

Cre/loxP 발현제어시스템을 조합한 재조합 Adenovirus 제작

Adenovirus Cre/loxP Kit

TaKaRa Code 6151

1 Kit (5회)

종래엔 곤란하였던 세포독성 유전자 삽입 재조합 아데노바이러스의 제작이 가능해졌다!!

아데노바이러스(adenovirus)는 ① 고역가의 바이러스액을 조제할 수 있고 ② 사람, mouse, rat를 포함하는 다수의 동물세포에 감염하고 ③ 증식세포 뿐만 아니라 정지기의 세포에도 감염하는 등 유전자 도입 벡터로서 많은 장점을 가진다. TaKaRa는 현재 COS-TPC법¹⁾을 이용하는 재조합 아데노바이러스 제작 키트인 Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150)을 판매하고 있고, 그 간편성과 높은 제작효율로 호평을 받고 있다. 그러나 이 키트를 사용할 때 숙주세포에 세포기능장애를 유발하는 세포독성 유전자를 삽입한 재조합바이러스를 제작하는 것은 곤란한 경우도 있었다. 금번 신발매하는 Adenovirus Cre/loxP Kit(TaKaRa Code 6151)을 종래 키트와 병용함으로써 이러한 문제를 해결할 수 있다. 본 고에서는 이 새로운 키트를 이용한 Cre/loxP 발현제어시스템과 실험례에 대하여 소개한다.

■ 개요

【비증식형 재조합 아데노바이러스】

현재 일반적으로 이용하고 있는 비증식형 재조합 아데노바이러스의 증식과 목적유전자의 발현 모식도를 그림 1에 나타내었다. 아데노바이러스의 E1유전자는 다른 모든 아데노바이러스 유전자의 발현개시에 필요한 것으로 알려져 있다.

비증식형 아데노바이러스 벡터는 다음과 같은 특징을 가진다.

- ① E1유전자가 결손되어 있어 E1을 발현하는 293세포와 같은 특정세포에서만 증식이 가능하다.
- ② 증식한 재조합 아데노바이러스는 표적세포에 높은 효율로 감염한다.
- ③ 표적세포내에서는 E1 유전자산물이 공급되지 않으므로 바이러스의 증식없이 목적유전자만 발현한다. 이와 같이 비증식형 재조합 아데노바이러스는 통상의 세포에서는 증식하지 않으므로 안전성이 높다고 할 수 있다.

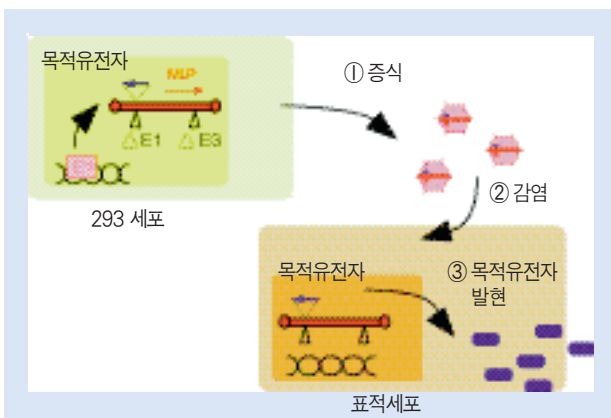


그림 1 비증식형 재조합 아데노바이러스

① E1유전자가 결손되어 있어 E1을 발현하는 293 세포와 같은 특정세포에서만 증식할 수 있다 ② 증식한 재조합 아데노바이러스는 표적세포에 높은 효율로 감염한다. ③ 표적세포내에서는 E1 유전자산물이 공급되지 않으므로 바이러스의 증식없이 목적유전자만 발현한다.

그림 1에 나타난 것처럼 재조합 아데노바이러스를 조제하기 위해서는 그 바이러스를 293 세포내에서 증식하여야 한다. 세포독성을 가진 유전자를 아데노바이러스 벡터에 삽입한 경우는 그 유전자산물에 의해 293 세포가 사멸되어 버리므로 재조합 바이러스의 조제가 곤란하였다. 따라서 이러한 유전자를 가진 재조합 아데노바이러스를 제작하려면 293 세포내에서의 바이러스 증식과정에서는 목적유전자의 발현을 억제하고, 표적세포에 감염하였을 때 처음으로 발현하도록 하는 엄밀한 발현제어계가 필요하다. 아데노바이러스는 세포당 1,000 copy에 이르는 증식능력을 가지므로 아주 정밀한 발현제어계를 요구한다. 일본 동경대학 의과학연구소의 Saito 박사 등의 그룹은 P1 phage의 Cre recombinase와 그 인식서열인 loxP를 이용한 새로운 발현제어계를 개발함으로써 이 문제를 해결하였다²⁾.

■ 원리

【Cre/loxP 발현 제어 시스템】

그림 2에 신 시스템의 개략을 나타내었다. 표적 바이러스의 promoter와 목적유전자사이에 stuffer 영역을 삽입하였다. Stuffer내에는 Poly A 신호가 존재하므로 이 상태(silent form)①에서는 목적유전자가 발현하지 않는다. 따라서 세포독성을 가진 유전자를 재조합하는 경우에서 바이러스를 증식할 수 있다. 표적세포에 감염할 때에는 이 silent form 바이러스와 Cre recombinase를 갖고 있는 제어바이러스②를 함께 감염한다. Stuffer의 양단에는 loxP 배열이 존재하므로 Cre recombinase가 잘라낸다. 그 결과 표적바이러스는 expression form③으로 변환되어 목적유전자의 발현을 개시한다.

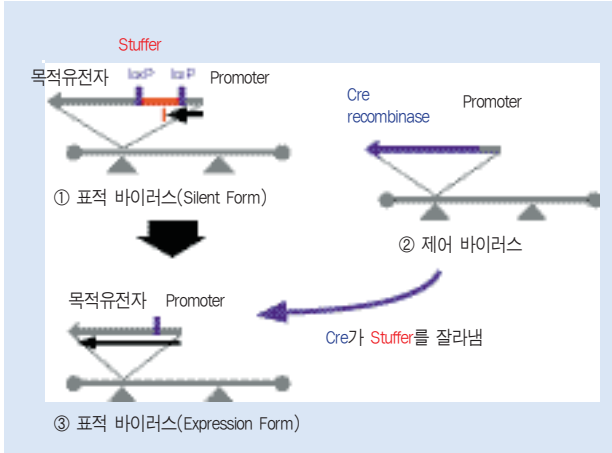


그림 2 Cre/loxP 발현제어 시스템

표적바이러스의 promoter와 목적유전자사이에는 stuffer 영역을 삽입하였다. Stuffer내에는 Poly A 신호가 존재하므로 이 상태(silent form)(①)에서 목적유전자는 발현하지 않는다. 표적세포에 감염할 때에는 이 silent form 바이러스와 Cre recombinase를 암호화하는 제어바이러스(②)를 함께 감염한다. Stuffer의 양단에는 Poly A 서열이 존재하므로 Cre recombinase가 잘라낸다. 그 결과 표적바이러스는 expression form(③)으로 변하여 목적유전자가 발현한다.

■ Kit 내용

Adenovirus Cre/loxP Kit(TaKaRa Code 6151)은 아래의 4가지로 구분되어 있다.

① Cosmid Vector pAxCALNLw (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	25 μl
② AxCANCre DNA-TPC	40 μl
③ AxCALNLZ DNA-TPC	40 μl
④ AxCAiLacZ DNA-TPC	40 μl

①의 cosmid vector pAxCALNLw의 구조를 그림 3에 나타내었다. 이 vector에는 여러가지 세포에서 강력하게 작용하는 것으로 보고된 CAG promoter, Stuffer 영역 및 Sva I cloning site가 함유되어 있다. Cloning site에 목적유전자를 삽입함으로써 silent form의 cosmid를 구축할 수 있으며, 약 3.5 kb까지의 DNA를 삽입할 수 있다. 이렇게 구축한 cosmid는 COS-TPC법으로 쉽게 재조합 아데노바이러스로 만들 수 있다. 재조합 아데노바이러스의 제작에는 Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150)이 필요하다. ②~④는 재조합 아데노바이러스의 genome DNA이며, 바이러스 유래의 말단 단백질을 부착한 것이다(Recombinant Adenovirus DNA-Terminal Protein Complex). 293 세포에 감염(transfection)함으로써 간편하게 재조합 바이러스를 제작할 수 있다. AxCANCre는 Cre recombinase를 발현하는 제어 바이러스이고, AxCALNLZ는 제어된(silent form)의 β -Galactosidase 유전자를 갖는 control virus이며, AxCAiLacZ는 β -Galactosidase를 항상 발현하는 control virus이다.

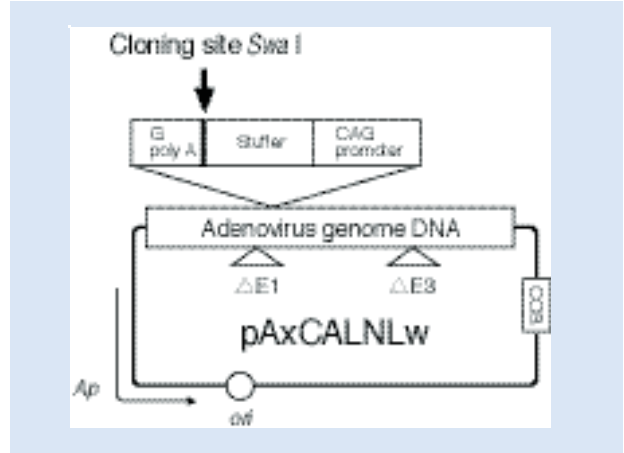


그림 3 Cosmid vector : pAxCALNLw의 구조

이 cosmid는 아데노바이러스 genome DNA의 대부분을 갖고 있다. 또한 아데노바이러스 genome에 CAG promoter, Stuffer 영역 및 Sva I cloning site를 삽입하였다. Cloning site에 목적유전자를 삽입함으로써 silent form의 cosmid를 구축할 수 있다.

■ 실험예 : β -Galactosidase 유전자의 유도발현

Cre/loxP 발현제어 시스템을 이용하여 reporter 유전자인 β -Galactosidase 유전자를 유도발현하였다.

【방법】

HeLa 세포에 AxCALNLZ와 AxCANCre를 감염하고 2일후에 X-gal 염색으로 β -Galactosidase의 활성을 검출하였다. Control로서는 AxCAiLacZ를 사용하였다. 또 감염은 모두 MOI 10으로 하였다.

【결과】

그림 4에 결과를 나타내었다. AxCALNLZ를 단독으로 감염한 경우(c)에는 stuffer에 의한 발현제어로 β -Galactosidase는 발현되지 않았다. 반면에 AxCALNLZ와 AxCANCre를 공감염한 경우(e)에는 stuffer가 제거되어 β -Galactosidase가 발현하였다. 이는 Cre/loxP 발현제어 시스템에 의해 외래유전자의 발현이 엄밀히 제어되었음을 의미한다.

■ 응용례

이미 몇몇의 연구그룹에서 Cre/loxP 발현제어 시스템을 이용함으로써 종래에는 곤란하였던 재조합 아데노바이러스의 제작에 성공하였다. 예를 들면, Okuyama 등의 그룹은 apoptosis 관련 유전자 중 하나인 Fas-ligand 유전자를 조합한 재조합 아데노바이러스를 제작하였다. 동 그룹은 pAxCALNLw에 Fas-ligand 유전자를 삽입하여 그 발현을 제어하는 재조합 바이러스(AxCALNFasL)을 제작하여, 표적세포에 AxCALNFasL과 제어바이러스 AxCANCre를 함께 감염하여 Fas-ligand 유전자를 발현하는데 성공하였다³⁾. 또 Sudo 등의 그룹은 ion channel 중의 하나인 Ca^{2+} -permeable AMPA receptor를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 제작하였다. 동 그룹도 발현을 제어한 재조합 바이러스(AxCALNLGluR2Q)를 제작하고, 이것을 제어 바이러스 AxCANCre와 함께 감염함으로써 PC12 신경세포에 높은 효율로 발현하는 데 성공하였다⁴⁾.

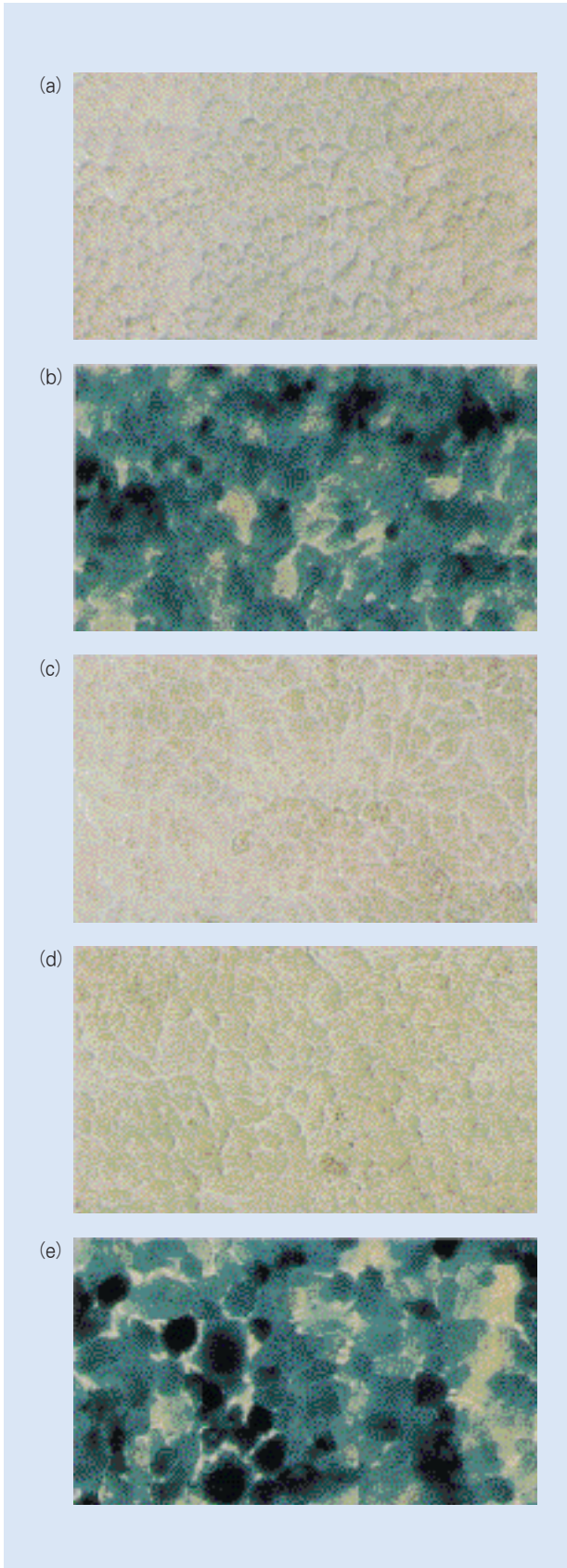


그림 4 β -Galactosidase의 발현유도
 HeLa 세포에 AxCALNLZ, AxCANCre 및 AxCaILacZ를 (b)~(e)에 나타낸 조건으로 감염하고, 2일후에 X-Gal 염색으로 β -Galactosidase의 활성을 검출하였다. 감염은 모두 MOI 10으로 하였다. (a)비감염세포, (b)AxCaILacZ, (c)AxCALNLZ, (d)AxCANCre, (e)AxCALNLZ + AxCANCre

■ 결론

이상에서 서술한 바와 같이 Cre/loxP 발현제어시스템은 삽입한 목적유전자의 발현을 엄밀하게 제어할 수 있으므로 세포독성을 갖는 유전자를 삽입한 재조합 아데노바이러스를 제작할 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 유용한 유전자 도입 벡터로서 이미 널리 이용되고 있다. 종래의 키트에 Adenovirus Cre/loxP Kit가 가세함으로써 보다 많은 연구목적에 대응하는 아데노바이러스 벡터를 제작할 수 있을 것이다.

【주의】 Adenovirus Cre/loxP Kit(TaKaRa Code 6151)은 단독으로는 사용할 수 없습니다. 그 사용에는 Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150)이 필요합니다. 이 2종류의 키트를 set로 한 Adenovirus Cre/loxP-Regulated Expression Vector Set(TaKaRa Code 6152)도 공급하고 있습니다.

【참고문헌】

- 1) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1320.
- 2) Kanegae, Y., Lee, G., Saito, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S. and Saito, I. (1995) *Nucl. Acids Res.* **23**, 3816.
- 3) Okuyama, T., Fujino, M., Li, X-K., Fumeshima, N., Kosuga, M., Saito, I., Suzuki, S. and Yamada, M. (1998) *Gene Therapy* **5**, 1047.
- 4) Sudo, M., Okado, H., Iino, M., Tsuzuki, K., Miwa, A., Kanegae, Y., Saito, I. and Ozawa, S. (1999) *Mol. Brain Res.* **65**, 176.

【관련제품】

제품명	TaKaRa code	포장량
Adenovirus Expression Vector Kit	6150	1 Kit (5회용)
Adenovirus Cre/loxP-Regulated Expression Vector Set	6152	1 Set
293 세포	B1215	4 ml

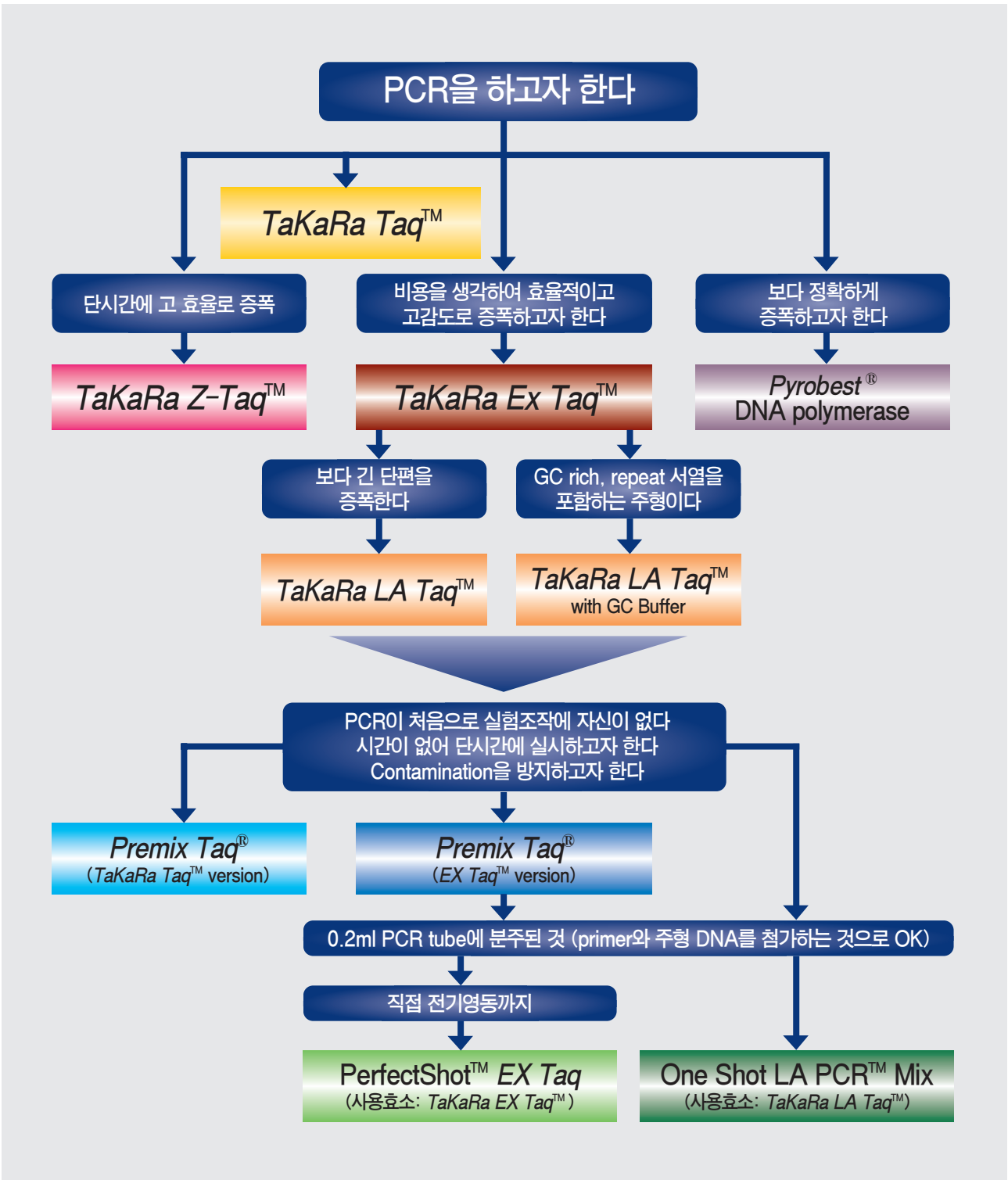
【본 제품 사용시의 주의사항】

- 본 제품을 이용한 실험에 있어서는 아래의 점들에 주의해 주시기 바랍니다.
- 사용시에는 관찰관청 및 조작성 안전위원회의 재조합 DNA 실험지침에 따라 주시기 바랍니다.
- 본 제품은 연구목적 이외에는 사용할 수 없습니다. 사람, 동물의 치료 및 임상 진단에는 사용하지 않도록 주의하여 주시기 바랍니다(또 본 제품으로 얻은 생물재료를 제3자에게 양도할 수 없습니다).
- 본 제품을 연구목적 이외에 사용할 경우에는 사전에 당사에 문의를 해 주시기 바랍니다.
- 본 키트는 293 세포내에서 포유동물에 감염성을 가지는 재조합 바이러스 입자를 생산합니다. 이 재조합 바이러스는 293 세포 이외에서는 증식할 수 없지만, 만일 피부나 기도 등에 부착하는 경우, 고효율로 세포내로 들어가 목적유전자를 발현합니다. 흡입이나 부착을 방지하기 위해, 반드시 안전 캐비닛을 사용해 주시기 바랍니다.
- 본 제품의 사용에는 유전공학과 세포공학과 관한 기본적인 기술이 필요합니다.
- 본 제품의 사용으로 발생한 어떠한 사고 및 손해에 대해서도 당사는 책임을 지지 않으므로 세심한 주의를 기울여 주시기 바랍니다.

PCR Enzymes 및 RT-PCR Kit 관련제품

TaKaRa는 다양한 PCR enzyme 과 관련제품을 준비하고 있습니다.
 PCR enzyme은 아래의 chart를 참조하여 실험목적에 맞게 선택할 수 있습니다.

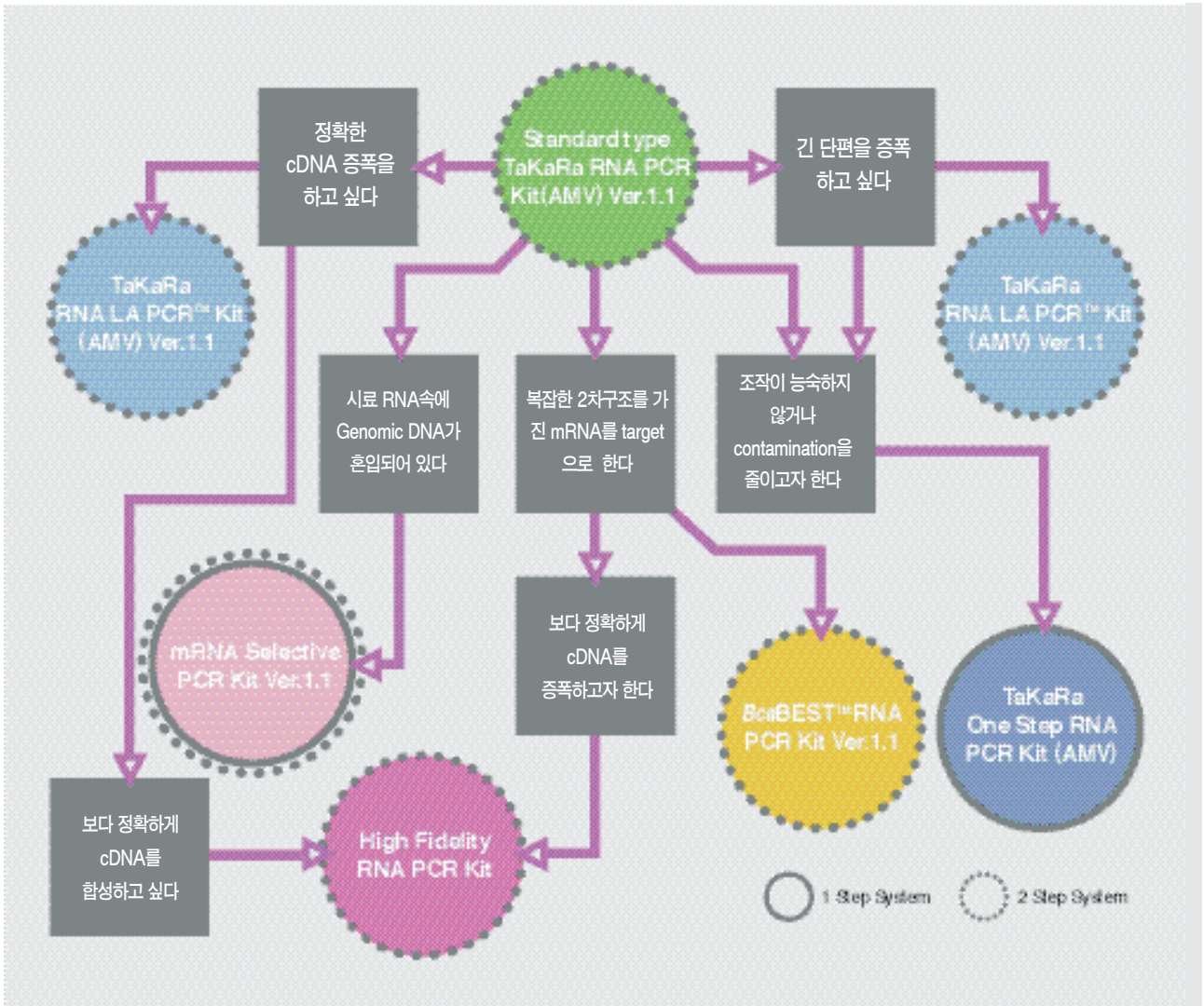
■ PCR Enzyme 선택 Chart



TaKaRa PCR 제품정보

TaKaRa는 RT-PCR을 위한 다양한 제품을 갖추었습니다. 연구 목적에 따라 적절한 것을 선택하여 주시기 바랍니다.

