융합된 이 면역독이 인체내로 들어가면, 이 독소에 대한 면역원성 (immunogenicity) 때문에 항체가 생기므로 비효율적이었다. 사람의 혈중 단백질인 휴먼 엔지오제닌을 독소로 사용할 때에는, 이와 같은 면역원성을 최소로 줄일 수 있는 장점이 있다. 최근 이 면역독을 초내중양(intrathecal neoplasia)을 치료하기 위해 신경중추계에 투입한 결과, 보통의 치료약이 갖는 부작용은 없는 것으로 알려졌다.

## 4. 신생혈관형성 억제제

신생혈관형성을 억제하는 물질을 발견하면 신생혈관형성에 기인하는 여러 질병 특히, 암을 치료할 수 있게 된다. 그림 2에는 암중양이 처음 생성되고, 이어서 신생혈관형성을 유도한 후, 최종적으로 전이가 되는 8개의 과정이 주어져 있다. 따라서, 이러한 각 과정을 표적으로 하면서 신생혈관형성 억제제를 개발할 수 있다. 이를 위한 접근법으로 신생혈관형성 유도인자의 생산을 억제, 신생혈관형성 유도인자가 수용체에 결합하는 것을 저해, 기저막이 가수분해되는 것을 저해, 내피세포의 이동을 저해, 내피세포의 증식을 저해, 모세관의 형성을 저해, 기저막의 합성을 저해, 전이를 억제하는 것이다(그림 2).

이러한 관점에서 그동안 발견 및 개발된 신생혈관형성 억제제는 1)폴리펩타이드류 2)폴리사카라이드류 3)항생제류 4)스테로이드류 5)폴리양이온 및 폴리음이온류 6)암억제유전자류 그리고 7)기타로 나눌 수 있다(표 2). 아직 암 환자에게 사용하도록 허용된 신생혈관형성 억제제는 없지만, 현재 임상실험단계에 들어가 있는 여러 신생혈관형성 억제제가 있다(표 3). 참고로, 임상 1단계는 소규모로 독성과 안정성을 조사하며, 임상 2단계는 소규모로 효능을 조사하며, 임상 3단계는 대규모로 신 치료법을 현재 인정되는 가장 좋은 치료법과 비교하는 것을 말한다.

## 5. 신생혈관형성 연구의 경제 산업적 및 사회 문화적 측면

### 5.1 경제 산업적 측면

신생혈관형성 억제연구는 당뇨병성망막증, 신생혈관성 녹내장, 류마티스성 관절염, 카포시육종, 건선, 혈관증, 악성종양등을 치료하는 약물개발과 밀접히 관련되어 있다. 그리고 국내 대부분의 제약회사가 이 분야의 개발사업에 관련되어 있다. 이중에서, 단순히 항암제의 국제시장만 고려하여도 2000년도

표 2 여러 신생혈관형성 억제제<sup>a,b</sup>

폴리펩타이드 류	TGF- $\beta$
	Interferon $\alpha$ -2a
	Platelet factor-4 fragment
	Interferon- $\gamma$
	TNF- $\alpha$
	Thrombospondin-1
	PAI-1, PAI-2
	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3
	Cartilage-derived inhibitor
	Glioma-derived angiogenesis inhibitory factor(GD-AIF)
	16-kDa Prolactin fragment
	Angiostatin
	Endostatin
	Angiopoietin-2
	Interferon- $\gamma$ inducible protein 10(IP-10)
Heparinase	
Proliferin관련 단백질	
gro- $\beta$	
폴리사카라이드류	DS4152
	SCM-chitin III
항생제류	Fumagillin
	AGM-1470(TNP-470)
	FR111142
	WF16775 A2
	Minocycline
스테로이드류	Herbimycin A
	Ovalicin
	Angiostatic steroids
폴리양이온 및 폴리음이온류	Medroxyprogesterone acetate
	2-methoxyoestradiol
암억제유전자류	Sumarin
	Protamine
	Distamycin A 유도체
	TP53
	RB
기타	VHL
	쥐 chromosome 16에 있는 Locus Loh2
	인간 chromosome 10q에 있는 유전자
	RNasin
	Genistein
	Lavendustin A
Thalidomide	
LM609	
2-hydroxycinnamaldehyde 유도체	

<sup>a</sup> Bussolino, F., Mantovani, A. and Persico, G. (1997) *TIPS* **22**, 251-256.  
<sup>b</sup> Tai-Ping, D., Jaggar, R. and Bicknell, R. (1995) *TIPS* **16**, 57-66.

에 약 54,000억원의 시장이 예상된다(출처:바이오인더스트리, 1997년, 제15호, 71쪽). 한국의 보건복지부 자료에 따르면, 1997년도 전국 1백21개 병원의 암환자는 모두 7만8천7백97명이 등록돼 1년전의 7만2천3백23명보다 9%나 늘어났으며, 차후 매년 증가할 전망이다.

신생혈관형성 유도연구는 보건의료산업의 허혈성 심장 및 하지질환등을 치료하는 신규 약품개발 및 기술개발과 밀접히 관련되어 있고 국내의 각 병원이 이 분야의 개발 사업과 관련되어 있다. 현재, 외국에서는 허혈성심장 및 하지질환환자에게 신생혈관조성 치료법을 직접 시술하여 이의 효과를 연구하는 임상실험이 진행되고 있다. 반면, 국내에서는 이에 관련된 연구가 매우 초보적인 단계이며, 임상실험이 진행되지 않고 있다. 참고로 한국의 통계청 자료에 따르면, 1997년도

표 3 현재 임상중인 여러 신생혈관형성 억제제<sup>a,b</sup>

억제제명	임상상태	회사 및 연구소명
CAI	임상 1 및 2기	NIH(USA)
CM101	임상 1기	CarboMed
Anti-VEGF monoclonal antibody	임상 1기	Genetech
Interleukin-12	임상 1기	Hoffmann-La Roche
Marimastat	임상 2 및 3기	British Biotech
2-Methoxyestradiol	임상 1기	EntreMed
Platelet factor 4	임상 1 및 2기	RepliGen
Thalidomide	임상 1 및 2기	EntreMed
TNP-470 (AGM-1470)	임상 1 및 2기	Takeda
Angiostatin	전임상	EntreMed
Endostatin	전임상	EntreMed
Greenstatin	전임상	목암생명공학연구소

<sup>a</sup> Brem, S. (1998) *Angiogenesis* **2**, 9-20.  
<sup>b</sup> Folkman, J. (1996) *Scientific American* **275**(3), 150-154.

우리나라 년 사망 구성비는 순환기계 질환(고혈압성 질환, 뇌혈관질환, 허혈성 심장질환, 동맥경화증)이 23.4%로 가장 높다.

미국의 경우에는

- 1) 현재 약 5,800만명의 순환기계질환자(cardiovascular disease)가 있는것으로 추산되고 있고, 이로 인한 의료비 지출이 연간 1,710억 US\$이 소요되고 있다.
- 2) 1998년 미국심장협회의 보고에 의하면 관상동맥 질환자(coronary arterydisease)는 1390 만명의 환자가 있으며, 이 중 720만명이 협심증(angina pectoris)환자이다.
- 3) 1996년 IMS health marketing report에 의하면 726,000명의 말초혈관성질환자(peripheral vascular disease)가 있으며, 이 중 10만명은 하지절단술(limb amputation)의 수술을 받는 환자이다.
- 4) Therapeutic angiogenesis 대상환자는 일단 심한 관상동맥질환자 및 하지절단술을 앞둔 말초 혈관성질환자이나 치료 결과가 좋으면 치료대상영역이 확대될 것으로 전망된다.

신생혈관형성 유도억제연구는 각종 질병의 진단 및 치료에 응용될 수 있으므로, 그동안 일본을 비롯한 각국의 여러 제약회사들이 신생혈관형성 억제제의 개발 및 발견에 투자를 하였다. 현재에는 그동안 개발한 여러 약제가 신생혈관형성에 관여하는 질병에 대한 효과를 보기위해 임상실험을 수행하고 있다(출처:Journal of the National Cancer Institute, Vol. 90, No. 13, PP. 960-962, July 1, 1998). 차후, 외국에서 개발한 신생혈관형성 유도억제제의 효과가 검증되면, 현존하는 국내의 항암제시장은 물론이고 허혈성 심장질환, 허혈성 하지질환, 안질환등의 치료제 시장은 이것에 의해 잠식되고 이에 따른 경제적 손실도 매우 클 것으로 예상된다.

### 5.2 사회 문화적 측면

그 동안 국민의 평균수명은 각종 보건복지정책의 개선으로 연장되고 있다. 그러나 최근 환경의 악화와 평균수명에 따른 성인병이 늘어나고 있다. 이중에서 신생혈관형성에 절대적으로 의존하는 암의 경우, 한국에서는 연간 약 5만여명이 암으로 사망하고, 이것은 전체 사망 원인의 2번째를 차지하고 있

는 실정이다. 전체인구 대비 암발생 위험도가 10배 이상 높은 노인인구의 확대에 따라 암에 의한 사망자도 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 전통적인 화학 항암제는 정상조직에 대한 부작용 및 암조직의 항암제에 대한 내성이 발생하여 반복적인 투여가 불가능하나 신생혈관형성 억제제는 전통적인 화학 항암제의 단점을 보완하였다. 따라서 신생혈관형성 억제제가 출시될 때에는 이러한 drug의 수요는 계속적으로 증가할 것으로 예상된다(표 4).

이와 같은 암이외에도, 사회의 구성원인 국민들은 점차 신생혈관형성에 연유하는 각종 질병(류마티스성 관절염, 만성염증, 당뇨병성 망막증, 혈관증, 중증허혈성하지, 허혈성심장병, 뇌졸중 등)에 대한 불안감을 갖고 심리적으로 위축되어 국가경제활동에도 지장을 초래할 수 있다.

그러나 신생혈관조성 치료법을 이용하면 당뇨병환자에게 주로 나타나는 족부궤양을 치료할 수 있으므로, 이들 환자의 경우 신생혈관형성 유도기술에 의해 양질의 삶을 영위하게 될 것이다(그림 4). 그리고 당뇨병환자 및 노인성 환자에게 나타나는 안질환도 신생혈관형성 억제제를 이용하면 치료할 수 있게 될 것이다.

### 6. 국외 연구동향

미국의 국립보건원(National Institute of Health)은 1998년 7월 30일 "Therapeutic Modulation of Angiogenesis in Disease"라는 연구 프로그램을 공모하였다(PA Number: PAR-98-096). 이 연구프로그램에는 미국의 국립암연구소(National Cancer Institute, NCI), 국립 심장, 폐 및 혈액연구소(National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI) 그리고 국립눈연구소(National Eye Institute, NEI)가 공동으로 참여하고 있다.

NCI는 신생혈관형성을 억제하는 연구(예를 들어, 혈관내피세포의 증식을 유도하는 인자 또는 내피세포에 존재하는 이의 수용체를 표적으로 하는 연구, 기능적인 혈관내피세포로 안정화되는 것을 억제하는 연구, 내재하는 신생혈관형성억제제의 양을 증가시키는 연구, 환자에게 합성된 신생혈관형성억제제 또는 현존하는 항암제와의 복합투여에 대한 연구등)을 공모하고 있다. HNLBI는 신생혈관형성억제 및 유도연구에 모두 관심을 가지고 있다. 부적절한 신생혈관형성에 의해 야기되는 여러 질환 즉, atherosclerosis, restenosis, idiopathic pulmonary fibrosis, acute adult respiratory distress syndrome, asthma등에 관한 연구를 공모하고 있다. 이와 동시에 신생혈관형성의 유도가 필요한 허혈성 심장 및 하지 질환에 대한 연구도 공모하고 있다. NEI는 시력약화 및 실명을 야기시키

는 주요원인인 망막혈관질환에 대한 연구를 공모하고 있다. 신생혈관형성에 연유하는 안질환의 경우(표 5), 현재까지 특별히 치료제가 없는 상황이다. 따라서 신생혈관형성 억제기술을 이용하면, 관련 안질환을 치료할 수 있게 될 것이다. 한편, 안질환중 Age-related Macular Degeneration(AMD)는 60세 이상의 노인에게 나타나는 실명의 직접적인 원인이 되고 있다. 현재, 이 질병의 치료를 위해 "Photo-dynamic therapy (PDT)"를 시행하고 있으며, 치료 건당 US\$ 2,000라는 경비가 소요되고 있다(Wall Street Journal, August 26, 1998). 최근 Agouron Pharmaceuticals, Inc는 경구투여가 가능한 AG3340이라는 신생혈관형성 억제제를 사용하여, 현재 PDT를 치료하기 위한 임상 2단계에 있다(출처:IBC USA Conference on Novel antiangiogenic therapy for diseases of ocular neovascularization (March 22, 1999). 따라서, 신생혈관형성 억제제를 이용하면 안질환인 PDT 치료를 현존의 외과적 수술 대신에 경구투여로 치료가 가능하게 될 것이다.

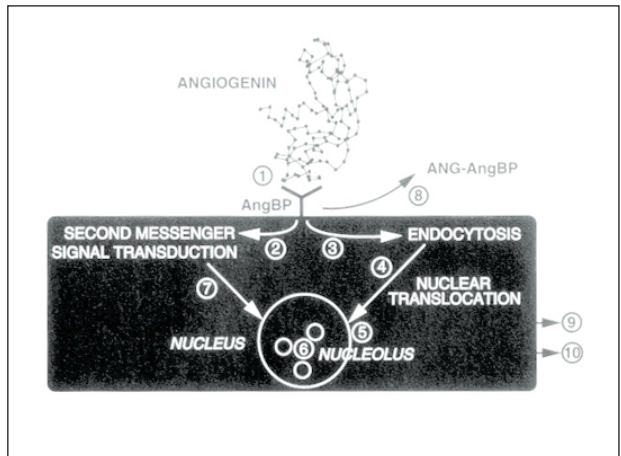


그림 3 엔지오제닌의 작용 메카니즘.

① 엔지오제닌이 세포 수용체에 결합한다. 여기에서 세포수용체를 엔지오제닌-결합 단백질로 표시하였지만, 황화 헤파린 프로티오글라이칸 또는 전통적인 수용체일 수도 있다. 결합은 표시한 것 처럼 세포 표면에 결합하는 지역이 있다. ② 결합 후, PLC와 PLA2를 활성화하고 2차 메세지 신호 전이가 일어난다. ③ 결합 후, 세포질내로 들어간다. ④ 세포질 내에서 핵쪽으로 이동한다. ⑤ 엔지오제닌이 핵속으로 들어간다. ⑥ 핵내에서 엔지오제닌이 핵인에 축적된다. 이곳에서 핵이 활성화되고, 내피세포가 증식하게 된다. ⑦ 2차 메세지 신호전도도 핵까지 전달된다. ⑧ 엔지오제닌의 일부는 엔지오제닌-결합 단백질과 세포외 복합체를 이룬다. 이것은 단백질 분해에 관련된 일련의 과정을 활성화시킨다. ⑨ 세포외 엔지오제닌은 세포 흡착 및 이동을 촉진하는 기질로 작용한다. ⑩ 이러한 모든 과정의 결과로 신생혈관이 형성된다.

허혈성 심장, 하지, 뇌질환의 경우, 현재까지 수술적 bypass 방법과 경피적 카테터를 이용한 중재적 방법들이 허혈성질환을 가진 환자의 치료에 이용되어 왔다. 그러나, 많은 환자에서 폐쇄된 동맥의 해부학적 정도나 분포가 위의 치료법으로

표 4 연도별 평균수명, 노인인구 및 단순증가에 따른 예측 암사망자 수

	1995년	2000년	2005년	2010년	2020년
예측 평균수명(1991년)	69세	71.3세	74.3세		
예측 평균수명(1997년)	73.5세(실측)	74.9세	76.1세	77세	78.1세
예측 노인인구(1991년)	254만명	317만명	396만명	467만명	
예측 노인인구(1997년)	265.7만명(실측)	337만명		503만명	690만명
단순증가 예측 암사망자		55,200명		72,000명	91,000명

출처: WHO, 1995 세계보건통계연감(1996), 한국통계청, 1995 인구동향조사(1996)

는 적용되지 않거나, 치료를 받더라도 실패하는 경우가 많이 생기게 된다. 즉, 이들에게서 현재로는 효과적인 약물치료법이 없다. 그러나, 신생혈관형성 유도기술인 신생혈관조성 치료법을 이용하면, 측부혈관의 형성을 증진시켜 허혈성 질환을 치료할 수 있게 될 것이다(출처:RAC Report #9711221 (Office of Recombinant DNA Activities, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). [20892-7052], 1998).

1998년 독일의 Schumacher 박사팀은 허혈성 심장질환을 치료하기 위해 신생혈관형성인자인 FGF-1을 심장에 직접 주사하고 이의 효과를 연구한 최초의 임상실험을 보고하였다 (Circulation, 1998;97:645-650). 1998년 미국의 Isner 박사팀은 허혈성 하지질환을 치료하기 위하여 말초 동맥질환에 의한 심한 허혈성 하지 질환환자의 하지에 신생혈관형성인자 VEGF 유전자를 주사하고 이의 효과를 보고하였다 (Circulation, 1998;97:1114-1123). 1998년 미국의 Crystal 박사팀은 VEGF121 유전자를 adenovirus 벡터를 이용하여 중증허혈성 심장환자의 심장근육에 주사하는 임상 1기 시험을 진행하고, 이를 보고하였다(RAC Report #9711221, Office of Recombinant DNA Activities, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA., [20892-7052], 1998). 이후 1999년에는 이러한 요법이 안정하다는 안정성 시험 결과를 보고하였다 (Human Gene Therapy 10:1331-1348, May 20, 1999).

7. 전망

신생혈관형성 유도억제기술을 활용하기 위해서는 우선 신생혈관형성을 관찰 및 연구할 수 있는 시험조사법(assay)이 개발되어야 한다. 현재 이를 이용하려는 많은 수요가 국내의 제약업계, 연구소, 학계에 골고루 있다. 미국의 Paragon Biotech Inc.는 신생혈관형성에 관련된 여러 in vivo 및 in vitro 실험조사법을 수행하는 사업을 하고 있고, 세계 각 지역에서 많은 수요가 있다고 한다.

신생혈관형성 유도억제기술을 사용 개발하기 위해서는 신생

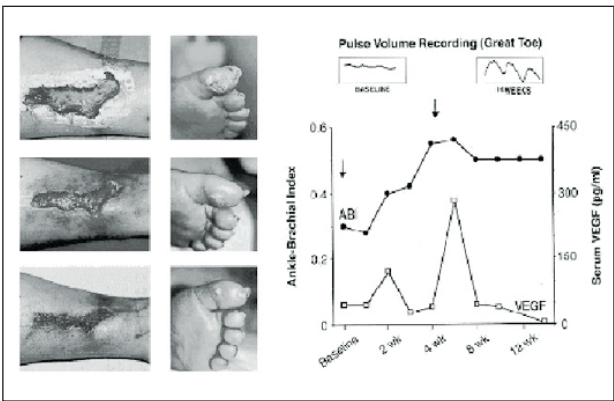


그림 4 당뇨병환자에게 나타나는 족부궤양의 신생혈관조성 치료법. 왼쪽 그림은 허벅지부분과 발가락부분이 치료후 완쾌되는 과정을 보여준다. 오른쪽 그림은 발가락의 혈류진행정도를 보여주는 pulse volume과 Ankel-Brachial Index(ABI) 수치를 보여주고 있다. 본 환자는 신생혈관조성 치료법을 통해 족부를 절단하지 않고, 정상적인 삶을 살 수 있게 되었으므로, 신생혈관형성 유도억제기술을 통해 삶의 질이 향상되었다.

혈관형성을 유도하는 장치 그리고 이를 관측할 수 있는 장비가 필요하다. 국내의 경우, 이에 관련된 산업이 전무하지만 이러한 장비의 수요는 조만간 급격히 증가할 것으로 예상된다. 미국의 Reming Bioinstruments Company는 in vivo에서 신생혈관형성을 대량으로 유도할 수 있는 normobaric oxygen feedback controller(OXYCYCLER model A44XO)를 개발, 판매하고 있다. 미국의 Moor Instruments Inc.는 moorLDI laser Doppler imager라는 기계를 개발, 판매하고 있으며, 이를 이용하면 허혈성 하지질환을 쉽게 관찰할 수 있다.

신생혈관형성 유도억제기술을 개발하기 위해서는 관련 물질(신생혈관형성 유도물질, 신생혈관형성 억제물질, 관련 항체, 관련 세포등)이 있어야 기초연구 실험 및 개발연구를 진행할 수 있다. 관련 물질들의 대부분은 이미 외국에서 개발한 것이며, 이의 사용을 위해서는 외국에서 거의 전량을 수입하고 있는 실정이다.

따라서 국내의 관련 연구 종사자들이 국제적 경쟁력을 가지면서 연구를 수행하기 위해서는 신생혈관형성 유도억제관련 물질의 국내 생산 및 공급이 필수적이며, 이에 대한 수요는 급격히 증가할 것으로 예상된다.

신생혈관형성 유도억제에 관련되어 판매되는 약제의 시장규모가 폭발적으로 증가할 것으로 전망되고 있다.

영국의 Financial Times Business Ltd/Biophoenix가 1999년 3월 22일 언론에 공개한 보고에 따르면, 신생혈관형성 유도억제에 관련되어 판매되는 약제의 시장 규모가 1999년에는 \$0이지만, 2005년에는 \$3,770 million이 될 것이라고 전망하고 있다 (표 5).