■ RT-PCR Kit 선택 Chart



■ RT-PCR Kit 일람표

제품명	TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)	TaKaRa RNA LA PCR™ Kit(AMV)Ver.1.1	TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.2.1	BcaBEST™ RNA PCR Kit Ver.1.1	mRNA Selective PCR Kit Ver.1.1	High Fidelity RNA PCR Kit
Code / 포장량	RR024A 50회 RR024B 50회×2	RR012A 50회	R019A 50회 R019B 50회×2	RR023A 50회 RR023B 50회×2	RR025A 50회 RR025B 50회×2	R020A 50회 R020B 50회×2
사용할 수 있는 RNA template	전 반					
역전사효소	AMV Reverse Transcriptase XL (42~60℃에서 가능)			BcaBEST™ Polymerase (65℃ 최적)	AMV Reverse Transcriptase XL (42~50℃에서 가능)	BcaPLUS RTase (65℃ 최적)
역전사길이	12.2kb 이상			7.5 kb 미만	12.2 kb 이상	9.5 kb 미만
DNA Polymerase	AMV-Optimized Taq	TaKaRa LA Taq™	TaKaRa Taq™	Bca-Optimized Taq	AMV-Optimized Taq	Pyrobest™ DNA Polymerase
증폭길이	적어도 5.6 kbp 까지	적어도 12.2 kbp 까지	적어도 5 kbp 까지	적어도 5 kbp 까지	적어도 2 kbp 까지	적어도 5 kbp 까지
3'-RACE법 성분	없음	있음		없음		있음*
특징	역전사와 PCR을 단일 튜브로 실시	적어도 12.2 kbp 까지 증폭가능한 긴 단편용 RT-PCR system	표준 RT-PCR System	복잡한 2차구조를 가진 RNA의 RT-PCR에 유효	Genome DNA가 혼재해 있어도 RNA 유래의 cDNA만을 증폭	Fidelity가 높은 cDNA를 증폭

* RT시에는 Oligo dT-Adaptor Primer FB를, PCR시에는 Adaptor Primer FB를 사용함으로써 3'-RACE법에 대응

TaKaRa PCR 효소 시리즈

TaKaRa PCR Enzyme 5제품의 비교

TaKaRa Taq™/ TaKaRa Ex Taq™/ TaKaRa LA Taq™/ Pyrobest™ DNA Polymerase/ TaKaRa Z-Taq™

■ 5종류의 PCR enzymes의 사용목적에 따른 구분

TaKaRa PCR enzyme에는 *TaKaRa Taq™*, *TaKaRa Ex Taq™*, *TaKaRa LA Taq™*, *Pyrobest™* DNA Polymerase 그리고 *TaKaRa Z-Taq™* 등의 5종류가 있어 각각의 용도에 맞게 선택할 수 있다. 시료에 따라 증폭효율이 다르나 보다 효과적으로 증폭하기 위한 참고기준으로 아래의 표로 나타내었다.

■ 사용구분의 기준

증폭길이	<i>TaKaRa Taq™</i> <i>Pyrobest™</i> DNA Polymerase	<	<i>TaKaRa Ex Taq™</i> <i>TaKaRa Z-Taq™</i>	<	<i>TaKaRa LA Taq™</i>
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)	<i>TaKaRa Taq™</i> <	<i>TaKaRa Ex Taq™</i>	<	<i>TaKaRa LA Taq™</i> <	<i>Pyrobest™</i> DNA Polymerase
		<i>TaKaRa Z-Taq™</i>			
증폭효율	<i>TaKaRa Taq™</i> ≒ <i>Pyrobest™</i> DNA Polymerase	<	<i>TaKaRa LA Taq™</i> ≤	<i>TaKaRa Ex Taq™</i>	<i>TaKaRa Z-Taq™</i>
반응속도	<i>TaKaRa Z-Taq™</i> 이 <i>TaKaRa Taq™</i> 보다 5배 더 빠르다				

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어질수록 필요한 주형 DNA의 양이 많아지고 또 PCR 조건도 엄밀해진다.

TaKaRa Taq™

일반적으로 1 kb이하의 단편을 증폭하는 경우는 *TaKaRa Ex Taq™*, *TaKaRa LA Taq™*과 동등하게 양호한 증폭산물을 얻을 수 있다.

TaKaRa Ex Taq™

특히 길이가 ~15 kbp인 단편의 증폭에 사용하면 *TaKaRa Taq™*보다 적은 효소량(50~80%)으로 *TaKaRa Taq™*과 동등 또는 그 이상의 증폭산물을 얻을 수 있다. 또 *TaKaRa Taq™*에 의한 증폭에서는 검출할 수 없었던 시료도 *TaKaRa Ex Taq™*을 사용하므로써 검출할 수 있었던 예가 다수 보고되어 있다.

TaKaRa LA Taq™

어떠한 시료에도 사용할 수 있으나 특히 15 kbp 이상의 긴 단편을 증폭할 경우 효과적이다. 또 GC rich 또는 반복서열을 가져 2차구조를 형성하는 DNA의 증폭에는 *TaKaRa LA Taq™* with GC buffer를 사용하면 된다.

* 통상의 길이(~2 kbp)의 증폭에는 감도, 증폭량, 시료량, PCR 조건의 범용성 그리고 정확도(fidelity)의 관점에서 *TaKaRa Ex Taq™*이 적당하다.

TaKaRa Z-Taq™

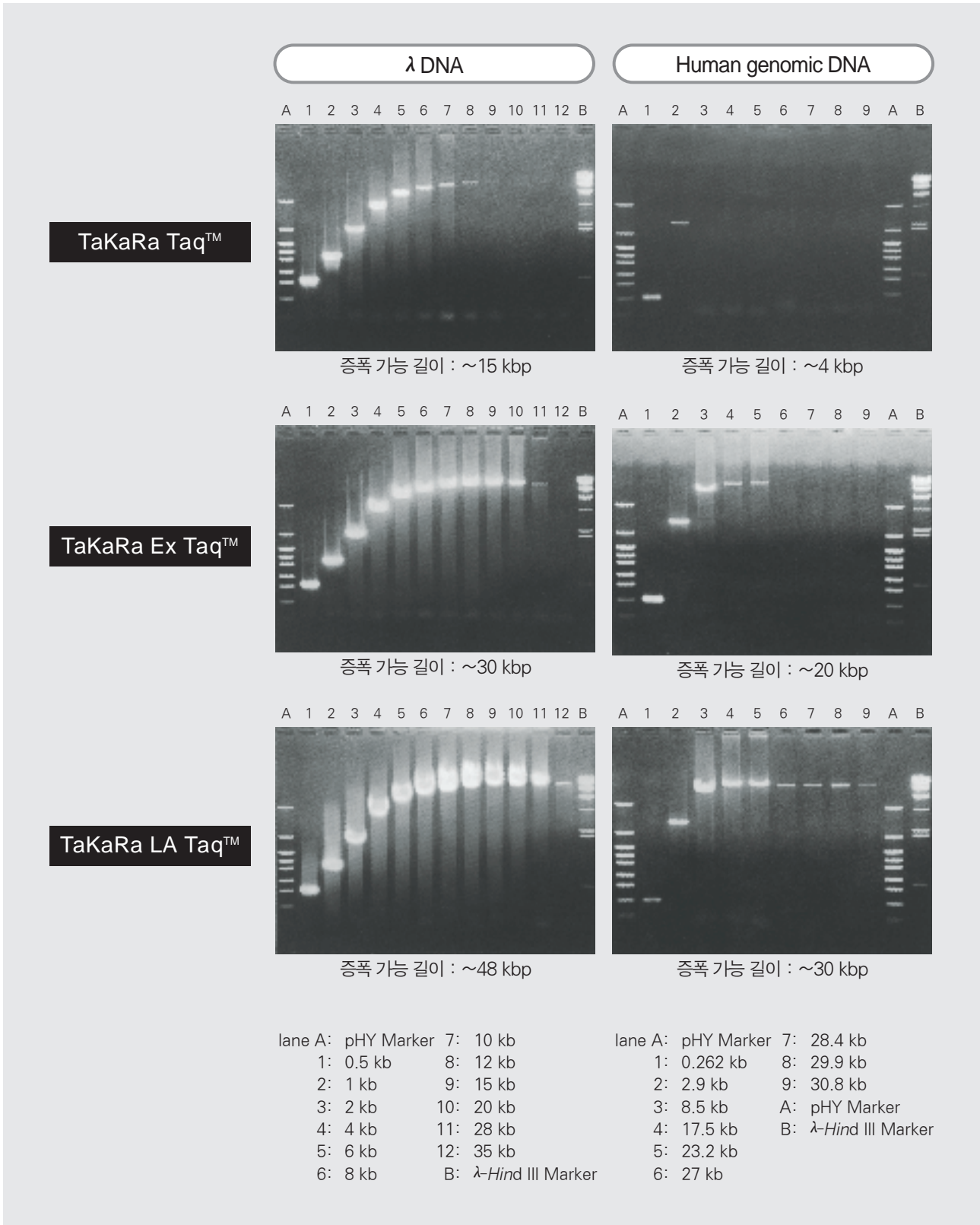
고속 PCR용 Polymerase로 반응속도가 아주 빨라(*Taq* DNA polymerase의 약 5배) 20분 이내에 1 kb의 단편을 증폭할 수 있다. 따라서 다수의 시료를 처리하는 경우에 아주 편리하다. 또 반응성이 우수하여 human DNA를 주형으로 하여 17.5 kb를 효율적으로 증폭할 수 있다.

Pyrobest™ DNA Polymerase

Pyrobest™ DNA Polymerase는 *Pyrococcus* sp. 유래의 초내열성 PCR enzyme이다. *Pyrococcus furiosus* 유래의 *Pfu* PCR enzyme과 동등하게 정확한 증폭이 가능할 뿐만 아니라 *TaKaRa Taq™*과 동등한 증폭효율을 얻을 수 있다. *TaKaRa Taq™* 등의 *Taq* DNA polymerase와 달리 hot start법을 사용하지 않아도 비특이적인 증폭이 일어나지 않는다.

■ 증폭효율의 비교

TaKaRa PCR enzyme군 중 *TaKaRa Taq™*, *TaKaRa Ex Taq™* 그리고 *TaKaRa LA Taq™*을 사용하여 0.5~35 kbp의 λ DNA와 0.262~30.8 kbp의 human genomic DNA를 증폭하고 각각의 증폭효율을 비교하였다.



PCR Enzymes

TaKaRa Taq™

*TaKaRa Taq™*은 *Thermus aquaticus*의 DNA polymerase 유전자를 클로닝하여 재조합형으로 대장균에서 발현하여 분리, 정제된 효소이다. 천연의 *Taq* polymerase와 동등한 기능을 갖도록 조제한 것으로 4 kb 이하 단편의 증폭에 아주 기본적인 PCR Enzyme이다.

TaKaRa Taq™(Mg²⁺ plus Buffer)

■ 내용

<i>TaKaRa Taq™</i> (5 U/ μ l)	250 U
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	1 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	800 μ l
Code No.	R001A 250 U 139,000원
	R001B(A×4) 1,000 U 520,000원
	R001C(A×12) 3,000 U 1,440,000원

TaKaRa Taq™(Mg²⁺ free Buffer)

■ 내용

<i>TaKaRa Taq™</i> (5 U/ μ l)	250 U
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ free)	1 ml
MgCl ₂ (25 mM)	1 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	800 μ l
Code No.	R001AM 250 U 139,000원
	R001BM(AM×4) 1,000 U 520,000원
	R001CM(AM×12) 3,000 U 1,440,000원

TaKaRa LA Taq™

*TaKaRa LA Taq™*은 3' → 5' exonuclease 활성(proof reading 활성)을 이용하는 TaKaRa LA PCR Technology를 구사하여 개발한 DNA polymerase이다. 아주 긴 단편을 증폭하는 경우 특히 15 kbp 이상의 증폭에 위력을 발휘한다. 0.5 kbp 이하의 단편을 증폭하는 경우는 시료에 따라 *TaKaRa Taq™*, *TaKaRa Ex Taq™*을 사용하는 것이 보다 만족한 결과를 얻을 수 있다.

TaKaRa LA Taq™

■ 내용

<i>TaKaRa LA Taq™</i> (5 U/ μ l)	125 U
10× LA Buffer II(Mg ²⁺ free)	1 ml
MgCl ₂ (25 mM)	1 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	400 μ l
Code No.	RR002A 125 U 172,000원
	RR002B(A×4) 500 U 646,000원

TaKaRa Ex Taq™

*TaKaRa Ex Taq™*은 20 kb 이하의 긴 단편을 증폭할 수 있도록 설계한 것으로 native *Taq* DNA polymerase에 비하여 아주 월등한 증폭성능을 갖도록 제조한 것이다. 또 혈액 시료 등에 있어서 시료의 순도에 영향을 적게 받으며, 미량의 시료로도 증폭할 수 있다. 경이로운 증폭효율을 갖는 PCR enzyme의 standard로서 TaKaRa가 권장하는 효소이다.

TaKaRa Ex Taq™(Mg²⁺ plus Buffer)

■ 내용

<i>TaKaRa Ex Taq™</i> (5 U/ μ l)	250 U
10× <i>Ex Taq</i> Buffer(20 mM Mg ²⁺ plus)	1 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	800 μ l
Code No.	RR001A 250 U 173,000원
	RR001B(A×4) 1,000 U 660,000원
	RR001C(A×12) 3,000 U 1,860,000원

TaKaRa Ex Taq™(Mg²⁺ free Buffer)

■ 내용

<i>TaKaRa Ex Taq™</i> (5 U/ μ l)	250 U
10× <i>Ex Taq</i> Buffer(Mg ²⁺ free)	1 ml
MgCl ₂ (25 mM)	1 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	800 μ l
Code No.	RR001AM 250 U 173,000원
	RR001BM(AM×4) 1,000 U 660,000원
	RR001CM(AM×12) 3,000 U 1,860,000원

TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer

*TaKaRa LA Taq™*을 사용하여도 주형이 GC rich 또는 repeat sequence를 갖고 있는 경우는 전혀 증폭되지 않는 경우가 있다. *TaKaRa LA Taq™* with GC buffer는 *TaKaRa LA Taq™*의 LA PCR™ buffer를 개량하여 복잡한 2차 구조를 갖는 주형의 증폭에 아주 효과적인 전용 GC buffer를 첨부한 제품이다.

TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer

■ 내용

<i>TaKaRa LA Taq™</i> (5 U/ μ l)	125 U
2× GC Buffer I	1.25 ml
2× GC Buffer II	1.25 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	400 μ l
Code No.	RR02AG 125 U 172,000원
	RR02BG(AG×4) 500 U 646,000원

TaKaRa Z-Taq™

TaKaRa Z-Taq은 고속 PCR용으로 최근 개발한 DNA Polymerase로 반응속도가 Taq Polymerase의 약 5배 정도로 매우 빨라, 20분 이내에 1 kbp 단편을 증폭할 수 있다. 또 반응성(processivity)도 뛰어나서 human genome DNA를 주형으로 하여 17.5 kbp를 증폭할 수 있으며, 반응시간이 단축되기 때문에 다수의 시료를 처리하는데 효과적이며 cycle 수를 늘림으로써(~50 cycle) 감도도 향상시킬 수 있다. TaKaRa Z-Taq은 신속성, 반응성, 고감도의 3박자를 갖춘 PCR용 효소이다.

TaKaRa Z-Taq™

■ 내용

TaKaRa Z-Taq™	200 U
10× Z-Taq™ Buffer(Mg ²⁺ plus, 30 mM)	800 μl
dNTP Mixture	800 μl
Code No.	R006A 200 U 368,000원
	R006B(A×4) 800 U 1,324,000원

Premix/One Shot Series

Premix Taq™

(TaKaRa Taq™ version/TaKaRa Ex Taq™ version)

Premix Taq™은 Taq DNA polymerase, PCR 반응용 buffer, dNTP mixture를 미리 2배 농도로 희석한 2× PCR solution이다. 주형 DNA와 primer를 첨가하는 것만으로 PCR을 실시할 수 있으므로 단시간에 반응을 종료하고자 하는 경우에 아주 적합하다. 또 pipetting 회수가 적기 때문에 cross contamination의 위험성을 대폭 줄일 수 있다.

Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version) R004A 120회용

■ 내용 값 138,000원

TaKaRa Taq™(1.25 U/25 μl)
PCR Buffer(2× conc. ; 20 mM Tris-HCl, pH8.3, 100 mM KCl, 3 mM MgCl ₂)
dNTP Mixture(2× conc. ; 각 0.4 mM)

* 4℃에 보존하여 주십시오.

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version) RR003A 120회용

■ 내용 값 173,000원

TaKaRa Ex Taq™(1.25 U/25 μl)
PCR Buffer(2× conc. ; Mg ²⁺ =4 mM)
dNTP Mixture(2× conc. ; 각 0.4 mM)

* 4℃에 보존하여 주십시오.

Pyrobest™ DNA Polymerase

Pyrobest™ DNA Polymerase는 *Pyrococcus* sp. 유래의 초내열성 DNA polymerase이다. Pfu DNA polymerase와 같이 정확도를 요구하는 실험에 사용하길 권장한다. 또 최적 활성온도인 75℃ 이하에서는 polymerase의 활성이 낮으므로 비특이적 증폭을 억제하여 정확한 증폭을 할 수 있다. 또한 TaKaRa Taq™과 동등한 증폭효율을 얻을 수 있다.

Pyrobest™ DNA Polymerase

■ 내용

Pyrobest™ DNA Polymerase	125 U
10× Pyrobest Buffer	500 μl
dNTP Mixture	400 μl
Code No.	R005A 125 U 170,000원
	R005B(A×4) 500 U 612,000원

One Shot LA PCR™ Mix

One Shot LA PCR™ Mix는 TaKaRa LA Taq™, PCR 용 반응버퍼, dNTP mixture를 미리 2배 농도로 혼합하여 0.2 ml PCR용 tube에 25 μl씩 분주하여 놓은 Premix series 제품이다. 주형과 primer를 첨가하는 것만으로 긴 단편의 DNA를 간편하게 단시간에 증폭할 수 있으며 contamination의 위험성도 대폭 줄일 수 있다.

One Shot LA PCR™ Mix 24회용

■ 내용

25 μl/0.2 ml PCR tube×24
(0.2 ml PCR tube에는 아래의 시약이 들어 있다.)
· TaKaRa LA Taq™(2.5 U/25 μl)
· LA PCR Buffer II(2×conc. ; Mg ²⁺ =5 mM)
· dNTP Mixture(2×conc. ; 0.8 mM)

Code No.	RR004	24회용	138,000원
----------	-------	------	----------

Premix/One Shot Series

PerfectShot™ Ex Taq (Loading dye mix)

PerfectShot™ Ex Taq (loading dye mix)는 0.2 ml PCR tube에 Premix Taq™과 전기영동에 필요한 시약을 미리 분주하여 놓은 Premix series 제품이다. 주형 DNA와 primer를 첨가하는 것만으로 아주 간편하게 PCR에서 전기영동까지 실시할 수 있다. 반응산물을 그대로 겔에 loading하는 것이므로 cross contamination의 위험성도 대폭 줄일 수 있다.

PerfectShot™ Ex Taq (loading dye mix)

■ 내용

25 µl/0.2 ml PCR tube × 48

(0.2 ml PCR tube에는 아래의 시약이 들어 있다.)

- TaKaRa Ex Taq™ (1.25 U/25 µl)
- Ex Taq Buffer (2× conc. ; Mg²⁺ = 4 mM)
- dNTP Mixture (2× conc. ; 각 0.4 mM)
- 색소 marker (Orange G, Bromophenol blue)
- 비중 증가제

Code No. RR005A 48회용 104,000원

Insert Check PCR Mix

Insert Check PCR Mix는 M13 primer를 함유한 premix type의 PCR 반응액(전용 buffer와 필요한 시약을 모두 포함)을 0.2 ml PCR tube에 각각 분주한 것으로 주형 DNA를 첨가하여 PCR을 고속으로 수행함으로써 insert의 확인을 보다 신속하게 할 수 있다. 또한 색소(dye)가 첨가된 제품도 있어 PCR 종료 후 전기영동에 그대로 사용하여 확인도 신속하게 할 수 있다.

Insert Check PCR Mix R010A

48회용

PerfectShot™ Insert Check PCR Mix PR020A

48회용

■ 내용

One Shot Insert Check PCR Mix (TaKaRa Code RR010A)

2 × One Shot Insert Check PCR Mix : 25 µl × 48개

PerfectShot™ Insert Check PCR Mix (TaKaRa Code RR020A)

2 × PerfectShot™ Insert Check PCR Mix : 25 µl × 48개

(색소 maker 함유 : Orange G/Bromophenol Blue)

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

PCR제품은 TaKaRa가 강합니다.

효소와 증폭기기를 함께 사용해 보시기 바랍니다.

TaKaRa PCR DNA 증폭기기

TaKaRa는 PCR 효소 뿐만 아니라 다양한 PCR DNA 증폭기기도 함께 공급합니다.

특히, PCR 효소들은 개발과정에서 그 조건검토를 위하여 당사의 증폭기기를 많이 활용하였으므로, 신속한 조건검토에 유리합니다.

TaKaRa Code	제 품 명
TP400	TaKaRa PCR Thermal Cycler SP
TP3000	TaKaRa PCR Thermal Cycler MP
TP240	TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL
TP2000	TaKaRa PCR Thermal Cycler
TP480	TaKaRa PCR Thermal Cycler 480

STS의 해석

- Microsatellite Marker-

다형성 DNA marker 로 RFLP 또는 VNTR 기법을 이용하였으나 최근에는 다수의 유전자에 대하여 PCR로 간단히 typing 할 수 있는 microsatellite marker를 활용하고 있다. 현재 사람의 전체 genome에서 3000개 이상의 microsatellite marker가 분리 및 등록되었다. 그 유전자의 좌위는 STS(sequence tagged site)로 결정하여 YAC clone의 인접지도등의 물리 지도 작성에 이용한다. 모든 microsatellite marker의 정보는 인터넷상의 GDB등에서 얻을 수 있다. Microsatellite marker의 이용은 computer 통신과 PCR로 대표되는 분자유전학이 공동으로 발전하였음을 보여주는 좋은 예이다.

서론

단백질 marker를 주로 이용하였던 다형성 유전자 marker가, 12~13년 전에 DNA marker로 대체되었다. 또 최근에는 RFLP, VNTR법 대신 대립유전자가 많고 PCR로 간단히 typing할 수 있는 microsatellite marker를 많이 이용하는 추세이다. 1992년 프랑스의 CEPH와 Genethon 등의 그룹은 전체 genome에서 3000개 이상의 microsatellite를 분리한 뒤, 그 유전자 좌위를 결정하여 STS(sequence tagged site)로 등록하였다¹⁾. STS는 전 genome의 염기서열을 결정하는 기준점이 된다. 동시에 동 연구그룹은 평균 0.9 Mb의 사람 genome을 삽입부분으로 가지는 YAC clone으로 전체 90% 이상의 인접지도를 완성하였다²⁾. Microsatellite marker는 유전자 지도 작성과 유전성질환의 해석에 있어 아주 유용한 최적의 유전자 marker로 확립되었다³⁾. 본 고에서는 microsatellite marker의 현황에 대하여 설명한다.

I. Microsatellite Marker란

Microsatellite marker를 포함하여 다형성 DNA marker는 아래와 같이 분류할 수 있다.

1. 1개의 염기가 치환된 것

A. RFLP(restriction fragment length polymorphism)⁴⁾ 각 개인으로부터 추출한 고분자 DNA를 제한효소로 절단하여, 임의의 DNA probe와 hybridization하였을 때 나타나는 절단길이의 다양성(=restriction fragment length poly morphism)이다. 점돌연변이이므로 대립유전자가 2개인 경우가 많고 특정 개인이 heterozygote로 되는 빈도가 0.5전후로 낮아진다. 최근에는 PCR로 목적하는 영역을 증폭하여 PCR 산물중의 점돌연변이의 존재 유무를 제한효소로 확인하는 PCR-RFLP법이 행해지고 있다. 이 방법은 PCR를 사용하므로 Southern Hybridization과 같이 대량의 DNA를 소비하지 않아도 된다.

2. 염기가 삽입/결실된 것

A. VNTR (variable number of tandem repeat) minisatellite marker⁵⁾

1 단위가 7~10개의 염기(bp)로 이루어진 짧은 단위의 반복수에 번이가 존재하여 발생하는 다형성이다. 대립유전자의 수가 많지만, 그 분포는 염색체상의 말단쪽에 편중되어 있다. 이 다형의 일부는 반복서열의 전후를 PCR로 증폭하여, PCR 산물의 길이 다형성으로 검출할 수 있다.

B. Microsatellite marker⁶⁾

1 단위가 7 bp 까지로 이루어진 단위가 반복하는 다형으로, 대립유전자의 수도 많고 개인이 heterozygote가 되는 비율이 80~90%가 되는 marker가 많이 보고되어 있다. 그림 1에 나타낸 (CA)_n 등의 dinucleotide 반복서열은 genome내에 5~10만 copy로 그 다형성이 풍부하다. PCR을 이용하므로 시료로 사용하는 고분자 DNA는 소량으로도 충분하다. 이미 몇몇 기업들은 전 염색체상에 균등하게 분포하는 microsatellite 다형 셋트를 시판하고 있다. Microsatellite marker는 1 단위가 7 bp 까지

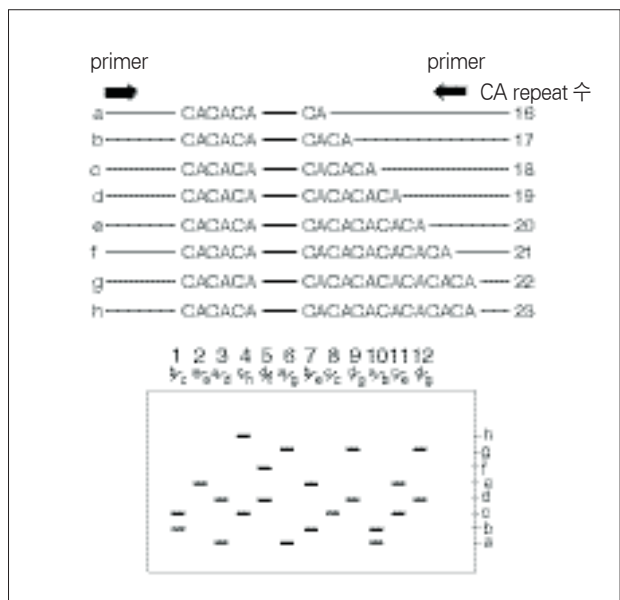


그림 1 Microsatellite marker의 모식도
Nucleotide repeat의 경우.

의 반복서열로 존재하므로 mononucleotide(AAA등), dinucleotide (CA,TA,CG등), trinucleotide(CTG,CGG등), tetranucleotide(TAAA등), pentanucleotide등의 종류가 있지만 이중 CA 반복서열의 수가 많으므로 가장 많이 사용하고 있다.

C. 유전자 삽입/결실(I/D)에 의한 다형

수 bp~수백 bp의 유전자가 삽입 또는 결실되므로써 형성하는 것이다. 예를 들면 APOB(apolipoprotein B) 유전자의 signal peptide 에는 9 bp, ACE(angiotensin 변환효소) 유전자의 intron 16에는 약 300 bp 크기의 1개의 Alu 서열, MDPK(근긴장성 dystrophy의 원인유전자) 유전자의 intron 8에는 약 1000 bp의 3개의 Alu 서열로 구성된 유전자의 삽입 및 결실이 존재하여 병인유전자의 해석에 이용한다. 이들은 PCR로 증폭할 수 있다.

II. Microsatellite marker의 정보

특정 염색체의 제한된 영역에 대한 지도를 작성하는 경우나, 어떤 유전병의 원인유전자를 해석하는 경우에는 어떤 DNA probe나 다형성 DNA marker가 필요한지의 정보를 얻는 것이 중요하다. 최근에는 인터넷으로 이용할 수 있는 GDB, CHLC, OMIM, Genethon 등이 유용하다. 여기에서는 유전병 정보(OMIM)이외에도 상세한 사람염색체지도, 다형을 나타내는 clone의 유전자 좌위 및 microsatellite marker의 경우, PCR primer의 염기서열, 반응조건 대립유전자의 길이와 유전자 빈도 등의 정보를 입수할 수 있다. *Nature* 지의 특별호(1995년 9월 28일 발행)에 "The Genome Directory"가 게재되었는데, 여기에는 상세한 염색체 지도가 기재되어 있다. 그러나 marker에 따라 동양인과 백인간에 유전자 빈도가 크게 다른 경우가 있음을 염두해 둘 필요가 있다⁷⁾. 게재한 대부분의 정보는 백인의 유전자 해석을 위해 개발한 DNA marker이기 때문에, 동양인

표 1 DNA marker의 정보를 얻을 수 있는 대표적인 web

GDB (Genome Data Base) http://gdbwww.gdb.org 사람의 유전자지도와 유전자 좌위 정보 OMIM (Online Mendelian Inheritance In Man) 사람 유전병의 catalogue
CHLC (Cooperative Human Linkage Center) http://www.chlc.org genotype, 유전자 marker와 좌위 정보
Genethon http://www.genethon.fr 사람 CA 반복서열의 연쇄지도, 상세한 연쇄지도 정보
Jackson Lab http://www.jax.org 마우스의 유전자지도 정보
Whitehead Institute http://www-genome.wi.mit.edu 마우스의 CA 반복서열의 연쇄지도
Research Genetics http://www.resgen.com 사람과 마우스의 CA 반복서열이 전염색체에 균등하게 분포하는 셋트를 map pair라 하여 시판하고 있다. 통신으로 구입가능

의 해석에는 적용할 수 없는 경우도 있다.

III. Microsatellite marker의 분리

특정 유전자 영역에서 microsatellite를 분리하기 위해서는 YAC clone의 경우 우선 cosmid clone으로 subcloning한다. 제작한 cosmid library를 CA oligonucleotide probe와 hybridization하여 CA 반복서열을 포함하는 cosmid를 분리한다. 이 cosmid를 *Sau3AI* 등의 제한효소로 소화하고, plasmid에 subcloning한 후 다시 CA oligonucleotide로 screening하여 CA를 포함하는 clone을 분리한다. 이 clone의 삽입 부분의 염기서열을 결정하고, CA 반복서열을 가지는 적당한 primer를 제작하여 6명 정도의 건강인 시료를 이용하여 다형이 출현하는지의 여부를 확인한다. 이 방법의 단점은 plasmid의 삽입부분의 길이가 긴 경우에는 CA 반복서열을 끼고 있는 염기서열을 결정할 수 없으며 반대로 삽입부분의 길이가 짧은 경우에는 적당한 길이의 primer 염기서열을 결정할 수 없다는 것이다. CA 반복서열의 반복수가 14이상인 것은 다형성을 나타낼 확률이 높다^{8,9)}. Hayashi 등은 cosmid에서 직접 CA 반복서열의 전후 염기서열을 결정하는 방법으로서 6종류의 sequence primer를 혼합하는 방법을 개발하였다¹⁰⁾.

IV. Microsatellite marker의 검출 방법

Microsatellite marker의 검출에는 RI 등으로 primer를 표식하는 것이 일반적이다. 그러나 PCR 산물의 길이를 100 bp 전후로 하면 acrylamide gel로 전기영동한 후 EtBr로 염색한 함으로써, 나타나는 밴드가 heterozygote인지 homozygote인지를 구별할 수 있다. 그림 2의 (A)에 그 예를 나타내었다. 이 방법으로는 PCR 산물의 정확한 길이를 결정할 수는 없지만 hetero duplex가 되어 나타나는 밴드를 이용해서 heterozygote인지 homozygote인지는 구별할 수 있다. 일반적으로 한쪽의 primer를 ³²P로 표식하거나 FITC나 Rhodamin 등으로 형광표식을 하여 염기서열 결정용 전기영동으로 genotype을 결정한다. 그림 2의 (B)에는 Rhodamin 표식 primer를 사용한 예를 나타내었다. 이 STS는 사람 염색체를 현미경을 사용하여 절단한 genome 유래의 library로부터 분리한 microsatellite marker로, CEPH(프랑스 파리에 본부가 있으며 사람의 유전자 다형으로부터 유전자지도를 작성하는 기관) 가계를 typing한 예이다. GDB에 의해 D7S1682(MS8-148)로 명명되었고 국제적으로 등록되어 통용되고 있다¹¹⁾. 또 ³²P를 사용한 RI 표식 레를 지도 2의 (C)에 나타내었다. 이것은 웨르나 증후군의 원인 유전자를 분리 동정하기 위하여, 8S1055(MS8-134)를 이용하여 상동 접합성 mapping(homozygosity mapping)을 한 것이다. 3가계의 환자는 모두 N/N이나 G/G의 homozygosity를 보였다.

V. Microsatellite marker의 응용

Microsatellite marker는 유전자지도 작성, 유전병 가계에 있어서의 연쇄 분석과 이병동포대법¹²⁾, 암억제 유전자의 해석에 있어서 heterozygosity의 소실 확인, 암조직 등에서의 DNA 복제시의 error(replication error:RER) 검출 등에 이용할 수 있다.

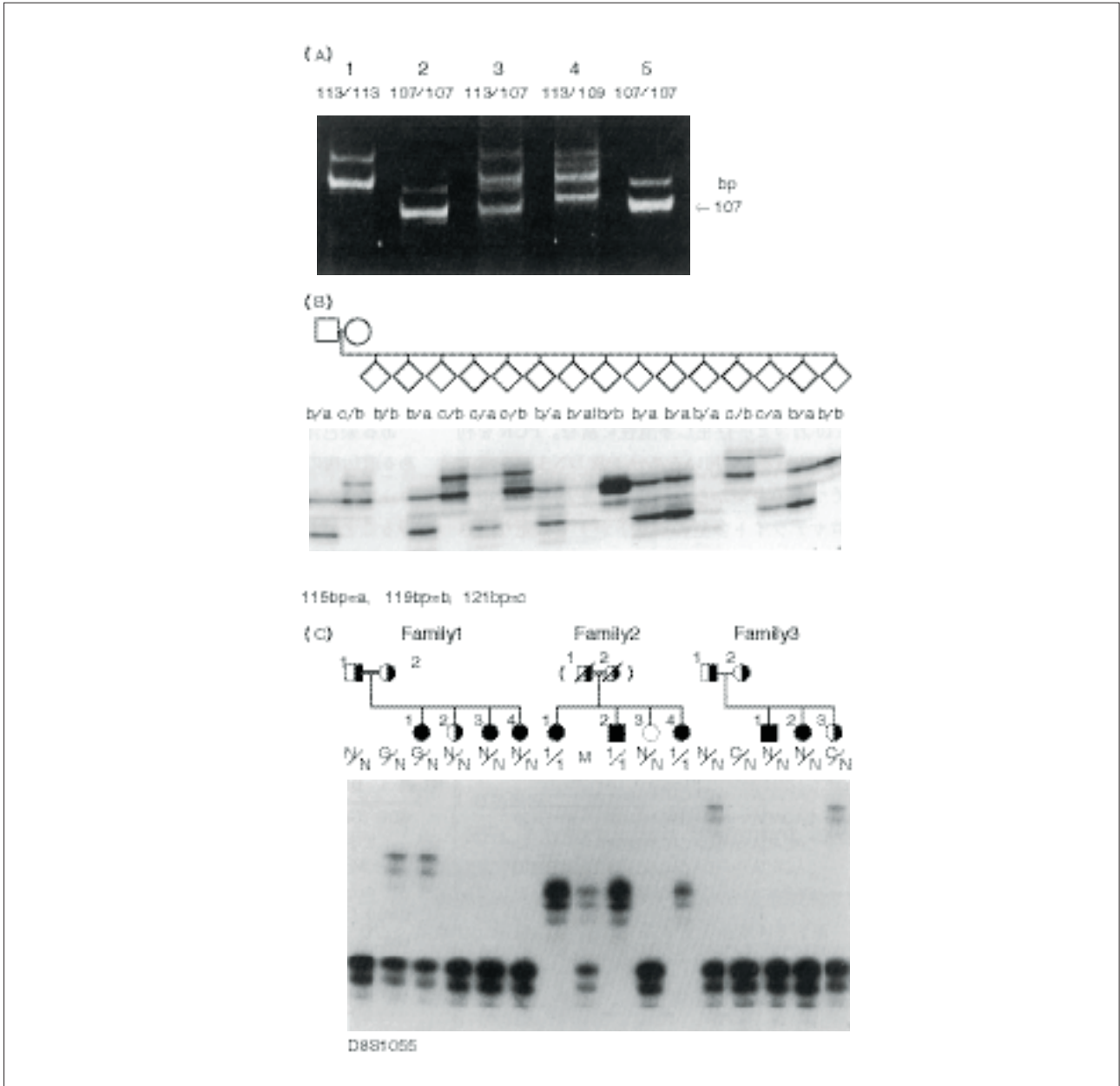


그림 2 Microsatellite marker의 검출법

(A) ANK 1 유전자의 다형을 10% polyacrylamide gel로 전기영동하고 염색하였다. Homozygote와 heterozygote를 구별할 수 있다(Nucl Acids Res., 19, 969,1991). (B) D7S1682를 CEPH 가계(#=1423)로 typing하였다. FMBIO100 사용. (C) D8S1055를 사용하여 웨르나 증후군가계를 해석하였다. ³²P 사용.

1. 연쇄지도 작성과 연쇄 분석

생식세포가 감수분열할 때는 부계유래와 모계유래의 2개의 상동염색체사이에 교차(=바꿈(crossing over))가 발생하고 그 결과로 유전자의 재조합이 발생한다. 1회 감수분열로 전염색체의 약 30군데에서 교차가 발생한다. 재조합 빈도는 재조합율= θ 로 나타내는데, 2개의 유전자와 거리가 멀어질수록 재조합(θ)은 커지는 반면, 가까이 좌위할 경우는 연쇄해 있다고 표현하여 재조합율은 거의 0이 된다. 동일한 염색체상에서 2개의 유전자좌가 어느 정도 떨어지면 좌위간의 교차는 2회 이상이 되고, 홀수회와 짝수회의 빈도는 동일하기 때문에 재조합율은 $0.5=1/2$ 가 된다. 또 2개의 유전자좌가 각각의 염색체상에 존재하는 경우도 동일 생식세포에서 분리될 확률은 0.5가 되어 재조합율은 0.5가 된다. 2개의 유전자좌의 지도 거리(map distance)=X와 재

조합율= θ 의 관계가 연쇄 분석의 기본이다. 동일 염색체의 2 유전자좌 사이에 1회의 교차만 발생하는 경우의 유전자 거리는 $X=\theta$ 로 정의한다. X는 Centi Morgan(cM)이라는 단위로 표시한다.

사람의 유전자 지도는 genome상에 존재하는 유전자 marker에 따라 제작하며 지도의 길이는 남자의 경우는 27.5 M으로, 여자의 경우는 38.5 M으로 추정한다. 그 평균값은 33 M = 3300 cM이다. 사람의 genome은 haploid 당 평균 3×10^9 염기대를 가지므로 1 cM은 평균 3×10^9 bp/3300=1000 kb가 된다. 초과파리와 쥐는 계획적인 교배로 유전자 지도를 작성하지만, 사람의 경우는 가계를 통계학적으로 처리하는 연쇄분석으로 연쇄지도를 작성한다. Rod 값은 각 핵가족마다 가산된다. Rod 값의 합계가 +3이상이면 양유전자의 좌위 사이에는 연쇄가 존재한

다고 판정하고, rod 값의 합계가 -2이하이면 연쇄가 없고, -2에서 +3 사이이면 판정이 불가능하므로 다수의 데이터를 필요로 한다. 실제 rod 값의 산출에는 computer program인 "LIPED" 또는 "LINKAGE"를 사용하는 경우가 많다. 일반적으로 최대의 rod 득점(Z_{max})을 나타내는 재조합율(θ_{max})이 2개의 유전자 간의 거리가 된다.

2. 이병동포대법(affected sib pair method)

이병동포대법에서는 연쇄분석처럼 2~3세대에 걸친 대가계 구성원의 시료를 모을 필요없이 이병한 2인의 동포와 양친의 시료를 모으기만 하면 된다. 또한 이 분석법은 질환 유전형식(우성 유전인지 열성유전인지)나 침투율(연쇄분석법은 rod 값을 산출할 때 중요하다)를 고려할 필요가 없다는 장점을 가진다. 이 분석법에 적당한 유전자 marker는 대립유전자가 많은 HLA 항원이나 Gm형 등이며, ABO 혈액형이나 점돌연변이에 의한 RFLP는 대립유전자가 2~3 종에 이르므로 이 분석을 사용하더라도 정확한 정보를 얻기 힘들다. PCR을 이용한 microsatellite marker는 이병동포대법을 해석하기 위하여 개발한 것이라고 해도 과언은 아니다. 실제 응용례로 자기면역질환인 바세도우병의 2개의 원인유전자 좌위인 HLA 좌위와 Gm 좌위는 본 방법으로 결정되었으며, 모두 열성유전임을 확인하였다. 또 동시에 원인유전자의 유전자 빈도도 추정하였는데, 이것은 역학 조사결과와 완전히 일치하였다. 금후 이 방법을 이용한 성인병의 해석을 시작할 것이다.

3. 질환을 가진 집단의 해석

어떤 질환의 발증 원인이 되는 유전자 변이부위와 인접하는 유전자 marker는 연쇄 불평형 상태가 되는 원리를 이용한 것이다. 질환을 가진 집단과 정상 집단 사이의 유전자 빈도를 비교하고 통계학적인 검토를 한다. 주효과유전자가 1~수개 존재한다고 가정하고 원인 유전자를 검색하는 경우, 우선 환자군과 대상군 사이에서 임의의 유전자 marker의 유전자 빈도를 비교해 환자군에 편중하는지의 여부를 χ^2 검정 등을 이용하여 비교한다(관련의 검출). 이 유전자빈도의 편중은 원인유전자 좌위와 조사한 유전자 marker와의 사이에 연쇄 불균형이 발생하였음을 의미한다. 그 다음 관련검출된 유전자 marker에 대하여 그것이 주효과유전자인가를 검토하기 위해, 이병동포대법 또는 연쇄 분석법으로 재해석한다.

오래전부터 ABO 혈액형의 질병과의 연관성에 관한 많은 논문이 발표되었다. 예를 들면, O형 혈액형을 가진 사람은 소화성 궤양에 걸릴 빈도가 높다는 보고나, HLA type의 만성 관절 류머티즘 질환과의 관련을 보고한 예가 그것이다. 여기서는 환자군과 대상군 집단의 유전자빈도를 비교하기 때문에, 환자군의 질병 진단 기준을 명확히 할 필요가 있다. 관련 유의성의 검정에는 χ^2 검정을 사용하고 대상군의 인원수가 환자군과 동일하면 이상적이지만, 많아도 4배까지로 한다. 대상군의 인원수가 너무 많으면 χ^2 값이 커져 정확한 검정을 할 수 없다. 또 2×2 분할표의 기대도수가 5이하인 세포가 존재하는 경우에는, χ^2 검정을 이용하면 확률이 약간 낮은것으로 계산되어 버리므로 Fisher의 직접확률계산법을 이용할 필요가 있다.

결론

DNA marker는 PCR에 의한 microsatellite marker의 출현으로 크게 변화하였고, 이에 편승하여 Genome Project도 비약적으로 진보하였다. 우선 microsatellite marker를 이용한 연쇄분석과 관련 연구로 염색체상의 유전자좌위를 결정하는 일을 제 1 단계로 한다. 다음에는 발현을 확인하고, 다시 유전자좌위도 결정된 ESTs(expressed sequence tags)로부터 책임유전자 그 자체를 분리 동정하는 작업, 이른바 positional candidate approach가 주류를 이루게 될 것이다¹³⁾.

【참고문헌】

- 1) Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., Lathrop, M. : *Nature*, **359**, 794-801 (1992)
- 2) Cohen, D., Chumakov, I., Weissenbach, J. : *Nature*, **366**, 698-701 (1993)
- 3) Miki Tetsuro 등 : 일본 임상 1994년 특별호 「임상 분자 생물학」, 488-495 (1994)
- 4) Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davies, R. W. : *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314-331 (1980)
- 5) Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. : *Science*, **235**, 1616-1622 (1987)
- 6) Weber, J. L., May, P. E. : *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 388-396 (1989)
- 7) Kamino, K., Nakura, J., Kihara, K., Ye, L., Nagano, K., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Miki, T., Ogiwara, T. : *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 407-419 (1993)
- 8) Nagano, K., Nakura, J., Kihara, K., Ye, L., Kamino, K., Mitsuda, N., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Miki, T., Ogiwara, T. : *Jpn. J. Hum. Genet.*, **38**, 393-399 (1993)
- 9) Ye, L., Nakura, J., Mitsuda, N., Fujioka, Y., Kamino, K., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Miki, T., Ogiwara, T. : *Genomics*, **28**, 566-569 (1995)
- 10) Iizuka, M., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, **3**, 171-173 (1991)
- 11) Nakura, J., Ye, L., Miki, T., Mitsuda, N., Ogiwara, T., Takahashi-Fujii, A., Ishino, Y. : *Jpn. J. Hum. Genet.*, **39**, 447-449 (1994)
- 12) Yasuda Tokuchi : 일본 의사회 잡지, **89**, 563-572 (1983)
- 13) Collins, F. S. : *Nature Genet.*, **9**, 347-350 (1995)

치매의 치료현황과 전망



서유헌

서울대학교 의과대학 교수
뇌의약학 센터 소장 및 한국뇌학회 회장

치매(dementia)는 기억력 장애, 판단력 상실 등 정신기능의 전반적인 장애가 나타나는 것을 특징으로 하며 결국은 인간의 삶을 황폐하게 하는 질환이다. 치매의 원인은 다양해서 약 50% 정도는 알츠하이머형 치매, 20-30%는 혈관성 치매 그리고 알코올성 치매, 파킨슨병 치매 등이 있으며, 약 15-20%는 알츠하이머형과 혈관성치매 양쪽을 다 앓고 있는 것으로 알려져 있다. 치매의 가장 중요한 원인 질환인 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)이라는 노인성 치매질환은 아직까지 발병원인이 정확하게 밝혀지지 않았지만 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병은 50세 이전에는 증상이 나타나는 경우가 드물지만 60세 이후로는 나이가 들어감에 따라 발생빈도가 점진적으로 증가하기 때문에, 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다. 실제로 이 병의 유병율은 65-74세 사이에는 10%, 75-84세 사이에는 19%, 85세 이상에서는 47%로 나타나 있다. 현재 서구 사회에서는 65세 이상 인구의 약 10%, 80세 이상인구의 약 40-50%에서 알츠하이머병이 발생되고 있으며, 이미 미국에서는 이 질환 환자가 400만 명, 우리나라에는 약 20만명 이상에 달하고 있고, 사망률은 심혈관 질환, 악성종양, 그리고 뇌졸중에 이어 제 4위를 점하고 있으며, 2000년대 중반까지는 1500만 명의 환자가 발생되리라 예견하고 있다. 일본과 중국에서도 혈관성 치매에 비해 알츠하이머의 발병율이 해마다 증가하고 있어 커다란 사회문제를 야기하고 있다. 우리나라의 경우, 2020년이 되면, 평균수명은 약 77세가 되고 65세 이상의 노인 인구는 633만명으로 늘어나 전체 인구의 약 12.5%를 차지할 것으로 예상되므로, 머지않아 각종 노화관련 퇴행성 신경질환들이 커다란 의료 및 사회적 문제로 대두할 전망이다. 게다가 우리나라의 경우 노인성 치매, 또는 '노망'은 노령인구에서 '당연히' 일어나는 것이라는 사회적 통념 때문에 노인성 치매환자들이 의료기관에서 집중적인 치료를 받기가 어려운 실정인어서, 알츠하이머 환자를 대상으로 한 새로운 치료법의 개발이 어려운 형편이다. 이미 미국을 비롯한 여러 선진국에서는 신경과학에 대한 막대한 투자와 연구인력을 투입하고 있으나, 현재로서도 치매의 근본원인은 정확히 밝혀져 있지 않으며 치료제 또한 극히 제한되어 있다. 따라서 의학적 관점에서 뿐 아니라 사회-경제적 측면에서도 퇴행성 뇌질환의 연구가 절실한 상태이며, 21세기 복지국가 실

현을 위한 보건의료정책을 수립하는 데 있어서도 우선적으로 고려되어야 할 분야이기도 하다. 필자는 치매의 원인이 되는 아밀로이드 전구단백질(APP)의 C단 펩티드(CT105) 연구와 치매 치료 개발을 주 연구분야로 진행 중이며, 본 고를 통해 치매의 치료현황과 전망에 대해 서술하고자 한다.