표 5 Ocular neovascular diseases

- Age-related Macular Degeneration(wet form)
- Diabetic Retinopathy
- Retinopathy of Prematurity
- Ischemic Retinopathies
- Corneal Neovascularization
- Rubiosis Iritis
- Neovascular Glaucoma
- Cyclitis
- Pterygium

출처: IBC USA Conference on Novel antiangiogenic therapy for diseases of ocular neovascularization (March 22, 1999)

8. 맺음말

“신생혈관형성이 암세포 성장 및 전이에 필수적”이라는 사실에 착안하여 개발되는 항암제는 기존의 항암제와는 근본적으로 그 접근법이 다르다. 기존의 항암제는 암세포를 표적으로 하는 반면에, 신생혈관형성 억제제는 증식하는 내피세포를 표적으로 하고 있다. 이러한 이유로, 신생혈관형성 억제제는 기존의 항암제보다 독성이 훨씬 약하고 따라서 부작용이 적을 것으로 기대된다. 정상인의 경우, 여성들의 배란시기를 제외하고는 신생혈관형성이 거의 일어나지 않고 있다. 따라서, 신생혈관형성억제제는 새로 증식하는 내피세포에만 공격을

하므로, 정상적으로 휴면상태에 있는 내피세포에는 거의 영향을 주지 않는 것이다.

신생혈관형성 억제제는 기존의 항암제보다 매우 효과적인 항암제이다. 한 개의 내피세포가 약 100개의 암세포를 지원하고 있으므로, 한 개의 내피세포를 공략하면, 약 100개의 암세포를 공략할 수 있기 때문이다. 즉, 암은 보급로가 차단되어 필요한 물자가 공급되지 않으므로 서서히 폐배할 수밖에 없는 것이다.

신생혈관형성 억제제의 또 다른 장점은 항암제를 꼭 암세포 내로 투입할 필요가 없다는 것이다. 보통, 항암제를 투여하면 극히 일부만이 암세포에 전달되므로, 항암제를 어떻게 암세포내로 잘 전달할 것인가가 항상 문제가 된다. 그러나 신생혈관은 암세포의 주위에 형성되므로 굳이 암세포의 내부로 항암제가 들어갈 필요가 없는 것이다.

기존 항암제의 가장 근본적인 문제점은 항암치료를 계속하면, 암세포가 사용한 항암제에 내성을 갖게 된다는 것이다. 그러나 신생혈관형성 억제제는 내피세포를 표적으로 함으로 근본적으로 이러한 내성문제가 없는 것이 큰 장점이다. 이미 엔도스테틴을 이용한 실험에서 실험동물의 경우, 내성이 생기지 않음이 발견되었는데, 이러한 사실은 장기간 암치료시에는 꼭 필요한 요건이기도 하다.

끝으로 신생혈관형성 억제제를 단독으로 투여하는 대신에 현존하는 항암제와 복합투여하면 시너지효과가 매우 높다는 것이다.

신생혈관형성을 표적으로 하는 항암제는 이상과 같은 장점에도 불구하고, 아직도 많은 질문에 대한 답이 여전히 필요하다. 예를 들어, 과연 모든 암들이 다 신생혈관형성 억제제에 의해 치료될 수 있는가? 이 약을 투여할 때 연령에 상관없이 과연 부작용은 없는가? 암말기 환자의 경우에도 이러한 접근법이 성공할 수 있는가? 등이다. 그러나 신생혈관형성에 대한 작용기작이 앞으로 더욱 더 밝혀지면, 그동안 인류가 기다려왔던 암정복은 현실로 다가오지 않을 까 기대해볼 수 있을 것이다.

신생혈관형성을 유도하는 물질 즉, 신생혈관형성 유도인자(예를 들어, 엔지오제닌 등)를 이용하면 신체의 특정부위(심장 및 하지등)에 생리화적인 신생혈관형성유도를 촉진할 수

있다. 신생혈관형성을 유도하여 기존의 치료방법으로는 치유가 어려운 중증 허혈성 심장질환(심근경색, 협심증) 및 중증 허혈성 하지질환(당뇨병성 발궤양)을 치료할 수 있다. 이러한 점에서 신생혈관형성은 두 얼굴을 가지고 있다(그림 5). 신생혈관형성에 대한 기초연구는 차후 산업화가 가능한 여러 연구 부산물을 창출할 것으로 예견된다. 이러한 부산물은 고부가가치물로서 국가의 경제력에도 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

### 장 수 의

이학박사

충북대학교 생명과학부

1981	고려대학교 화학과 이학사
1983	고려대학교 대학원 화학과 이학석사
1988	미국 Cornell 대학교 대학원 화학과 이학박사
1988-1991	미국 Harvard 의과대학 박사후연구원
1991-1994	충북대학교 생화학과 조교수
1995-	현재 충북대학교 생명과학부 부교수

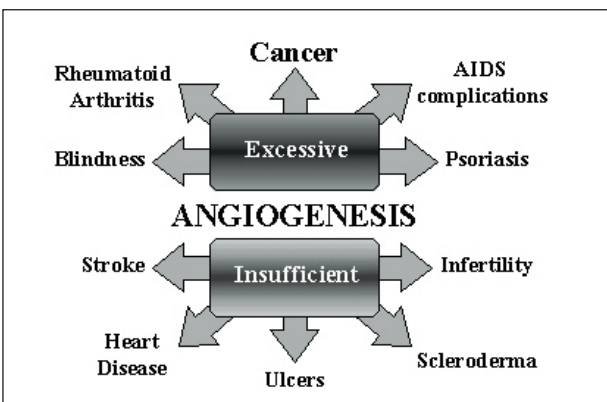


그림 5 신생혈관형성의 두 얼굴. 불필요한 신생혈관형성이 과다하면 실명, 암 등의 질병이 발생하지만, 도리어 정상적인 신생혈관형성이 부족하면 불임, 궤양 등의 질병이 발생한다.

# Anti-human fibronectin antibody를 이용한 면역조직염색의 예

Fibronectin(FN)은 동물의 세포표면, 세포외 matrix 및 혈액속에 존재하는 세포접착성 당 단백질로 fibrin, heparin, collagen 등에 결합하여 세포 접착, 세포이동 및 발달, 암전이 억제 등에서 여러가지 기능을 한다. 이는 세포성 FN과 혈장 FN의 2종류로 대별되고 분자량 24만전후의  $\alpha$ ,  $\beta$  라 불리우는 2개의 polypeptide chain이 C말단에서 S-S결합으로 연결된 dimer 분자로 존재하고, 여러 가지 ligand에 특이적으로 결합하는 복수의 domain으로 구성되어 있다(그림 1). FN 측정은 임상적으로 중요하다. 예를 들면 암환자에 있어서 혈청이나 뇨속의 FN 분해물의 변동을 anti-fn monoclonal 항체를 이용하여 측정하고 FN과 세포의 암화와의 관련성(세포의 악성전환에 따라 세포로부터 소실 또는 격감한다)를 보고한 예가 있다. TaKaRa는 FN의 각 domain에 특이한 mouse 유래의 monoclonal antibody를 판매하고 있다. 이번에는 사람 정상조직 및 각종 종양조직의 파라핀절편을 각종 anti-FN antibody를 이용하여 검색한 예를 소개한다.

TaKaRa는 아래와 같은 anti-fibronectin monoclonal antibody를 판매하고 있다.

TaKaRa Code	clone 번호	domain 특이성 (아래그림 참조)	fibronectin에 대한 세포접착에로의 영향	교차반응성			
				소 항원	돼지 항원	토끼 항원	쥐 항원
M001	FN8-12	피브린 결합(제2) domain	×	×	×	×	×
M002	FN12-8	세포결합 domain	저해효과 있음	○	×	×	×
M009	FN9-1	제1 피브린 · 헤파린 결합 domain	×	○	○	○	×
M010	FN30-8	세포 결합 domain	저해효과 있음	×	×	×	×
M013	FN1-1	C말단 S-S결합부위	×	○	○	○	○
M014	FN21-1	collagen 결합 domain과 헤파린 결합 domain의 결합부위	×	×	○	○	×
M114	FNC4-4	collagen 결합 domain	×	○	○	○	×
M115	FNH3-8	헤파린 결합(제3) domain 중 Type III 반복구조의 최말단측(H12)을 인식	×	×	×	○	×

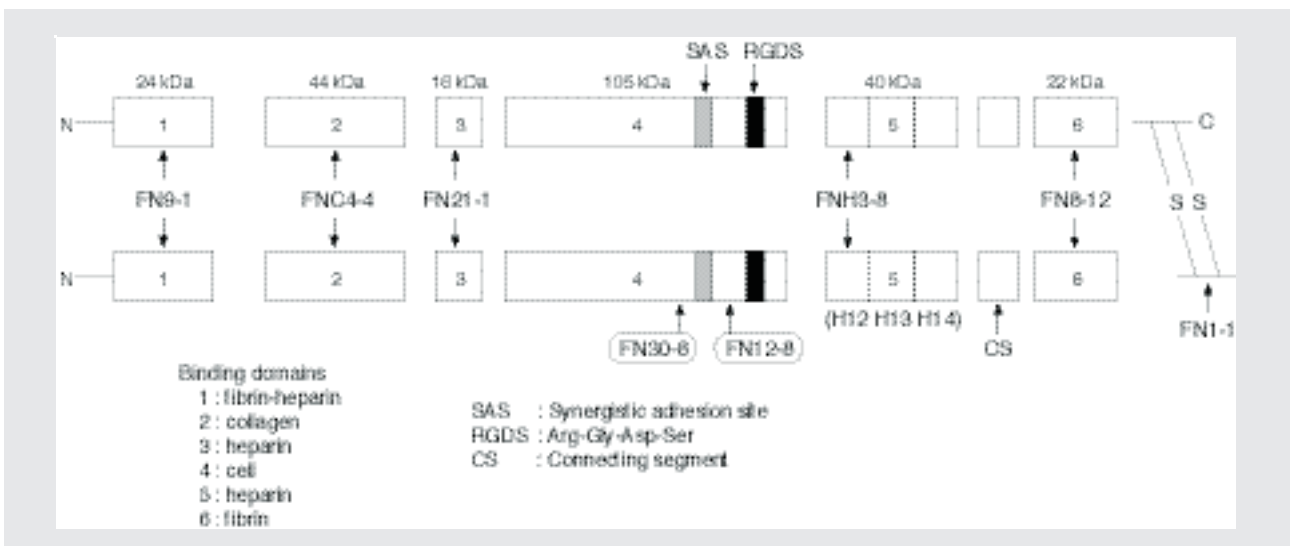


그림 1 Fibronectin의 thermolysin 분해단편과 각종 monoclonal antibody의 인식 domain

■ 실험예

일차항체 : 200배 희석(10  $\mu\text{g/ml}$ )

조직절편 : 시판(DAKO)의 파라핀 포매(embedding) 절편

검출방법 : LSAB2법(streptavidin-biotin 법)

조작순서 : 1) 탈 파라핀

2) 활성화 반응처리(proteinase K 처리)  
proteinase K 0.4 mg/ml, 실온 5분

3) 내인성 biotin의 blocking kit(DAKO) 사용

4) 내인성 peroxidase의 blocking  
3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 실온 5분

5) 비특이적 결합부위의 blocking  
blockase 원액, 실온 20분

6) 일차항체 반응, 실온 20분

7) Streptavidin-biotin 반응  
LSAB2 kit(DAKO) 사용

8) DAB 발색

9) 핵염색(haematoxylin)

10) 탈수 · 투철 · 봉입

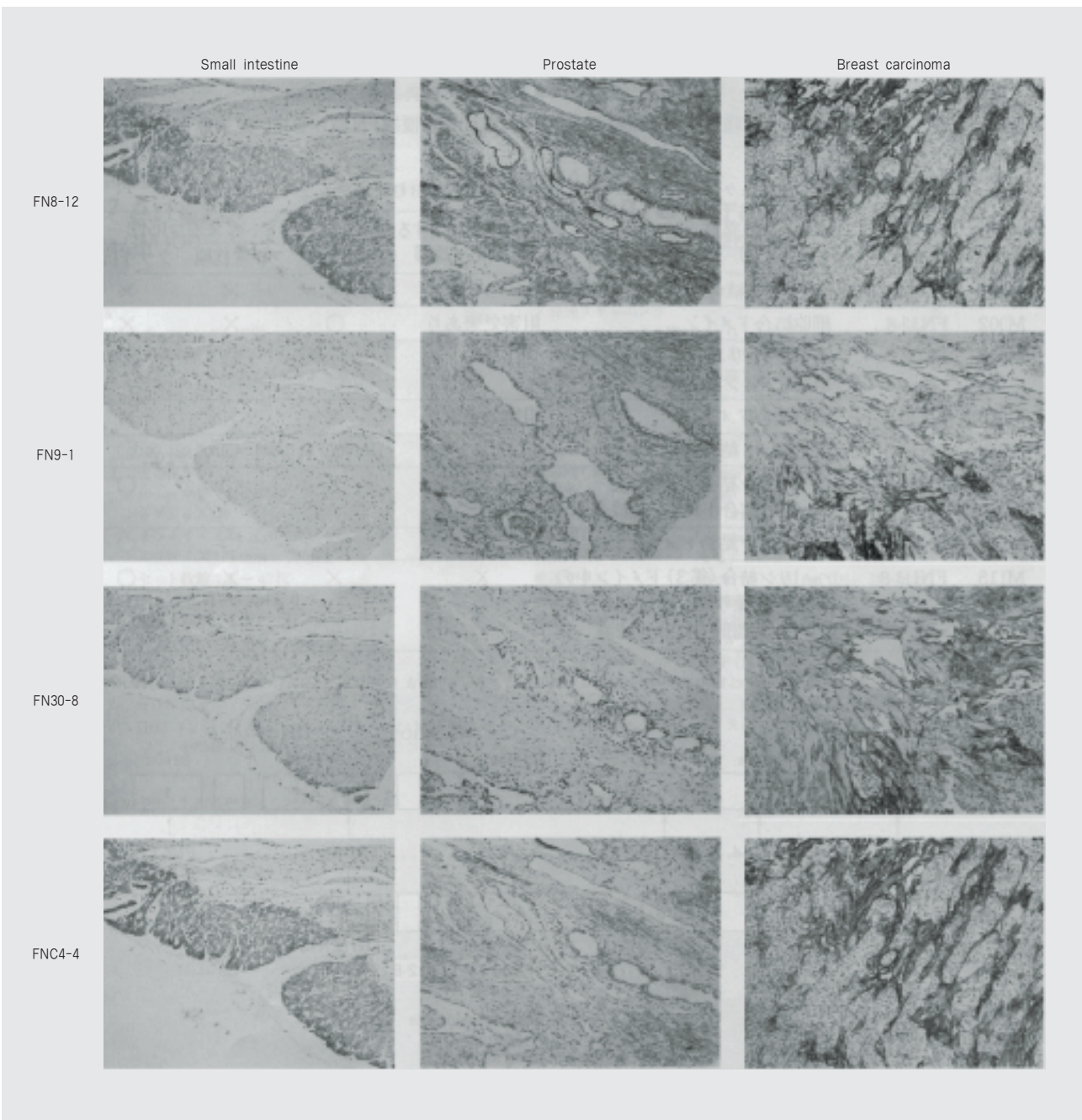


그림 2 Anti-fibronectin monoclonal antibody를 이용한 정상인 및 종양조직의 염색예

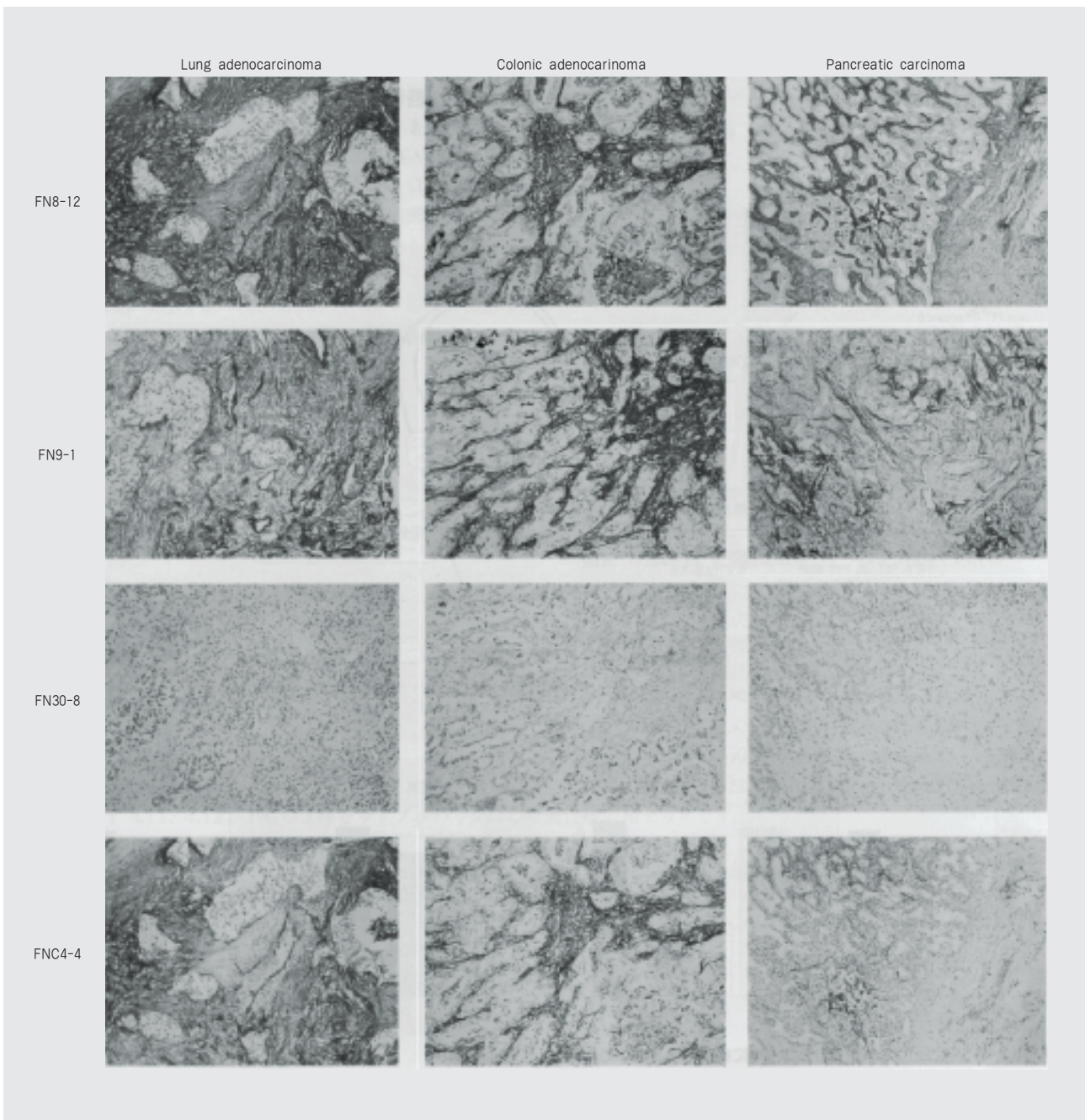


■ 제품목록

TaKaRa Code	Clone 번호	Subclass	용량
M001	FN8-12	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M002	FN12-8	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M009	FN9-1	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M010	FN30-8	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M013	FN1-1	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M014	FN21-1	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M114	FNC4-4	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg
M115	FNH3-8	Mouse IgG <sub>1</sub>	0.4 mg

■ 참고문헌

- 1) Katayama, M., Hino, F., Odate, Y., Goto, S., Kimizuka, F., Kato, I., Titani, K. and Sekiguchi, K. (1989) *Exp. Cell Res.* **185**, 229-236.
- 2) M. Nanba(1987) *독립의학회지* **2**, 167-175.
- 3) M. Katayama(1990) *임상검사* **34**, 1725-1730



# 진핵세포용 유전자도입 시약

## Trans IT<sup>®</sup> Polyamine Transfection Reagents

Trans IT<sup>®</sup> Polyamine Transfection Reagents는 liposome법을 이용한 진핵세포 유전자도입시약으로 높은 효율로 발매이래 호평을 받고 있다. 본 시약을 이용할 경우 지금까지는 무혈청배지로 교환한 후 배양세포를 transfection하는 방법을 권장하였지만, 이번에 완전배지(혈청 함유 배지)로도 transfection 할 수 있음을 PanVera사가 보고하였기에 이를 소개한다.

### ■ 본 제품의 특징

- 1) 높은 효율로 DNA, RNA를 세포에 도입할 수 있다.
- 2) Transient 및 stable transformant를 얻을 수 있다.
- 3) 종래의 liposome을 이용한 제품과 비교하면 세포에 대한 독성이 낮다.

- 4) 시약을 녹여서 사용해야 하는 번거로움이 없고 튜브에 들어 있는 시약을 그대로 사용한다.

■ 실험 1 : 각종 protocol에 의한 도입효율의 비교  
완전배지 상태로 transfection을 한 경우와 종래의 방법으로 한 경우의 도입효율을 조사 비교하였다(그림 1).