1. 치매의 병인기전 연구

1) 노인성치매(알츠하이머병)의 병인기전연구

알츠하이머병의 병인기전연구는 아밀로이드 전구단백질(APP)의 C단 펩티드를 중심으로 수행하고 있다. APP는 정상인의 뇌에 존재하는 단백질이며, 대개 α -secretase라는 효소에 의해 대사되어 분비형인 APPs로 대부분 존재하며, β -secretase와 γ -secretase라는 효소에 의해 생성되는 C단 단백질과 베타 아밀로이드 펩티드(A β)의 경우는 소량 존재하지만, 알츠하이머 환자의 경우는 이러한 대사에 이상이 생겨서, 소량으로 존재하여 야할 C단 펩티드와 A β 가 다량 생성, 뇌에 침착하여 알츠하이머 환자의 뇌에서 발견되는 신경반(senile plaque)을 형성하는 것으로 알려져 있다(그림 1).

a. C단 단백질 클로닝 및 신경세포에 미치는 영향에 관한 실험
1996년 필자 등의 연구팀은 아밀로이드 전구단백질에서 C단 펩티드를 클로닝하였고, 그 펩티드를 *E. coli*에 transformation 하여, 이를 대량 생산, 분리하는 데 성공하였으며(Life science, 1996), 이때부터 C단 펩티드가 신경세포에 미치는 독성 및 그 관련 기전에 관한 연구에 몰두하여 기존에 많은 지지를 받고 있는 베타 아밀로이드 펩티드가설에 반하는 "C 단 단백질 학설"을 주장하였고, 이를 입증하는 많은 논문을 국제 학술지에 발표하였으며, 외국의 저명학자들로부터 많은 지지를 받고 있다. 뿐만 아니라, 1997년에는 뇌연구 학술지로 가장 저명한 *TINS (Trends in Neuroscience)*와 *Journal of Neurochemistry*에 그 동안의 C단 단백질 학설에 관한 필자의 연구를 종합적으로 정리하여 소개하는 두편의 총설 논문을 초청받아 집필, 발간하여 치매연구에 새로운 전기를 마련하였다. 즉, 정상적인 아밀로이드 전구단백질의 대사이상으로 생산된 105개의 아미노산으로 구성된 C단 단백질(CT)이 강한 신경세포독성을 나타낸다는

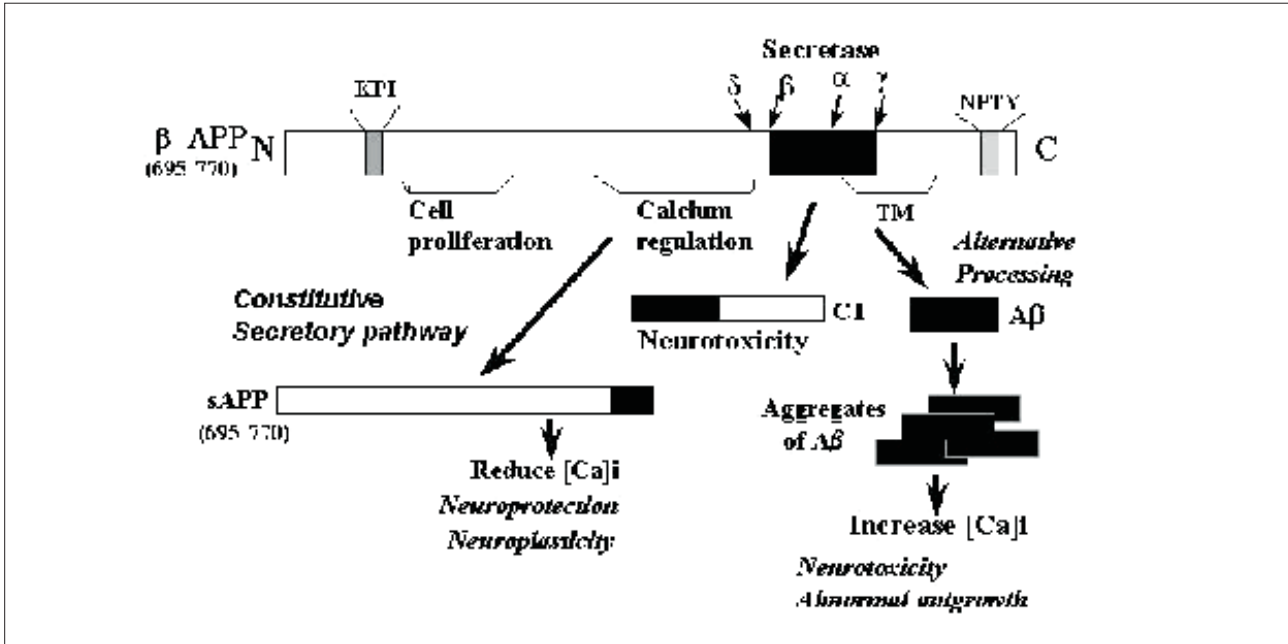


그림 1 아밀로이드 전구 단백질(APP)의 대사과정

사실을 처음으로 밝힌 것으로, 기존 학설에서는 베타펩티드가 중요한 원인이라 생각되었으나, C단 단백질의 독성이 베타펩티드보다 10배 이상 강하다는 사실을 밝혀낸 것이다. 필자의 발표에 이어, 저명한 과학 학술지인 Nature지에서도 캐나다 학자의 C단백질 유전자를 이식한 이식쥐가 가장 성공적인 치매모델쥐로 평가되었을 뿐만 아니라, 이 논문에 대한 Mattson과 Furukawa 박사의 해설 논문에는 필자의 논문이 중요논문으로 인용될 정도로, 필자의 "C단 단백질 가설"의 중요성은 세계 학계에서 높이 평가되었다.

b. C단 단백질의 독성발현과 세포 내 칼슘항상성과의 관련성
아밀로이드 C단 단백질이 신경세포내 칼슘에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여, 세포내 여러 이온채널 및 변화하는 칼슘농도의 아밀로이드 C단 단백질과의 관련성을 연구하고 있다. 이미 지난 98년과 99년에는 CT의 Na⁺-Ca⁺⁺ exchange 및 Mg⁺⁺-Ca⁺⁺ ATPase에 미치는 영향을 Neuroreport에 발표하였을 뿐만 아니라 C단 단백질 독성발현기전중의 세포내 칼슘농도 증가 및 그 세포내 변화, C단 단백질의 구조적인 변화까지 연구하여, 올해(2000) 생물학 분야에서 가장 유명한 저널인 FASEB Journal(SCI 13.861)에 게재승인을 받았다. 연구결과를 요약하면, CT105는 칼슘 항상성을 붕괴하거나 신경세포를 glutamate에 의한 흥분독성에 더욱 민감하게 만들고 또한 CT105의 일부분은 다양한 조건에서 부분적인 β -sheet conformation을 가져 이것이 CT105의 침착 및 독성과 연관성을 가질 것이라는 것이다.

c. C단 단백질 독성발현과 Nitric Oxide(NO) 관련 세포의 신호전달 관련성

CT 단백질의 독성발현시 나타나는 astrocyte와 glial 세포의 활성화와 관련하여 Nitric Oxide의 변화를 관찰하였다. 그 결과 CT 단백질의 독성발현과 비례하여 Nitric Oxide가 증가하는 것

을 관찰할 수 있었다. CT105 APP에 의한 MAPK cascade 활성화의 세부적인 기전을 밝히기 위하여 여러 가지 MAPK specific inhibitor들을 이용한 연구, MAPK cascade의 upstream으로 생각되는 tyrosine kinase의 관련성 연구, 그리고 downstream effector이면서 최종적으로 다양한 활성을 유발할 것으로 생각되는 여러 가지 apoptosis 관련 유전자들의 활성화 여부 확인 등을 진행중이며, 기타 parallel signal로서 작용할 수 있는 여러 가지 지질성 화학물질을 검색하고 있다. 이러한 C단 단백질 관련 신호전달기전을 99년 미국 신경과학회에서 발표하였다.

d. C단 단백질의 기억 및 인지기능 손상에 관한 연구

C단 단백질에 의한 신경독성 이외에도 학습 및 기억능력에 대한 영향을 알아보기 위하여 정상쥐의 뇌실내에 C단 단백질을 직접 주입한 후 그에 대한 연구를 실행하였다. 그 결과 C단 단백질을 주입한 쥐는 정상쥐에 비해 학습 및 기억 능력이 현저히 떨어짐을 관찰하였고, 또 알츠하이머 환자의 노인반(senile plaque) 주위에서 쉽게 관찰되는 astrocyte의 활성화시 나타나는 GFAP 단백질의 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다. 이 실험결과는 C단 단백질을 마우스의 뇌실 내로 직접 주입함으로써 노인성 치매 환자에서 나타나는 주요한 증상인 인지 및 기억력 저하증상에 대한 C단 단백질의 독성의 연관성을 증명하였으며, 이를 외국 신경과학 저널인 Journal of Neurochemistry(1998)에 게재하였다.

e. C단 단백질 유전적 돌연변이의 클로닝 및 신경세포 영향조사

C단 단백질 CT105는 아밀로이드 베타펩타이드(A β)와 NPTY sequence를 포함하고 있는데(그림 1 참조), NPTY는 endocytosis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. C단 단백질의 세포독성에 가장 중요한 역할을 하는 부위를 알아보기 위하여, C단 펩타이드의 아밀로이드 베타펩티드 또는 NPTY를 제거한 C단 펩타이드와 이들을 포함한 C단 펩타이드의 세포독성

비교를 통한 독성 기전을 연구하기 위해 primer를 이용한 PCR 증폭과 GST-융합단백질 제조를 통해 deletion mutant 등을 제조하였고, 이 연구결과는 올해(2000) 유명한 신경과학지인 *Journal of Neuroscience Research*에 게재중이다.

2) 가족성 알츠하이머의 병인기전 연구

가족성 알츠하이머는 여러가지 유전자의 이상발현에 의해 발병되는 것으로 알려져 있는데, 그 대표적인 유전자중 하나가 프레세닐린이다. 이는 1번과 14번 염색체에 존재하며, 가족성 알츠하이머 환자중 약 70%는 이 단백질 유전자의 이상과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

a. 프레세닐린의 발현 및 세포분화에 관한 연구

가족성 치매인 familial Alzheimer's Disease와 관련이 있는 preseniline 1(PS10)과 presenilin 2(PS2;프레세닐린)은 sel 12와 sequence의 유사성을 가지며 주로 Golgi apparatus와 endoplasmic reticulum에 위치한다. 본 연구에서는 마우스 난자와 착상전 단계에서의 PS1, PS2, APP 및 β -catenin의 발현양상을 면역화학적 방법으로 분석함으로써 이들 단백질의 기능을 확인 하였다. 그 결과 프레세닐린과 APP는 수정 후 8세포기부터 16세포기까지 세포질뿐만 아니라 핵에 존재하고, 초기 분화단계인 낭배엽시기에서는 핵에서 그 발현이 사라지지만 β -catenin은 세포질막에서만 높은 수준으로 발현함을 알 수 있었다. 이 결과는 핵의 프레세닐린이 초기 세포분열, 분화, Cell adhesion에 중요한 역할을 할 것이며 초기 배엽시기에서도 프레세닐린은 APP와 β -catenin과 기능적인 연관성을 가짐을 시사해 준다. 이 결과에 대해서는 이미 작년에 미국 신경과학회 및

유럽 신경화학회를 통해 발표한 바 있다.

3)혈관성 치매 및 루이바디 치매 관련 연구

a. α -synuclein에 관한 연구

최근 비아밀로이드 단백질인 α -synuclein이 가족성 파킨슨병의 원인 유전자일 것으로 알려지면서 이 단백질에 대한 연구에 박차를 가하게 되었다. 이 유전자는 치매 환자의 뇌에서 35개의 아미노산 잔기로 된 비아밀로이드 단백질인 NAC가 발견되었으며 NAC도 아밀로이드 A처럼 NACP라는 전구체에서 대사되어 생성되고 노화의 병리학적 소견인 신경섬유 덩어리와 신경반 중심부에 NAC가 있음이 면역조직학적 실험 방법에 의해서 밝혀졌다. NACP는 수용성 단백질로 열에 안정하고 뇌의 presynaptic vesicle에 존재하며 NACP에는 PKC의 기질이 될 수 있는 KTKEGV motif가 반복되는 특이한 아미노산 서열이 존재하는 것으로 보고되었다. 다른 보고된 결과에서 랫트와 소에도 뇌에 특이적으로 존재하는 NACP 유사단백질이 확인되었는데 발생과정중 출생 후 synapse가 형성되는 시점에서 이의 발현이 크게 증가하는 것으로 보아 뇌에서 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있다. 이상의 결과와 NAC가 아밀로이드 A와 함께 많은 양이 발견되는 것으로 보아 뇌의 퇴행성 질환인 치매와 NAC와 NACP는 밀접한 관계를 가짐을 알수 있다.

따라서 APP및 NACP의 발현기작과의 연관성을 연구하고 아밀로이드 A의 침착 과정에서의 NAC의 역할과 그 분자적 기능 및 구조를 밝힘으로써 노화 및 치매의 병리기전 이해에 도움을 줄 것으로 기대된다. 현재 NAC의 돌연변이형은 이탈리아인의 가족성 파킨슨 병에서만 나타났으므로, 우리나라의 파킨슨 병에 대한 연구를 위해 한국형 NAC의 돌연변이형을 연구하는 것도

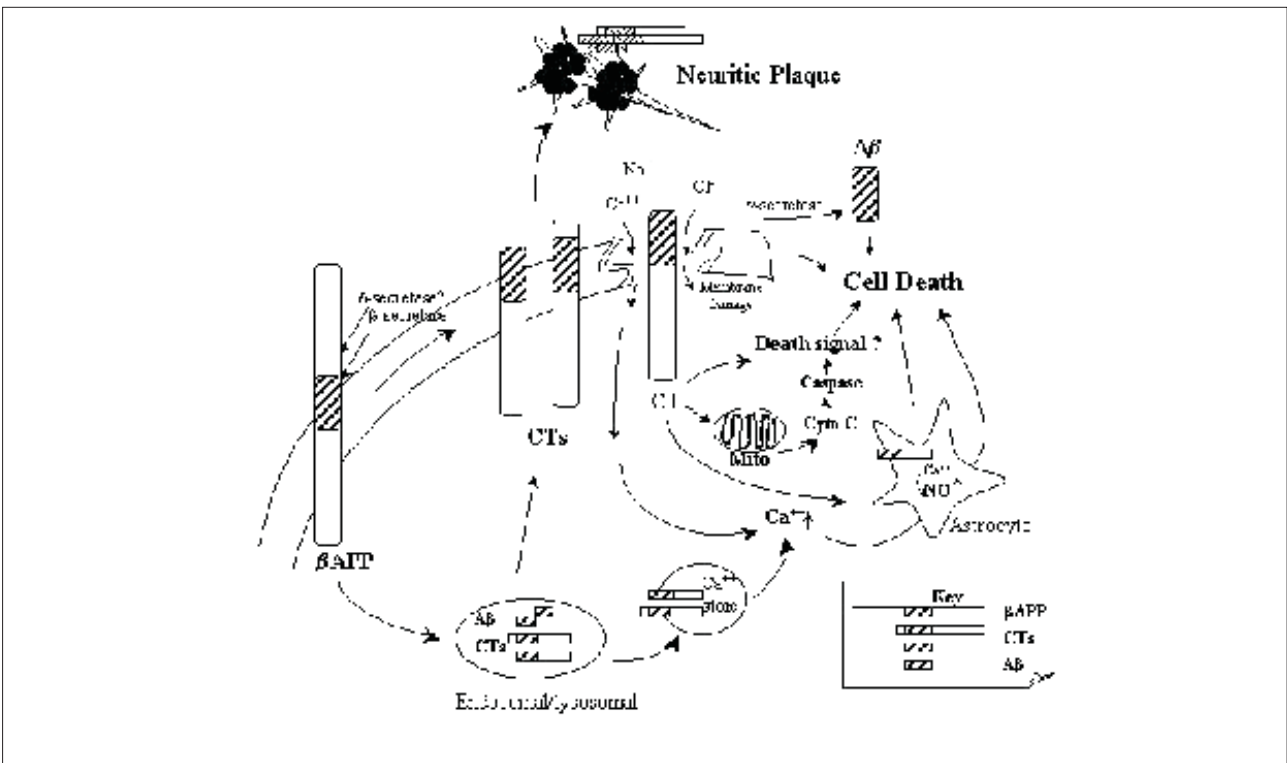


그림 2 아밀로이드 C단 단백질의 세포속성기전

중요한 의미를 가질 수 있을 것으로 사료된다.

2. 치매치료제 개발 연구

Alzheimer disease의 원인에 대하여는 여러 가지 설들이 제기되고 있으나 현재까지 밝혀진 특징으로는 기억력과 인지기능의 현저한 감퇴증상, 사후 부검 소견상 뇌조직의 세포내에 아밀로이드 베타 단백질(A β)이 주성분인 노인반(Senile plaque)의 형성, 영역의 세포밖에 hyperphosphorylated protein이 주성분인 신경섬유덩어리(Neurofibrillary tangle) 등의 존재 등을 들 수 있다. 최근에 이 아밀로이드 베타 단백질의 독성이 주요한 발병원인이라는 설들이 지배적이지만 아직 확실하게 검증된 바는 없다. 이 질환의 1차 증상인 기억력과 인지기능의 감퇴현상은 콜린성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다. 그 예를 보면 정상인에 무스카리닉 수용체 길항제(muscarinic receptor antagonist)인 Scopolamine을 투여해 보면 최근의 기억력에 장애가 생기며 Alzheimer disease 환자에게 이것을 투여하면 기억력 장애가 더 심각해짐이 확인되었고, 대뇌피질부위의 주 콜린성 신경 입력통로인 Neucleus Basalis of Meynert의 신경세포의 수가 급격히 감소되어 있는 것과 해마(Hippocampus)와 대뇌피질(Cortex)에서 Choline uptake와 아세틸콜린의 합성량이 감소하며 Cholineacetyltransferase의 활성도가 급격히 떨어져 있는 것이 이 환자의 뇌에서 확인되었으며 또한 nicotinic 과 muscarinic receptor의 수가 뇌에서 감소되어 있는 것 등이 있다. 비록 원인적인 치료방법은 아니더라도 위에 전술한 바와 같이 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 콜린성신경계를 보충해주고 개선해 주어 저하된 인지기능을 개선해 줄 수 있는 약물을 개발하고자 노력하고 있다. 현재까지 개발된 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor)로 Lecithin, 수용체 활성제(Receptor agonist)로 RS-86, nicotine 등이 아세틸콜린분해억제제(Acetylcholinesterase inhibitor)로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판사용중인 Tacrine과 최근에 승인된 Aricept 등이 있으나 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다.

그래서 이런 단점들을 보완한 즉 독성이 낮고 강력한 항콜린에스테라제 효과를 가지며 감퇴된 기억력을 개선시켜줄 수 있는 약물을 개발하고자, 본 연구를 지난 6년 동안 2단계에 걸쳐 수행하였으며, 그 결과 이런 조건들을 만족시킬 수 있는 새로운 물질인 Dehydroevodiamine-HCl을 찾았으며, 1999년에는 임상 실험에 진입하기 위하여 더 정확한 약리학적인 효능과 기전 검증, 안전성 검색 연구를 진행해 왔다. 노인성 치매는 "21세기 질환"으로 일컬어질 정도로 발병이 폭발적으로 늘고 있기 때문에, 미국에서는 우리나라 1년 예산을 초과하는 연간 1000억불(120조원)의 막대한 돈을 치매치료에 사용하고 있다. 그러나 현재 개발중이거나 실제로 임상에서 사용하고 있는 치매치료제들은 효능면에서 미약할 뿐만아니라 심각한 부작용까지 빈번하게 나타나고 있어 환자에게 투여하는데 큰 장애가 되고있다. 그 동안 미국에서 개발되어 전세계적으로 치매치료제로 사용되었던 Tacrine은 미약한 효능과 간독성유발로 인하여 현재는 사용이 극히 제한되고 있다. 이런 단점들을 보완할 뿐만 아니라 더 큰

효능을 가진 신약개발을 위하여 필자 등의 연구진은 지난 7년간 G7연구비의 지원을 받아 천연물로부터 항콜린에스테라제 효과와 기억력 증진효과를 가진 단일성분인 DHED(Dehydroevodiamine HCl)를 분리해 내는데 성공하였다. 실험실내 검색뿐만 아니라 다양한 기억력 감퇴동물모델을 이용하여 이 물질이 강력한 항치매효과가 있다는 것을 확인하였다. 또한 소동물은 물론 대동물에 이 물질을 직접 장기간 투여 하여 안정성 및 기타 약리학적 검색을 시행한 결과, 기존의 다른 치매치료제들보다 안정성면에서도 우수함이 밝혀졌다. 또, 이것은 대뇌혈류증진 효과도 동시에 가지므로 우리나라에서 사망률 1위를 차지하고 있는 뇌졸중이나 그 후유증으로 발병할 수 있는 치매증상에도 효과가 클 것으로 예상되며, 우수한 신약으로서 국민 보건 향상은 물론 향후 새로운 밀레니움의 국가이익에 크게 기여할 것으로 기대된다. 이미 한국(0203456), 일본(2,906,339), 미국(5,859,016) 등으로부터 특허를 획득하였으며 현재 임상 사용을 위한 실험을 제일약품(주)과 공동으로 진행중이다. 이와 같은 DHED의 효능에 대한 종합결과들을 국제저명학술지인 *J. Neurochemistry* 2000년 1월호에 발표하였다.

서 유 현

의학박사

서울대학교 의과대학, 약리학교실 교수

1973	서울대학교 의과대학 의학 학사
1976	서울대학교 대학원 신경약리학, 석사
1981	서울대학교 대학원 신경약리학, 박사
1998. 9. 1~현재	<i>J. Neurosci. Reserch</i> (JNR) Editor
1998. 2~현재	한국 노벨과학상 수상 지원 본부 이사
1998. 2~현재	한국뇌학회 회장
1998. 9~현재	뇌의약학 센터 소장
1999. 7~현재	국가 뇌연구 촉진 심의위원회 심의위원
1999. 7. 20~현재	전문인 참여포럼 공동대표

콩 DNA의 추출법

본 고에서는 콩 DNA를 전자동핵산 추출정제장치 GENEXTRACTOR-100을 사용하지 않고 GENEXTRACTIN™ - B, C, Kit (TaKaRa Code TA702)을 이용하여 수작업으로 추출하기 위한 protocol을 소개한다.

■ 필요한 시약 및 키트

GENEXTRACTIN™-B.C. Kit (TaKaRa Code TA702)

SUPREC™-01 (TaKaRa Code 9040)

Proteinase K (TaKaRa Code 9033)

■ 기타 준비물

- 5 M Guanidine 용액
- 추출완충액 : 10 mM Tris-HCl(pH8.0)
150 mM NaCl
2 mM EDTA · Na
1% (w/v) SDS
- 15 ml test tube
- 2 ml eppendorf tube
- 1.5 ml eppendorf tube
- 특급 EtOH
- Blender (파쇄기)
- 원심분리기(15 ml tube용 및 eppendorf tube용)
- Vortex

■ 건조 콩의 DNA 추출법

- 1) 콩을 파쇄하여 분말화한다.
- 2) 콩분말 0.5 g을 15 ml test tube로 옮긴다.
- 3) 추출완충액 1.75 ml, Proteinase K(20 mg/ml) 50 μ l, 5M Guanidine 용액 200 μ l를 첨가한다.
- 4) Vortex로 교반한 후 58℃에서 1시간동안 가온한다.
- 5) 원심분리(3000 rpm, 5분)를 한다.
- 6) 상층 300 μ l를 2 ml eppendorf tube로 옮긴다.
- 7) 그 상층에 Solution I* 100 μ l, 0.2% SDS Solution* 200 μ l, Silica gel Solution* 1 ml을 첨가한다.
- 8) Vortex로 각반한 후 원심분리(12,000 rpm, 5분)하고 상층을 제거한다.
- 9) Pellet에 1× Wash Solution* 300 μ l를 첨가한 후, Silica gel과 함께 SUPRE-01(DNA 회수용 filter가 부착된 원심분리용 tube)의 filter cap으로 옮긴다.
- 10) 원심분리(12,000 rpm, 5분)로 여과액을 제거한다.
- 11) 동일한 filter cap에 1× Wash Solution* 300 μ l를 첨가한 후, 원심분리(12,000 rpm, 5분)로 여과액을 제거한다. 이 세정 조작을 한번 더 반복한다.

- 12) Filter cap의 아래 tube를 새로운 1.5 ml용 E. tube로 옮긴다. 70℃로 가온한 TE Buffer* 100 μ l를 filter cap의 중앙에 넣고 원심분리(12,000 rpm, 5분)를 한 후 아래 tube에 모인 DNA함유액을 회수한다.

*을 표시한 시약은 GENEXTRACTIN™-B.C. Kit 에 포함되어 있다.

■ 실시예

본 방법으로 콩 DNA를 추출한 후 추출한 DNA로 agarose gel 전기영동을 하였다(그림 1). 또 본 방법과 타사의 추출법을 비교하기 위해, 본 법 및 타사의 추출 키트로 콩(유전자재조합 콩 함유) DNA를 추출한 후, 이를 주형으로 하여 PCR Screening Kit For GM Soybean (TaKaRa Code RR201A)로 PCR을 하였다(그림 2).

■ 결과

그림 1에 나타난 것처럼 본 방법 (GENEXTRACTIN™-B.C. Kit를 사용한 방법)을 이용함으로써 충분한 콩 DNA를 추출할 수 있었다. 또 그림 2의 결과로부터 본 방법이 타사의 추출법에 비해 훨씬 우수함을 확인하였다. 유전자 변형 작물(GMO)의 PCR 검출에서는 시료로부터 PCR이 가능한 DNA를 충분히 확보하는 것이 전제조건이다. 유전자 변형 콩을 검정하기 위한 DNA추출법으로서의 본 방법은 타사의 것보다 적합하다고 생각한다. 데이터는 나타내지 않았지만 본 방법은 옥수수에도 적용할 수 있다. 건조하지 않은 생 콩이나 옥수수 및 그 가공식품으로부터의 DNA 추출은 특수한 기술이 필요로 한다.

* 당사는 GMO 검정서비스를 실시하고 있습니다(본지 44~45 페이지 참조). 상세한 내용에 관해서는 문의를 해 주시기 바랍니다. 가공식품의 경우는 검체의 상태에 따라 검정이 불가능한 경우도 있습니다.