### ■ Standard Protocol

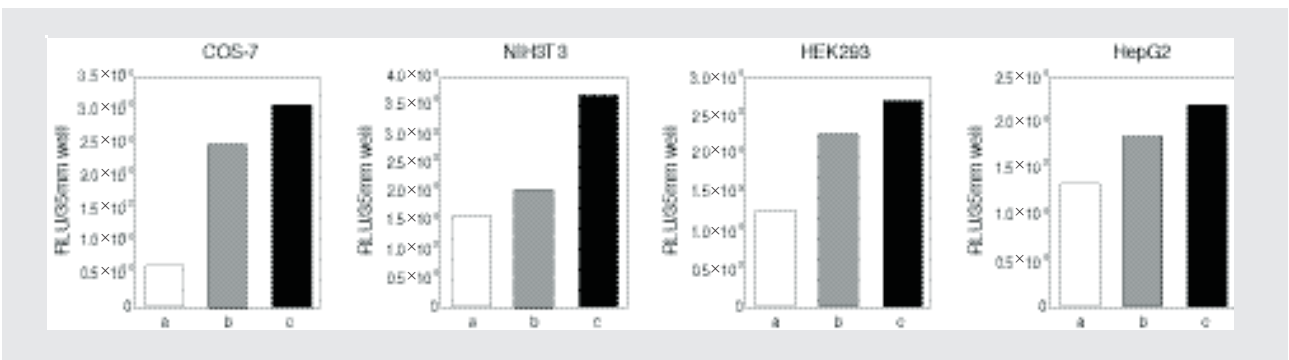
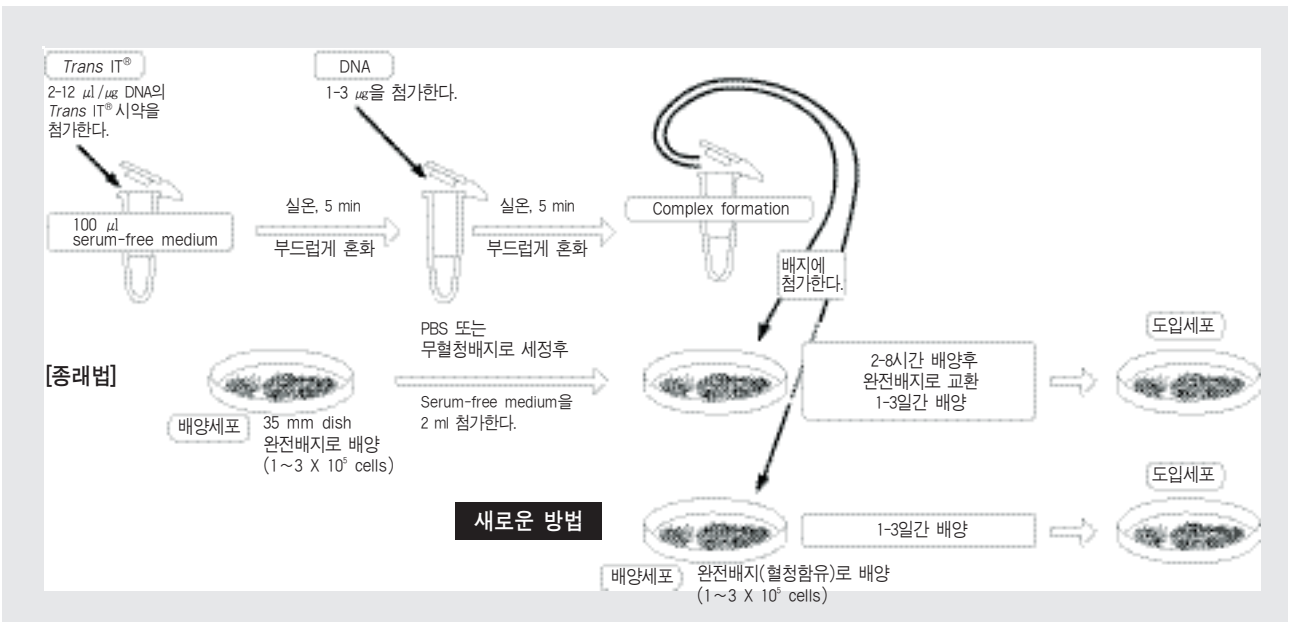


그림 1 각종 transfection protocol에 있어서 도입효율의 비교

Trans IT-LTI를 이용하여 luciferase 유전자를 코드하는 vector를 각종 세포에 transfection 하였다. 배양후 luciferase 활성을 측정하여 도입효율을 구했다.

- a: 종래법(무혈청배지로 교환 후 transfection)
- b: 완전배지 상태로 transfection을 한다 → 4시간후에 배지교환
- c: 완전배지 상태로 transfection을 한다 → 배지교환을 하지 않았다.

그 결과 배지를 교환하지 않고 완전배지상태로 transfection 하는 쪽이 종래법보다도 높은 효율을 얻을 수 있음을 확인하였다. 또 transfection 시약의 제거를 위한 transfection후의 배지교환도 Trans IT의 독성이 적기 때문에 특별히 필요하지 않았다. 이 새로운 방법은 조작이 매우 간단하면서도 높은 효율을 얻을 수 있다. 또 transfection 후의 세포 상태가 중요한 유전자발현 연구에도 이상적이다.

■ 실험예 2 : 타사제품과의 비교

본 제품(Trans IT®-LT1) 및 타사의 lipofection 시약을 사용하여 NIH3T3 세포 또는 293 세포에 2 µg의 plasmid DNA(CMV promoter의 하류에 luciferase 유전자를 코드)를 감염하고 그 효율을 비교하였다. 각각의 transfection은 각사의 protocol에 따라 하였다. Trans IT®-LT1의 경우는 DNA와 Trans IT®-LT1과의 복합체를 완전배지(10% 혈청 함유)에 직접 첨가한 후 배지교환을 하지 않고 그대로 배양을 계속하는 방법을 이용하였다. 세포를 40시간 배양한 후 luciferase 활성을 측정하여 transfection 효율을 구하였다. 그림 2에 나타난 것처럼 Trans IT®-LT1을 이용하여 새로운 방법으로 transfection을 행하였을 경우 타사제품보다 높은 transfection 효율을 얻을 수 있었다.

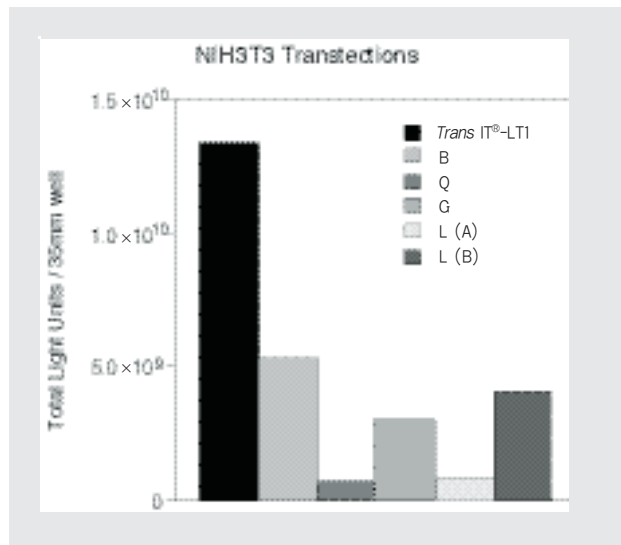
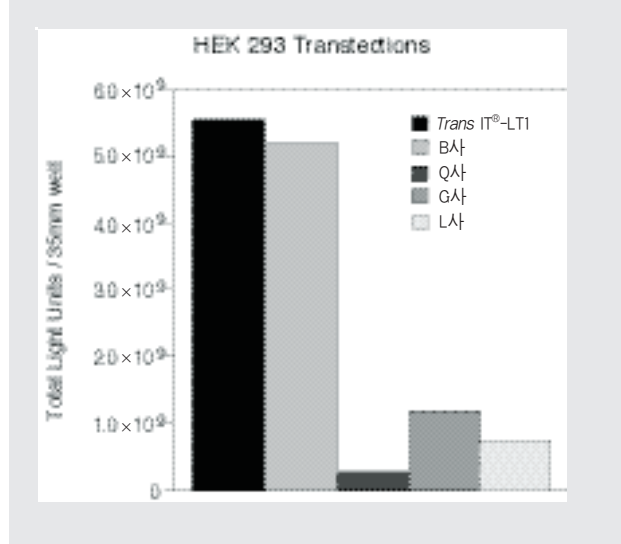


그림 2 Trans IT와 타사의 Lipofection시약과의 비교

■ 제품목록

제품명	TaKaRa Code	포장량
Trans IT®-LT1	V2310	50~300회(35 mm dish)
Trans IT®-LT2	V2320	50~300회(35 mm dish)
Trans IT®-100	V2100	50~300회(35 mm dish)
Trans IT®-PanPak	V2500	각 25~150회(35 mm dish)

Trans IT®-LT1, -LT2, -100의 3종을 sample pack으로 한 조건 검토용 set 입니다.

Strategic Diagnostics사 인증 Laboratory Service

# 효소면역법에 의한 유전자변형 대두의 검정수탁서비스 개시!!

금번 TaKaRa는 미국 Strategic Diagnostics사(SDI사)와의 기술 제휴로 일본에서는 유일하게 인증받은 연구실로서 SDI사의 유전자 재조합 작물(GMO) 검정용 EIA Kit을 이용한 검정수탁서비스를 개시하였다. 유전자 변형 대두 "Round-Up-Ready"에 들어 있는 제초제 내성 유전자의 단백질 산물(CP4 EPSPS)을 측정함으로써 유전자 변형 대두 검정 업무를 수탁한다. 이 검정에서는 SDI사가 "Round-Up-Ready"의 개발원인 Monsanto사와의 제휴에 의해 개발한 CP4 EPSPS 단백질을 단시간(약 4시간)에 검출할 수 있는 2 step EIA Kit(GMO Soya Test kit)을 사용한다. 본 kit는 생 콩(大豆)이나 분쇄콩, 탈지콩으로부터의 GMO 검출에 적합하다. 또 본 kit를 사용한 측정에는 생콩(大豆), 분쇄콩, 시료의 분석에 필요한 표준품으로서 full-fat flour standard 및 defatted flour standard를 사용하므로 검정하는 시료의 대한 정량적인 측정을 할수 있다.

주의) 가공식품에 대해서는 검체의 가공 상태에 따라 검정할 수 없는 경우가 있습니다.

■ 조작법

검체로부터 단백질을 추출

- ↓
- 필요에 맞게 단백질 추출시료를 희석
- ↓
- 시료 100 μl를 well에 첨가
- ↓ 37°C, 1시간
- 세정 3회
- ↓
- Soya conjugate(효소표식항체) 100 μl를 well에 첨가
- ↓ 37°C, 1시간
- 세정 3회
- ↓
- Color Reagent 100 μl를 well에 첨가
- ↓ 실온, 10분
- Stop solution 100 μl를 well에 첨가
- ↓
- 450 nm 측정

■ 성능

정량범위 0.3%~2.5% w/w GMO  
검출감도 0.1% w/w GMO

동시재현성 (CV치 ; n=24)

sample*	0.3% GMO	1.25% GMO	2.5% GMO
Full Fat Flour	13.2%	8.9%	6.8%
Defatted Flour	22.2%	7.1%	5.8%

\* GMO의 함량(%)은 중량%

일차 재현성(CV치 ; n=24)

sample*	0.3% GMO	1.25% GMO	2.5% GMO
Full Fat Flour	12.8%	7.4%	8.1%
Defatted Flour	20.6%	9.1%	6.3%

\* GMO의 함량(%)은 중량%

TaKaRa는 자신의 시료를 검정하는 고객에 한하여 SDI사의 유전자 재조합 대두 검정용 EIA Kit(GMO Soya Test Kit) 및 표준품도 판매한다.

■ GMO Soya Test Kit

TaKaRa Code	ST001	96회용	
내용:	Soya Extraction Buffer	500 ml	1 vial
	Soya Assay Buffer	70 ml	1 vial
	Coated Strip Well	8 wells × 12 strips	
	Soya Conjugate		1 vial
	Soya Conjugate Diluent	22 ml	1 vial
	Color Reagent	20 ml	1 vial
	Stop Solution	20 ml	1 vial
	10× Wash Buffer Concentrate	100 ml	1 vial

■ 표준품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Full-Fat Standard	ST010	1 Set
Defatted Flour Standard	ST011	1 Set

\* 이 서비스는 TaKaRa 본사 유전자해석센터에서 실시합니다.

Version  
Up

# Pyrobest® DNA Polymerase

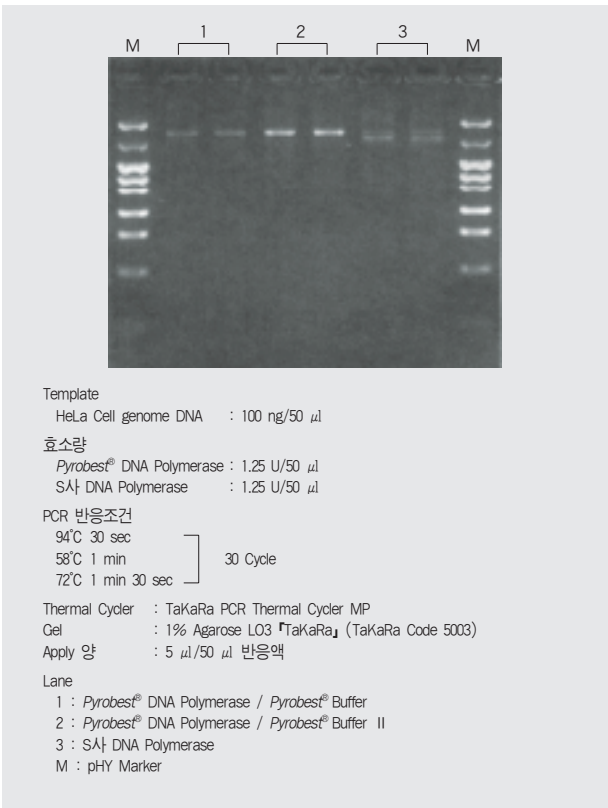
TaKaRa Code R005A 125 U  
R005B(A×4) 500 U

## Buffer의 개량으로 보다 높은 「정확성」과 「반응성」을 실현!!

정확성을 요구하는 증폭반응에 사용하였던 호평의 Pyrobest® DNA Polymerase의 첨부 buffer를 version up하여 Pyrobest® buffer II로 개량하였다. Buffer를 개량함으로써 동등한 정확성을 유지한 채 보다 높은 반응성을 실현할 수 있게 되었다. 따라서 높은 정확성과 반응성을 겸비한 증폭반응이 가능하다. 본 고에서는 지금까지 첨부하였던 Pyrobest® buffer와 이번에 version up한 Pyrobest® Buffer II를 사용하여 Pyrobest® DNA Polymerase에 의한 증폭반응 및 S사 DNA Polymerase에 의한 증폭반응을 각각 실시하여 비교 검토 한 결과를 소개한다.

### ■ 실험 1 : Human p53 region 2.9 kbp의 증폭반응

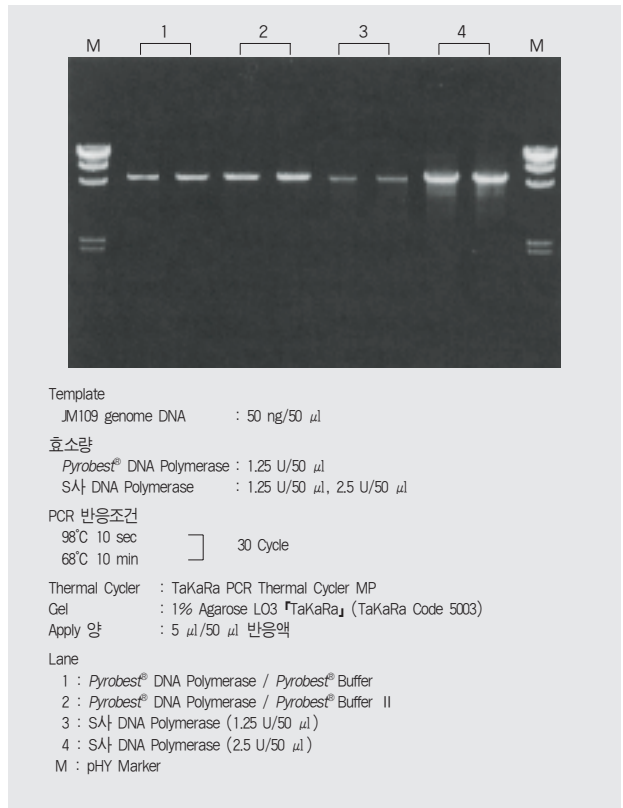
Human genome DNA를 주형으로 하여 p53 region의 2.9 kbp 단편을 증폭해 보았다.



Pyrobest® Buffer II를 사용하여 반응하면 기존의 buffer에 비해 증폭산물량이 증가함을 확인할 수 있었다. 또 S사 DNA Polymerase의 반응에서는 비특이적인 증폭을 확인할 수 있었지만 Pyrobest® DNA Polymerase에서는 확인할 수 없었다.

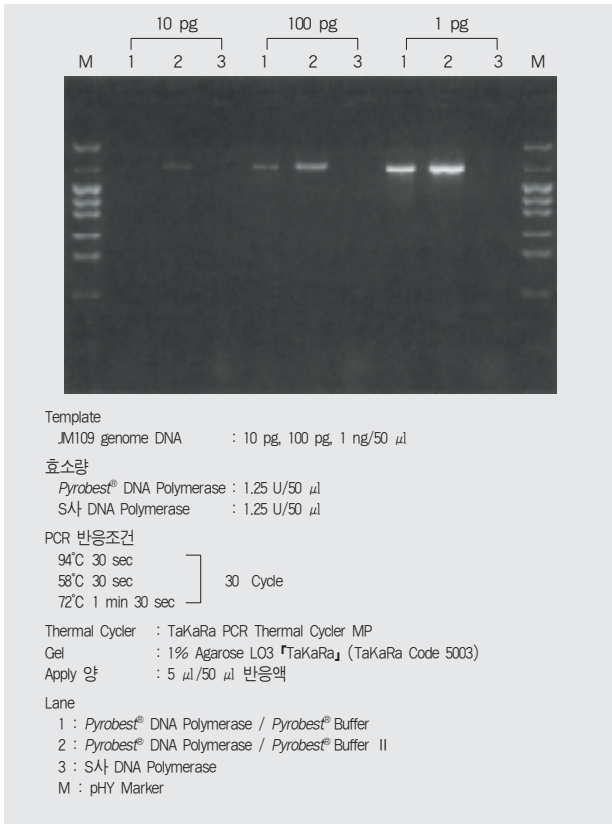
### ■ 실험 2 : 대장균 8 kbp의 증폭반응

대장균의 genome DNA를 주형으로 하여 8 kbp의 단편을 증폭해 보았다.



Pyrobest® Buffer II를 사용하여 반응하면 기존의 buffer에 비해 증폭산물량이 증가함을 확인할 수 있었다. 또 S사 DNA Polymerase를 동량(1.25 U/50  $\mu$ l)사용한 경우보다도 증폭산물량이 많고 2배량(2.5 U/50  $\mu$ l)을 첨가한 경우에서도 동등한 증폭산물량을 확인할 수 있었다.

■ 실험 3 : 대장균 2 kbp의 증폭반응에서의 감도  
 다양한 양의 대장균 genome DNA을 주형으로 하여 2 kbp의 단편을 증폭하였다.



Pyrobest<sup>®</sup> Buffer II를 사용하여 반응함으로써 기존의 buffer로 증폭할 수 없었던 10 pg/50  $\mu$ l의 주형량에서도 증폭이 확인되었다. 또 100 pg/50  $\mu$ l, 1 ng/50  $\mu$ l의 주형량에서도 증폭산물량의 증가를 확인할 수 있었다. 한편 S사 DNA Polymerase는 이 target의 증폭에 관하여 적합하지 않았고, 1 ng/50  $\mu$ l의 주형량에 있어서도 증폭을 확인할 수가 없었다.

## TaKaRa PCR Enzyme들을 보다저렴하게 사용할 수 있습니다!!

당사의 홈페이지(www.bohan.co.kr)를 접속하신 후 초기 화면의 "뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제(1999.11.22 ~ 2000.2.29)"를 클릭하여 인터넷 주문을 하시면 100일간 20%의 할인혜택과 다양한 특전을 받으실 수 있습니다. TaKaRa는 TaKaRa Taq의 발매 이래 연구자의 요구에 부응하여 여러가지 PCR Enzyme 관련제품을 개발, 공급하여 왔습니다. 연구 목적에 맞추어 아래의 풍부한 제품 중에서 선택하여 주시기 바랍니다.

### PCR Enzymes

- PCR 반응의 가장 기본적인 Enzyme  
**TaKaRa Taq<sup>™</sup>**  
 250 U 111,000원
- 경이의 증폭량, 향상된 증폭길이의 New standard  
**TaKaRa Ex Taq<sup>™</sup>**  
 250 U 138,000원
- 보다 길고 정확한 단편의 증폭에  
**TaKaRa LA Taq<sup>™</sup>**  
 125 U 138,000원
- GC rich, repeat sequence 등  
 복잡한 2차구조를 갖는 주형의 증폭에  
**TaKaRa LA Taq<sup>™</sup> with GC Buffer**  
 125 U 138,000원
- 초고속의 신속한 증폭에  
**TaKaRa Z-Taq<sup>™</sup>**  
 200 U 294,000원
- High Fidelity의 초정확성  
**Pyrobest<sup>™</sup> DNA Polymerase**  
 125 U 136,000원

### Premix/One Shot Series

- Primer와 주형 DNA를 첨가하는 것만으로 OK  
**Premix Taq<sup>™</sup>**  
 (TaKaRa Taq<sup>™</sup> version/TaKaRa Ex Taq<sup>™</sup> version)  
 120 회 110,000원  
 500 $\mu$ l  $\times$  6개 138,000원
- 0.2 ml tube에 Primer와 주형 DNA를  
 첨가하는 것으로 LA PCR이 OK  
**One Shot LA PCR<sup>™</sup> Mix**  
 25 $\mu$ l  $\times$  24개 111,000원
- 0.2 ml tube에 Primer와 주형 DNA를  
 첨가하는 것으로 PCR에서 전기영동까지 OK  
**PerfectShot<sup>™</sup> Ex Taq**  
 (Loading dye mix)  
 48 회 83,000원

\* 상기 가격은 인터넷 주문에 한 합니다.

NEW

# Influenza A Virus EIA Kit

TaKaRa Code MK120

96회

Influenza는 virus로 유발되는 중요한 감염증 하나로서, 「감기」증후군과는 임상적, 역학적, virus학적으로 크게 차이를 나타낸다. Influenza virus는 상기도 점막상피세포에 감염, 호흡기를 통해 침입해 온다. 다른 「감기」증후군과 비교하여 두통, 발열, 권태감이 격심하고, 특히 A형 influenza의 경우에는 고령자나 유아에서 사망한 예도 있을 정도로 심각한 증상을 나타낸다. 본 고에서는 influenza A형 virus를 검출하기 위해 신발매한 EIA kit에 관하여 소개한다.

## ■ 서론

Influenza virus는 envelope를 가진 RNA virus이며 virus 입자는 직경 약 100 nm의 구상이다. NP(핵 단백질)의 항원성 차이에 의해 3종류의 형태(A,B,C,형)로 분류되는데, A형과 B형은 virus 표면 단백질에 존재하는 적혈구응집소(HA 항원)과 neuraminidase(NA 항원)의 항원성의 차이로 인해 아형으로 분류된다. A형은 표면항원의 특이주가 출현하기 쉽고 변이항원에 대하여 항체보유율이 낮아 세계적 대유행을 불러 일으킨다. Virus는 사람 이외에 돼지, 말, 오리 등의 조류에서도 분리되고 있으며, 동물체내에서 유전자 재조합이 일어나 신형의 virus가 출현할 수도 있다. B형은 새로운 변이주가 출현하여도 항원의 변이가 연속적으로 일어나 국지적으로만 유행한다. 이번에 심각한 증상을 일으키는 A형 influenza의 존재를 검출하기 위해, 표면항원의 변이가 일어나더라도 반응할 수 있는 A형 NP항원에 대한 항체를 이용한 Influenza A형 Virus 측정 Kit를 Osaka 공중위생연구소의 협력을 얻어 개발하였다. 사용하는 포집항체는 조류에서 유래한 H5N9의 A형 influenza virus(A/Turkey/Ontario/7732/66)을 면역하여 얻은 anti-A type-antibody로 A형 influenza virus에 전반적으로 반응한다. 그 측정원리는 다음과 같다. 즉, influenza A형의 핵 단백질(NP)에 대한 monoclonal antibody를 고정화한 96-well plate(항체 plate)로 virus 항원을 포획한 뒤, 포집한 항원을 biotin으로 표식한 토끼 유래 anti-influenza A type polyclonal antibody(biotinylated Ab)로 결합시킨후, 항원에 결합한 biotinylated secondary Ab에 peroxidase로 표식한 streptavidin을 결합시켜, peroxidase의 기질을 첨가하여 발색함으로써 influenza A형 virus를 간접적으로 검출한다.

측정조작시간은 2시간 정도이며, 측정감도는 0.4 HA의 virus에 해당하는 항원량까지 검출할 수 있다. HA는 influenza가 갖는 적혈구 응집능을 이용한 influenza의 정량법(적혈구응집법)의 단위이다(이 방법에서는 검체(항원)의 2배 단계희석계

열을 조제하여 molmot의 적혈구 유액을 완전히 응집한 검체의 최고 종말 희석배수를 구하여 HA로 정의한다). 1 HA는 검체의 원액(1배 희석)으로 적혈구를 완전응집할 수 있는 virus 양에 상당한다. Virus 양이 많을 수록 희석 배수는 높아지며 HA 값은 커지게 된다. 본 kit에서 사용하는 단위 1 unit는 1 HA의 virus에 해당하는 항원량을 표시한다.

Virus 분리법과의 상관관계를 조사해 보니 Virus 분리법에서는 A형 양성으로 판정된 50 검체 중 34 예가 ELISA 양성으로 나타나는 68%의 검출율을 보였다. Virus 입자가 하나라도 존재하면 검출할 수 있는 Virus 분리법보다는 감도가 떨어지지만 단시간에 대량의 검체처리를 할 수 있다는 이점을 가지므로 양계장, 양돈장 등에서의 감염검출 등에 도움이 될 것으로 사료된다. 검체는 사람의 경우 콧물 또는 가래액을, 닭의 경우 분변을, 돼지의 경우는 콧물을 이용한다.

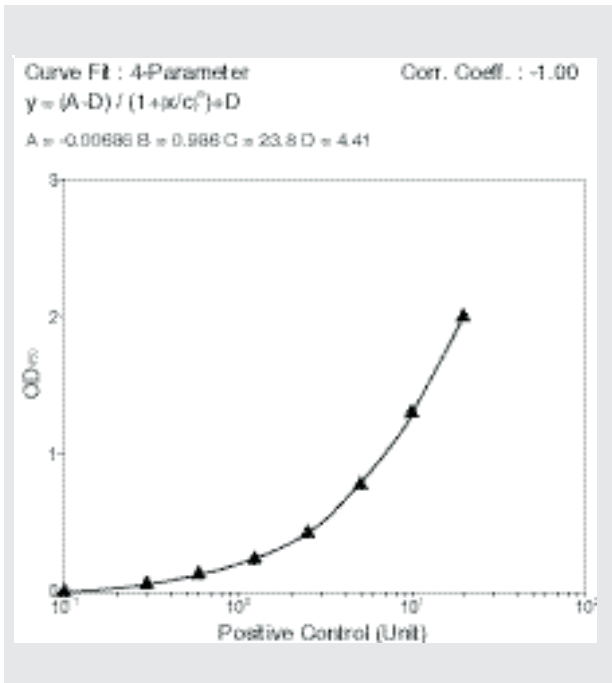
## ■ Kit의 내용

항체 plate	1 plate
A형 virus 양성 control(불활성화된 제제)	1 ml용
biotin화 항체	11 ml용
peroxidase 표식 streptavidin	11 ml용
기질액(TMBZ:3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)	12 ml
반응정지액(1N 황산)	12 ml
검체희석액	
(virus를 용해하기 위한 계면활성제 함유)	11 ml

■ 검체의 조제방법

- 사람, 돼지 유래의 경우: 콧물이나 후두세척액을 검체로서 사용한다. 콧물은 tube 또는 면봉으로 채취한다. 점성이 높은 경우는 소량의 PBS에 현탁하고 불용물을 원심제거한다. 그 상층액 100μl에 동량의 검체희석액을 첨가해 2배로 희석하여 측정에 사용한다.
- 새에서 유래한 경우: 분변을 채취하여 검체로 사용한다. 동일하게 소량의 PBS에 현탁하고 불용액은 원심분리하여 제거한다. 그 상층액 100μl에 동량의 검체희석액을 첨가해 2배로 희석하고 측정에 제공한다.
- 측정까지 검체를 보관할 필요가 있을 경우는 -20°C에서 보존한다.
- Virus의 양이 적은 경우는 일단 MDCK(개 신장세포)에 접종하여 virus를 배양하고 배양후에 세포를 검체희석액으로부터 추출하여 그것을 그대로 ELISA에 제공하여도 좋다.
- 어느 검체라도 감염성이 있는 것으로 취급하고 모든 작업에 있어서 biohazard(미생물학적 위험성)에 대한 대책을 강구한다. 폐기시에는 autoclave로 반드시 멸균한다.

■ 검체의 조제방법



표

Positive Control (unit)	20.0	10.0	5.00	2.50	1.25	0.625	0.313	0.00
OD <sub>450</sub>	2.184	1.484	0.945	0.597	0.396	0.285	0.226	0.173

■ 재현성

(1) 동시재현성

Positive control을 희석하여 만든 3 종류의 시료를 이용하여 동시재현성 실험을 실시하였다(n=16).

동시재현성 (n=16)

	X(unit)	Sd(unit)	CV(%)
시료 1	2.730	0.102	3.7
시료 2	0.867	0.038	4.4
시료 3	0.367	0.020	5.5

(2) 일차 재현성

Positive control을 희석하여 만든 3 종류의 시료를 3일에 걸쳐 측정하여 일간 변동을 조사하였다.

일차재현성 (n=3)

	X(unit)	Sd(unit)	CV(%)
시료 1	2.680	0.046	1.7
시료 2	0.828	0.038	4.5
시료 3	0.336	0.031	9.2





# Influenza Virus Typing Set

TaKaRa Code MK421

1 Set

Influenza virus는 표면 단백질의 변이가 심하게 일어나 백신접종의 효과를 좌우하는 큰 요인이 된다. 또한 강한 감염력을 가지기 때문에 단시간에 퍼진다. 따라서 influenza virus의 typing은 매우 중요하다. 본 제품은 influenza virus의 아형을 typing하기 위한 kit이다. 각종 biotin화 항체(A형 virus의 아형을 구별할 수 있는 monoclonal Ab 2종, 모든 A형 virus에 결합하는 monoclonal형 Ab 1종, 모든 B형 virus에 결합하는 monoclonal형 Ab 1종, A형과 B형의 양쪽에 결합하는 polyclonal Ab 1종)과 peroxidase 로 표식한 streptavidin을 조합하여 이용함으로써 typing을 실시한다. 검출감도는 PAP법과 동등하며, 주로 virus 검체를 96-well microplate상에서 배양세포에 감염, 증식시킨 후 동정할 수 있도록 편리하게 조제하였다.

### Kit의 내용

① Biotin화 항 influenza A형 (H1N1, H2N2) 항체 Biotinylated-C179	100 $\mu$ l
② Biotin화 항 influenza A형 (H3N2) 항체 Biotinylated-F49	100 $\mu$ l
③ Biotin화 항 influenza A형 항체 Biotinylated-C111	100 $\mu$ l
④ Biotin화 항 influenza B형 항체 Biotinylated-9D6	100 $\mu$ l
⑤ Biotin화 항 influenza A형, B형 항체 Biotinylated-Anti influenza A, B	100 $\mu$ l
⑥ Peroxidase 표식 streptavidin Avidin-POD	500 $\mu$ l
⑦ 항체희석액 (×4) Diluent (×4)	250 ml

\*사용시에는 PBS로 4배 희석하여 사용한다.

### Biotinylated 항체의 특이성

- 항 influenza A형 (H1N1, H2N2) 항체 : C179  
Influenza A형(H1N1)형과 (H2N2)형의 HA 주요영역에서 공통으로 보존되어 있는 입체구조를 인식하는 항체이다. 항원 변이에 좌우되지 않고 H1 아형과 H2 아형에 반응한다.
- 항 influenza A형(H3N2)항체 : F49  
Influenza A형(H3N2)의 HA 주요영역을 특이적으로 인식하는 항체이다.
- 항 influenza A형 항체 : C111  
Influenza A형 virus의 matrix 단백질(M1)을 인식하는 항체이다. A형 virus의 아형에 상관없이 모든 A형 virus 형에 반응한다.
- 항 influenza B형 항체 : 9D6  
Influenza B형 virus의 핵 단백질(NP)를 인식하는 항체이다. 광범위한 B형 influenza virus에 특이적으로 반응한다.

- 항 influenza A형, B형 항체 : 토끼의 polyclonal 항체  
Influenza virus(A형:북경주 H1N1, 무한주 H3N2, B형:삼중주, 광동주)의 HA 항원을 면역하여 만든 토끼유래의 항혈청이다. A형 virus와 B형 virus에 동등하게 반응한다.

각 항체의 virus주에 대한 반응성을 표 1에 나타내었다.

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

Virus type and strain	C179		F49		C111	
	Staining	Neutralizing	Staining	Staining	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/Chicken/Germany "N" /49	-	-	+	+	-	-
(H11N6) A/Duck/England/56	-	-	-	-	+	+
(B) B/Nagasaki/1/8	-	-	-	-	-	-

표 2 각종 influenza B형 virus에 대한 monoclonal Ab 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/40	+
B/Lee/2/87	+
B/Aichi/5/88	+
B/Honkon/22/89	+
B/Mie/1/93	+
B/Kanton/5/94	+

■ 조작법

(1) 96-well microplate에서 single layer로 배양한 MDCK세포(Madin-Darby canine kidney)에 virus를 접종한다.

아래와 같이 조작한다(각종 검사기관에 의하여 독자적으로 검토한 방법이 있는 경우는 이 범위에 들지 않는다) 채취한 콧물을 Hank's 배지 또는 PBS 등으로 현탁하여 4°C 10,000×g에서 5분간 원심분리한 뒤 그 상층액을 virus 액으로 한다. 혈청 함유 배지를 이용하여 96-well plate에서 80% 까지 포화 배양한 MDCK 세포로부터 배양 상층액을 제거하고 200 μl의 PBS로 well을 1회 세정한다. Well로부터 액을 충분히 제거한 후 조제한 virus 액을 세포에 감염시킨다. 다음에 혈청 함유 배지에 100 μl 첨가하고 15~20시간 동안 배양을 계속한다.

(2) 세포의 고정

Virus를 감염시킨 MDCK세포의 배양액으로부터 배지를 제거한다. 100 μl의 99% ethanol을 well에 첨가하고 실온에서 10분간 방치하여 세포를 고정한다(제거한 배지에는 감염성 virus 입자가 존재하고 있으므로 취급에 주의한다). 고정후 PBS로 각 well을 3회 세정하고 그 액은 버린다.

(3) 내인성 biotin의 blocking

0.1% avidin 용액을 각 well에 100 μl씩 첨가하고 10분간 방치한다. 액을 제거한 후 0.01% biotin 용액을 각 well에 100 μl씩 첨가하고 10분간 방치한다. 다음에 PBS로 3회 세척한 뒤 액을 버리고 다음조작으로 이동한다.

(4) 비특이적 결합부위의 blocking

⑦의 용액을 PBS로 4배 희석한다. 그 액을 각 well에 200 μl씩 첨가하고 실온에서 30분간 방치하여 blocking을 실시한다. 액을 버리고 plate의 면을 뒤집어 paper towel 위에 놓고 액을 완전히 제거한다. 또한 ⑦의 용액 및 그 4배 희석액은 방부

제를 함유하지 않기 때문에 사용후에는 동결 보존한다.

(5) Biotin화 항체반응

각 항체를 ⑦의 4배 희석액으로 100배 희석하여 항체 용액을 필요한 양 만큼 조제한다.

Blocking 조작을 한 plate well에 각 항체 용액을 100 μl씩 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨다(이때 하나의 항체를 하나의 well에 첨가하도록 한다.) 반응후 세정용 완충액(0.1% Tween/PBS)로 각 well을 4회 세정한다. 액을 버리고 paper towel 위에서 액을 완전히 제거한다.

(6) Peroxidase 표식 streptavidin 결합반응

⑥의 peroxidase 표식 streptavidin을 ⑦의 4배 희석액으로 100배 희석하여 효소용액을 필요한 양 만큼 조제한다. 이 용액을 각 well에 100 μl씩 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨다. 반응후 세정용 완충액(0.1% Tween/PBS)로 각 well을 4회 세정한다. 액을 버리고 paper towel 위에서 완전히 제거한다.

(7) 발색반응

발색기질 (자가조제 또는 구입하여 조제한 DAB기질을 이용함)을 각 well에 100 μl씩 첨가하고 실온에서 발색시킨다. 현미경으로 각 well을 관찰하며 충분한 발색이 진행된 시점에서 기질을 버리고 각 well에 PBS를 100 μl씩 첨가한다. 염색 결과의 pattern에 따라 influenza virus의 typing을 행한다.

■ 참고문헌

- 1) Okuno, Y. et al (1993) *J. Virol.* **67**, 2552-2558.
- 2) Okuno, Y. et al (1994) *J. Virol.* **68**, 517-520.
- 3) Ueda, M. et al (1997) 일본홍부임상 56권 11호 : S116-S121
- 4) Ueda, M. et al (1998) *J. Chin. Microbiol.* **36**, 340-344.
- 5) Nakagawa, N et al (1999) *J. Virol. Methods* **79**, 113-120.

■ 관련제품

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



# Cyclooxygenase(COX) 관련제품

금번 TaKaRa는 산화 stress 및 apoptosis 관련제품으로서 COX-1 및 COX-2에 대한 각 항체 및 양 유래의 COX-1, COX-2를 신 발매하였다. 본 고에서는 이들의 제품을 소개한다.

Cyclooxygenase(COX)는 Prostaglandin H synthase 라고도 불리우는 생체내 효소로 고등동물의 각종 세포에서 구성적으로 발현하는 COX-1과 유도효소인 COX-2의 2종류로 분류된다. COX는 arachidonic acid를 prostaglandin H<sub>2</sub>로 변환하는 효소로, prostaglandin, thromboxane, prostacyclin 생합성의 제 1단계에 관여한다. 특히 유도효소인 COX-2는 IL-1이나 다양한 증식인자에 의한 자극으로 생합성이 유도되어, 특정 종류의 암이나 apoptosis, 골대사 등과의 관련성이 주목받고 있다.

## (1) Anti-COX 항체

### Anti-Ovine COX-1

Clone 번호	특이성	TaKaRa Code	Subclass	용량
CX111	양 COX-1과 반응	M156	Mouse IgG <sub>2b</sub>	0.5 mg
FITC 표식 CX111*	양 COX-1과 반응	M157	Mouse IgG <sub>2b</sub>	0.25 mg
Antiserum	양 COX-1과 반응	M158	Rabbit 유래	100 $\mu$ l

\* FITC로 표식한 CX111 monoclonal Ab

### Anti-Mouse COX-1

Clone 번호	특이성	TaKaRa Code	Subclass	용량
polyclonal	Mouse COX-1과 반응	M159	Rabbit 유래	0.2 mg

### Anti-Human COX-2

Clone 번호	특이성	TaKaRa Code	Subclass	용량
CX229	Human COX-2와 반응	M160	Mouse IgG <sub>1</sub>	50 $\mu$ g
FITC 표식 CX229*	Human COX-2와 반응	M161	Mouse IgG <sub>1</sub>	100 $\mu$ g
Polyclonal	Human COX-2와 반응	M162	Rabbit 유래	0.5 mg

\* FITC로 표식한 CX229 monoclonal Ab

### Anti-Mouse COX-2

Clone 번호	특이성	TaKaRa Code	Subclass	용량
Polyclonal	Mouse COX-2와 반응	M163	Rabbit 유래	0.3 mg
Antiserum	Mouse COX-2와 반응	M164	Rabbit 유래	100 $\mu$ l

### Anti-Ovine COX, Polyclonal

Clone 번호	특이성	TaKaRa Code	Subclass	용량
Polyclonal	양 COX-1, 2와 반응	M165	Rabbit 유래	0.2 mg

## (2) COX(Ovine)

제품명	TakaRa Code	용량
COX-1 (Ovine)	7901	5000 U
COX-1 (Ovine) Electrophoresis Standard*	7902	5 $\mu$ g/50 $\mu$ l
COX-2 (Ovine)	7903	1000 U
COX-2 (Ovine) Electrophoresis Standard*	7904	5 $\mu$ g/50 $\mu$ l

\*주) Western blotting 이나 전기영동의 standard용 제품이며, 변성에 의해 효소활성은 실패되었음.

### ■ 유래

COX-1 : 양의 정량샘 ; COX-2 : 양의 태반

### ■ 활성의 정의

37°C, pH 8.0에서 arachidonic acid 산을 기질로서 1분간에 1 nmol의 효소를 소비하는 효소활성을 1 U로 한다.

### ■ 보존

-80°C



# Sure-RACE™ Multi-Tissue RACE Panels

Human  
Mouse

TaKaRa Code GN300  
TaKaRa Code GN301

OriGene Technologies사의 제품입니다.

## Nested PCR에 의한 표적 유전자의 splicing 해석 및 전사개시점의 해석을 간편하게 실시 !!

시판하는 cDNA library에는 유전자 전체길이를 cover하는 clone은 적고 5'영역측이 빠진 clone이 많이 존재한다. 이와 같은 경우는 5'말단 영역을 얻기 위해 유전자 특이적인 primer를 이용하여 5'-RACE(Rapid amplification of cDNA ends)법을 일반적으로 이용한다. 본 제품은 mRNA가 아닌 double strand cDNA(5'말단에 두 개의 adaptor 배열을 부가)를 48 well plate에 분주해 놓아 번거로운 poly-A tail mRNA의 조제와 역전사 반응을 하지 않고 PCR 시약을 well에 가하여 nested PCR을 하는 것만으로 5'-RACE를 할 수 있다. 더구나 48 well plate에 24종류의 조직으로부터 조제한 2단계 농도(1×, 5×)의 double strand cDNA를 분주해 놓아 조직간에서의 splicing 해석이나 전사개시점의 해석을 nested PCR과 agarose 전기영동을 하는 것만으로 간단히 할 수 있다. 또 human 및 mouse용의 2종류 제품을 준비하였다.

### ■ 특징

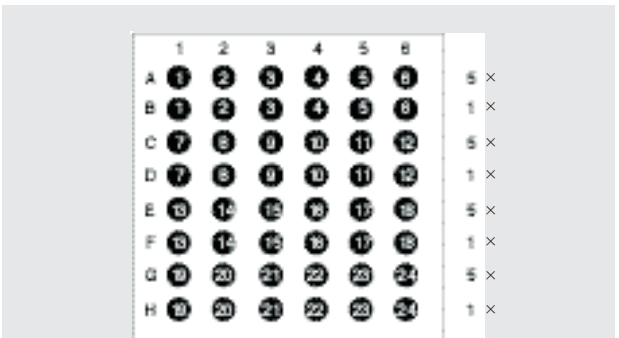
- 1) Nested PCR과 전기영동조작만으로 할 수 있다. 필요한 adaptor-primer(2종류: ADP1, ADP2)를 첨부하였다.
- 2) Plate well 중의 double strand cDNA의 조제에는 MMLV RTase와 *Tth* DNA polymerase에 의한 dual-cycling 반응법(mRNA의 2차구조의 영향을 받기 어렵다)을 역전사에 이용하므로 완전한 길이의 cDNA를 조제할 수 있는 가능성이 높다. 또 nested PCR을 위해 double strand cDNA의 5'말단에 adaptor 배열을 부가하였다.
- 3) 24종류의 조직간에서의 비교를 agarose gel 전기영동으로 쉽게 실시할 수 있다.
- 4) Control로 TFR 유전자에 특이적 primer를 첨부하였다.