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
GENEXTRACTIN™-B.C. Kit	TA702	100 회용
SUPREC™-01	9040	100 개
Proteinase K	9033	5 ml
PCR Screening Kit for GM Soybean RR201A		48 회용
PCR Screening Kit for GM Maize RR202A		48 회용

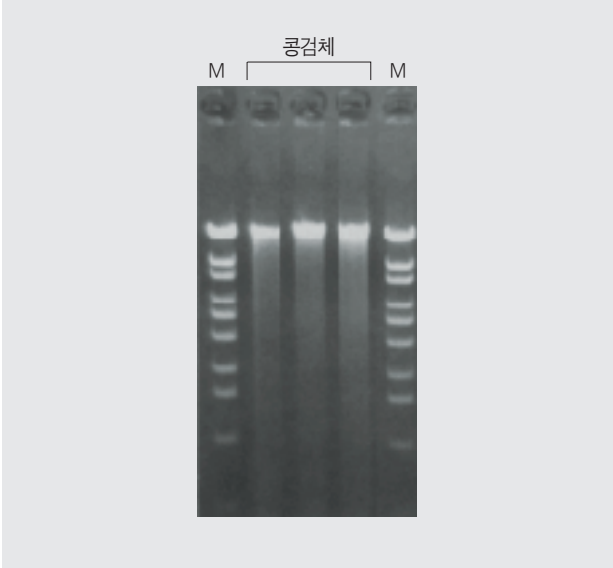


그림 1 본 방법으로 추출한 콩 DNA의 전기영동사진
 추출한 DNA 용액의 1/10양 (10 μl)을 agarose gel에 전기영동하였다.
 영동 조건 : 1% agarose gel(Agarose L03[†]TaKaRa_J; TaKaRa Code 5003)
 M : Size marker λ-EcoT14 I digest (TaKaRa Code 3401)

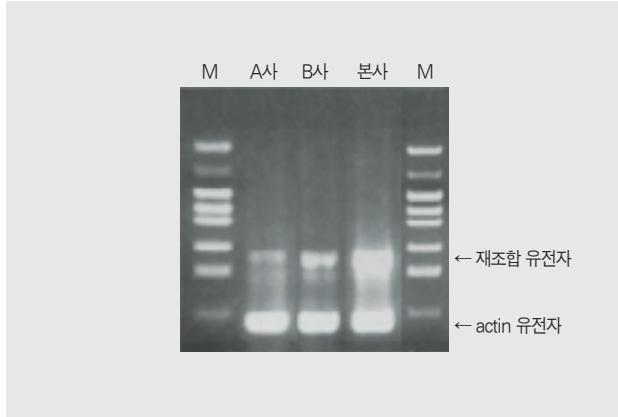


그림 2 본 방법과 타사의 추출법의 비교
 각사의 방법 (A사, B사, 본 방법)을 이용하여 콩 시료 (유전자재조합 콩을 1%함유) 로부터 추출한 DNA를 주형으로, PCR screening Kit for Soybean (TaKaRa Code RR201A)을 사용하여 PCR을 한 후 전기영동하였다. 4 μl의 추출 DNA를 PCR 반응에 사용하였다.
 영동조건 : 2% agarose gel (Agarose L03[†]TaKaRa_J; TaKaRa Code 5003)
 M : pHY Marker (TaKaRa Code 3404A/B)

유전자 변형작물(GMO)의 검정도 해 드립니다.

(본지 44~45 페이지 참조)

유전자 변형작물(식품)에 관한 표시제 도입이 검토되고 있으며, 입법화를 진행하고 있는 현 시점에서 시료의 GMO 혼입 여부를 확인하고 싶은 분들이 많으리라 예상합니다. 당사는 유전자 변형작물의 검정과 관련하여 검사제품을 판매하고 있을 뿐만 아니라 검정서비스도 해 드립니다.



다. GMO 검정은 크게 표준 적성검사와 정량검사로 나눌 수 있습니다. 당사는 적성 검사는 물론 정량검사도 최첨단 기법으로 해 드리고 있사오니 GMO 검정에 관해서는 당사 및 전문 대리점으로 문의를 해 주시기 바랍니다.

Dr. GenTLE™(효모 · 그램 양성균용)의 다양한 용도

대장균 Genome DNA의 추출도 가능!!

Dr.GenTLE™ (효모 · 그램 양성균용)

TaKaRa Code 9083

50회

각종 효모 및 그램 양성균으로부터 약 30분의 간단한 조작으로 고순도의 genome DNA를 추출할 수 있는 Dr. GenTLE™ (효모 · 그램 양성균용)을 사용하여, 대장균(그램 음성균)에서도 동일하게 고순도의 genome DNA를 추출할 수 있었기에 소개한다.

■ Kit의 내용

GenTLE™ Yeast Solution I	27 ml
GenTLE™ Yeast Solution II	3 ml
GenTLE™ Yeast Solution III	15 ml
TE Buffer	7.5 ml

■ 실시례

【 조작 】

대장균 JM109 및 pET-16b plasmid(총 5.7 kbp, pBR322 ori)를 가진 대장균 JM109를 각각 L-Broth와 L-Broth + ampicillin으로 하루밤 배양하였다. 배양종료시의 Growth OD₆₀₀은 각각 4.15와 3.40이었다.

각 배양액 1.4 ml(A)와 0.35 ml(B)를 microtube에 옮긴 후 아래의 protocol에 따라 DNA를 추출하였다.

대장균 배양액 (A : 1.4 ml or B : 0.35 ml)

원심분리(10,000 rpm×2분)

균체

GenTLE™ Yeast Solution I 180 μ l 첨가 · vortex로 현탁

GenTLE™ Yeast Solution II 20 μ l 첨가 · vortex로 현탁*

70℃, 10분

GenTLE™ Yeast Solution III 100 μ l 첨가 · 천천히 혼합

수냉, 5분 (1분마다 가볍게 섞어줌)

원심분리 (12,000 rpm×5분)

상층**

Isopropanol 250 μ l 첨가 · vortex 혼합

원심분리(12,000 rpm×5분)

침전

70% EtOH로 세정

건조

DNA (A : 50 μ l , B : 12.5 μ l의 TE Buffer로 각각 용해)

* : 사용균체량이 많은 (A)의 경우는 Sol II 첨가시 점도가 높아진다.

** : 원심분리를 2번 반복함으로써 DNA의 순도가 보다 높아지는 경우가 있다.

【 결과 】

얻은 각각의 DNA 용액을 0.5 μ l씩 0.8% agarose gel로 전기영동하여 DNA의 추출을 확인하였다(그림 1). 추출한 4개의 시료로부터 각각 배양액 1 ml 당 1~4 μ g의 genome DNA를 얻을 수 있었다. Plasmid를 함유하는 균주에서 genome DNA와 함께 plasmid DNA도 회수하였다. 각 DNA의 순도는 A_{260/280} = 1.65~1.85이었고, 소량에서 분리한 (B)쪽이 약간 높은 값을 가졌다.

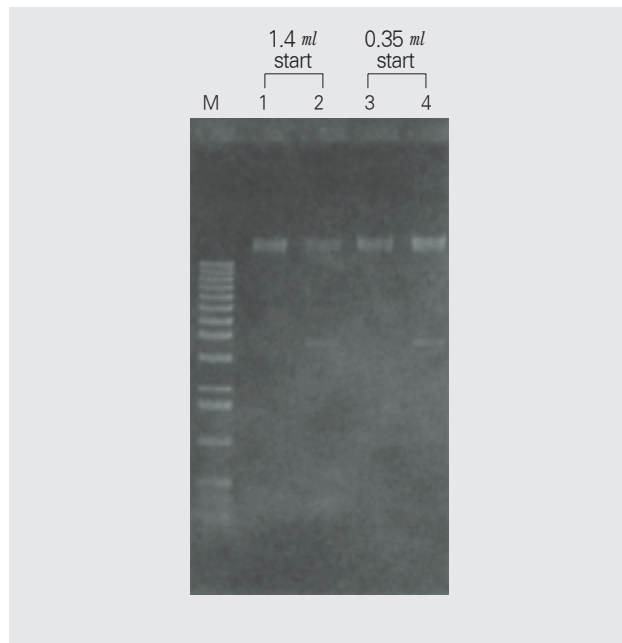


그림 1 추출정제된 대장균 genome DNA의 agarose gel 전기영동 사진

Lane

M : DNA size marker

1 : JM109 (A)

2 : JM109/pET16b (A)

3 : JM109 (B)

4 : JM109/pET16b (B)

NEW

Mouse 생체내 세포용 유전자 도입시약

Trans IT[®] In Vivo Gene Delivery System

TaKaRa Code V5125 25 injections

PanVera 사 제품입니다

유전자의 도입과 발현을 연구하는데 있어서, 지금까지는 주로 생체 밖에서 배양한 세포를 사용하였다. 이와같은 연구에 의해 도입 유전자의 생체 내에서의 발현과 제어기, 유전자 산물의 상호작용등 다양한 정보를 밝혀왔다. 그러나 세포는 생체내의 환경 (인접한 세포나 세포외 matrix 등) 에 따라 다양한 영향을 받는다. 이러한 환경하에서 도입유전자의 발현을 해석하기 위해서는 생체내의 세포에 유전자를 직접 도입 할 필요가 있다. 본 제품은 핵산 (DNA, RNA)을 mouse 각 조직의 실질세포에 효율적으로 도입하기 위한 시스템이다. 핵산과 Trans IT[®] In Vivo Polymer Solution을 혼합하여 복합체를 형성한 후, Delivery Solution으로 희석하여 mouse의 꼬리정맥에 주사함으로써 간편하고 재현 성높게 핵산을 도입할 수 있다. 도입한 유전자의 발현 수준이 비교적 높은 조직은 간장이며 비장, 신장, 폐, 심장 등에서도 도입유전자의 발현 을 확인할 수 있었다. Mouse 생체내에서의 유전자발현 연구나 특정조직에서의 유전자 발현연구 등에 유용하다 (주: 도입유전자의 생체내에 서의 발현은 사용한 promoter나 도입유전자 또는 목적하는 조직에 따라 영향을 받을 가능성이 있다).

■ Kit의 내용

Trans IT [®] In Vivo Polymer Solution	0.3 ml
Trans IT [®] In Vivo 10 × Delivery Solution	8.5 ml

■ 특징

- 살아있는 mouse의 생체내 조직에 핵산을 고효율로 도입할 수 있다(mouse 간장의 약 5~20%의 실질세포에 도입가능).
- 조직이 비교적 간편하다(DNA와 Polymer Solution을 섞은 후, Delivery Solution으로 희석하여 mouse의 꼬리정맥에 주입하면 된다).
- Mouse 각종 조직(간장, 비장, 신장, 폐, 심장 등)의 실질세포에 유전자를 도입할 수 있다.
- Virus를 사용하지 않으므로 안전하다.

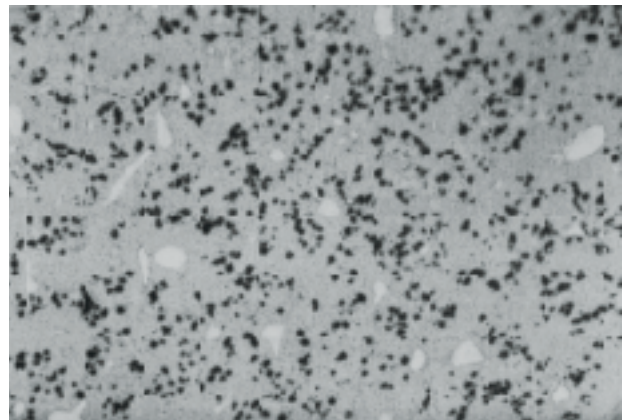


그림 1 Trans IT[®] In Vivo Gene Delivery System을 사용하여 도입한 report 유전자 (β -galactosidase)의 mouse 간장에서의 발현 해석

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
진핵세포용 유전자 도입시약 Trans IT [®] Polyamine Transfection Reagents*		
Trans IT [®] -LT1	V2310	50~300 회 (35 mm dish)
Trans IT [®] -LT2	V2320	50~300 회 (35 mm dish)
Trans IT [®] -100	V2100	50~300 회 (35 mm dish)
Trans IT [®] -PanPak**	V2500	각 25~150 회 (35 mm dish)

* Trans IT[®]Polyamine Transfection Reagents는 Liposome법을 이용한 진핵세포용 유전자 도입시약이다. 배양세포에 유전자를 도입하기 위한 방법에는 Calcium-Phosphate법, DEAE-dextran법 등이 있지만, Liposome법이 transfection 효율이 더 높고, 조작도 간편하여 다수의 시료를 처리하는데 적절하다. 본 제품은 지금까지의 타사제품 보다 높은 효율로 DNA, RNA를 배양세포에 도입할 수 있으며, transient 및 stable transfection을 할 수 있다. 또 liposome을 사용하는 타사의 제품에 비해 transfection시 세포에 대한 독성도 낮다.

**Trans IT[®]-PanPak은 Trans IT-LT1, -LT2, -LT100의 3종류를 sample pack으로 준비한 조건검토용 set이다.

NEW

Rat 갈색 지방세포 배양 Kit

TaKaRa Code MK422 1 Kit

비만 등의 연구에 이용하는 갈색 지방세포의 조제가 쉬워졌습니다!!

갈색 지방조직은 갈색 지방세포를 주요 구성세포로 하며 견갑골 간, 겨드랑이, 후경부, 심장, 신장 주변부에 존재한다. 교감신경계를 지배하는 조직내 지방의 산화 분해로 열을 발생하여 한냉으로부터 장기를 보호하거나, 과식 후 여분의 에너지를 열로서 체외로 방산하는 방열기로서의 기능을 가진다. 일반적으로 지방조직이라 하면 피하나 내장주변에 널리 분포하고 있는 백색 지방조직(과잉 에너지를 중성지방으로 축적한 뒤, energy 부족상태에서 지방산을 분해하여, 혈중으로 방출하는 기능을 가진다)을 먼저 연상하는 경우가 많은데, 갈색 지방조직은 그것과 기능적으로 크게 다르다. 또 이 둘은 형태학적으로도 차이를 보인다. 백색 지방세포는 단방성으로 큰 지방방울로 가득 차 있으며, 핵과 세포질은 세포주변조직에 의해 눌러져 있다. 한편 갈색 지방세포는 다방성의 지방방울과 mitochondria로 채워져 있다. 과식에 의한 에너지의 과잉섭취로, 백색 지방세포에 지방이 축적함에 따라 비만을 일으키는 것으로 알려져 있지만, 에너지의 과잉섭취가 아닌 경우에도 비만을 일으킬 수 있음이 소형 설치류(rat 이나 mouse)를 이용한 실험에서 밝혀졌다. 이는 갈색 지방조직의 기능이 저하하는 경우이다. 이 상태에서는 갈색 지방세포에 의한 에너지의 열로의 변환이 저하하고, 소비되지 않은 여분의 에너지가 지방으로 축적되기 때문에 비만이 일어나는 것이다. 그러나 사람의 경우는 갈색 지방조직의 존재량이 신생아의 경우에는 확인되지만 성인의 경우에는 거의 확인할 수 없을 만큼 미비하기 때문에 갈색 지방세포와 비만과의 연관성에 대해서는 많은 의문점을 가져 왔다. 그러나 최근에는 소형 설치

류의 갈색 지방조직에 존재하는 열발생분자 uncoupling protein(UCP: 산화적 인산화를 탈공역하는 기능을 가지고, 화학 에너지를 ATP가 아닌 열로 변환한다)의 유사단백질이 사람의 골격조직 등에 다량 발현함이 밝혀졌다. 또 갈색 지방세포와 백색 지방세포를 선택적으로 활성화하는 비만의 특효약으로 주목받고 있는 β_3 -adrenoreceptor (β 교감신경계 수용체) agonist가 발견되었고, 이 수용체가 사람의 장관이나 담낭, 골격근에도 존재하는 것이 밝혀졌다. 이처럼 비만에 관한 연구의 재료로서 갈색 지방조직이 최근 주목을 받고 있다.

그러나 갈색 지방세포는 주화세포로서 ATCC 등으로부터 쉽게 구할 수가 없으므로 rat등의 설치류로부터 갈색 지방조직을 분리한 후 그것을 배양하여 조제하였다.

TaKaRa는 rat의 갈색 지방전구세포와 전용배지를 set로 제품화였다. 본 kit를 이용하면 kit내의 전구세포를 전용배지로 계대 배양하고 순서에 따라 갈색 지방세포를 조제할 수 있다.

지방조직과 관련한 생리활성 연구나 비만 또는 당뇨병관련 특효약의 screening 및 열생산 분자와 관련한 실험등에 응용할 수 있다.

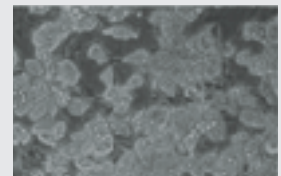
■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Rat 갈색 지방세포 전용배지 set	MK423	1 Set

갈색 지방전구세포



분화



분화함에 따라 갈색 지방전구세포가 작은 기름방울로 채워져 다방성 구조를 가진 갈색 지방세포로 변화함을 현미경으로 관찰할 수 있다.

NEW

Candida albicans 유래 정제 항원

사람에 항상 존재하는 *C. albicans*에 흥미가 있는 연구자를 위해 정제항원과 항체를 준비하였습니다!!

*C. albicans*는 사람의 구강, 소화기관, 장기 등에 존재하므로 대부분의 사람은 본균 유래의 성분에 대한 면역응답을 한다. 따라서 이전부터 암환자의 면역상태를 조사하기 위해서 전세계적으로 *C. albicans* 추출물 피부 테스트나 임파구 검사에 사용하여 왔다. 또 일본에서도 알레르기 검사용 Allergen Extract로 실제 이용하여 왔다.

이번 TaKaRa는 이 *C. albicans*의 항원성분으로서 분리정제되어 그 항원성에 대하여 연구되고 있는 세포벽 type A mannan, 분비성 산성 protease(SAP2), Mn-SOD 및 이 항원의 검출에 유용한 항체를 신 발매했기에 소개한다.

■ *C. albicans* 유래 정제항원 및 항원 검출용 항체

세포벽 type A mannan

본 제품은 일본 동북약학대학의 Suzuki 등이 *C. albicans* NIH A-207주(혈청형 A)로부터 분리한 것¹⁾으로 전세계의 연구자가 사용해 온 것이다. 사용예에 대해서는 문헌 2.

분비성 protease (SAP2)

SAP를 code하는 유전자로는 9종이 보고되어 있다. 본 제품은 SAP2 유전자가 code하는 분자량 45 kDa의 단백질로서 *C. albicans* 감염의 병원 인자로서의 역할을 규명하는 연구에 주로 사용하고 있다. 또한 친식 병원인자로서의 역할은 이미 밝혀져 있다³⁾.

Mn형 Superoxide Dismutase (Mn-SOD)

C. albicans 유래 분자량 25 kDa의 단백질이다. 건강한 사람의 림프구나 혈청을 이용한 실험에서 항원성을 확인할 수 있었다^{4,5)}.

SAP2 항체 및 Mn-SOD 항체

SAP2 및 Mn-SOD를 인식하는 rabbit polyclonal antibody이다. SAP2에 대해서는 monoclonal 항체도 있다.

■ 제품 목록

제품명	TaKaRa Code	포장량
<i>Candida albicans</i> 유래 항원		
세포벽 type A mannan	MG001	5 mg
분비성 산성 protease (SAP2)	MG002	0.2 mg
Mn형 Superoxide Dismutase (Mn-SOD)	MG003	0.1 mg
항체		
항 SAP2 monoclonal 항체	M166	0.2 mg
항 SAP2 rabbit polyclonal 항체	M167	0.2 mg
항 Mn-SOD rabbit polyclonal 항체	M168	0.2 mg

본 항체는 candida · allergen extract나 진균감염모델동물의 조직 등의 생체시료로부터 항원을 검출하는데 유용하다.

■ Allergen Extract · Candida에 함유된 SAP2의 검출

SAP2 monoclonal 항체를 사용하여, 시판하는 Candida · allergen extract에 함유된 SAP2를 검출한 예를 소개한다. Allergen extract · Candida(시판) 10 μ g을 12.5% polyacrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF막에 blotting하였다. 1차항원으로 100배 희석한 SAP2 monoclonal antibody를, 2차항원으로 HRP 표식 항 mouse 항체를 사용하여, SuperSignal[®] CL-HRP Substrate System (TaKaRa Code P7447)로 알레르기 엑기스 내의 SAP2를 검출하였고, 그 결과를 그림 1에 나타내었다.

【참고문헌】

- 1) Suzuki S. et al.(1992) 일본의 진균학회 잡지 **33**, p239
- 2) Akiyama K. et al.(1998) *Allergy*, **53**, 173.
- 3) Akiyama K. et al.(1996) *Allergy*, **51**, 887.
- 4) Takesako K. et al.(1999) ICAAC,398
- 5) Endo M. et al.(1999)일본의 진균학회 총회 요지집 p70

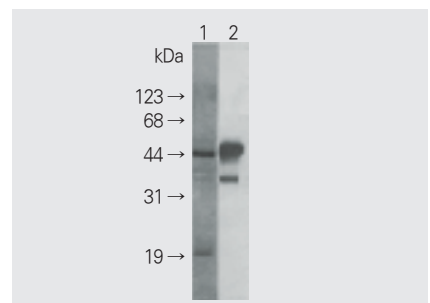


그림 1 SAP2의 검출례

Lane 1: Allergen Extract · Candida 10 μ g을 전기영동한 후 염색한 것
Lane 2: Allergen Extract · Candida 10 μ g을 전기영동하여 염색한 후, 항 SAP2 monoclonal 항체를 사용하여 immunoprecipitation으로 검출한 것.



유전자 Fingerprinting을 이용한 자동세균검사장치 RiboPrinter® System

TaKaRa Code DP100 1대
Qualicon 사 제품입니다. RiboPrinter는 Qualicon사의 등록상표입니다.

금번 TaKaRa는 미국 Qualicon사와의 제휴로 동사가 개발한 자동세균검사장치 RiboPrinter® System의 판매를 개시하였다. RiboPrinter® System은 세균의 ribosomal RNA 유전자 주변영역의 다형성을 이용한 유전자 fingerprint 해석(Ribotyping)을 자동으로 실시하는 장치로, 단시간에 세균의 typing뿐만 아니라 동정까지 할 수 있다. 해석결과는 RiboPrinter® pattern의 data로 표준화되어 data base화할 수 있으므로 과거 data와의 비교 검사로 user간의 data 공유가 가능하다. RiboPrinter® pattern의 data base에는 대장균, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* 등 약 1000 여종 이상의 세균에 관한 정보가 축적되어 있다. 이와 같이 본 시스템은 신속한 오염세균의 동정과 오염원의 확인이 요구되는 식품, 의약품의 제품공정관리 및 병원 등 시설의 위생 환경관리에 최적이다.



RiboPrinter® System은 열처리한 세균 시료로부터 아래의 조작을 자동적으로 실행한다. 자동적으로 처리하므로 조작에 의한 error를 최소화할 수 있다.

- 1) DNA의 추출
- 2) 제한효소로 DNA 절단
- 3) 전기영동분리 및 membrane으로의 blotting
- 4) 특이적 probe로 hybridization
- 5) 화학발광에 의한 band의 검출
- 6) Data 처리(시료의 RiboPrinter® pattern에 의한 typing 및 동정)

■ 특징

- 세균종의 수준을 초월하여 세균의 typing이 가능하다.
- 1회에 8시료를 동시에 처리할 수 있으며, 8시간 안에 결과를 얻을 수 있다. 2시간 단위로 8시료의 동시처리를 개시할 수 있어 하루에 32 시료를 처리할 수 있다.
- Data는 RiboPrinter® pattern으로서 표준화되므로 data base화를 할 수 있다.
- 시료에서 얻은 RiboPrinter® pattern과 data base와의 비교를 통해 자동적으로 시료를 동정할 수 있다.
- User간의 network 연결로 data base를 간단히 공유할 수 있다.
- 1000 종류 이상 세균주의 RiboPrinter® pattern이 이미 data base로 축적되어 있다.

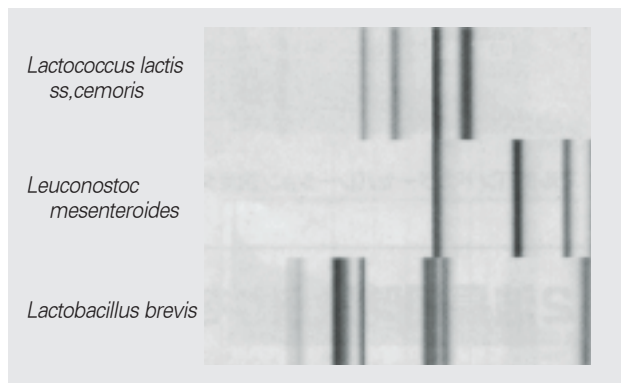


그림 RiboPrinter® System을 이용한 부패균, 병원균, 유용미생물의 RiboPrinter® pattern에 의한 typing

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code
RiboPrinter® 전용 시약	
RiboPrinter® System Sample Preparation Pack	DP001
RiboPrinter® System EcoR I Batch Kit	DP002
RiboPrinter® System Pst I Batch Kit	DP003
RiboPrinter® System Pvu II Batch Kit	DP004

기능별, 목적별 DNA Chip

IntelliGene™ 탄생



◆◆◆◆ Ready-made DNA Chip 판매개시 ◆◆◆◆

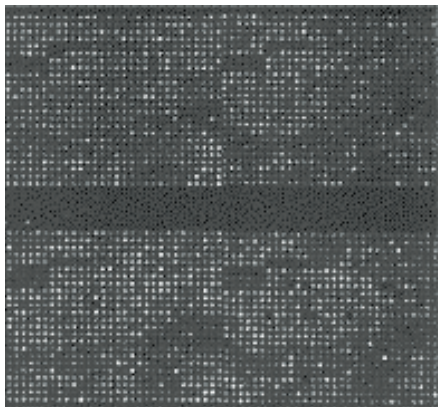
TaKaRa는 금번 새로운 DNA Chip을 개발하여 공급하게 되었습니다. 유전자 발현해석의 방법으로서 DNA Chip 기술을 이용한 연구를 지원 합니다. 또 TaKaRa는 GMS사의 DNA Chip 제작장치(GMS 417 arrayer)와 DNA Chip 해석장치(GMS 418 Array Scanner)도 공급하고 있습니다

세계최

광합성 메카니즘 연구에

CyanoCHIP Version 1.0

광합성 Gram negative bacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 strain의 90% 이상의 유전자를 커버하는 약 3000종류의 DNA 단편을 정렬, 고정화한 DNA Chip입니다.