### ■ 원 리



### ■ 내 용

48-well plate	2 장
TFR primer set (TRP1, 2)	각 10 μM
Adaptor primer (ADP1, 2)	각 10 μM
DNA Marker (20 lane)	100 μl
Loading dye	



#### Sure-RACE™ human panels (48-well plates)

1. Brain 2. Heart 3. Kidney 4. Spleen 5. Liver 6. Colon 7. Lung
8. Small intestine 9. Muscle 10. Stomach 11. Testis 12. Placenta 13. Pituitary 14. Thyroid gland
15. Adrenal gland 16. Pancreas 17. Ovary 18. Uterus 19. Prostate
20. PBL 21. Fetal brain 22. Fetal liver 23. Fat 24. Mammary gland

#### Sure-RACE™ mouse panels (48-well plates)

1. Brain 2. Heart 3. Kidney 4. Spleen 5. Thymus 6. Liver 7. Stomach
8. Small intestine 9. Muscle 10. Lung 11. Testis 12. Skin 13. Adrenal gland
14. Salivary gland 15. Uterus 16. Prostate 17. Embryo 8-9 day 19. Embryo 9.5 day
19. Embryo 12.5 day 20. Embryo 19 day 21. Breast/Virgin
22. Breast/Pregnant 23. Breast/Lactating 24. Breast/Involuting

그림 Sure-RACE™ human panels, Sure-RACE™ mouse panels

# Cell line(주세포)의 유지

분자생물학, 생화학의 실험재료로서 널리 이용하는 것이 주세포(cell line)이다. 주세포는 일반적으로 무한증식능력을 획득하여 세포가 가지는 성질을 효율적으로 조사할 수 있고, 비교적 안정하게 유지된다는 특징을 가진다. 현재 수많은 주세포가 확립되었고 그들의 대부분은 몇몇의 공적기관 및 영리기관으로부터 입수할 수 있다. 따라서 실험목적에 맞는 세포를 용이하게 선택하고 사용할 수 있게 됨에 따라 주세포를 연구대상으로서 넓게 이용할 수 있다. 또 세포의 유지가 초대 배양세포에 비해 아주 용이한 점도 커다란 장점이라 할 수 있다. 하지만 주세포는 생체내에서 본래 가지고 있던 기능 및 그들이 유래한 조직의 성질을 어느 정도는 소실한, 말하자면 인공세포이다. 그 결과 얻을 수 있는 data는 어디까지나 그 주세포가 존재하는 조건하에서의 결과이고 생체에서의 기능과 연결할 수 없다는 것을 염두에 두지 않으면 안된다. 실제로 실험을 할 때 유의해야 할 것은 세포는 다양한 특성 및 개성을 가진다는 것이다. 이용하는 세포 개개의 성질에 맞추어 취급하지 않으면 양호하고 안정된 실험결과를 얻기는 힘들다. 이러한 이유로 세포의 특성에 대한 정확한 정보를 얻는 것이 중요하다. 외부로부터 입수할 때에는 신뢰하는 기관, 연구실을 선택하여 입수하고 가능한 한 상세한 정보를 얻는 것이 중요하다. 이와 관련하여 일반적으로 알아두어야 할 점은 아래와 같다.

- 1) 접착성: 단층인가 부유인가
- 2) 배 지 : 기본배지, 혈청, 증식인자, 세포접착인자 등의 첨가물
- 3) 계대의 방법: 시기, 희석율, 세포분산법
- 4) 기 타 : 특이산물의 생산, 접촉저해성, 특정 증식인자에 대한 감수성, 특이유전자의 구조 등, 그 세포에 특이적인 사항

세포는 장시간 배양하면 자연의 성질을 잃고 변화한다. 특히 주세포는 취급이 용이하여 아무렇게나 취급하는 경향이 있는데 그 세포를 결정짓는 특징(예를 들어 3T3계 세포의 접촉저해성)에는 특별한 주의를 기울여야 한다. 실험을 시작할 때는 동일 stock을 어느 정도 늘려 보존하고, 그것을 용해하여 사용한다. 일반적으로 동일한 세포는 2, 3개월 이상 사용하지 않는다. 또 세포주의 혼입을 막기 위해 2종류 이상의 세포를 동시에 취급하지 않고, 배지, PBS, trypsin 등의 용액은 세포마다 별개의 것을 사용한다. Pipet, tube는 같은 것을 반복하

여 사용하지 않는다.

## I. 계대

세포를 장기간 유지하면서 실험에 이용하기 위하여 대량으로 증식하는 경우, 배양 중인 세포를 용기로부터 회수하여 별도의 용기로 옮겨 주어야 한다. 이 조작을 계대(subculture, passage, transfer)라 한다. 실제의 배양에서 가장 문제가 되는 것은 세포의 계대이다. 이에 대한 유의점 및 protocol을 아래에 소개한다.

### 1) 계대의 시기

세포는 새롭게 배양용기에 이식될때 일반적으로 그림 1과 같은 양상으로 증식한다. 제 1기는 지체기(lag phase)이다. 이 시기에는 계대시의 손상 및 shock에 의하여 세포가 증식 가능한 상태로 되기까지의 회복을 요하는 시간, 또 새로운 환경에 적응할 때까지의 기간이다. 증식은 하지 않는다. 제 2기는 대수증식기(logarithmic growth phase)인데 이 시기에 세포는 급속히 증식한다. 그리고 영양분의 고갈, 노폐물의 축적, 세포밀도의 상승 등에 의해 증식이 정지하는 상태가 정상기(stationary phase)이다. 이 증식곡선은 세포의 종류 및 배양환경에 따라 변하는데 특히 정상기에서는 어느 정도 기간 머물러 유지되다가 갑자기 사멸이 시작된다. 그 후 세포는 사멸기(death phase)에 들어 간다.

세포를 양호한 상태로 유지하기 위해서는 가능한 한 세포에

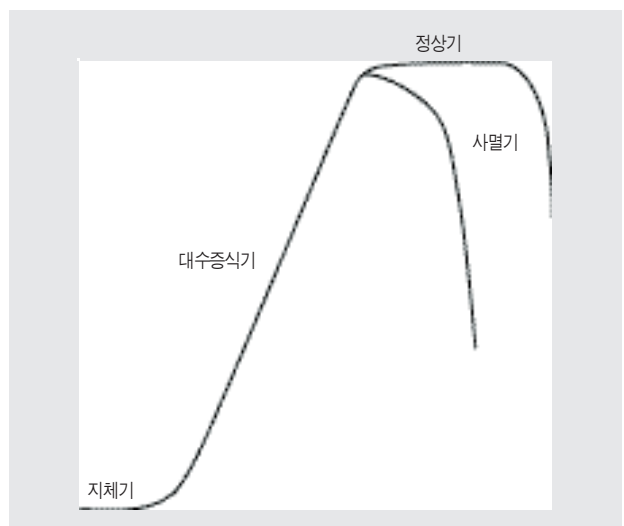


그림 1 증식곡선

shock을 부여하지 않는 것과 정상기가 길지 않도록 하는 것이 중요하다. 따라서 대수증식기가 끝날 무렵에 계대를 해주는 것이 좋다.

### 2) 계대방법

단층세포의 경우 세포사이나 세포와 배양기벽사이의 결합을 끊어 부유세포로 만들어 주어야 한다. 대부분의 경우, trypsin 등의 protease를 사용한다. 또 세포의 구축을 위해  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  등의 2가 이온이 필요하다. 따라서 EDTA 등의 chelate제를 병용 또는 단독으로 사용한다. 결합이 약한 세포는 rubber policeman 등을 이용하여 기계적으로 분리해 낸다.

기본적으로 어떤 방법을 사용하든지 상해를 가능하면 줄여 떼어 내는 것이 중요하고, 이용하는 세포에 맞는 방법을 선택한다. 부유세포의 경우는 세포를 회수한 뒤 희석하여 접종하면 된다.

### 3) 희석을

세포는 그 증식능에 따라 적절한 희석율이 있다. 농도가 너무 높으면 당연히 빈번하게 계대하여야 하고 너무 낮으면 접종후의 증식이 극히 나빠지게 된다. 또 결과적으로 압력을 가해 세포를 선택해 버릴 가능성도 있다. 통상은 3~20배 정도로 희석하고 1주간 간격으로 계대 한다. 배지교환은 1주일에 2~3회 정도 해준다.

## 준비물

### 1) 시약

- PBS
- Trypsin solution

### 2) 시약의 조제

· PBS		(최종농도)
NaCl	8 g	(137 mM)
KCl	0.2 g	(2.7 mM)
$Na_2HPO_4$	1.15 g	(8.1 mM)
$KH_2PO_4$	0.2 g	(1.47 mM)
물로 total 1 l 까지 채운다		
Autoclave로 멸균하여 사용한다		
· 0.25% Trypsin solution		
trypsin (1: 250)	2.5 g	

PBS로 total 1 l 까지 채운다

필터(직경 0.22  $\mu$ M)를 이용한 멸균, -20°C 보존

세포에 따라 EDTA를 최종농도 0.02%까지 가해도 좋다.

## 계대 protocol

(섬유아세포인 Balb3T3, NIH3T3등을 100 mm dish에서 배양한 경우)

배지를 흡인하여 버린다



PBS를 첨가해 세척한다



Trypsin solution (0.1~0.25%)을 1~2 ml 첨가한 후 dish 전체로써 골고루 퍼지게 한 다음, Trypsin solution의 대부분을 흡인한다<sup>①</sup>



Incubator내에서 2~10분간 보온한다



현미경으로 세포가 떼어지기 시작함을 확인한 후 새로운 혈청함유 배지를 첨가한다<sup>②</sup>



세포수를 측정하고 희석하여 새로운 용기에 옮긴다<sup>③</sup>



세포가 편중되지 않도록, 직선방향으로 상하좌우로 흔들어 퍼트린다<sup>④</sup>

## Protocol상 주의점

- ①건조에 극히 약한 세포 (표피각화세포주308, BalbMK2 등)은 흡인하지 않고 trypsin액을 남긴채 배양하는 쪽이 좋은 경우도 있다. 그 후 배지를 첨가해 원심분리를 하고 trypsin을 제거할 필요가 있지만 원심분리 조작자체가 shock가 되는 세포도 있기 때문에 주의해야 한다.
- ②장시간의 trypsin처리는 세포를 상하게 하고 접착성을 갖게 하여 떨어지지 않게 만드므로 처리시간은 최소한으로 한다.
- ③통상 계대시마다 반드시 세포수를 측정할 필요는 없다. 시간을 들여 세포수를 측정하기보다는 오히려 손쉽게 조작하는 쪽이 좋은 결과를 얻을 수 있다. 따라서 mass pipette보다 입구가 큰 pipette을 이용하는 경우가 많다.
- ④회전시키면 중심쪽으로 편중한다. 반면, 적절하게 반대방향으로 회전하면 비교적 편중현상이 적어진다.

# BugBuster™ Protein Extraction Reagent

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

## ■ 특징

- 초음파파쇄기와 같은 장비가 필요없다.
- 한번에 대량 추출을 할 수 있다.
- 조작이 간단하여 재현성이 높은 추출이 가능하다.
- 상기의 정제 kit을 이용하면 GST · Tag 또는 His · Tag 용 합 단백질의 추출시료를 그대로 정제할 수 있다.

## ■ 실험예 : 각종 추출법에 의한 재조합 Endo A 추출효율의 검토

균체내의 단백질을 종래의 초음파 추출법, 신제품 BugBuster Protein Extraction Reagent 및 타사 추출시약을 이용하여 추출하고 그 효율을 비교 검토하였다. 본 실험에는 검체로서 재조합 Endo A (endoglycosidase의 일종, 분자량 약 74,000) 단백질을 발현하는 대장균(JM109주) 균체를 이용하였다.

(1) BugBuster™ Protein Extraction Reagent에 의한 추출법  
 균체배양액 6 ml을 원심분리(14,000 rpm×10 min)하여 균체를 모으고 그 균체에 시약 12 ml을 첨가한 뒤 거품이 생기지 않도록 부드럽게 교반 한다. 다음에 왕복진탕기를 이용하여 실온에서 10분간 부드럽게 incubation한 후 원심분리(14000 rpm×20 min)를 한 뒤 그 상층액을 이용하여 활성측정과 SDS겔 전기영동을 한다.

### (2) P사의 추출법

원심분리하여 얻은 균체(배양액 6 ml 상당)에 P사 시약 12 ml을 첨가하고 P사의 방법에 따라 추출하였다. 그 상층액을 분석에 사용하였다.

### (3) 종래의 초음파 추출법

원심분리하여 얻은 균체(배양액 6 ml 상당)에 추출 buffer 0.3 ml을 첨가하여 잘 교반한 후 TOMY model UR-20P Handy Sonic 사용하여 초음파 처리를 5 sec×4회 실시하였다..

다음에 원심분리(13,000 rpm×5 min)을 하여 상층액을 분석에 사용하였다.

### (4) Endo A 활성의 측정

각각의 상층액을 시료로 하여 dansylasparagine-glyco peptide 기질의 초산 buffer(pH6.0)내에서 반응을 하고 생성물을 조제하여 TaKaRa PALPAK Type R로 분석하였다.

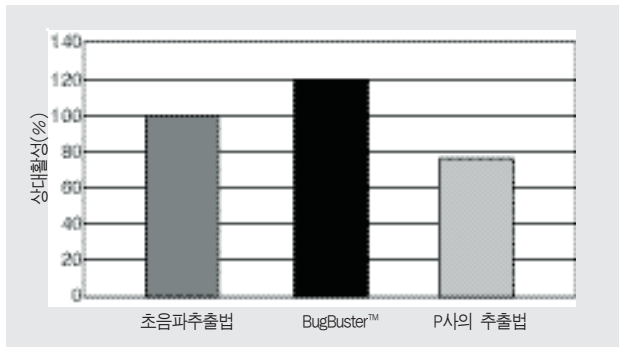


그림 1 초음파추출법으로 얻은 시료의 활성을 100으로 했을때의 상대활성

이와 같이 1회의 추출에서는 BugBuster™ Protein Extraction Reagent가 가장 높은 추출효율을 나타내었다.

### (5) SDS-Gel 전기영동

SDS-Gel 전기영동은 Laemmli법에 따라 아래와 같이 실시하였다. SDS를 함유한 시약조제용 buffer에 2.5 μl (초음파추출 시료의 경우) 또는 10 μl (본 시약 또는 P사 시약으로 추출한 시료의 경우)의 상층액을 첨가하여 열처리한 후 그 전량을 10% polyacrylamide에 apply하고 25 mA의 정전류로 전기영동을 실시하였다. 단백질의 염색에는 Gelcode® Blue Stain Reagent를 이용하였고 탈색은 탈이온수로 하였다. 그것들의 전기영동 pattern을 그림 2에 나타냈다.

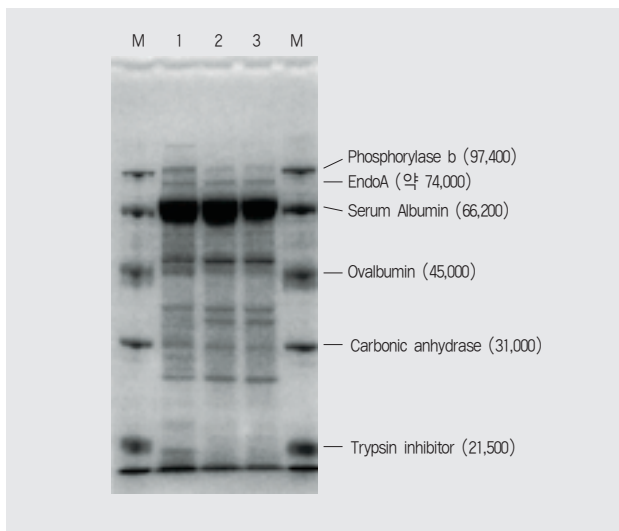


그림 2 각종추출법에 의한 전기영동 pattern의 비교

Lane 1 : 초음파추출법; Lane 2; BugBuster™; Lane 3; P사의 추출법;  
 Lane M : Size Marker (Molecular Weight Standard, Low Range)

## 단백질 검출의 새로운 방법

SYPRO Red protein gel stain은 독특한 단백질 검출시약이다. 이것은 Coomassie<sup>®</sup> blue 염색의 감도를 초월하면서도 빠르고 간편하게 염색할 수 있다. 단순히 gel을 1× SYPRO Red stain (in 7.5% acetic acid)에 40 - 60분간 담가 두기만 하면 된다.

단백질 band는 300 nm U.V. transilluminator나, green He-Ne 또는 YAG laser-excited gel scanner로 쉽게 볼 수 있으며, 사진이나 전자영상으로 보존할 수 있다. 단백질 정량은 band당 ng에서 ug까지 10<sup>3</sup>까지 직선적인 관계를 보인다.

SYPRO Red stain은 고정화 과정이 필요 없어 아주 효과적인

로 Western Blot 분석을 위한 membrane으로의 transfer가 가능하다. 염색약의 일부는 단백질과 함께 transfer되어 단백질을 membrane 상에서 관찰할 수 있다. 염색시약은 단백질에 공유결합으로 결합하는 것이 아니므로 antigenic site를 그대로 유지시켜 주고 항체와의 결합 부위도 작용할 수 있도록 해준다.

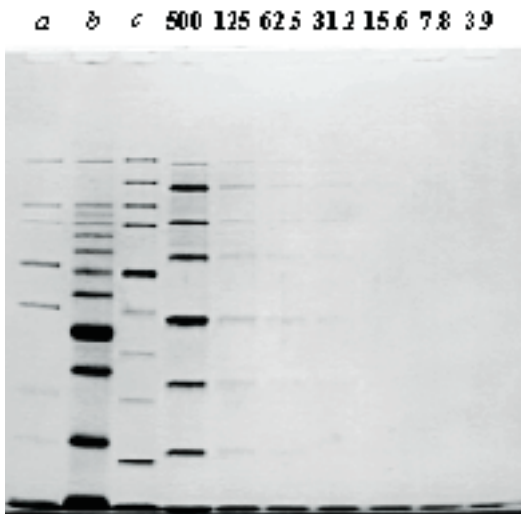
## 제품의 특징

감도 : 5 ng/band 까지 가능하다.

편리성 : 1 step 염색법으로 염색액의 교환이 필요없다.

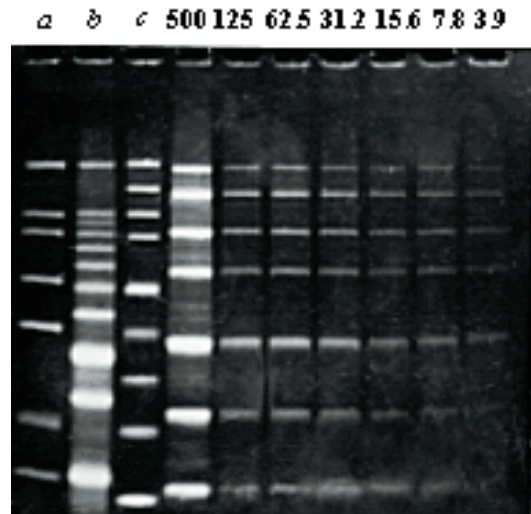
속도 : 밤새도록 탈색할 필요가 없다.

## SYPRO Red Stain과 Coomassie Stain의 감도 비교



Alpha Imager 2000으로 잡은 Coomassie-stained gel의 digital image.

단백질들을 Tris Glycine/SDS buffer로 만든 1 mm 두께의 10% precast gel로 분리하였다. Lanes a, b, c는 각기 다른 3사의 marker들을 나타낸다.



SYPRO Red-stained gel 사진.

사진은 단백질을 Tris Glycine/SDS buffer로 만든 1 mm 두께의 10% precast gel로 분리한 후 300 nm UV transilluminator로 SYPRO Red photographic filter를 장착하여 촬영하였다.

Lanes a, b, c는 각기 다른 3사의 marker들을 나타낸다.

SYPRO Red Stain은 Coomassie stain보다 월등히 높은 감도를 가지며 염색속도도 빠르다. SYPRO Red-stained gel은 destaining의 필요없이 한 시간 이내에 얻을 수 있다. SYPRO Red Stained gel은 Western Blotting, Microsequencing, 2D Gel Electrophoresis에 응용할 수 있다.



## BioWhittaker사의 정상 사람 세포 관련제품

### BioWhittaker사의 정상 사람 세포 (Normal Human Cells)

- 초대~제 4 또는 제 7 계대 세포의 동결품<sup>1</sup>
- 세포수 > 5×10<sup>6</sup> cells/vial
- 세포는 모두 증식 성능을 확인하고, 마이코플라즈마 (mycoplasma), 세균, 효모 및 진균에 오염되지 않아야 하며, 또한 PCR법에 의해 HIV-1, HBV, HCV 음성임을 확인하였다.
- 각 세포주에는 분석보증서(CA)를 첨부하였다.
- 계대배양중의 형태관찰로 성상을 확인하고, 각종 동정시험으로 확인하였다.
- 권장 접종밀도<sup>1</sup>: 2,500~5,000 cells/cm<sup>2</sup>
- 계대에서 confluent monolayer에 도달하는 일수<sup>1</sup>: 5~14일
- 최소 보증분열횟수<sup>1,2</sup>: 12~15회

<sup>1</sup> 세포의 종류에 따라 다르다.