CyanoCHIP Version 1.0

인발아세포 Apoptosis 연구에

Human Apoptosis CHIP Version 1.0

Human 유래의 기지 유전자 중에서 Apoptosis와 연관된 약 160종류의 cDNA 단편을 정렬화한 DNA Chip입니다.

암연구를 보다 효율적으로

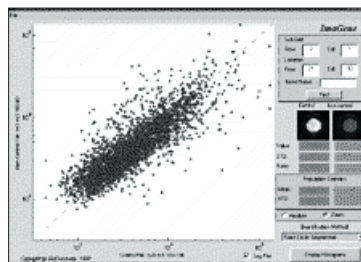
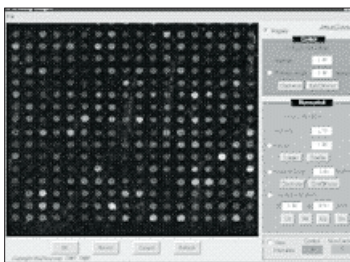
Human Cancer CHIP Version 1.0

Human 유래의 기지 유전자 중에서 Cancer와 연관된 약 390종의 cDNA 단편을 정렬화한 DNA Chip입니다.

DNA Chip 조작의 연습에 최적

TestARRAY

처음으로 DNA Chip을 사용하시는 분이 일련의 조작을 연습할 수 있습니다. Human 유래의 기지 유전자 39종류와, 광합성 gram negative bacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 strain 유래의 48종류 유전자 의 DNA 단편을 정렬화한 것입니다.



CyanoCHIP 해석례

곧 일 발매

- *E. coli* DNA Chip
- 환경호르몬 DNA Chip
- 형광 표식용 키트
- DNA Chip용 slide glass, cover glass

* 본 제품은 연구용입니다. 사람, 동물의 의료, 임상진단에는 사용할 수 없습니다.

판매원



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



코이바이오시스템 (주)
Life Science & Biotech

Tel. 02-841-7530
Fax. 02-841-7531
수원 0331-286-8592
대전 042-472-3669

세포의 Cloning 및 동결보존

1. Cloning

주화세포(cell line)는 실제로 단일 세포군이 아니며, 염색체 구성이나 세포생물학적 성질도 다른 세포의 집단이다. 재현성 있는 실험을 하기 위해서는 균일한 세포군, 즉 clone을 분리하여 얻는 것이 매우 중요하다. 이 작업을 cloning이라 한다. 또 세포에 유전자를 도입하여 stable transformant를 얻고자 할 때도 cloning 조작이 중요하다. Cloning 법에는 1) Microwell : 한 개의 세포를 얻어 그것을 증식하는 방법, 2) Colony 분리법 : 낮은 밀도로 세포를 배양 후 단일 세포에 유래했다고 생각되는 세포군, 즉 colony를 분리하는 방법 등이 있다. 1)의 방법은 한 번만에 확실하게 colony를 얻을 수 있는 장점을 가지나, 증식이 곤란하고, conditioned medium을 필요로 하는 경우가 있다. 2)의 방법은 간편한 조작으로 할 수 있고 증식도 빠르지만, clone이라 단정할 수 없다. 또 이 방법은 같은 조작을 2~3회 반복하여야 하는 단점을 가진다.

준비물

1) 기구

- 96 well microplate
- Stainless cylinder
- 여과지
- 핀셋

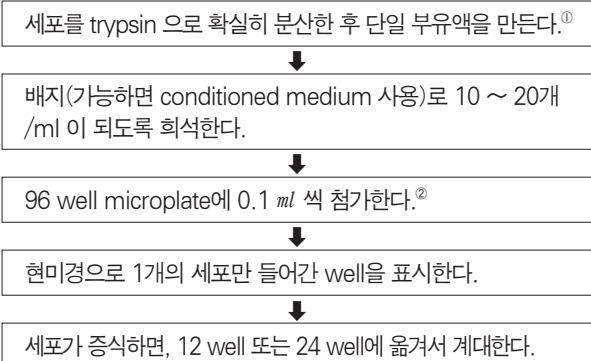
2) 시약

- PBS
- 0.25% trypsin solution
- 실리콘 그리스 또는 바세린
- ※ 전부 멸균 후 사용

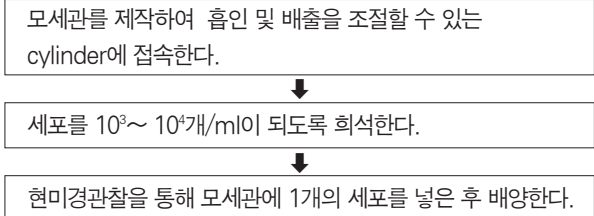
Protocol

1) Microwell Method

〈 방법 1 〉



〈 방법 2 〉

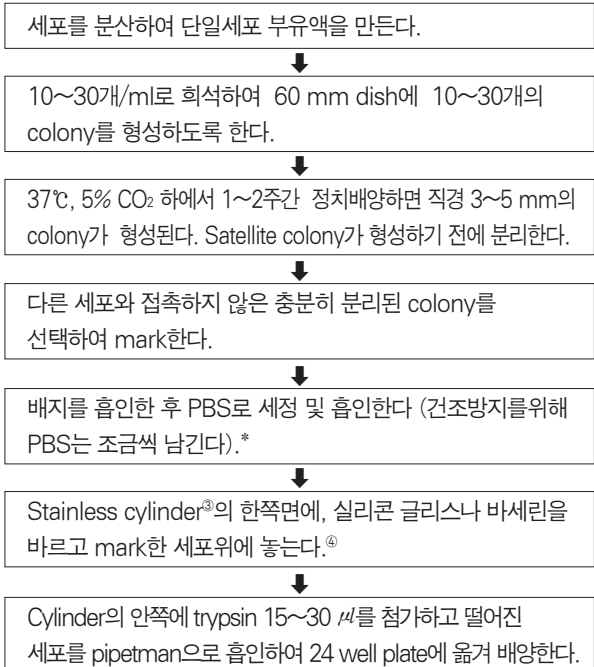


Protocol상의 주의점

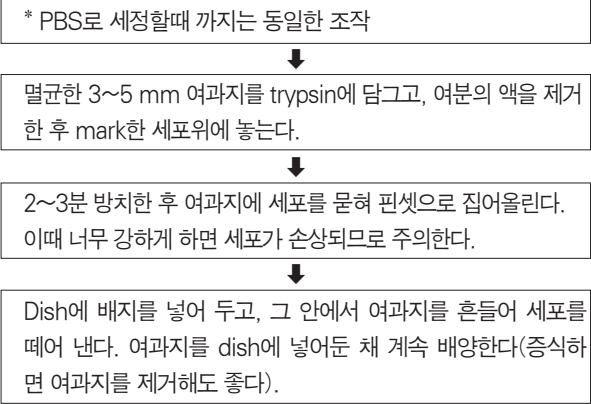
- ① 세포는 1개로부터는 증식하기 힘들다. 세포를 단일개체로 하는 동시에, 상해를 최소화 하기 위해 trypsin은 단시간에 pipetman으로 부드럽게 처리하여야 한다.
- ② 2 ~ 4×10³개 정도의 세포를 96 well microplate상에서 단계 희석해 가면 최종적으로 1개의 세포가 되게 할 수도 있다.

2) Colony 분리법

〈 방법 1 〉



〈방법 2〉



Proccol상의 주의점

- ③ 내경 5~6 mm, 높이 8~12 mm 정도의 cylinder. 유리관이라도 좋다. 또한 tip 끝 부분을 1 cm 정도 잘라서 사용하는 것이 좋다.
- ④ 그리스의 부착이 문제. 적으면 trypsin이 새고, 반대로 너무 많으므로 구멍이 막힐 수 있다. 균일하게 적당량을 바른다.

Cloning의 조작에 따라, 특수한 세포를 선별해 버릴 수 있다. 분리한 후에는 이 세포수가 중요한 성질을 상실하지 않았는가를 확인해야 한다.

【참고문헌】

1) 조작배양의 기술, 일본조작배양학회편, 일본 조창서점, 1988.
 2) Mitsui Y., Takagi Y., Ichihara A., Srkiguchi M., Matsumura T. 공저 기능세포의 분리와 배양, 마루젠, 1986.
 3) Takaoka S. : 조작배양입문, 학회출판센터, 1986.
 4) 신생화학실험강좌, 세포배양기술, 일본생화학회편, 동경화학동인, 1990.

2. 동결보존

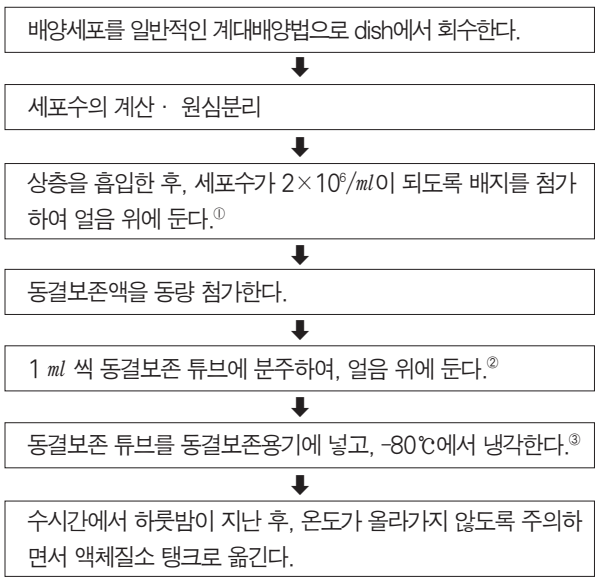
실험에 사용하는 세포가 유한증식능을 가질 경우는 물론이고 무한증식능을 가진 세포일지라도 가까운 시일내에 사용하지 않는 세포를 항상 배양하여 유지한다는 자체는 무리이다. 또 배양중에 세균이나 mycoplasma의 contamination이 발생하거나 세포가 형질전환을 일으켜 실험에 사용할 수 없게 되는 등 세포를 잃게 되는 경우도 있다. 하나의 실험을 동일한 형질을 가진 세포로 하거나 혹은 실험목적에 따라 특수한 형질을 가진 세포를 사용해야 하는 경우, 후일의 실험을 위해서는 어떤 방법으로든 세포를 보존하는 것이 중요하다. 동결보존은 그 한가지 방법이다. 기본적인 개념과 기술은 동결보존제로 세포막을 보호하고 서서히 냉각하여 초저온(-196℃)에서 보존한다는 것이다. 중요한 것은 급속히 용해함으로써 생세포를 유지한다는 것이다. 개개의 세포종에 따라 적당한 동결보호제의 종류와 농도, 냉각, 보존, 용해의 온도나 방법이 다르지만 본 고에서는 일반적인 방법에 대하여 소개한다.

준비물

- 1) 기구·기계
- 세포 동결보존용 튜브(Cryogenic Vial CORNING 25702)
 - -80℃ deep freezer 또는 dry ice box
 - 액체질소식 동결보존용기
- 2) 시약·배지
- 동결보존액
- 동결보존액의 보호제로서는 dimethylsulfoxide(DMSO) 및 glycerin 등을 일반적으로 사용한다. 동결조작을 개시하기 전에 우선 배지에 15~20% (V/V : 최종농도의 2배)가 되도록 첨가 해 둔다. 이외에 무혈청배지용 동결 보존배지로 시판하고 있는 FM-1(동결약제)도 있다. FM-1을 사용하면 무혈청상태로 세포를 보존할 수 있어 표피각화세포와 같이 혈청이 분화를 유도하는 세포에 유용하다.

Protocol

1) 세포동결보존



Proccol상의 주의점

- ① 동결보존시의 세포 농도 및 1 tube당 세포수는 최종농도가 $1 \times 10^6/ml$ 이상이면 좋다. 용해후 며칠동안 어느 정도의 세포수가 얻어지는 지를 미리 알수 있도록 tube 당 세포수를 표시해 둔다.
- ② 동결보존용 tube에 세포명 및 날짜 등의 필수사항을 기입한다. 동결하는 세포수가 많을 때는 조작시간을 줄이기 위하여 필수사항을 기입한 라벨 또는 tube를 미리 필요한 갯수만큼 준비해 둔다.
- ③ 세포의 동결은 서서히 하는 것이 원칙이다. 1분에 1℃씩 냉각하는 것이 최선이다. 전용의 동결용기를 사용하는 것이 가장 좋으나, 동결보존 튜브를 솜으로 보호한 뒤 -80℃ deep freezer 또는 dry ice 속에서 수시간 보존하는 간이법도 있다.

PCR 산물의 보다 빠른 direct cloning 실현!!

AccepTor Vector Kits

AccepTor Vector Kit는 반응산물에 1개의 3'-dA nucleotide overhang을 부가하는 *Taq* 또는 *Tth* polymerase를 이용하여 제조한 PCR 산물들의 단순 클로닝을 위해 개발한 제품이다.

AccepTor Vector Kit내의 vector는 바로 ligation 단계에 사용할 수 있도록 미리 조제해 놓았다. 단순히 vector와 제조한 PCR 산물을 혼합하고, 여기에 Clonables 2× Ligation Premix를 첨가한 후 NovaBlue Singles Competent Cell에 형질전환하기만 하면 된다. dU 잔기들은 형질전환후 *in vivo*에서 dT 잔기로 변환한다.

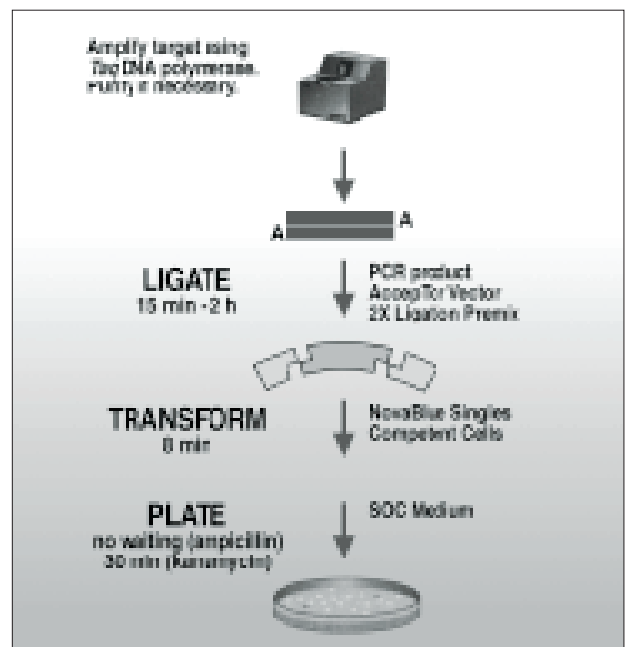
본 kit를 사용하면 PCR product의 ligation으로부터 얻은 형질전환체의 plating까지의 전체과정을 최소한의 피펫조작으로 40분만에 끝낼 수 있다. AccepTor Vector Kit는 10반응분에서 20반응분, 40반응분에 이르기까지 다양한 포장단위로 구성되어 있으며, 또 kit내의 성분을 각각의 단품으로도 다양하게 구매할 수 있다.

■ 장점

1. 제한효소가 필요없다.
2. 특별한 primer가 없다.
3. PCR 산물을 vector에 바로 ligation한다.
4. 일반적인 *Taq* polymerase나 기타 non-proofreading enzyme에 적합하다.

5. 3개의 다른 vector로 blue/white screening을 할 수 있다.
6. 40분만에 형질전환체의 plating까지 완료할 수 있다.

■ 실험순서



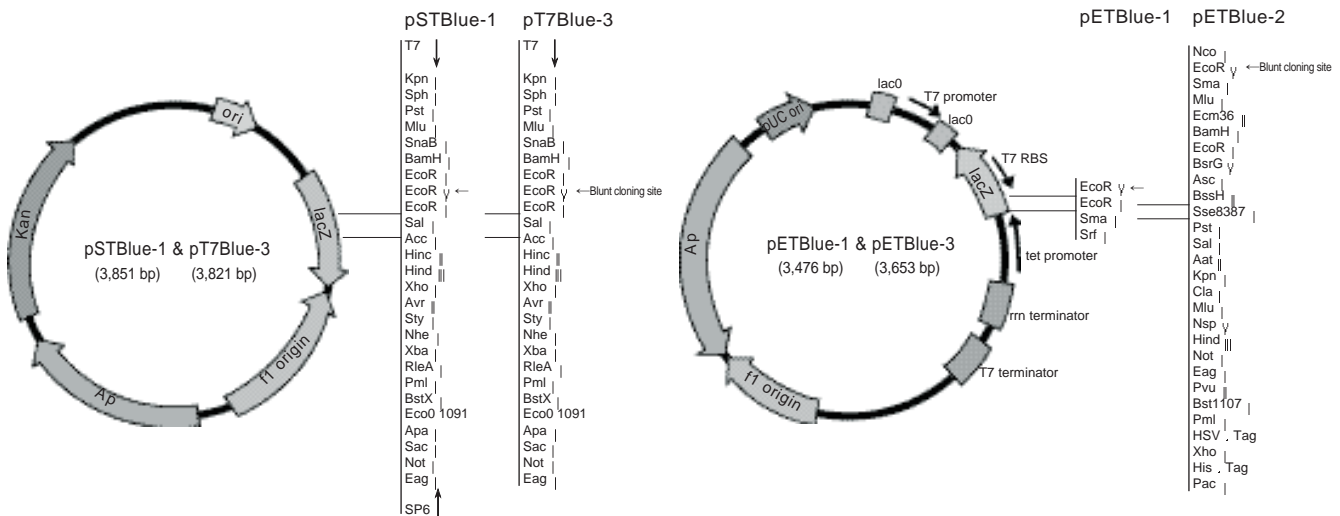
■ Kit의 내용물

Kit component	Introductory Kits	AccepTor Vector Kits			AccepTor Vector	
	10반응	20반응	40반응	20반응	40반응	
AccepTor Vector	0.5 μ g	2×0.5 μ g	4×0.5 μ g	2×0.5 μ g	4×0.5 μ g	
Positive Control Insert	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	
Clonables 2× Ligation Mix	55 μ l	2×55 μ l	4×55 μ l			
Nuclease-free Water	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml			
NovaBlue Singles Competent Cells	11×50 μ l	22×50 μ l	44×50 μ l			
Tuner(DE3)pLacI Competent Cells*	0.2 ml	2×0.2 ml	4×0.2 ml			
SOC Medium*	2 or 3×2 ml	4 or 5×2 ml	7 or 9×2 ml			
Test Plasmid	10 μ l	10 μ l	10 μ l			

*pETBlue Kit은 Tuner(DE3)pLacI Competent Cell과 별도의 SOC medium 튜브 포함.

■ 3종류의 vector 이용

AccepTor Vector Kit	Applications	Vector Advantages
pSTBlue-1	Archiving, Subcloning, Sequencing, <i>In vitro</i> transcription	Dual opposed SP6/T7 promoters Amp or Kan selection Dual <i>EcoR</i> I sites flank insert
pETBlue-1	Protein Expression: T7 lac-driven, tightly Controlled, high level Expression in <i>E. coli</i>	No fusion tags Insert provides ATG start codon
pETBlue-2		Optional C-terminal HSV · Tag, HIS · Tag Vector provides ATG start codon



■ 제품리스트

pSTBlue-1 Kits

Product	Size	Cat. No.
Introductory pSTBlue-1		
AccepTor Vector Kit	10 반응	70594-3
pSTBlue-1 AccepTor	20 반응	70595-3
Vector Kit	40 반응	70595-4
pSTBlue-1 AccepTor	20 반응	70596-3
Vector(linearized vector)	40 반응	70596-4

pETBlue-1 Kits

Product	Size	Cat. No.
Introductory pETBlue-1		
AccepTor Vector Kit	10 반응	70597-3
pETBlue-1 AccepTor	20 반응	70598-3
Vector Kit	40 반응	70598-4
pETBlue-1 AccepTor	20 반응	70599-3
Vector(linearized vector)	40 반응	70599-4

pETBlue-2 Kits

Product	Size	Cat. No.
Introductory pETBlue-2		
AccepTor Vector Kit	10 반응	70600-3
pETBlue-2 AccepTor	20 반응	70601-3
Vector Kit	40 반응	70601-4
pETBlue-2 AccepTor	20 반응	70602-3
Vector(linearized vector)	40 반응	70602-4

관련 단일품목

Product	Size	Cat. No.
NovaBlue Singles	11 반응	70181-3
Competent Cells	22 반응	70181-4
Clonables Ligation/ Transformation Kit	11 반응	70526-3
pSTBlue-1 DNA(uncut)	20 µg	70199-3
pETBlue-1 DNA(uncut)	20 µg	70608-3
pETBlue-2 DNA(uncut)	20 µg	70609-3

Agarose gel 전기영동은 유전자 조작을 시행하는데 있어 필수적 수법으로 핵산의 분석 및 분리회수에 널리 이용한다. 현재 시판되는 agarose는 이전과 비교해 품질면에서 대부분 문제가 없다. 그러나 실험목적에 따라서는 고순도의 agarose를 사용하는 것이 좋은 경우와 그렇지 않은 경우도 있다. TaKaRa는 각종 실험목적에 적합하도록 agarose를 다양하게 구비하고 있다.

1. 실험 목적별 Agarose gel의 적용

Agarose 종류	사용농도	분석범위	DNA회수						Southern Northern	In-Gel Reaction
			PFGE	Electro-elution	Phenol Extract	DEAE Paper	Glass Beads	SUPREC -01		
SeaKem Gold	0.3~ 2%	500 b~ 10 Mb	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+
SeaKem GTG	0.5~ 2%	500 b~ 20 kb	++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+
SeaPlaque GTG	0.75~ 2%	500 b~ 20 kb	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
SeaKem LE, ME, HE	0.5~ 2%	500 b~ 20 kb	+	++	-	++	++	++	++	-
SeaKem HGT	0.3~ 2%	500 b~ 20 kb	++	++	-	++	++	++	++	+
Agarose L03, H14	0.5~ 2%	500 b~ 20 kb	+	++	-	++	++	++	++	-
NuSieve GTG	2~ 10%	10 b~ 1 kb	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
NuSieve 3:1	2~ 8%	10 b~ 2 kb	-	+	-	+	+	+	+++	-
Metaphor	1.8~ 5.0%	40 b~ 1 kb	-	+	-	+	+	+	++	-
I. D. ^{NA}	1.0~ 1.5%	1 kb~23.4 kb	-	+	-	+	+	+	+++	-
InCert	0.75~ 1.0%	-	+	+	+	+	-	-	-	++

+++ : 아주 적합 ++ : 충분히 적합 + : 적합 - : 적합치 않음 *시료 조제용 gel-plug로서 사용

2. Genetic Technology Grade

■ : 사용권장 ○ : 사용가능 ● : in gel

	SeaKem GTG	SeaKem Gold	NuSieve GTG	SeaPlaque GTG	InCert
1 kb까지의 단편 분리					
1 kb이상의 단편 분리					
2 Mb-6 Mb의 단편 분리		(PFGE)			(Gel Plug)
높은 gel 강도					
저농도 gel					○
높은 이동도		○			
Blotting					
단편 회수					
제한효소처리	○	○	●	●	●
Ligation	○	○	●	●	
Cloning			●	●	
DNA Labeling			●	●	
PCR			●	●	
Sequencing			●	●	
염색체 DNA 조제					○
PFGE Resolving Gel	○				
Low-Melting Agarose					

3. Analytical Grade

	L03	H14	NuSieve 3:1	MetaPhor	SeaKem LE	I. D. ^{NA}	SeaPlaque
1 kb까지의 단편 분리							
1 kb이상의 단편 분리	○	○			○		○
Blotting							
PFGE Resolving Gel							
DNA Typing				○			
Low-Melting Agarose							

4. 주요 Agarose의 분리 단편크기별 권장 농도

Size Range (bp)	권장농도 (% W/V)	
	1×TAE Buffer	1×TBE Buffer
MetaPhor		
150- 800	2.0	1.8
100- 600	3.0	2.0
50- 250	4.0	3.0
20- 130	5.0	4.0
< 80	—	5.0
NuSieve 3:1		
500-1,000	3.0	2.0
100- 500	4.0	3.0
10- 100	6.0	5.0
NuSieve GTG		
500-1,000	2.5	2.0
150- 700	3.0	2.5
100- 450	3.5	3.0
70- 300	4.0	3.5
10- 100	4.5	4.0
8- 50	5.0	4.5
SeaPlaque GTG, SeaPlaque		
500-25,000	0.75	0.70
300-20,000	1.00	0.85
200-12,000	1.25	1.00
150-6,000	1.50	1.25
100-3,000	1.75	1.50
50-2,000	2.00	1.75
SeaKem GTG, SeaKem LE		
1,000-23,000	0.60	0.50
800-10,000	0.80	0.70
400-8,000	1.00	0.85
300-7,000	1.20	1.00
200-4,000	1.50	1.25
100-3,000	2.00	1.75
SeaKem Gold*		
5,000-50,000	0.3	
1,000-20,000	0.5	
800-10,000	0.8	
400-8,000	1.0	
300-7,000	1.2	

*12,000 bp 보다 큰 길이의 분리에 TBE Buffer의 사용은 적합치 않다.

■ 권장영동 조건

- 12,000 bp 이상일때는 전극간의 거리에 대해 1~2 V/cm 이하.
- 1,000 bp 미만일때는 같은 5~6 V/cm.
- 이들의 중간 길이일 때는 1~6 V/cm 전압이 바람직하다.

5. BPB(Bromophenol Blue) 및 XC(Xylene Cyanol)의 주요 Agarose의 각 농도에서의 이동도(bp)

1×TAE		% Agarose	1×TAE	
XC	BPB		XC	BPB
SeaKem GTG, SeaKem LE				
24,800	2,900	0.30	19,400	2,850
11,000	1,650	0.50	12,000	1,350
10,200	1,000	0.75	9,200	720
6,100	500	1.00	4,100	400
3,560	370	1.25	2,500	260
2,800	300	1.50	1,800	200
1,800	200	1.75	1,100	110
1,300	150	2.00	850	70
SeaPlaque GTG, SeaPlaque				
11,700	1,020	0.50	6,100	400
4,000	500	0.75	2,850	280
2,300	350	1.00	1,700	180
1,500	200	1.25	1,000	100
1,000	150	1.50	700	70
700	100	1.75	500	50
550	60	2.00	400	30
320	30	2.50	250	10
NuSieve GTG				
750	175	2.50	460	75
400	120	3.00	210	35
115	< 20	4.00	150	< 20
100	< 20	5.00	80	< 20
85	< 20	6.00	50	< 20
NuSieve 3:1				
950	130	2.50	700	70
650	80	3.00	500	40
350	40	4.00	250	20
200	30	5.00	140	8
120	20	6.00	90	4
SeaKem Gold				
24,800	3,550	0.30	19,000	2,550
12,200	2,050	0.50	9,200	1,500
9,200	1,050	0.75	7,100	800
6,100	760	1.00	4,000	500
4,100	600	1.25	2,550	350
2,600	400	1.50	1,900	250
2,000	330	1.75	1,400	180
1,500	250	2.00	1,000	100
MetaPhor				
480	70	2.00	310	40
200	40	3.00	140	35
120	35	4.00	85	30
85	30	5.00	60	15

정상사람세포(BioWhittaker 사)의 배양법

■ 세포의 배양 순서

(1) 동결세포의 보존

세포는 동결보존배지(각 세포의 적합 배지에 10% FBS, 10% DMSO를 첨가한 배지)안에 동결보존되어 있다. 세포는 드라이 아이스 포장(-80℃)으로 납품한다. 상품이 도착하는 즉시 액체 질소에 보존한다. 다른 보존방법을 이용하면 해동후에 세포가 생육하지 않는 경우가 있으므로 주의해야 한다.

(2) 배지 준비

주의 : BioWhittaker사의 정상사람세포를 배양하는 경우에는 반드시 각 세포의 전용 권장배지를 사용해야 한다.

- ① 기본배지와 첨가인자 셋트(SingleQuots)의 용기 표면을 70% ethanol 또는 isopropanol로 닦아서 멸균한다.
- ② 무균조건(clean-bench)에서 첨가인자 셋트의 각 용기를 열고 셋트에 함유되어 있는 모든 첨가인자를 기본배지(500 ml)에 전량 넣는다. 첨가인자 셋트 내에 FBS가 함유되어 있는 경우에도 그대로 첨가한다(비동화할 필요는 없다).
- ③ 첨가인자 셋트용기의 label을 기본배지용기에 붙이고, label에는 사용기한을 기재해 둔다(첨가인자를 넣은 배지는 2~8℃에서 약 1개월간 유효하다).

(3) 배양용기의 준비

주의 : 정상사람세포의 배양에는 시판하는 멸균처리 된 접착세포배양용 flask와 dish를 사용해야 한다. Collagen 등의 접착인자로 표면 처리한 flask와 dish 혹은 초대 배양용 사알레도 사용할 수 있다.

- ① 각 세포의 권장 접종밀도(2,500~5,000 cells/ml) 및 세포 vial 안의 세포수($>5 \times 10^5$ cells/vial)을 근거로, 준비하는 배양용기의 수를 계산한다.
예)HMVEC-d Neo(TaKaRa Code C2505) 520,000 cells의 경우: HMVEC-d Neo의 권장 접종밀도는 5,000 cells/ml 이므로, 전 세포에 필요한 배양면적은 $520,000 / 5000 = 104 \text{ cm}^2$ 가 됩니다. 배양용기로 T-25 flask를 사용하면, flask 1개당 배양면적은 25 cm^2 이므로 준비해야 하는 flask의 수는 $104 \text{ cm}^2 / 25 \text{ cm}^2 = 4$ 병 이다.
통상, 세포 1 vial에 대해 HMVEC의 경우는 4개, 기타 내피 세포(권장 접종밀도 2,500 cells/ml)는 8개의 T-25 flask를 준비한다.

- ② 무균적으로 배지 용기를 열고, 배양용기의 배양면적 5 cm^2 당 1 ml의 비율로 배지를 첨가한다.
예) T-25 flask 및 600 mm 사알레의 경우 5 ml의 배지를 첨가한다.
- ③ 배지를 넣은 배양용기를 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣고 사용시까지 적어도 30분간 보온한다. 통풍이 되지 않는 용기(flask 등)을 사용하는 경우에는 뚜껑을 절반 정도만 닫아 느슨하게 한다.

(4) 세포의 용해

주의 : 복수의 동결세포 vial을 해동할 경우는 한번에 1개씩 처리한다. 동결세포는 상당히 까다로우므로 세포의 용해에서 새 배지로 이식하는 시간을 가능한 짧게 해야 한다. 또 용해한 세포는 절대 원심분리를 하지 않는다. 원심분리 과정에서 세포는 손상을 받을 수 있다.

- ① 동결세포 vial을 액체질소에서 꺼낸다. Vial의 표면을 70% ethanol 또는 isopropanol로 닦아서 멸균한다. Clean bench 내부에서 vial 덮개를 1/4정도 돌려 내압을 뺀 다음 다시 한번 닫는다(이때 vial을 완전히 열지 않도록 주의한다).
- ② 37℃의 항온 수조에 vial의 3/4을 담그고, 중심이 용해될때까지 vial을 약 1, 2분간 천천히 돌려 섞는다(vial 전체를 담그지 않도록 주의한다). Vial의 상태를 관찰해 얼음 덩어리가 완전히 녹으면 항온 수조에서 꺼낸다. 이때 세포가 용해된 상태로 3분 이상 방치하면 세포가 손상을 받으므로 주의한다.
- ③ Vial을 꺼내면 즉시 주위의 물을 닦아 내고, clean bench 안으로 옮겨 70% ethanol로 멸균한다.
- ④ 용해한 세포용액의 색을 확인한다(통상 용액은 분홍색이다).

(5) 세포의 접종

- ① Vial 덮개를 뺀다. Vial 입구를 절대로 만지지 않도록 주의한다.
- ② 1000 μl micropipet을 800 μl 로 설정하고, 멸균 tip의 선단을 vial 안에 넣어 천천히 그리고 확실히 5번 정도 상하로 pipetting한다. 이때 pipetting은 천천히 하며 tip의 끝을 vial의 바닥 가까이로 유지하여 기포가 생기지 않도록 한다.
- ③ 37℃, 5% CO₂ incubator에 미리 보온해 둔 배양용기(배지 함유)에 같은 양의 세포를 넣는다.
예) T-25 flask 4개의 경우 250 μl 씩 넣어준다.
- ④ 배양용기를 닫는다. Flask의 경우에는 가스교환이 가능하도록 덮개는 조금 느슨하게 둔다.

TaKaRa는 BioWhittaker사의 정상사람세포를 공급하고 있으며 호평을 받고 있다. BioWhittaker사는 미국에서 가장 먼저 국제표준화기구 품질보증규격(ISO9001)을 취득한 기업으로, 엄밀한 품질관리 시스템으로 생산한 고품질의 제품을 제공하고 있다. 정상사람세포를 배양할 때는 까다로우므로 신중히 취급해야 한다. 본 고에서는 BioWhittaker사의 접착제 정상사람세포의 표준배양법에 대해 간단히 소개한다. 한편 일부 세포(신경전구세포, 골아세포, 수상세포, 말초혈단핵세포)의 배양법은 여기에 소개한 방법과는 상당히 다르므로 주의해야 한다. 보다 상세한 내용은, 각 세포에 첨부되어 있는 instruction manual을 참조한다.

⑤ 37℃, 5% CO₂ incubator에 배양용기를 넣는다. 세포는 용기의 저면에 접촉한다.

(6) 세포의 유지

① 세포를 배지에 접종한 다음날, DMSO 및 미접착 세포를 제거하기 위해 배지를 교환한다. 그 이후에는 이들에 한번 배지를 교환하고 세포의 상태를 매일 확인한다. 배지교환은 다음과 같이 한다. 무균 pipet을 부착한 aspirator를 사용하여 세포의 접착이 적은 곳에서 배지를 흡인 제거한다. 그리고 동일한 장소를 통해 미리 보온 해둔 새로운 배지를 넣는다.

② 세포의 증식밀도가 증가하는 것을 대비하여 교환하는 배지량은 늘려준다.

25% confluent 이하	1 ml/ 5 cm ²
25~45% confluent	1.5 ml/ 5 cm ²
45% confluent 이상	2 ml/ 5 cm ²

③ 세포를 유지하려면 70~90% confluent의 상태에서 계대 이식을 해 주어야 한다. 세포가 과잉으로 증식하면 접촉저해가 일어나거나, 세포가 배양용기의 바닥으로부터 이탈하여 trypsin이 작용하기 힘들게 된다.

(7) 세포의 장기 배양(subculture)

T-25 flask를 사용해서 장기배양을 하는 경우를 예로 들어 아래에 그 순서를 나타내었다. 한편 아래에 표시한 시약이나 배지의 양은 T-25 flask 1병을 기준으로 한 것이다.

주의: 세포의 계대 이식에는 반드시 전용의 subculture 시약 셋트(ReagentPack™)를 사용한다.

① Subculture 시약을 준비한다.

Trypsin/EDTA 3 ml, HEPES Buffered Saline Solution 5 ml, 및 Trypsin Neutralizing Solution 5 ml을 각각 녹인 후 실온에 둔다.

4℃에 보존해 둔 배지를 실온으로 옮긴다.

② Clean bench속에서 70~90% confluency까지 증식한 flask에서 배지를 흡인제거한다.

③ 실온에 두었던 HEPES Buffered Saline Solution 2~3 ml로 세포를 세정한다.

④ Flask에 남은 액을 흡인 제거한다.

⑤ 실온에 두었던 Trypsin/EDTA 3 ml를 첨가한다. 모든 세포에 trypsin이 접촉할 수 있도록 flask를 조작한다.

⑥ 현미경으로 flask를 관찰한다. 세포의 90% 이상이 둥글게 될 때까지 trypsin 처리를 계속한다.

⑦ Flask를 손바닥에 고정시키고 세포가 떨어진 상태를 조사한다. Flask 표면에서 세포의 대부분이 떨어질 때까지 trypsin 처리를 계속한다. 떨어지지 않는 경우에는 30초마다 손바닥으로 가볍게 flask를 쳐 본다.

⑧ 세포를 떼어낸 후, 즉시 실온에 두었던 Trypsin Neutralizing Solution 3 ml을 즉시 flask에 넣어 trypsin을 중화한다.

⑨ 15 ml의 멸균 원심관에 세포를 신속하게 옮긴다.

⑩ Flask에 남은 세포에는 HEPES Buffered Saline Solution 2 ml을 넣어 씻어주고, 그 액을 원심관에 넣는다.

⑪ Flask를 현미경으로 관찰하여 남은 세포의 수가 전체의 5% 이하인 지를 확인한다.

⑫ 원심관에 모은 세포를 200×g로 5분간 원심분리한 뒤 100~200 ml의 상청을 남긴채 제거한다. 원심관을 손가락으로 툭툭 쳐 주므로서 세포침전물을 풀어준다.

⑬ 배지 4~5 ml로 세포를 현탁하고, 액의 총량을 확인한다.

⑭ 세포현탁액의 일부를 꺼내 hemacytometer 또는 cell counter로 세포수를 세어 총세포수를 계산한다. 250,000~1,000,000 cells/ml이 되도록 세포현탁액을 HEPES Buffered Saline Solution 으로 정확히 희석한다.

⑮ 희석한 세포현탁액의 일부를 꺼내 trypan blue 염색으로 세포의 생존율을 구한다. 다음식으로 생세포수를 계산한다.

$$\text{생세포수} = (\text{총세포수} \times \text{생존율}) / 100$$

⑯ ⑮에서 계산한 생세포수로부터 계대 이식에 사용할 flask의 수를 결정한다. ((3) 배양용기의 준비 참조)

⑰ 배지병을 열고 flask 면적 5 cm²당 1 ml의 배지를 넣는다.

⑱ 희석한 세포를 5 ml pipet으로 각반 현탁하고 균일하게 된 세포 현탁액을 계산량씩 flask에 넣는다.

⑲ Flask를 천천히 흔들어 세포를 균일하게 분산한다.

⑳ 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣어 배양한다. 가스교환이 가능하도록 뚜껑을 조금 느슨하게 풀어 둔다.



인터넷 세상

인터넷 용어

북마크(Bookmark)

인터넷의 여러 사이트를 돌아다니다가 기억해 놓고 싶은 사이트를 체크하여 보관, 관리하고 후에 그 사이트로 가고자 할 때 사이트의 URL을 외우지 않고도 보관되어 있는 리스트에서 선택만 하면 바로 접속할 수 있도록 URL 주소를 관리할 수 있는 것이 바로 북마크.

클라이언트(Client)

서버는 말그대로 서비스를 제공하는 것 또는 사람을 의미한다. 인터넷에서는 서비스를 제공하는 컴퓨터와 프로그램을 의미한다. 이와 상응하는 용어로 클라이언트가 있는데 이것은 서비스를 받는 것 또는 사람을 의미한다. 인터넷에서 서비스를 받는 컴퓨터 또는 프로그램을 의미하게 된다.

크래커(Cracker)

컴퓨터 시스템에 무단으로 접근을 시도하는 개인을 말하는데, 해커(hacker)와는 달리 악의적인 경우가 많으며 시스템을 파괴하는 많은 방법을 알고 있다.

해커(Hacker)

시스템, 특히 컴퓨터와 컴퓨터 네트워크의 내부 작동 원리를 이해하는 데 즐거움을 느끼는 사람. 나쁜 의미로 잘못 사용되는 경우도 있는데 이럴 때는 크래커가 올바른 표현이다.

E-mail

컴퓨터를 통하여 소식을 주고받는 기능이다. 인터넷을 통한 전자우편은 기존의 편지에 비하여 빠르고, 전화보다 저렴하며, 인터넷 계정을 갖고 있는 사람이라면 세계 어느 곳에 있더라도 소식을 전할 수 있다는 장점이 있다.

프레임(Frame)

윈도우가 창이라면 프레임은 창틀이다. 윈도우 화면을 여러개로 나누어 서로 다른 내용을 담아 보여줄 수 있는데 각각의 부분을 프레임이라고 한다.

LAN(Local Area Network)

근거리 통신망. 지역내 정보통신망이라고도 한다. 한 사무실이나 한 건물 내의 한정된 범위에서 여러 개의 컴퓨터를 통신 회선으로 접속하여 서로 데이터를 교환할 수 있도록 한 네트워크를 말한다.

네트워크(Network)

두 대 이상의 컴퓨터를 케이블 등으로 연결하여 서로 데이터를 교환할 수 있도록 만든 시스템.

서버(Server)

인터넷 정보 요청을 받아들이고 처리하여 결과를 제공하는 쪽의 컴퓨터나 프로그램을 '서버'라고 하고, 반대로 정보를 요청하는 컴퓨터나 프로그램을 '클라이언트'라고 한다.

텔넷(Telnet)

텔넷은 원격지의 컴퓨터에 접속하기 위해서 지원되는 인터넷 표준 프로토콜 중 하나이다. 텔넷을 이용해서 우리는 세계 어느 지역의 컴퓨터이건(만약 그 컴퓨터가 인터넷에 연결되어 있고 그 컴퓨터에 계정을 가지고 있다면) 거리상의 제약을 받지 않고 실시간으로 접속할 수 있다.

추천사이트

최근 각광을 받고 있는 인기사이트를 추천해 드립니다. 필요한 정보를 찾아 보시기 바랍니다.

1. 검색엔진

(국내)

야후! 코리아(<http://www.yahoo.co.kr/>)

국내에서 가장 인기있는 검색엔진

한글 알타비스타(<http://altavista.co.kr/>)

국내 정보사냥대회때 가장 빠르게 많은 정보를 찾아내는 검색엔진으로 유명

라이코스 코리아(<http://www.lycos.co.kr/>)

서비스를 시작한지 얼마되지 않은 검색엔진이지만, 여러가지 부가적인 서비스로 인해 인기 몰이 중

(국외)

야후(<http://www.yahoo.com/>)

초보들이 가장 많이 찾는 주제별 검색엔진으로, 현재 세계 최고의 인기를 얻고 있는 검색엔진

인터넷 정보화 시대를 맞이하여 새로운 기획으로 본 코너를 마련하였습니다.
본 코너에서는 인터넷의 용어 및 추천 사이트를 정리해 드립니다.
연구자 여러분께 조금이나마 도움이 되셨으면 합니다.

Altavista(<http://www.altavista.com>)
키워드형 검색엔진으로, 빠른 속도가 자랑

Infoseek(<http://infoseek.go.com/>)
야후와 알타비스타의 장점을 갖춘 검색엔진

Magellan(<http://magellan.excite.com/>)
우수 사이트만을 별도로 검색할 수 있는 기능을 제공

2. 각종 사전 사이트

과학/기술 사전모음
(http://www.control.co.kr/dic_ie.htm)
과학/기술에 사용되는 사전을 모아둔 사이트

Webopedia(<http://webopedia.internet.com/>)
영어로 제공되는 컴퓨터 용어 사전 사이트

야후 한/영어 사전(<http://dic.yahoo.co.kr/>)
야후코리아에서 제공하는 한/영어사전

안철수컴퓨터바이러스연구소
(<http://www.ahnlab.com/>)
안철수 바이러스 정보를 알 수 있는 사이트

3. 경제/법률 관련 사이트

한국증권거래연구소(<http://www.kse.or.kr/kor>)
우리나라의 주식거래가 이루어지는 한국증권거래소의 공식 사이트

전자상거래와 법
(<http://www.eclaw.net/html/first.htm>)
국내 전자상거래와 관련된 법률정보를 포함하여 그외 전자상거래에 관련된 다양한 정보를 얻을 수 있는 사이트

법률상식
(http://www.sppo.go.kr/homepage/civilapp1/common_sense.html)
검찰청에서 제공하는 법률 상식

4. 노벨상 관련

The Nobel Prize Internet Archive
(<http://nobelprizes.com/nobel/nobel.html>)
역대 노벨상 수상자들을 검색할 수 있으며, 수상자들에 대한 정보를 얻을 수 있는 사이트

5. 교육기관 · 도서관 관련 사이트

College and University Home Pages
(<http://www.mit.edu:8001/people/cdemello/univ.html>)
미국과 세계대학들의 사이트 주소를 링크시켜 놓은 사이트

미국대학랭킹
(<http://www4.usnews.com/usnews/edu/college/corank.htm>)
미국 대학들에 대한 정보를 얻을 수 있는 곳으로, 매년 각 대학을 평가한 순위가 수록되며, 올해에 1위를 한 대학을 찾아보는 것도 정보검색의 실력!

국회도서관(<http://www.nanet.go.kr>)
우리나라의 국회도서관 홈페이지

세계도서관(<http://www.sjcp1.lib.in.us>)
세계의 도서관을 찾아볼 수 있는 사이트

6. 데이터베이스

E.coli Center Database
(<http://cgss.biology.yale.edu/cgsc.html>)

EMBL Database [Includes Swiss-Prot Database]
(<http://www.ebi.ac.uk>)

GenBank Database [National Center For Biotechnology Information]
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

2000년 “중합 고객지원서비스 Bio21”사업

작년 한 해 “중합 고객지원서비스 Bio21”을 통해 수준 높은 토 탈서비스를 제공해 드리고자 노력하였습니다. 2000년에도 보다 더 충실히 하겠습니다.

중합 고객지원서비스 Bio21”의 사업내용은 아래와 같습니다.

- (1)Homepage에 의한 정보 검색 및 인터넷 쇼핑
- (2)Bio21 클럽운영 및 E-mail 정보제공 서비스
- (3)기술지원서비스
- (4)TaKaRa Symposium 개최
- (5)Technical Workshop 개최
- (6)기술자료 및 판촉자료 제작 보급
- (7)학회 학술활동 지원

본 서비스는 철저한 회원제로 운영합니다. 당사의 서비스를 받고자 하시는 분은 홈페이지(www.bohan.co.kr)를 통해 회원가입을 해 주시기 바랍니다.

광주과학기술원 생명과학과 우수졸업생에 보한바이오메디칼상 제정 시상 : 임영준씨

당사는 광주과학기술원 생명과학과의 우수졸업생을 시상하는 보한바이오메디칼상을 금년부터 제정하여 시상키로하고 지난 2월 22일 생명과학과 졸업생인 이학석사 임 영준(지도교수 엄 수현)씨를 첫번째 수상자로 선정하여 상패와 부상을 시상하였습니다. 당사가 광주과학기술원과 협력하여 생명과학과 대학원생의 학업 및 연구의욕을 높이고자 제정한 이상은 생명과학과 교수들의 엄정한 심사에 의하여 수상자를 선정하였으며 연례적으로 시상할 계획입니다.

TaKaRa 기술연구소 GMO 검사기술연수

(주)풀무원 기술연구소 연구원 김 태락 박사의 1명(지난해 11월), TaKaRa와 풀무원의 합작으로 설립한 한국유전자검사센터 연구원 박 영민 씨(2월 21일부터 1주일간)와 롯데제과 기술연구소 연구원 김 원국 씨(2월 28일부터 3일간)의 GMO 검사방법에 관한 연수가 해당 기관의 요청에 따라 당사 일본본사 연구소에서 실시되었습니다. 유전자 변형작물의 안전성에 관한 관심이 높아지고 표시제도에 대한 입법화가 추진되면서 각 기업 및 연구기관에서 표준 검사방법에 관한 관심이 높아지고 있는 상황으로 당사는 앞으로도 선진기술을 보급하는 데 기여하고자 합니다.

생명과학 벤처기업(주) 바이오리더스와 협력키로

당사는 생명공학연구소 성문희 박사를 중심으로 한 20여명의 박사가 주주로 참여하여 지난 연말에 창업한 (주)바이오리더스(공동대표이사 성문희, 김형순)와 사업협력을 하기로 합의 하였습니다. (주)바이오리더스는 대량발현벡터시스템 등 첨단 유전자공학기술을 응용한 생물전환기술에 의한 환경친화형 유용생물소재의 생산, 의약품 및 기능성 식품 소재의 개발, 생물축매의 대량생산을 목적으로 지난해에 창립한 생명공학 벤처기업입니다. 금년 봄 첫상품의 상시를 시작으로 본격적인 사업에 들어가며 3월중으로 연구소의 설립도 완료할 예정입니다. 당사는는 국내 뿐만 아니라 해외 사업에 이르기까지 기술도입, 기술제공, 마케팅, 상품개발, 판매의 종합적인 부분에서 협력키로 하고 첫번째 사업으로 대량발현 시스템의 국제특허 출원 및 해외판매에 관하여 이미 구체적인 업무를 진행하고 있습니다.

다양한 신규사업 전개

당사는 새 천년에도 다양한 신규사업을 전개합니다. 이미 당사의 산학협력 벤처기업인 (주)아트만바이오사이언스를 통해 합성 DNA의 국내생산을 개시하였으며, 2000년 1월 TaKaRa가 (주)풀무원과 공동설립한 (주)한국유전자검사센터에서는 유전자 변형작물(GMO)의 검정 서비스를 개시합니다. 또한 기존의 연구지원사업 부문이외에 새로이 개척한 바이오식품사업 (“Apoidan-U” 판매 등) 부문도 확대해 나갈 예정입니다. 또한 국내 대학, 연구소, 벤처 기업 등과도 협력하여 신제품의 개발, 해외수출 등도 적극 추진하고 있습니다.

바이오식품 개인특약점 모집

금번 ‘아포이당-U’의 한국내 출시를 시작으로 생명과학 및 생물 공학 기술을 기반으로 한 바이오식품 사업을 시작하기에 뜻 있는 개인특약점을 아래와 같이 모집합니다.

- 형 태 : 개인특약점
 조 건 : · 개인 사업등록자
 · 의약품, 건강식품 영업 경험자 우대

사업설명회 : 당사 방문시 사업설명 가능
 Apoidan-U는 당사의 바이오연구소와 일본 재단법인 당쇄공학연구소가 10여년간의 연구를 통해 암세포에 특이적으로 apoptosis를 일으키고, HGF의 발현을 유도하는 것으로 밝혀진 Fucoidan을 다량 함유하는 다시마에서 추출한 혼합염료입니다. 일본에서는 지난 97년 판매를 개시 하였으며, 현재 Fucoidan의 의약품으로의 개발도 진행중입니다.

2000년에도 생명과학 관련 학회활동 지속 지원

당사는 창사 이래 지속적으로 생명과학 관련 학회의 발전을 위해 지원을 아끼지 않았습니다.

금년에는 보다 많은 학회와 협의하여 참여범위를 확대하고자 합니다. 지원예정인 학회 현황은 아래와 같습니다.

- 뇌학회
- 대한생화학분자생물학회
- 한국식물병리학회
- 한국식물학회(식물생명공학심포지움)
- 한국원예학회
- 식물조직배양학회
- 조류학회
- 한국분자생물학회
- 한국미생물학회
- 한국산업미생물학회
- 한국생물과학협회
- 한국생화학학회
- 한국유전학회(유전체학술협의회)

당사의 작은 정성이 우리나라의 생명과학 발전으로 이어질 수 있도록 앞으로 최선을 다하겠습니다.

춘계학술대회 전시회 참가

당사는 생명과학 관련 학회에서 주관하는 2000년 춘계학술대회의 기기전시회에 참여할 예정입니다.