<sup>2</sup> 세포분열은 보증분열횟수 이상으로 계속되는데 이런 경우에는 증식속도, 생화학적 반응이나 기능이 저하하여 실험결과에 영향을 주는 경우가 있다.

### BioWhittaker사의 배지

BioWhittaker사의 배지는 정상 사람 세포의 종류별로 최적상태의 증식에 적합하도록 조제하였다. 첨가물을 함유하지 않은 기본배지, 첨가인자 셋트(SingleQuots<sup>®</sup>)와 기본배지와 SingleQuots<sup>®</sup>를 조합한 배지 키트(BulletKit<sup>®</sup>)가 있다. 또 방사성물질로 표식하기 위한 표식용 배지 키트도 있다. 각 배지는 각 정상 사람 세포가 증식함을 확인한 것이며, 모든 배지는 lot별로 생화학검사 및 무균시험을 실시하였다.

#### ■ 전용 배지 키트(BulletKit<sup>®</sup>)

BulletKit<sup>®</sup>는 기본배지 500 ml 1개와 첨가인자 셋트(SingleQuots<sup>®</sup>) 1 셋트로 구성되어 양자를 혼합하여 각 세포에 최적인 배지 500 ml을 조제할 수 있다. 기본배지와 첨가배지가 별도로 소분되어 있어 적당하게 첨가물의 종류와 농도를 조절할 수 있고, 또한 배지의 유효기간을 연장할 수 있다.

#### ■ 기본배지

BioWhittaker사의 기본배지는 정상 사람 세포의 각 형태에 최적이 되도록 조제하였다. 기본배지에는 세포증식에 필요한 첨가인자를 함유하지 않으므로 세포의 접종효율과 증식을 증대하기 위하여 첨가인자를 첨가해야 한다. BioWhittaker사의 배지의 대부분은 미국 Colorado 대학 분자 세포발생 생물학교실(MCDB)의 Richard Ham박사 연구실의 조제법에 준거한다.

#### ■ 첨가인자 셋트(SingleQuots<sup>®</sup>)

SingleQuots<sup>®</sup>는 증식인자와 그외 첨가물 및 항생물질을 함유하며, 그대로 사용하도록 소분하였다. SingleQuots<sup>®</sup>를 500 ml의 기본배지에 첨가함으로써 최적의 배지를 조제할 수 있다. 모든 SingleQuots<sup>®</sup>는 무균시험 및 세포증식시험을 완료한 것이다.

#### ■ 표식용 배지 키트(LM Custom)

표식용 배지 키트는 표식시험에서 표식에 자주 사용하는 아미노산을 제거한 표식용 기본배지 500 ml 1개, 각 아미노산의 셋트 및 첨가인자 셋트(SingleQuots<sup>®</sup>)로 구성되어 있다. 표식용 기본배지는 기본배지에서 myoinositol, proline, thymidine, isoleucine, leucine, methionine 및 cysteine을 제거하였으며, phenol red를 함유하지 않는다.

각 아미노산은 기본배지에 첨가할 때에 본래의 농도가 되도록 소분되어 있어, 합입정지실험(pulse-chase technique)에 사용할 수도 있다.

#### ■ 계대배양용 시약셋트(ReagentPack<sup>™</sup>)

각 세포 모두 사용 가능한 계대배양에 필요한 시약셋트

### 제품의 보존 온도

#### ■ 사람 정상 세포

액체질소 보존

#### ■ 기본배지

4°C 보존

#### ■ 첨가인자 셋트(SingleQuots<sup>®</sup>)

-20°C 보존

#### ■ 전용 배지 키트(BulletKit<sup>®</sup>)

기본배지는 4°C에 보존하고 각 첨가인자셋트(SingleQuots<sup>®</sup>)는 -20°C에 보존한다.

혼합한 상태에서는 4°C에 보존한다.

#### ■ 표식용 배지키트(LM Custom)

표식용 배지키트(LM Custom)는 4°C에 보존하고 각 아미노산과 첨가인자 셋트(SingleQuots<sup>®</sup>)는 -20°C에 보존한다. 혼합한 상태에서는 4°C에 보존한다.

#### ■ 계대배양용 시약셋트(ReagentPack<sup>™</sup>)

-20°C 보존. Trypsin/EDTA는 신선해야 하므로 용해 후 20 ml 씩 소분하여 -20°C에서 보존하여 사용한다.

## 사용상의 주의

- (1) BioWhittaker사 제품의 사용은 모두 연구용입니다.  
사람과 동물에 사용하거나 생체진단 목적으로 사용할 수 없습니다.  
또 식품, 화장품, 가정용품 등으로도 사용해서는 안됩니다.
- (2) 제품은 BioWhittaker사의 세포, 배지, 시약 등 완전한 시스템으로 유효기간 내에 사용할 경우에만 소정의 성능을 갖습니다.
- (3) HIV-1 DNA, HBV DNA의 존재에 대해서는 PCR법의 검출한계 내에서 음성임을 확인했으나, 사용시에는 충분히

히 주의하여 주십시오. 폐기할 경우에는 가압멸균 처리하여 주십시오.

- (4) 세포분열은 보증분열횟수 이상으로 계속되는데 이 경우에는 세포의 증식속도, 생화학적 반응이나 기능이 저하하여 실험결과에 영향을 주는 경우가 있습니다.
- (5) BioWhittaker사 제품의 사용으로 인해 발생한 여하한 사고, 손해에 대해서 당사에서는 책임을 지지 않으므로 양지하시고 사용 바랍니다.

BioWhittaker사 제품에 대해서는 별도의 카탈로그를 참조하시기 바랍니다.

## Normal Human Cell · Media 일람표

세포의 기호	정상 사람세포 타입	권장 배지킷트	기본배지	기본배지의 유래
AoSMC	대동맥 평활근세포	SmGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	SmBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131
BSMC	기관지/기관 평활근세포	SmGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	SmBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131
CASMC	관상동맥 평활근세포	SmGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	SmBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131
HAEC	대동맥 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HCAEC	관상동맥 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2-MV BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HIAEC	장골동맥 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HMEC	유선 상피세포	MEGM <sup>®</sup> BulletKit <sup>®</sup>	MEBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 170
HMVEC-d	피부 미소혈관 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2-MV BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HMVEC-L	폐 미소혈관 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2-MV BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HPAEC	폐동맥 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HRCE	신피질 상피세포	REGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	REBM <sup>™</sup>	CCMD <sup>™</sup> 180*
HUAEC	제대동맥 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
HUVEC	제대정맥 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
NHA	성상세포	AGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	ABM <sup>™</sup>	CCMD <sup>™</sup> 190*
NHBE	기관지/기관 상피세포	SAGM <sup>®</sup> BulletKit <sup>®</sup>	SABM <sup>®</sup>	CCMD <sup>™</sup> 161*
NHDF	피부 섬유아세포	FGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	FBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 202
NHEK	표피 각화세포	KGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	KBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 153
NHEM	표피 멜라닌세포	MGM <sup>®</sup> -3 BulletKit <sup>®</sup>	MBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 153
NHLF	폐 섬유아세포	FGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	FBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 202
NHMC	사구체 간질세포	MsGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	MsBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131
NHNP	신경 전구세포	NPMM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	NPBM <sup>®</sup>	CCMD <sup>™</sup> 500*
NH0st	골아세포	OGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	OBM <sup>™</sup>	개변 MCDB 131
PASMC	폐동맥 평활근세포	SmGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	SmBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131
PrEC	전립선 상피세포	PrEGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	PrEBM <sup>™</sup>	CCMD <sup>™</sup> 200*
PrSC	전립선 간질세포	FGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	FBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 202
RPTEC	근위 뇨세관 상피세포	REGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	REBM <sup>™</sup>	CCMD <sup>™</sup> 180*
SAEC	소기도 상피세포	SAGM <sup>™</sup> BulletKit <sup>®</sup>	SABM <sup>™</sup>	CCMD <sup>™</sup> 161*
SkMC	골격근세포	SkGM <sup>®</sup> BulletKit <sup>®</sup>	SkBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 120
UASMC	제대동맥 평활근세포	SmGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	SmBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131
UtMVEC	자궁근층 미소혈관 내피세포	EGM <sup>®</sup> -2 MV BulletKit <sup>®</sup>	EBM <sup>®</sup> -2	개변 MCDB 131
UtSMC	자궁 평활근세포	SmGM <sup>®</sup> -2 BulletKit <sup>®</sup>	SmBM <sup>®</sup>	개변 MCDB 131

## 뉴밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제 실시

당사는 새 천년 맞이를 연구자 여러분들과 함께 축하하고 기쁨을 나눈은 물론 당사 창립 4주년 및 Bio21 인터넷 쇼핑몰의 탄생을 기념하기 위해 “뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제”를 1999년 11월 22일부터 2000년 2월 29일까지 100일간 실시합니다.

본 행사에서는 관련업계 최초로 개설한 당사의 Bio21 인터넷 쇼핑몰(www.bohan.co.kr)을 이용하여 제품을 구입하시는 분께 100일 동안 20%의 할인 혜택과 다양한 특전을 드립니다. 할인대상 품목은 PCR 효소 및 PCR 관련제품, 유전공학 키트, 제한효소, 수식효소, DNA marker 및 기타제품, Novagen사의 주요제품과 FMC사의 전제품입니다. 본 행사에 참여하시는 고객에게는 기본적인 20% 할인혜택 이외에도 다양한 보너스 특전을 드립니다. 즉, 행사기간은 물론 그 이후에도 쇼핑몰을 이용하시는 분께는 2000년 6월 말까지 구매금액의 2%를 적립하여 경품으로 환원하여 드립니다. 또 하나 2000년 6월 말까지 이용한 고객 중 우수고객 2명에게는 TaKaRa 연구소를 견학할 수 있는 특전도 드립니다. 한국 고객을 위하여 TaKaRa 본사의 지원으로 실시하는 본 행사를 적극 활용해 보시기 바랍니다(본지 46~49페이지 참조).

## 홈페이지 제품정보 일신

당사는 고객여러분들에게 홈페이지를 통한 정보를 제공해 드리기 위해 꾸준히 노력해 왔습니다. 금번 제품정보를 보다 충실히 제공해 드리고자 금년 8월 출간한 2000/2001 TaKaRa 생명과학연구용 제품가이드의 내용을 On-Line Catalogue화하여 홈페이지에 update하였습니다.

당사 홈페이지(www.bohan.co.kr)를 접속하신 후 초기화면에서 제품정보란을 통해 열람하실 수 있습니다. 본 사이트의 내용은 계속 갱신하여 CD판으로 발행할 예정입니다.

이번에 업데이트한 On-Line Catalogue에는 신제품 정보를 추가함은 물론이고 기존의 제품에 관하여도 새로운 정보를 계속해서 실을 예정입니다.

또한 당사는 On-Line Catalogue 이외에도 생명과학 연구와 관련한 기술정보를 포함한 다양한 정보들을 홈페이지를 통해 계속해서 제공해 드리고자 합니다.

## 보한바이오메디칼(주) 창사 4주년 기념 전진대회

고객 여러분의 성원에 힘입어 꾸준히 성장해 온 당사는 1999년 11월 1일 창사 4주년을 맞이하게 되었습니다. 이를 기념하고 지나온 활동들을 되돌아 보기 위해 당사와 전문대리점인 (주)녹십자양행 및 (주)코아바이오시스템은 11월 5 - 6일 양일간 보한바이오메디칼(주) 창사 4주년 전진대회 및 등반대회를 산정호수 인근의 명성산에서 가졌습니다.

본 행사를 통해 고객 여러분께 어떻게 하면 보다 질 높은 서비스를 해 드릴 것인지 또 어떠한 점들을 개선하여 보다 더 충실한 판매활동을 할 것인지를 심도 있게 토론하였고, 등반대회를 통해 TaKaRa man들의 단합도 도모하였습니다. 앞으로는 고객여러분께도 TaKaRa의 활동에 대한 전반적인 평가를 통해 강화 및 개선을 하여 착실한 브랜드로서 자리를 더욱 더 견고히 잡아가겠습니다. 화창한 햇살과 깨끗한 공기를 마실 수 있었던 산정호수에서의 전진대회를 계기로 거듭나는 TaKaRa가 될 수 있도록 최선의 노력을 경주하겠습니다. 많은 격려와 질책 부탁드립니다.



## BK21(Brain Korea 21) 참여기업 선정

당사는 교육부가 선정한 두뇌한국21사업(BK21)의 참여업체로 선정되었습니다.

이번 선정은 농업생명과학분야에서 명지대학교 경상대학교가 공동으로 신청한 BK21 사업의 참여업체로 신청하여 선정된 것입니다.

당사는 금후 6년간에 걸쳐 공동연구 등을 통하여 자금을 지원하게 됩니다

## 한국분자생물학회로부터 감사패 받아

당사는 한국분자생물학회 창립 10주년 기념식에서 TaKaRa Symposium 개최 등에 의한 학회 발전에 기여한 공로로 감사패를 받았습니다.

한편 금년으로 네번째를 맞는 '99 TaKaRa Symposium이 99년 한국분자생물학회 추계학술대회의 일환으로 지난 10월 25일 서울 교육 문화회관에서 개최 되었습니다.

이날 오후 3시부터 개최된 행사에는 300여명의 청중이 참가하여 대성황을 이루었습니다.

발표된 내용은 생명과학 분야에서 최근에 가장 관심을 받고 있는 4분야에서 최일선에서 활동하고 계신 연사가 비전문가도 알기 쉽도록 정리하여 소개해주므로서, 특히 젊은 생명과학도에 많은 도움을 주었습니다.

당사는 앞으로 보다 알찬 내용으로 TaKaRa Symposium을 기획하여 학문 발전에 기여하고자 합니다.

## 산학협력 실험실창업 벤처기업 자매회사 아트만바이오사이언스(주) 창립

당사는 명지대학교와 산학협력으로 산학협력 실험실창업 벤처기업 자매회사 (주)아트만바이오사이언스(Atman Bio Science Inc.)를 천년에 한번 있는 길일인 지난 1999년 9월 9일 창립하였습니다. 명지대학교 생명과학과 교수를 중심으로 설립한 아트만바이오사이언스는 금후 합성 DNA 제조, 단백질 해석, 유전자 염기서열 해석, DNA Chip의 제작 및 해석 등 연구지원서비스와 참여 교수가 연구성과를 바탕으로한 새로운 제품의 개발 생산, 국내 연구자가 개발한 각종 효소 등 생물재료, 기술을 산업화하여 국내공급은 물론이고 전세계에 판매할 예정입니다.

Takara Shuzo Co., Ltd, Japan의 기술 공여와 협력으로 최고 품질의 제품을 생산하고, 연구지원서비스 기술을 공여받아 신뢰의 결과를 보장 할 것입니다.

국내 판매는 당사의 전문 대리점인 (주)코아바이오시스템과 (주)녹십자양행을 통하여 이루어지며, 우선 12월부터 합성 DNA부터 공급해 나갈 계획입니다. 장기적으로는 국내의 각종 생명과학 연구성과나 기술을 산업화나 상품화 하여, 국내 생명과학 및 기술의 발전과 세계화에 선도적인 역할을 하도록 할 것입니다.

## 서울대 유전자 이식연구소 및 (주)마이크로젠 연구원의 DNA Chip 해석기술 연수

서울대학교 의과대학 유전자이식연구소(소장 서정선) 및 주식회사 마크로젠(대표이사 송원일) 생명공학 연구소(소장 이종은)의 이종은 박사를 비롯한 3명의 연구원이 지난 9월 20일부터 23일 까지 Takara의 바이오메디칼센터에서 DNA Chip 해석방법에 관한 연수를 받았습니다.

Takara는 미국의 GMS사와 협력으로 DNA Chip 제작 및 해석 시스템의 공급은 물론이고 세계 최초로 Cyanobacterium의 전 유전자 3000개를 Chip으로 제작한 CyanoCHIP Version을 공급하는 등 DNA Chip의 개발 및 해석 방법의 개발에도 많은 노력을 기울이고 있습니다.

이번 연수에서는 DNA Chip 해석에 있어서 핵심적인 Probe의 제작, Hybridization, Scanning, Image 해석에 이르기까지 전 부분에 걸쳐서 실시하고 있습니다.

한편 서울대 의대 유전자이식연구소와 생명공학 벤처기업 (주)마크로젠은 DNA Chip Center를 설립하여 DNA Chip에 관한 연구는 물론이고 Chip의 개발 및 해석업무를 본격적으로 수행할 예정입니다.

## 바이오 건강음료 Apoidan-U 신발매

당사는 그 동안 준비하여 온 바이오식품사업의 첫번째 상품으로 바이오 건강음료 Apoidan-U를 발매합니다. Apoidan-U는 다시마에서 유래하는 다당류 Fucoidan을 다량 함유하는 혼합음료입니다.

Fucoidan은 당사의 바이오연구소와 일본 재단법인 당쇄공학 연구소가 10여년의 연구에 의하여 밝혀낸 다당류로 그 생물학적 기능과 구조를 해명하였습니다. 지난 96년에는 Fucoidan-U가 암세포에 특이적으로 세포의 자살현상인 apoptosis를 일으킴을 확인하였고, 작년에는 HGF의 발현을 유도함을 밝혀내어 관련학회에 발표하였습니다. 일본에서는 지난 97년 Apoidan-U를 발매하였고, Fucoidan의 의약품으로의 개발도 진행 중에 있습니다.

당사는 생명과학의 연구성과로 밝혀진 소재로 개발한 바이오식품을 개발 발매하고자 합니다.

최고 명성의 고품질

# TaKaRa 합성 DNA

그 기술 그 품질 그대로  
산학 협력 벤처기업 (주)아트만바이오사이언스에서

국내 생산 개시

**가격 30%이상 대폭 인하 !!**

- 200 nmol 합성(10 OD 보증), PCR Grade
 

1-17 mer	44,000원	→	30,000원	(32% 인하)
18-25 mer	50,000원	→	35,000원	(30% 인하)
26-35 mer	57,000원	→	40,000원	(30% 인하)
- HPLC 정제료(최종 1 OD 보증), SEQ Grade
 

45,000원	→	30,000원	(33% 인하)
---------	---	---------	----------

**납기 단축 !!**

- 통상 납기 2-3일(현재는 7일-10일)

**소량합성 가능 !!**

- 50 nmol 합성(2 OD 보증), PCR Grade
 

1-17 mer	25,000원
18-25 mer	30,000원
26-35 mer	35,000원

당사는 정품시약과  
컬럼만을 사용합니다

여러분의 신뢰와 성원으로 알차게 성장하고 있는 당사는 고객의 요구에 부흥하고 보다 저렴하고 빠른 공급으로 연구자 여러분이 편리하게 이용할 수 있도록 하고자, 명지대학교와 협력하여 (주)아트만바이오사이언스를 설립하여 고객서비스의 새로운 장을 열고자 합니다. 우선 합성 DNA를 국내 생산하므로써 납기를 단축하고 가격을 대폭 인하하였습니다. 그러나 합성 및 정제기술은 20년 전통의 TaKaRa의 중앙연구소로부터 공여 받아 안심할 수 있으며 TaKaRa가 품질을 보증합니다. 앞으로 DNA 합성이외에 다양한 분야에서 새로운 서비스를 제공할 것입니다.

판매원



LS사업팀 Tel. 02-581-0131~5  
Fax. 02-581-0137  
대전지점 Tel. 042-222-7437  
Fax. 042-222-7439



(주)코아바이오시스템

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

## DNA Chip 판매 개시

TaKaRa 바이오연구소는 다수의 유전자 단편을 slide glass상에 정렬 및 고정화하여 다수의 유전자의 발현을 동시에 monitor할 수 있는 DNA Chip의 개발을 진행해 왔다. 그 제 1탄으로서 CyanoCHIP, Human Apoptosis CHIP, Human Cancer CHIP과 그 관련제품을 9월 28일부터 판매하기 시작하였다. 당사는 이들을 DNA Chip 제품시리즈 [IntelliGene™]으로 발매하였다(본지 2~5페이지 참조).

Human Apoptosis CHIP (Version 1.0) 및 Human Cancer CHIP (version 1.0)은 사람 유래 유전자 중 각각 apoptosis에 관여하는 161개의 cDNA 단편과 암화에 관련하는 382개의 cDNA 단편을 slide glass상에 정렬 및 고정화한 것이므로 대부분의 생명과학 분야의 기초 및 응용연구에 이용할 수 있으리라 기대한다. CyanoCHIP (Version 1.0)은 Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803주의 genome상에 code되어 있는 거의 대부분의 유전자(93%)에 해당하는 2,854개의 DNA 단편을 정렬 및 고정화한 것으로 이 광합성 세균의 모든 genome 서열을 결정한 카즈사 DNA 연구소의 전면적인 협력을 얻어 완성하게 되었다. *Synechocystis*는 광합성 기작의 해명을 위한 model 생물로서 수명연장을 위한 연구대상으로 이용되어 왔는데, 이번에 DNA chip을 발매함으로써 이 영역의 연구에 새로운 방법을 가미할 수 있음에 따라 연구에 획기적인 발전을 기대할 수 있게 되었다.

TaKaRa는 미국 Genetic MicroSystem(GMS)사와 제휴하여 DNA Chip 제작장치 및 DNA Chip 해석장치에 대한 아시아에서의 독점판매권을 취득하여 작년 가을부터 판매하기 시작하였다. DNA chip을 상업적으로 제조하기 위해서는 DNA 단편을 기관위에 안정하게 spotting 해야 할 뿐만 아니라 chip을 제작하기 위해 준비해야 하는 다수의 DNA 단편을 높은 효율로 조제할 수 있는 시스템을 확립할 필요가 있다. TaKaRa는 1988년에 PCR business를 개시한 이래 수년간 축적해 온 DNA 증폭과 조제 및 정제에 관한 기술과 GMS사의 DNA Chip 제작 및 해석장치를 조합함으로써 상업적인 DNA Chip 제조 시스템을 일본에서는 처음으로 확립할 수 있었고 이번에 제품으로 발매하기에 이르렀다.

금후 이러한 chip들에 이어서 생명과학 분야 뿐만 아니라 암 예방식품이나 환경호르몬 분야에서의 실용적인 DNA Chip을 개발·제조하여 판매할 예정이다. 또 대장균 유전자의 chip을 곧 발매하기 위해 준비 중이다.

이러한 chip들은 [TaKaRa] 브랜드로서 전세계에 판매할 것이다.

## ELISA법에 의한 유전자 재조합 대두의 검정 Kit 판매와 수탁서비스 개시

Takara 바이오사업부문은 미국 Strategic Diagnostics사(SDI사)와의 제휴로, 일본의 SDI사 인증 실험실로서, SDI사가 개발한 monoclonal antibody를 이용한 방법(ELISA법)에 의한 유전자 재조합 대두 검정용 kit의 발매와 검정 수탁서비스를 개시하였다(본지 27페이지 참조).

SDI사의 유전자 재조합 대두 검출용 kit는 유전자재조합 대두인 [Round-Up Ready]에 유입한 제초제 [Round-Up] 내성 유전자의 산물인 [CP4 EPSPS 단백질]과 특이적으로 반응하는 monoclonal antibody를 이용하여 검출한다. 이 kit는 SDI사가 Round-Up Ready의 개발원인 미국 Monsanto사와의 제휴로 개발한 생대두, 분쇄대두 및 탈지대두의 [CP4 EPSPS 단백질]을 약 4시간만에 고감도로 검출할 수 있다. 또 본 kit는 생대두 및 분쇄대두의 분석에는 Full-Fat Flour Standard를, 탈지대두의 분석에는 Deffated Flour Standard를 사용함으로써 정량적인 측정을 할 수 있다. TaKaRa는 이 kit를 발매함과 동시에 kit을 이용한 유전자재조합 대두 검출의 수탁업무를 개시하였다.

## 다시마 식이섬유 fucoidan을 풍부하게 함유한 pocket portable 건강보조식품 [Apoidan-U 과립] 신발매

TaKaRa 바이오사업부문은 다시마 유래의 해조 식이섬유 fucoidan을 풍부하게 함유한 건강보조식품 [Apoidan-U 과립]을 신발매하였다. [Apoidan-U 과립]은 다시마로부터 당사 독자 방법에 따라 추출한 해조 식이섬유 fucoidan을 함유하는 다시마 추출물을 과립형태로 한 건강보조식품이다. Apoidan 시리즈의 line-up으로서 여행을 할 때나 외출 및 출장시 많은 분들이 편리하게 휴대하기 쉬운 과립 형태로 개발한 것이다. TaKaRa는 3년전부터 바이오음료 [Apoidan-U]을 판매해 오고 있다. [Apoidan-U]는 TaKaRa 바이오연구소가 10년 이상 추진해 온 해조 식이섬유에 관한 연구과정에서 발견한 U-Fucoidan에 간세포증식인자(HGF)를 유도하여 세포의 젊음을 유지하는 F-fucoidan도 함유하는 건강음료이다. [Apoidan-U 과립] 1포에는 바이오음료 [Apoidan-U] 1병(50 ml) 분의 다시마 fucoidan이 함유되어 있다.

업계 최초의 사이버 대잔치 실시중 !!

20% off

# 뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제

[www.bohan.co.kr](http://www.bohan.co.kr)

(1999. 11. 22 ~ 2000. 2. 29)

당사는 현재 당사의 창립 4주년 및 Bio21 인터넷 쇼핑몰의 탄생을 기념하고 다가오는 새 천년의 기쁨을 고객 여러분과 함께 나누고자 "뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제"를 성황리에 실시하고 있습니다.

본 행사에 참여하시는 분께는 100일 동안 20%의 할인 혜택과 다양한 특전을 드립니다.

다가오는 새 천년은 본격적인 인터넷 사이버 시대가 될 것입니다.

판매가격의 공개를 통한 신용거래 정책을 고수하고 있는 당사는 인터넷 거래를 통한 신용있고 정확한 문화를 만들고자 꾸준히 노력해 왔습니다.

고객 여러분은 Bio21 인터넷 쇼핑몰을 이용함으로써 24시간 언제든지 주문을 하실 수 있고, 당사 및 전문대리점은 주문처리에 할애하는 시간을 다른 서비스를 위해 활용할 수 있어 결국 고객 여러분은 보다 풍부하고 질 높은 서비스를 받으실 수 있게 됩니다.

당사는 앞으로도 보다 편리하고 신속한 인터넷 주문을 위해 제반 시스템을 점진적으로 개선해 나갈 것입니다.

## 인터넷 쇼핑은 어떻게?

당사의 홈페이지([www.bohan.co.kr](http://www.bohan.co.kr))에 접속하신 후 초기화면의 "뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제"를 클릭하시면 됩니다. 신규 주문자는 반드시 인터넷쇼핑 회원으로 가입을 하셔야 합니다. 회원가입시에만 당사의 보너스 특전을 받으실 수 있습니다.

## 인터넷 쇼핑 할인 품목은?

PCR 효소 및 관련제품 20% off

유전공학 키트 20% off

제한효소, 수식효소 20% off

Novagen 주요제품 20% off

FMC Agarose 등 전제품 10~20% off

DNA Marker & 기타 20% off

## 보너스 특전은?

하나

2000년 6월 말까지 구매금액의 2%를 적립하여 경품으로 환원하여 드립니다.  
(100만원 이상 구매고객에게)

그리고

하나 더

2000년 6월 말까지 이용한 고객 중 우수 고객 2명에게 TaKaRa 연구소 견학  
특전 부여

\*이 행사는 인터넷쇼핑몰을 이용하는 경우에 한 합니다

## 뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제 가격표 (2000년 2월 29일까지)

### 제한 효소

코드	제품명	단위	소비자가	할인가	코드	제품명	단위	소비자가	할인가
1001A	Acc I	100 U	60,000	48,000	1071A	Mlu I	1,000 U	60,000	48,000
1002A	Acc II(FunD II)	100 U	60,000	48,000	1160A	Nco I	500 U	99,600	80,000
1116A	Afa I(Rsa I)	1,000 U	60,000	48,000	1161A	Nde I	400 U	60,000	48,000
1004A	Alu I	500 U	105,000	84,000	1162A	Nhe I	500U	72,000	58,000
1005A	Apa I	10,000 U	120,000	96,000	1166A	Not I	500 U	84,000	67,000
1007A	Ava I	500 U	80,000	64,000	1073A	Pst I	10,000 U	66,000	53,000
1009A	Bal I	20 U	72,000	58,000	1075A	Pvu	1200 U	84,000	67,000
1010A	BamH I	10,000 U	60,000	48,000	1076A	Pvu II	2,000 U	60,000	48,000
1021A	Bgl II	2,000 U	96,000	77,000	1078A	Sac I	2,000 U	84,000	67,000
1034A	Cla I	1,000 U	84,000	67,000	1079A	Sac II	1,000 U	60,000	48,000
1037A	Dra I(Aha III)	4,000 U	108,000	86,000	1080A	Sal I	3,000 U	66,000	53,000
1040A	EcoR I	10,000 U	60,000	48,000	1082A	Sau3A I(Mbo I)	200 U	60,000	48,000
1042A	EcoR V	3,000 U	72,000	58,000	1084A	Sca I	1,500 U	78,000	62,000
1051A	Hae III	4,000 U	72,000	58,000	1085A	Sma I	2,000 U	60,000	48,000
1056A	Hha I	2,000 U	78,000	62,000	1086A	Spe I	300 U	90,000	72,000
1059A	Hinc II(Hind II)	1,000 U	60,000	48,000	1180A	Sph I	400 U	108,000	86,000
1060A	Hind III	10,000 U	60,000	48,000	1185A	Ssp I	500 U	78,000	62,000
1061A	Hinf I	3,000 U	60,000	48,000	1088A	Stu I	500 U	60,000	48,000
1064A	Hpa I	500 U	60,000	48,000	1093A	Xba I	3,000 U	66,000	53,000
1068A	Kpn I	5,000 U	96,000	77,000	1094A	Xho I	5,000 U	72,000	58,000

### 수식 효소

코드	제품명	단위	소비자가	할인가
2011A	T4 DNA Ligase	25,000 U	72,000	58,000
2021A	T4 Polynucleotide Kinase	1,000 U	66,000	53,000
2021S	T4 Polynucleotide Kinase	500 U	60,000	48,000
2030A	T4 Polynucleotide Kinase (E. coli A19)	100 U	78,000	62,000
2040A	T4 DNA Polymerase	100 U	66,000	53,000
2120A	Alkaline Phosphatase(E.coli C75)	50 U	72,000	58,000
2130A	DNA Polymerase I (E. coli)	500 U	66,000	53,000
2140A	Klenow Fragment (E. coli DNA Pol I)	200 U	72,000	58,000
2150A	Ribonuclease H (RNase H)	1,000 U	72,000	58,000
2170A	Exonuclease III	5,000 U	60,000	48,000
2180A	Poly (A) Polymerase	20 U	78,000	62,000
2210A	Deoxyribonuclease I (DNase I)용액	30,000 U	72,000	58,000
2215A	DNase I	5,000 U	75,000	60,000
2230A	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	300 U	60,000	48,000
2240A	DNA Topoisomerase I	100 U	60,000	48,000
2250A	Alkaline Phosphatase (Calf Intestine)	1,000 U	66,000	53,000
2310A	Ribonuclease Inhibitor	5,000 U	108,000	86,000
2410A	S1 Nuclease	20,000 U	60,000	48,000
2420A	Mung Bean Nuclease	2,000 U	72,000	58,000
2520A	SP6 RNA Polymerase	3,000 U	78,000	62,000
2540A	T7 RNA Polymerase	5,000 U	72,000	58,000
2610A	Reverse Transcriptase (RAV-2)	400 U	200,000	160,000
2620A	Reverse Transcriptase XL (AMV)	500 U	250,000	200,000

### 유전 공학 키트

코드	제품명	단위	소비자가	할인가
6021	DNA Ligation Kit Ver.1	50 회	199,900	160,000
6022	DNA Ligation Kit Ver.2	50 회	199,900	160,000
6025	DNA Blunting Kit	20 회	150,000	120,000



## 뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제 가격표 (2000년 2월 29일까지)

6045	Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2	30 회	220,000	176,000
6046	BcaBEST Labeling Kit	40 회	180,000	144,000
6090	Mutan-Express Km Enzyme/Oligo Set	20 회	330,000	264,000
6119	cDNA PCR Library Kit	20 회	200,000	160,000
6120	cDNA Synthesis Kit	RNA 20 $\mu$ g 분	450,000	360,000
6121	3' -Full RACE CORE Set	20 회	288,000	230,000
6122	5' -Full RACE CORE Set	10 회	360,000	288,000
6123	Solid Phase cDNA Synthesis Kit	25 회	500,000	400,000
6125	Competitive RNA Transcription Kit	10 회	129,600	104,000
6150	Adenovirus Expression Vector Kit	1 Kit	555,600	444,000
6624	Differential Display Kit(for RI)	1 Kit	920,000	736,000
6625	Fluorescence Differential Display Kit(Fluorescein)	1 Kit	920,000	736,000
6626	Fluorescence Differential Display Kit(Rhodamine)	1 Kit	920,000	736,000
9081	Dr. GenTLE(혈액용)	200 회	205,700	165,000
9091	TaKaRa DEXPAT	100 회	158,400	127,000
9092	DNA Extraction Kit for GMO Detection	100 회	300,000	240,000
9410	EASYTRAP Ver.2	1 Kit	160,000	128,000
6030A	Kilo-Sequence Deletion Kit	5 회	224,400	180,000
MK500	<i>In situ</i> Apoptosis Detection Kit	20 회	216,000	173,000
MK600	ApopLadder Ex	24 회	237,600	190,000

### PCR용 효소/PCR용 키트

코드	제품명	단위	소비자가	할인가
R001A	TaKaRa Taq	250 U	139,000	111,000
R001AM	TaKaRa Taq(Mg <sup>2+</sup> free)	250 U	139,000	111,000
RR001A	TaKaRa EX Taq	250 U	173,000	138,000
RR001AM	TaKaRa EX Taq(Mg <sup>2+</sup> free)	250 U	173,000	138,000
RR002A	TaKaRa LA Taq	125 U	172,000	138,000
RR002AG	TaKaRa LA Taq with GC buffer	125 U	172,000	138,000
R006A	TaKaRa Z Taq	200 U	368,000	294,000
R005A	Pyrobest DNA Polymerase	125 U	170,000	136,000
R004A	Premix Taq (Taq Version)	120 회	138,000	110,000
RR003A	Premix Taq (Ex Taq Version)	500 $\mu$ l $\times$ 6 개	173,000	138,000
RR004	One Shot LA PCR Mix	25 $\mu$ l $\times$ 24 개	138,000	110,000
RR005A	Perfect Shot Ex Taq (Loading dye mix)	48 회	104,000	83,000
RR013A	TaKaRa LA PCR Kit Ver.2	50 회	264,000	211,000
RR015A	TaKaRa LA PCR <i>in vitro</i> Cloning Kit	10 회	360,000	288,000
RR012A	TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV)	50 회	480,000	384,000
R019A	TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1	50 회	360,000	288,000
RR024A	One Step RNA PCR Kit	50 회	360,000	288,000
RR025A	mRNA Selective PCR Kit Ver.1.1	50 회	420,000	336,000
R020A	High Fidelity RNA PCR Kit	50 회	345,000	276,000
RR017	Competitive DNA Construction Kit	10 회	144,000	115,000
RR201	PCR Screening Kit for GM Soybean	48 회	1,500,000	1,200,000
WA002	Catrimox-14 Solution	100 ml	171,400	137,000
WA005	Catrimox-14 RNA Isolation Kit RIK 2.11	50 회	360,000	288,000

### Novagen 주요 제품

코드	제품명	단위	소비자가	할인가
NV004	pT7Blue T-Vector only (69820-1)	2 $\mu$ g	196,000	157,000
NV5851	His · Bind Resin (69670-3)	10 ml	121,000	97,000
NV586	His · Bind Resin buffer kit (69755-3)		141,000	113,000
NV585	His · Bind Resin (69670-4)	50 ml	449,000	359,000
NV625	Pellet Paint Co-Precipitant (69049-3)	125 회	84,000	67,000
NV611	Chromatography Column, 5 ml polypropylene, with closures (69673-3)		20,000	16,000

## 뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제 가격표 (2000년 2월 29일까지)

NV595	Thrombin, Restriction Grade (69671-3)	50 U	95,000	76,000
NV590	T7 · Tag monoclonal antibody, purified IgG (69522-3)	50 $\mu$ g	178,000	142,000

### FMC 주요 제품 (전제 품할인)

코드	제품명	단위	소비자가	할인가
F50000	SeaKem LE Agarose	125 g	223,000	178,000
F50001	SeaKem LE Agarose	25 g	54,000	43,000
F50010	SeaKem ME Agarose	125 g	247,000	222,000
F50011	SeaKem ME Agarose	25 g	64,000	58,000
F50021	SeaKem HE Agarose	25 g	71,000	64,000
F50031	SeaKem HEE0 Agarose	25 g	76,000	68,000
F50041	SeaKem HGT Agarose	25 g	69,000	62,000
F50070	SeaKem GTG Agarose	125 g	323,000	290,000
F50071	SeaKem GTG Agarose	25 g	74,000	67,000
F50080	NuSieve GTG Agarose	125 g	394,000	355,000
F50081	NuSieve GTG Agarose	25 g	115,000	104,000
F50090	NuSieve 3:1 Agarose	125 g	394,000	355,000
F50091	NuSieve 3:1 Agarose	25 g	118,000	106,000
F50101	SeaPlaque Agarose	25 g	162,000	146,000
F50111	SeaPlaque GTG Agarose	25 g	191,000	172,000
F50152	SeaKem GOLD Agarose	25 g	140,000	126,000
F50181	MetaPhor Agarose	25 g	154,000	139,000
F50513	SYBR GREEN I	10 X 50 $\mu$ l	191,000	172,000
F50611	50% Long Ranger Solution	250 ml	154,000	139,000
F50615	50% Long Ranger Solution	1 l	559,000	503,000

### DNA Marker & 기타

코드	제품명	단위	소비자가	할인가
3401	$\lambda$ -EcoT14 I digest	100 $\mu$ g	75,000	60,000
3402	$\lambda$ -BstP I digest	100 $\mu$ g	75,000	60,000
3403	$\lambda$ -Hind III digest	100 $\mu$ g	50,000	40,000
3405A	$\Phi$ X174 Hae III digest	20 $\mu$ g	85,000	68,000
3407A	100 bp DNA Ladder	500 $\mu$ l	180,000	144,000
3409A	20 bp DNA Ladder	50 $\mu$ g	138,000	110,000
3412A	1 kbp DNA Ladder	50 $\mu$ g	118,800	95,000
3802	Random Primer	50 nmol	100,000	80,000
4026	dATP	100 mmol	112,000	90,000
4027	dGTP	100 mmol	112,000	90,000
4028	dCTP	100 mmol	112,000	90,000
4029	dTTP	100 mmol	112,000	90,000
4030	dNTP Mixture	각 3.2 mmol/1.28 $\mu$ l	100,000	80,000
3010	$\lambda$ -DNA	400 $\mu$ g (8 OD)	65,000	52,000
9030	IPTG	5 g	169,900	136,000
9031	X-Gal	1 g	199,900	160,000
9033	Proteinase K	5 ml	229,900	184,000
9040	SUPREC-01	100 개	250,000	200,000
9041	SUPREC-02	100 개	250,000	200,000
T905	TBE (Tris-borate-EDTA) powder	30 포	100,000	80,000

- FMC제품은 전품목에 (10~20%)할인을 해 드립니다.
- 2일 이내에 공급할 수 있으나 일부 상품은 재고상황에 따라 납품이 다소 늦어질 수도 있습니다.
- 이 행사는 한국 고객을 위하여 TaKaRa 본사의 지원으로 실시합니다.

**Q1** TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer(TaKaRa Code RR02AG/BG)로, GC rich한 template 를 사용하는 경우 증폭할 수 있는 크기는?

**A1** 높은 GC 함량(70%)을 가지는 주형으로 2 kbp까지의 증폭을 확인하였습니다. 약 200~300 bp의 짧은 증폭도 물론 가능합니다.

**Q2** TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer에 첨부되어 있는 GC Buffer로, GC rich가 아닌 template의 증폭도 할 수 있는지?

**A2** GC Buffer I 을 이용하여 GC함량이 약 50%인 주형을 증폭한 결과, human genome의 17.5 kbp의 증폭과 λ DNA의 35 kbp의 증폭을 확인하였습니다. 단 GC buffer는 통상의 LA PCR Buffer보다 높은 변성효과를 가지므로 GC함량이 적은 주형을 이용한 경우는 증폭효율이 낮아지는 경우가 있습니다(특히 GC buffer II를 이용할 경우). GC함량이 50% 전후인 주형의 증폭에는 통상의 TaKaRa LA Taq(TaKaRa Code RR002A/B)에 첨부한 LA PCR buffer II를 사용해 주시기 바랍니다.

**Q3** H.A.-Yellow(TaKaRa Code HA001/002)나 H.A.-Red(TaKaRa Code HA004/005)는 polyacrylamide로 사용할 수 있는지?

**A3** 할 수 없습니다. H.A.-Yellow나 H.A.-Red는 agarose gel 에서만 사용할 수 있습니다.

**Q4** BugBuster™ Protein Extraction Reagent(TaKaRa Code NV674/6741)의 사용량은?

**A4** 세포의 현탁에 사용하는 BugBuster의 양은 배양액의 1/25양만큼 사용해 주시기 바랍니다(예를 들면 100 ml배양액의 경우는 4 ml의 BugBuster를 사용합니다). 배양액이 소량(40 ml이하)인 경우는 배양액의 1/5양을 사용합니다(예를 들면 1.5 ml의 배양액의 경우 300 μl의 BugBuster를 사용합니다).

**Q5** Label IT®로 표식한 probe를 hybridization에 이용한 후 membrane을 reprobe할 수 있는지?

**A5** Membrane을 reprobe하는 것은 가능합니다. 통상 membrane을 0.5% SDS존재하에서 60°C로 보온하면 probe가 이탈됩니다. 단 reprobe하는 경우는 hybridization후 probe를 이탈할 때까지 membrane이 건조하지 않도록 해야 합니다.

**Q6** SeaPlaque GTG Agarose(TaKaRa Code F55175A/F50110)나 NuSieve GTG Agarose(TaKaRa Code F55190A/F50080)를 사용하여 In Gel 반응을 할 때 주의점은?

**A6** 저용점 agarose를 이용하는 경우 agarose gel로부터 DNA를 추출하지 않고 agarose 존재하에서 각종 효소반응(제한효소, ligase 반응 등)을 실시할 경우 아래의 점들에 주의해야 합니다.

- 1) 전기영동 buffer는 TAE buffer를 사용합니다.
- 2) Ethidium bromide, SYBR Green I (TaKaRa Code F50512/F50513) 또는 GelStar Nucleic Acid Stain (TaKaRa Code F50535)등으로 염색을 하는 경우 염색시간은 가능한한 짧게 합니다.
- 3) 자외선을 조사하는 경우에는 조사시간을 가능한한 짧게 하고, 300 nm 이상의 장파장의 UV transilluminator를 사용합니다.
- 4) 반응액중의 겔 농도는 SeaPlaque® GTG Agarose의 경우는 0.5%이하, Nusieve® GTG Agarose의 경우는 1.5% 이하로 합니다.

**Q7** TaKaRa에서 판매하고 있는 vector의 염기서열을 알고 싶은데...?

**A7** Genbank에 등록되어 있는 vector는 카탈로그나 설명서 등에 Acession No.를 기재해 두었습니다. 등록되지 않은 vector는 당사로 문의해 주시기 바랍니다. 또한, Novagen사 vector의 염기서열은 Novagen사의 home page(<http://www.novagen.com>)에서 확인할 수 있습니다.

**Q8** TaKaRa 제품을 사용한 후 논문에 회사명을 기재하는 경우에 어떻게 쓰면 됩니까?

**A8** 당사가 제작한 제품의 경우는 Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan 이라 기재하여 주십시오. 또한 Novagen사의 제품은 Novagen, Inc., Madison, WI, USA가 됩니다.

NEW

## Ribonuclease Inhibitor (Porcine liver)

TaKaRa Code 2311A	5,000 U
TaKaRa Code 2311B(A×5)	25,000 U

농도 : 40 U/μl  
보존 : -20°C  
기원 : 돼지 간장

본 제품은 돼지의 간장으로부터 정제한 RNase inhibitor이다. RNase A와 1:1의 복합체를 형성하고 ribonuclease 작용을 비길항적으로 강력히 저해한다( $K_i=4 \times 10^{-10}$  M) 또, 종래의 길항성저해제(nucleotide류, 무기인산류)와는 달리 본 저해제는 단백질이므로 phenol 처리에 의해 반응계로부터 용이하게 제거할 수 있다. 돼지간장에서 유래하기 때문에 사람 DNA가 오염될 염려가 없다.  
본 제품은 사람 태반 유래의 RNase inhibitor와 동일하게 사용할 수 있다.

NEW

## pKO Scrambler NTKV series

각 20 μg/20μl

pKO Scrambler® NTKV-1901	TaKaRa Code LX1901
pKO Scrambler® NTKV-1902	TaKaRa Code LX1902
pKO Scrambler® NTKV-1903	TaKaRa Code LX1903
pKO Scrambler® NTKV-1904	TaKaRa Code LX1904
pKO Scrambler® NTKV-1905	TaKaRa Code LX1905
pKO Scrambler® NTKV-1906	TaKaRa Code LX1906
pKO Scrambler® NTKV-1907	TaKaRa Code LX1907
pKO Scrambler® NTKV-1908	TaKaRa Code LX1908

Lexicon Genetics 사의 제품입니다

기본적인 구조는 기존의 pKO Scrambler Series와 동일하지만 positive selection 배열에 Neomycin을, negative selection 배열에 Thimidine Kinase(TK)를 미리 재조합해 둔 vector이다. pKO Scrambler NTKV Series에는 cloning site가 다른 vector 8종류(pKO Scrambler NTKV-1901~pKO Scrambler NTKV-1908)가 준비되어 있다.

NEW

## pKO SelectTK

TaKaRa Code LXV830 20 μg

Lexicon Genetics 사의 제품입니다

NEW

## Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR

TaKaRa Code 2630A 250 U

RT-PCR용으로 AMV에서 유래한 역전사 효소이다. TaKaRa가 판매하는 RNA PCR Kit내의 AMV 역전사 효소 component와 같은 농도(5 U/ul)로 조정되어 있다.

NEW

## gWiz™ High Expression Vector

각 20 μg/20μl

gWiz™ Blank Mammalian Expression Vector	TaKaRa Code GS024
gWiz™ β-Galactosidase Mammalian Expression Vector	TaKaRa Code GS025
gWiz™ CAT Mammalian Expression Vector	TaKaRa Code GS026
gWiz™ Luciferase Mammalian Expression Vector	TaKaRa Code GS027
gWiz™ GEP Mammalian Expression Vector	TaKaRa Code GS028
gWiz™ Secreted Alkaline Phosphatase Mammalian Expression Vector	TaKaRa Code GS029

GeneTherapy System 사의 제품입니다

gWiz™ High Expression Vector Series는 독자적으로 추가 개량한 CMV promotor + intron A와 인공 terminator를 포함한 포유류 발현용 vector이다. 다양한 포유류 세포나 조직에서 vector 중에 삽입된 유전자를 높은 효율로 발현할 수 있다. gWiz™ Blank Vector는 multiple cloning site(MCS)를 가져 목적 유전자를 cloning하고 다양한 포유류 세포에서 발현하기 위해 사용한다. 기타 5 종류의 vector는 MCS에 미리 reporter 유전자를 재조합 해 놓은 제품이다. 모든 vector들은 대장균에서 높은 효율로 증식할 수 있다.



## Human p53 ELISA Kit Human sVE-cadherin ELISA Kit

### Human p53 ELISA Kit

TaKaRa Code H256 96 회

측 정 범 위 : 0.8~50 U/ml

감 도 : 0.5 U/ml

시 료 용 량 : 50  $\mu$ l

Assay 시간 : 75분

표 식 효 소 : Biotin/streptavidin-HRP (horseradish peroxidase)

발 색 기 질 : TMB (tetramethylbenzidine)

Bender MedSystems 사의 제품입니다

본 제품은 세포배양 상청, 사람 혈청, 혈장 및 기타 체액으로부터 human p53을 ELISA 법으로 정량하기 위한 Kit이다. 암 억제유전자로 알려져 있는 human p53 유전자는 제17번 염색체 상에 위치하며, 모든 human cancer의 반수이상에 걸쳐 변이가 확인되었다. p53 단백질은 대부분의 정상 조직에서 발현하며, DNA상의 특이적 염기 서열을 인식하여, 특정 유전자의 전사활성을 촉진하거나 다수 유전자의 전사를 억제하는 것으로 알려져 있다. 또 다양한 세포성, virus성 단백질과 결합하거나 mismatch를 가지는 DNA와 특이적으로 결합하는 활성도 알려져 있습니다. p53은 DNA 손상과 동반하는 세포 주기의 정지, DNA repair 및 apoptosis 유도에 있어서도 중요한 역할을 한다.

### Human sVE-cadherin ELISA Kit

TaKaRa Code H253 96 회

측 정 범 위 : 0.16~10 ng/ml

감 도 : 0.15 ng/ml

시 료 용 량 : 20  $\mu$ l

Assay 시간 : 195분

표 식 효 소 : Biotin/streptavidin-HRP (horseradish peroxidase)

발 색 기 질 : TMB (tetramethylbenzidine)

Bender MedSystems 사의 제품입니다

본 제품은 세포배양 상청, 사람 혈청, 혈장 및 기타 체액 속의 가용성 VE-cadherin을 ELISA법으로 정량하기 위한 kit이다. VE-cadherin(별명:cadherin-5)은 칼슘의존성의 세포 접착 분자로 알려져 있는 cadherin family의 한 member로서, 혈관 내피에 특이적으로 발현하는 막관통 단백질이다. 그 분자량은 약 130 kDa이며 세포간 접착을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또 그 발현 장소로서 유추해 볼 때 세포 접착이외에도 백혈구의 혈관 투과성 등에도 관여하리라 생각한다.



## Influenza Virus 검출 및 Typing Kit

(본지 30~33페이지 참조)

### Influenza A Virus EIA Kit

TaKaRa Code MK120 96 회

### Influenza Virus Typing Set

TaKaRa Code MK421 1 Set



## Cyclooxygenase (COX) 관련제품

(본지 34페이지 참조)



## Sure-RACE™ Multi-tissue RACE Panels

Human TaKaRa Code GN300

Mouse TaKaRa Code GN301

Origene Technologies 사의 제품입니다

(본지 35페이지 참조)

# 신 제 품 안 내

NEW

## BioWhittaker 사 "Poietics" 사람 조혈세포 Series

Poietic Technologies사는 미국 FDA가 인가한 정상골수제공자 프로그램을 추진해 온 실적이 있고, 신뢰성 있는 고품질의 정상골수 유래 세포를 제공해 오고 있다. 국제 표준화 기구의 품질보증규격(ISO9001)을 취득한 BioWhittaker사의 엄밀한 품질관리 시스템 하에서 더욱 안정한 고품질의 제품을 연구자 여러분에게 제공한다.

제품명	세포수	TaKaRa Code
단핵세포	Bone Marrow Mononuclear Cells (25 x 10 <sup>6</sup> )	PT007
	Bone Marrow Mononuclear Cells (100 x 10 <sup>6</sup> )	PT008
	Bone Marrow Mononuclear Cells (25 x 10 <sup>6</sup> ), 5 donors	PT009
	Cord Blood Mononuclear Cells (100~200 x 10 <sup>6</sup> )	PT010
	Cord Blood Mononuclear Cells (200~400 x 10 <sup>6</sup> )	PT011
AC133+ Cells	Bone Marrow AC133 <sup>+</sup> Cells (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT012
	Cord Blood AC133 <sup>+</sup> Cells (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT013
	Fetal Liver AC133 <sup>+</sup> Cells (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT014
Stroma 세포	Bone Marrow Stromal Cells (10 x 10 <sup>6</sup> )	PT015
	* 골수유래의 단핵세포로부터 분리하여, 3-4주간 배양후, 방사선처리를 하였음.	
골수	4 Species Bone Marrow Panel (5 x 10 <sup>6</sup> /specis)	PT016
	Baboon Bone Marrow (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT017
	Canine Bone Marrow (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT018
	Murine Bone Marrow (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT019
	Human Bone Marrow (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT020
기타세포	Cord Blood CD4 <sup>+</sup> T Cells (20~40 x 10 <sup>6</sup> )	PT021
	Cord Blood CD4 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>+</sup> T Cells (10~20 x 10 <sup>6</sup> )	PT022
	Cord Blood CD19 <sup>+</sup> B Cells (10 x 10 <sup>6</sup> )	PT023
	Fetal Liver Dendritic Cells Precursors (5 x 10 <sup>6</sup> )	PT024
	Cord Blood Erythroid Progenitors (1 x 10 <sup>6</sup> )	PT025

NEW

## BioWhittaker 사 신제품 정상 사람 전립선 stroma 세포전용 배지 series

전용배지 kit : SCGM™ Bulletkit® (B3204 + B4181)

TaKaRa Code B3205 1 Kit

기본배지 : SCBM™

TaKaRa Code B3204 500 ml

첨가배지 : SCGM™ SingleQuots®

TaKaRa Code B4181 1 Set

표식용 배지 kit : SCGLM™ Bulletkit®

TaKaRa Code B3214 1 Kit

NEW

## 약물대사 관련제품 UDP-Glycosyltransferase (UGT), rHuman(BACULOSOMES)

UGT 1A3 BACULOSOMES®

TaKaRa Code V2470 5 mg

UGT 2B7 BACULOSOMES®

TaKaRa Code V2636 5 mg

PanVera 사의 제품입니다.

Human UGT를 함유하는 재조합 Baculovirus를 감염시킨 곤충세포로부터 조제한 microsome 입니다.

## TaKaRa PCR Enzymes

연구 목적에 맞추어 풍부한 제품 중에서 선택!!

### PCR Enzymes

- PCR 반응의 가장 기본적인 Enzyme  
**TaKaRa Taq™**
- 경이의 증폭량, 향상된 증폭길이의 New standard  
**TaKaRa Ex Taq™**
- 보다 길고 정확한 단편의 증폭에  
**TaKaRa LA Taq™**
- GC rich, repeat sequence 등 복잡한 2차구조를 갖는 주형의 증폭에  
**TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer**
- 초고속의 신속한 증폭에  
**TaKaRa Z-Taq™**
- High Fidelity의 초정확성  
**Pyrobest™ DNA Polymerase**

### Premix/One Shot Series

- Primer와 주형 DNA를 첨가하는 것만으로 OK  
**Premix Taq™**  
(TaKaRa Taq™ version/TaKaRa Ex Taq™ version)
- 0.2 ml tube에 Primer와 주형 DNA를 첨가하는 것으로 LA PCR이 OK  
**One Shot LA PCR™ Mix**
- 0.2 ml tube에 Primer와 주형 DNA를 첨가하는 것으로 PCR에서 전기영동까지 OK  
**PerfectShot™ Ex Taq**  
(Loading dye mix)
- 주형 DNA만 첨가하는 것으로 Insert의 확인이 OK  
**Insert Check PCR Mix**

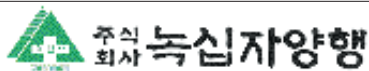
▶ 사용구분익 기준

상기 가격은 인터넷 주문에 한 함

증폭길이	TaKaRa Taq™ Pyrobest™ DNA Polymerase	<	TaKaRa Ex Taq™ TaKaRa Z-Taq™	<	TaKaRa LA Taq™
λ DNA					
양호하게 증폭	~6 kbp 정도		~20 kbp 정도		~35 kbp 정도
증폭가능 길이	~12 kbp 정도		~30 kbp 정도		~48 kbp 정도
human genomic DNA					
양호하게 증폭	~2 kbp 정도		~10 kbp 정도		~20 kbp 정도
증폭가능 길이	~4 kbp 정도		~20 kbp 정도		~30 kbp 정도
정확도(fidelity)	TaKaRa Taq™ < TaKaRa Ex Taq™ < TaKaRa LA Taq™ < Pyrobest™ DNA Polymerase < TaKaRa Z-Taq™				
증폭효율	TaKaRa Taq™ ≒ Pyrobest™ DNA Polymerase < TaKaRa LA Taq™ ≒ TaKaRa Ex Taq™ < TaKaRa Z-Taq™				
반응속도	TaKaRa Z-Taq™이 TaKaRa Taq™ 보다 5배 더 빠르다				

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어지면 필요한 주형 DNA의 양이 많아집니다. 또 PCR 조건도 엄밀하게 됩니다. 자세한 내용에 관해서는 당사의 TaKaRa Biotechnology 생명공학 연구용 제품가이드 또는 Internet homepage 제품검색을 이용하시기 바랍니다.

판매원



LS사업팀 Tel. 02-581-0131~5  
Fax. 02-581-0137  
대전지점 Tel. 042-222-7437  
Fax. 042-222-7439



(주)코아바이오시스템

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

# TaKaRa PCR Thermal Cycler SP

PCR의 TaKaRa가 새로운 High Grade Thermal Cycler 발매

## 특징

- Oil-free PCR
- 96개 시료 동시 처리
- LA PCR™에 최적
- 고정도의 온도제어로 높은 재현성
- 미량의 시료 DNA의 증폭 가능
- 광범위한 온도범위 제어
- 충실한 display 표시 및 편리한 조작성
- 운전이력의 monitor 기억 및 보존
- 초고속 PCR 실현
- Compact하고 미려한 디자인



TaKaRa Code TP400(기본사양)

## ▶ 사양

제품명	TaKaRa PCR Thermal Cycler SP
치수	300(W) × 450(D) × 300(H) mm
중량	15.0 kg
전원	100~120 V 50/60 Hz
온도제어범위	0~99.9°C
온도제어	설정온도와 실제 시료 온도와의 차이 : ±0.5°C 이내
정확도	정상상태에서의 시료온도의 상하변동 : ±0.5°C 이내 가열시(37°C~94°C) block 온도의 overshoot : ±0.5°C 이내 냉각시(94°C~40°C) block 온도의 undershoot : 1°C 이내
온도제어능력	Normal mode : 1°C/sec 이상, 초고속 Fast mode도 탑재
온도균일성	±0.5°C 이내
온도제어기구	Peltier 소자
Sample block	0.2 ml tube 및 96 well tube plate 용 block
조작프로그램	· 보존가능 file 수 : 96 file · 1 file내의 pattern 수 : 5 pattern/file · 1 pattern내의 온도 segment : 5 segment/pattern
Cycle 수	99 cycle/pattern
설정시간	1초~99분 59초
Heating cover	tube 상부를 항상 가열해 주므로 mineral 오일 필요없음

진행상황확인	아래의 점등을 display로 확인할 수 있다. · 운전중인 file명, pattern 및 그 segment 일람을 표시 · 현재의 상황, 온도(시료 온도, cover 온도), 시간, 진행상황, 남은 시간, 총운전시간을 표시 · 온도 chart 그림을 표시
자기진단	heater, chiller 등의 이상 유무 점검
운전이력	장치의 운전이력을 memory에 기억 보존
Printer 접속	RS-232C port를 장비. 작동결과, 이력, program file의 내용 출력

\* 본 사양은 개량을 위해 예고없이 변경될 수 있습니다.

## ▶ 소모품

제품명	TaKaRa Code	포장량
TaKaRa Micro PCR Tube(0.2 ml cap 부착)	9047	1,000개
TaKaRa Micro Strip PCR Tube(8련)	9048	8 × 120개
TaKaRa Micro Strip Caps(8련)	9049	8 × 120개
TaKaRa PCR Tube Plate-24 (0.2 ml 연결 tube)	9063	20매(3 × 8련/매)
TaKaRa PCR Tube Plate-48 (0.2 ml 연결 tube)	9064	10매(6 × 8련/매)
TaKaRa PCR Tube Plate-96 (0.2 ml 연결 tube)	9069	10매(12 × 8련/매)
TaKaRa PCR Tube Plate Caps-8	9050	8련 cap × 120개

TaKaRa PCR Related products are sold under licensing arrangements with F. 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.

**TaKaRa**  
BIOMEDICALS

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

판매원 (주)녹십자양행 L/S사업팀 (주)코아바이오시스템  
LS사업팀 Tel. 02-581-0131~5 Tel. 02-841-7530  
Fax. 02-581-0137 Fax. 02-841-7531  
대전지점 Tel. 042-222-7437 수원 0331-284-8592  
Fax. 042-222-7439 대전 042-622-2726



U-Fucoidan 함유

건강을 지향하는 당신에게, 바다로 부터의 선물

바이오음료

# APOIDAN<sup>TM</sup>-U

아포이당-U

건강한 때야말로 드셔야 할 때입니다.

건강 생활의 Power-Up!

이런 당신에게 권해 드립니다.

- 보양 중이신 분
- 40세 이상의 남성
- 술을 좋아하시는 분
- 담배를 아무리해도 끊지 못하는 분
- 스트레스가 많은 직장인
- 하루하루의 일상 생활이 바쁘신 분
- 외식, 인스턴트식, 육식을 주로 하시는 분
- 식생활의 밸런스가 불안정하신 분
- 채소를 싫어하시는 분
- 바깥에서의 활동이 많으신 분
- 다이어트를 하시려는 분
- 아름답고 젊음을 유지하시려는 분
- 부모님의 건강을 걱정하시는 분
- 건강을 지향하시는 분

## 새로운 차원의 「다시마의 파워」

당사가 자랑하는 최첨단 생명공학 기술이 예로부터 건강에 유용한 성분이 풍부하다고 알려져 있는 전통의 천연 식용재료에서 신비로운 『다시마의 파워』를 찾아 냈습니다.

**바** 이오음료 APOIDAN<sup>TM</sup>-U

전통적인 식용 재료를 최첨단 생명과학 기술로 만든 새로운 트렌드의 제품입니다.

원래 사람이 가지고 있는 '탄력성'을 발휘하여 자기를 위하여 건장을 유지하고자 하는 것이 앞으로의 새로운 거각 사식입니다

해조식이섬유는 야채와는 성질이 달라 장에서 소화·흡수되기 어려우므로 다이어트 효과가 있으며, 다른 영양소(예를 들면 포도당이나 콜레스테롤 등)의 흡수를 지연시킵니다. 또한 체내에서 생성되거나 외부에서 들어온 유해물질의 흡수를 저해·배출합니다.

정말로 건강을 생각하신다면  
이 한 병으로!

**중** 래의 『다시마 영양소』는 풍부한 해조식이섬유를 함유한 다시마 추출액에 응축되어 있습니다.



## 제품개요

제품명 : 바이오음료 APOIDAN-U (아포이당-U)

식품의 유형 : 혼합음료

용량 및 용기 : 50ml 갈색병

포장 : 1 세트 30병 (10병 × 3 BOX )

### 원재료명

U-Fucoidan 함유 다시마 추출물

맥아당

레몬과즙

안정제(펙틴)

향료

산미료

동결건조매실분말

비타민 C

### 영양성분

열 량 : 6 kcal

탄수화물 : 1.3 g

단 백 질 : 0 g

지 방 : 0.1 g

비타민 C : 7 mg

나 트 른 : 13 mg

요 소 : 0 mg

( 분석치는 제조 직후의 평균 수치를 나타내고 있습니다.)

※ 가격 : 165,000원 (부가세 포함)

1 세트 30병입 (1병은 50 ml입니다.)

제품 구입 또는 판매를 희망하시는 분은  
당사로 연락주시기 바랍니다.

**다** 시마의 저영양가야말로 과식하는 분에게  
지방과 탄수화물의 과잉섭취를 막아줍니다.

단백질, 지질, 열량이 적기 때문에  
좋아하는 식생활을 계속하면  
서 무리없이 다이어트할  
수 있는 이상적인 보조  
식품입니다.

또한 알칼리성식품이므로 산성식품을 과잉 섭취  
하기 쉬운 현대인의 영양  
밸런스를 보정하여 신체의 항



이지만 기준량으로 1일 1병씩 드실 것을 권해 드리나 신체의  
상태에 따라 마시는 시기와 양은 자유롭게 결정하십시오.

● 기호에 따라  
설탕, 꿀을 첨  
가해 드셔도  
좋습니다.

● 우유에 첨가해 요구르  
트풍으로 즐기셔도 좋  
습니다.



● 튀김의 소스나 죽에  
첨가해 드셔도 좋습  
니다.



천

계