고객 여러분들을 직접 전시회장에 찾아 뵙고 인사를 드리며, 최근 쏟아지는 각종 최신정보 및 신제품을 정리해 소개해 드리겠습니다. 전시장을 방문하시는 고객여러분께는 다양한 기념품도 증정해 드립니다. 현재 참가가 결정된 학술대회는 아래와 같습니다.

- 한국생화학학회
- 대한생화학분자생물학회(4월 27일~28일)
- 한국산업미생물학회
- 한국미생물학회

전시회장에서 뵙겠습니다.

뉴 밀레니엄 인터넷 쇼핑 대축제 성황리에 마쳐

당사는 업계최초로 생명과학연구용제품 전문쇼핑몰인 "Bio21 인터넷 쇼핑몰"을 지난해 6월 개설하여 연구자 여러분의 호평을 받아 왔습니다. 새로운 천년을 맞이하여 인터넷쇼핑몰의 이용을

늘리고 정보화 시대의 조류에 능동적으로 대처하고자 지난 1999년 11월 22일부터 2000년 2월 말까지 100일간 인터넷 쇼핑몰에 의한 주문에 대해 20% 할인 등 다양한 혜택을 드리는 뉴밀레니엄 대축제를 실시하였고, 연구자 여러분의 성원으로 힘입어 성공적으로 마칠 수 있었습니다. 앞으로도 보다 다양한 정보와 혜택으로 고객과 늘 함께 하는 보한바이오메디칼이 되도록 하겠습니다.

2000년도 종합 고객지원서비스 Bio21 사업안내

Bio21 회원여러분께

본지를 빌어 Bio21 클럽에 가입해 주심을 다시 한번 감사드립니다.

철저한 회원제로 운영하는 Bio21 클럽 회원 여러분에게는 2000년 올해에도 아래와 같이 종합 고객 지원 서비스를 해 드립니다.

"종합 고객지원서비스 Bio21"의 사업내용은 아래와 같습니다.

- (1) Homepage에 의한 정보 검색 및 인터넷 쇼핑
- (2) Bio21 클럽운영 및 E-mail 정보제공 서비스
- (3) 기술지원서비스
- (4) TaKaRa Symposium 개최
- (5) Technical Workshop 개최
- (6) 기술자료 및 판촉자료 제작 보급
- (7) 학회 학술활동 지원

홈페이지(www.bohan.co.kr)의 경우 보다 많은 정보를 편리하게 검색하여 열람하실 수 있도록 다양한 정보들을 DB화 할 예정입니다.

특히 Bio21 인터넷 쇼핑몰의 불편함을 해소하기 위해 보다 편리한 제품정보 검색 및 주문체계를 가진 새로운 쇼핑몰을 구축합니다.

또 2000년에는 홈페이지를 중심으로 Bio21 회원여러분들을 위한 다양한 이벤트를 실시할 예정입니다. 폐사 홈페이지를 꾸준히 접속하시어 행사에 참여하여 주시고, 회원에 가입하지 않은 주위 분들에게도 가입을 권유해 주시기 바랍니다.

TaKaRa - 풀무원 합작 '(주)한국유전자검사센터' 설립

TaKaRa는 GMO 분석에 대한 선진 기술 확보 차원 및 GMO 표시제 시행에 따른 선도적 역할 수행을 위하여 2000년 1월 (주)한국유전자 검사센터를 설립하였습니다. 그 설립배경 및 개략에 관해 다음과 같이 소개해드립니다.

〈설립배경〉

국내외적으로 유전자 변형 농산물(GMO)의 안전성에 대한 논란이 최근 수년간 지속되어 왔고, 최근에는 국내에서 제조되고 있는 두부제품에서 GMO 성분이 검출되었다는 소비자보호원의 발표로 인해 소비자, 업계, 관련단체의 혼란이 가중되고 있다.

이에 따라 소비자의 알권리 차원에서 GM작물과 그 가공식품에 대해 정확한 표시제를 도입하자는 의견이 대두되어 농림부는 오는 2001년 3월부터 유전자 변형(GM) 콩과 콩나물, 옥수수에 대해 유전자 변형임'을 명시하도록 하였으며, 수입업자나 도.소매업자 등이 종자구입, 생산, 저장, 판매 등 유통단계에서 GM 여부를 확인한 증명서를 근거로 하도록 했다. 또한 식품의약품 안전청에서도 국내 유전자 변형 가공식품에 대해 2001년 7월부터 이에 대한 표시를 의무화하도록 한 바 있다.

따라서 국내에서도 유전자 변형 제품에 대한 검사와 분석의 필요성이 대두되고 있으나 국내에서는 아직까지 이를 분석할 공인 방법이나 기준이 확립되어 있지 못한 실정이었다.

또한 분석과정에서의 절차나 과정이 전혀 정립되어 있지 못해 오류 가능성이 매우 높은 상황이었다.

이런 상황에서 (주)풀무원은 최첨단 산업인 생명공학분야에 새롭게 진출하게 된 것이다. 앞으로 유전자변형 작물과 그 가공식품에 대한 표시제로 분석과 검사 수요가 급증할 것으로 여겨짐에 따라 이에 대한 TaKaRa-풀무원 합작법인인 (주)한국유전자검사센터의 향후 전망도 매우 밝다고 할 수 있다.

일본 TaKaRa가 개발한 PCR법에 의한 TaKaRa 분석법은 검체(콩 혹은 두부관련 제품)에서 독립적으로 채취한 복수의 샘플에 대해 측정을 하고 있다. 측정결과는 통계처리를 해서 신뢰도 99%의 결과분석이 가능하다. 본 검사방법에 의한 검출한계는 0.01%이나 소수점 1자리 숫자를 가지고 검사결과를 보고한다. 본 검사방법은 검체 중의 GMO 함량을 정확히 측정하는 것이 가능하며, [검출되었다/검출되지 않았다]라고 하는 정성분석과는 다르다. 즉, 정성분석은 아주 적은 양이 혼입된 경우에 있어서도 '검출되었다'라고 보고하게 된다. 이것은 IP관리(Identity Preservation; 선적부터 일관된 격리수송)된 원료를 사용해서 제조한 두부라도 과학적 검증으로 양성이라고 판단되어, 혼란을 초래하는 결과를 가져오게 된다. 정확한 정량 검사업무를 제공하는 것은 제조업체에게는 엄격한 품질관리를 가능하게 하며, 국내에서 검토되고 있는 GMO 표시제에도 일조할 것으로 판단된다.

〈신설 (주)한국유전자검사센터 개요〉

1. 이사진

- 가토 이쿠노신(加藤 郁之進, Takara Shuzo Co., Ltd. 전 무이사, 바이오메디칼부문 본부장, 바이오연구소장)
- 이제현(보한바이오메디칼 사장)
- 쓰루마루 하루히코(鶴丸 治彦, Takara Shuzo Co., Ltd. 상무, 경리담당 임원)
- 유주현(연세대 명예교수, 한국중균협회 이사장)
- 배종찬(주식회사 풀무원 사장)
- 여익현(주식회사 풀무원 상무이사, 기술연구소장)
- 감사 : 변유량(연세대 교수, Bio-products Research Center 소장)

2. 투자비용 : 자본금 10억원

- Takara Shuzo Co., Ltd.: 5억원(50%)
- (주)풀무원 : 4억 8천만원(48%)
- 한국중균협회 : 1천만원(1%)
- 연세대부설 생물산업소재 연구센터(BRC) : 1천만원(1%)

3. 소재지

- 서울시 서대문구 연희동 134번지 연세대학교내 연세공학원

TaKaRa DNA Chip 으로 급부상!!

일본 마이니치 데일리 뉴스가 1999년 12월 3일자 [business]면을 통해 당사의 일본 본사인 Takara Shuzo사의 DNA chip 관련 기술개발과 경제적 파급효과에 대하여 대대적으로 보도하였기에 소개해 드리고자 합니다.

.....
1999년 12월 3일, Takara Shuzo사의 주가가 6% 상승하였다. 즉, 일본 최대 소주 생산업체의 주가가 85엔 상승한 1,515엔에서 거래된 것이다. 이 현상은 동사의 생명공학 사업이 상당한 이익을 창출할 것이라는 투자자들의 기대심리에 의한 것이었다. 이날 약 4백만 주가 거래되었는데 이것은 무려 지난 3개월 동안 하루 평균 거래량의 4배에 이르는 것이다. 이에 대해 일본 Nissan Securities사 주식관리과의 head broker인 Massaru Kazama씨는 "투자자들은 Takara Shuzo Co.의 DNA chip 기술 개발에 관한 뉴스를 접한 후 이익이 상승할 것이라는 낙관론 속에 주식을 매입한 것이다."라고 분석하였다.

일본의 한 경제신문은 Takara Shuzo가 의학적 활용을 위해 glass slide상에 수 많은 human DNA를 고정한 "DNA chip"을 생산하는 첨단기법을 개발하였음을 1면에 보도하였다. 동사는 초창기에는 뛰어난 발효기술을 바탕으로 생명공학 시장에 진출하였다. DNA chip 시장은 2010년경에는 일본시장에서만도 25조엔의 규모로 성장하리라 예측되고 있다. 동 신문은 Takara Shuzo가 기존의 방법에 비해 절반의 비용으로 DNA chip을 생산할 수 있는 기술을 보유하고 있다고 밝혔다.

Takara는 9월 28일 3종류의 DNA chip에 관한 마케팅을 개시하였다. 이 중 2가지는 특정 암의 발생과정에서 기능하는 유전자들을 확인하는 데 이용되며, 나머지 하나는 광합성과 관련한 생물학적 과정을 분석하기 위한 것이다. Takara는 상업적으로 chip을 판매하는 일본 최초의 기업이다. 동사의 생명공학 사업은 연간 매출의 4%를 차지한다.

또한 Takara Shuzo는 1999년 9월 21일, 대두(soybean)와 같은 곡물의 유전자변형(genetically modified) 여부를 검증하기 위해 일본 3번째의 무역회사인 Mitsubishi사와 합작투자회사를 설립한 바 있다.

(1999년 12월 3일자 일본 마이니치 데일리 뉴스 (business)면)

환경호르몬 DNA Chip과 대장균 DNA Chip의 개발

TaKaRa 바이오 연구소에서는 금번 2종류의 DNA CHIP, 즉 호르몬교란작용(환경호르몬작용) 유전자 발현을 측정하여 판단할 수 있는 [환경 호르몬 DNA CHIP]과 대장균 K12주의 대부분 유전자 DNA단편을 정렬고정화한 [대장균 DNA CHIP]을 개발하였습니다.

[환경 호르몬 DNA CHIP]은 12월 10일 일본 내분비 교란 화학물질학회 제 2회 연구발표회에 발표되었고, 또한 [대장균 DNA CHIP]을 이용한 해석 data는 제 22회 일본 분자생물학회에서 12월 8일 발표되었습니다. 또한 위의 두 종류의 DNA Chip은 2000년 봄 부터 발매할 예정입니다.

환경호르몬 및 대장균 DNA Chip의 개요는 다음과 같습니다.

환경호르몬 DNA CHIP

환경 호르몬이라 불리는 화합물은 호르몬 본래의 작용을 호르몬 수용체와 반응하여 정상 호르몬작용의 balance를 방해하는 물질로 규정하고 있다.

지금까지 세계적으로 사용되고 있는 화학물질 중 호르몬의 작용을 교란할 가능성이 있는 의약품이 많이 보고되고 있으며, 본격적인 연구가 필요하게 되었다. 일반적으로 사용하는 환경호르몬의 분석에는 gas chromatography나 액체 chromatography 등의 기기분석을 이용한 물질의 고정이나 화학물질이 에스트로젠 수용체와 반응하는지를 측정하는 receptor-assay, 세포와 동물을 이용한 bio-assay등이 이용되며 각각의 특징을 살린 분석이 이루어지고 있다. 그러나 이들 방법만으로는 의혹화학물질의 호르몬교란작용에 대한 해석은 거의 불가능하다. 예를 들면 위의 분석방법에서는 DES와 genistein(대두 isoflavone의 일종)은 함께 호르몬 교란작용에 대해 양성판단이 내려지지만, DES는 사람에 대해서는 강한 호르몬 교란작용을 하는데 비해 genistein은 교란작용은 없고 여성의 갱년기장애의 경감이나 골

조증의 치료에 유효하다는 보고가 나와 있다.

또한 비스페놀과 노닐페놀의 작용에 대해서도 같은 수준의 명확한 교란작용해석은 이루어지고 있지 않다. 이상과 같은 것을 해결한 것이 이번에 발표된 [환경호르몬 DNA CHIP]이다. 이는 핵 내의 receptor 유전자군, receptor 공역인자의 유전자군, 성선 분화 유전자군, 세포주기에 관여하는 유전자군 등에서 선별한 약 400개의 유전자를 정렬고정화한 DNA Chip이다.

이 [환경 호르몬 DNA CHIP]를 이용하여 종래의 실험 법에서는 해석할 수 없었던 교란작용을 유전자의 발현효율이나 패턴을 해석하여 환경호르몬의 본질을 명확하게 하는 실험을 할 수 있다. 이번에는 E-SCREEN 테스트에 사용되고 있는 MCF-7세포를 이용하여 각종 환경호르몬으로 의심되는 화합물을 첨가하여 유전자의 발현량 변화를 비교하였다. 그 결과 테스트하는 화합물에 의해 변동하는 유전자가 다른 것을 알 수 있었으며 이 결과는 12월 10일에 일본 내분비 교란화학물질학회 제 2회 연구발표회에서 발표되었다.

대장균 DNA CHIP

대장균 K12주 대부분의 유전자(90%이상) DNA단편을 정렬 고정화한 DNA Chip를 개발하였다. 1922년에 미국에서 분리된 대장균 K12주는 생명과학분야에서 지금까지 가장 많이 연구되어온 미생물의 하나로 분자생물학의 연구에 필수 미생물이다. 대장균의 염색체는 약 47,000Kbp 길이를 갖는 환상 2가닥 DNA이다. 1997년에 그 전 genome 배열이 결정되어 약 4300개의 유전자가 추정되었다. 그러나 많이 연구되어 왔음에도 불구하고 그 유전자의 반수 가까이 아직 생리적 기능이 밝혀지지 않고 있다. 본 DNA CHIP을 이용하여 대장균 유전자의 기능해석이 진전돼 유전자 발현 네트워크 해명이 가속될 것이 기대어진다. 또한 테스트용으로 대장균 유전자 2000개를 정렬 고정화한 DNA Chip를 만들어 이를 이용한 해석 data는 奈良先端科學技術大學 森교수에 의해 제22회 일본 분자생물학회의 Technical Seminar (12월 8일)에 발표되었다.

이상에서 설명한 [환경호르몬 DNA CHIP]과 [대장균 DNA CHIP]을 개발, 신 발매하는 것으로 이미 발매된 cyanoCHIP, Human cancer CHIP, Human apoptosis CHIP의 세 종류의 DNA Chip과 함께 총 5종류의 DNA Chip을 발매하게 됩니다. 당사는 세계 DNA Chip 개발의 리더로서 앞으로 더 많은 종류의 DNA Chip을 개발해 나갈 것입니다.

싸고 좋은 합성 DNA를 찾으십니까? 역시 TaKaRa 입니다.

TaKaRa 합성 DNA

최고 명성의 TaKaRa 합성 DNA의 기술 및 품질을 그대로 제공받아 당사의 산학협력 벤처기업인 (주)아트만바이오사이언스(대표이사: 홍순광 교수, 명지대 생명과학과)에서 국내생산을 개시함으로써 고객여러분께는 보다 저렴하게 다양한 합성량(50 nmole, 200 nmol, 대량합성)의 제품을 빠르게 공급할 수 있게 되었습니다. 또한 국내생산으로 합성가격을 30% 이상 인하할 수 있었고, 납기 또한 기존의 7~10일에서 2~3일로 단축할 수 있었습니다. 또한 고품질의 유지를 위해 정품의 시약 및 컬럼만을 사용하며, 고객여러분의 편리한 주문을 위해 홈페이지 (www.bohan.co.kr) 초기화면에서의 온라인 주문시스템도 갖추었습니다.

공급가격 및 납기

하기 공급가는 합성료, 정제료, 송료를 전부 포함한 가격입니다.

■ PCR Grade

가격 단위 : 원

Scale 구분	50 nmole	200 nmole	1 μmole	납기
1 - 17 mer	25,000	30,000	85,000	2 ~ 3일
18 - 25 mer	30,000	35,000] 잔기당 5,000	2 ~ 3일
26 - 35mer	35,000	40,000		2 ~ 3일

* 50 nmole 2 OD 이상, 200 nmole 10 OD 이상 보증

■ SEQ Grade

가격 단위 : 원

Scale 구분	200 nmole	납기
1 - 17 mer	60,000	2 ~ 3일
18 - 25 mer	65,000	2 ~ 3일
26 - 35mer	70,000	2 ~ 3일

* 최종 1 OD 보증

■ 수식합성

가격 단위 : 원

Scale 구분	200 nmole	납기
FITC 수식	199,800	
Biotin	199,800	
XRITC	199,800	
S-oligo	199,800	통상 2주일
인산화	199,800	
DIG	199,800	
Inosine	199,800	

* 수식합성은 TaKaRa Shuzo Co, Ltd에서 직접 생산 공급합니다.

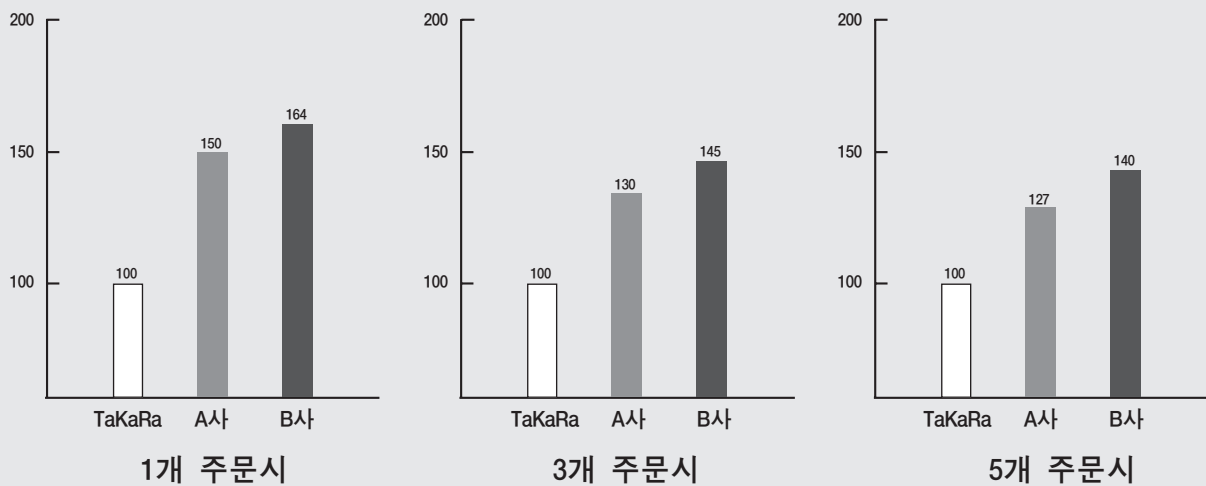
* 공급가는 40 mer 까지의 것에 해당합니다. 40 mer 이상을 수식하거나, 위 수식합성 이외에 관해서는 당사에 문의하여 주시기 바랍니다.

TaKaRa 합성 DNA는 가격도 저렴합니다.

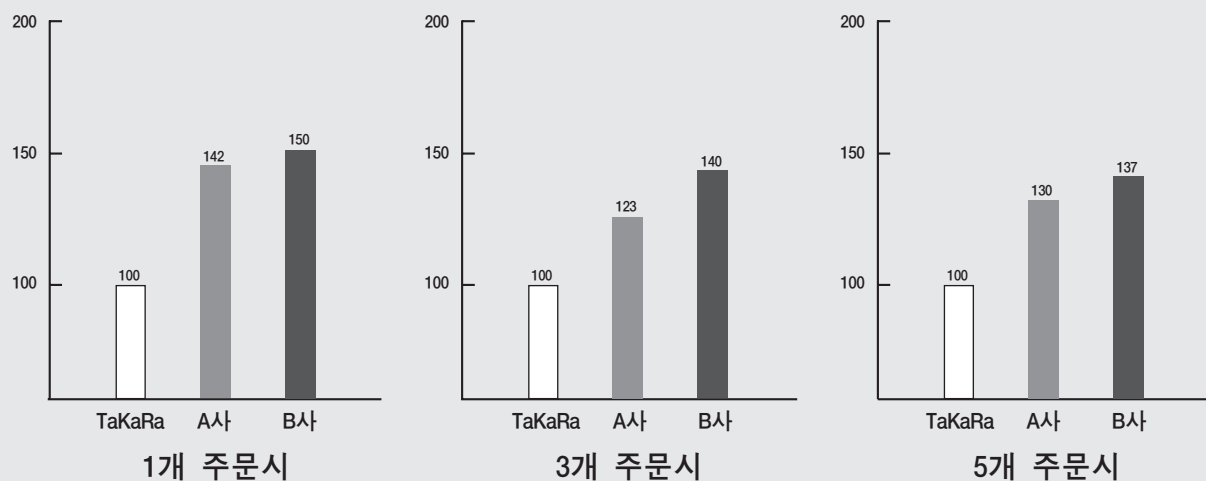
고품격의 제품을 보다 저렴하게 공급해 드리고 있습니다.
아래와 같이 타사 제품의 공급가격과 비교해 보았습니다.

타사 합성가격 비교

● PCR Grade (200 nmol scale, 25 mer 기준)



● SEQ Grade (200 nmol scale, 25 mer 기준)



유전자 변형작물(GMO) 검정 서비스

당사는 한국유전자검사센터(회장 유 주현)을 설립하여 국내 최초로 유전자변형작물, 식품검사 수탁서비스를 실시합니다.

유전자변형작물은 작물의 품질개량, 생산성 향상, 재배기술 개선, 가격인하 등 다양한 잇점에도 불구하고 그 안전성이나 환경에의 영향 등에 관하여 많은 염려와 관심을 모으고 있습니다. 우리나라를 비롯한 여러나라에서 유전자변형작물(식품)의 표시제에 대하여 검토하고 있으며 입법이 진행되어 머지 않은 시기에 표시제가 실시될 것으로 예상되고 있습니다. 한편 식품제조사나 일반 소비자도 정확한 정보를 제공하고 정확히 알고 선택하므로서 합리적인 유전자변형식품을 이용할 수 있도록 하자는 분위기가 형성되어 가고 있습니다.

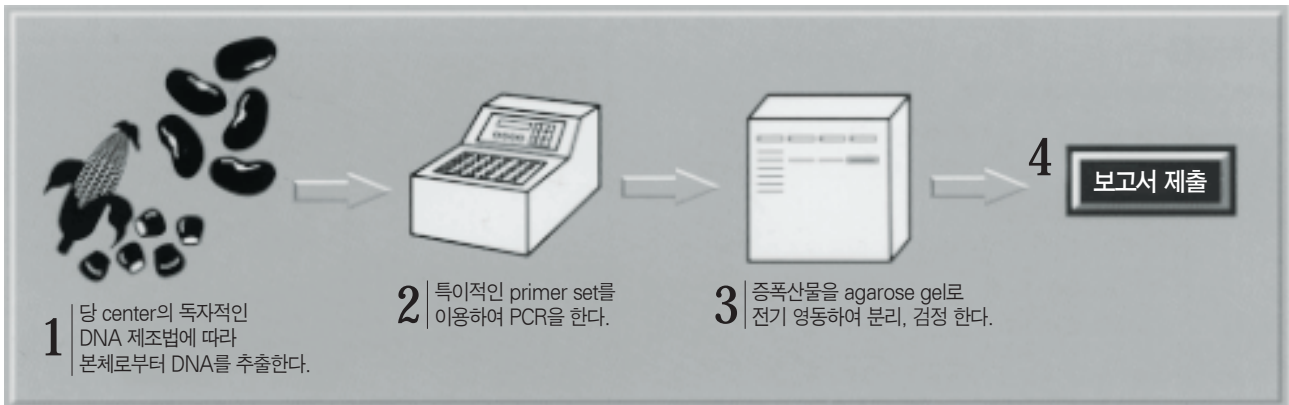
당사는 이와 같은 시대적 요구에 부응하여 유전자 변형작물이나 가공식품을 첨단 기술로 정확하게 분석 검사하므로써 신뢰의 결과를 제공합니다.

1. 표준 정성검사

유전자 변형 콩, 옥수수 또는 그 가공물(식품)이 유전자 변형작물을 함유하는지, 그 유무를 판별하는 것으로 당 센터 독자의 자동화 방법으로 DNA를 조제하여 Multiplex PCR의 방법으로 검정합니다.

콩, 옥수수 등의 원형을 유지하고 있는 검체라면 한알에서도 검출할 수 있습니다. PCR 검정의 정도는 검체중에 5% 이상의 유전자 변형 작물이 존재하면 검정할 수 있습니다.

■ 표준 검정예



■ 검체 취급

콩 혹은 옥수수 검체를 의뢰하는 경우, 1 검체의 검사를 위해 작물원형을 가지고 있는 콩과 옥수수 낱알을 최대 20 g까지 준비합니다. 21 g 이상의 검체에 대해서는 복수검체로 취급합니다.

■ 검사대상

대 두 : 콩, 두부, 튀김류, 고야두부 등
(검정 불가능 품목: 된장, 간장, 기름, 청국장 등)

옥수수 : 옥수수 알맹이
(검정 불가능 품목 : corn starch 등)

(주)가공식품의 경우 검체의 상태에 따라 검정이 불가능 할 수도 있습니다.

■ 해석결과에 대하여

PCR 산물의 전기영동 사진과 최종 보고서를 제공합니다.

■ 시료에 대하여

시료 준비 후 당사 또는 전문대리점으로 연락을 주시기 바랍니다.

■ 기타

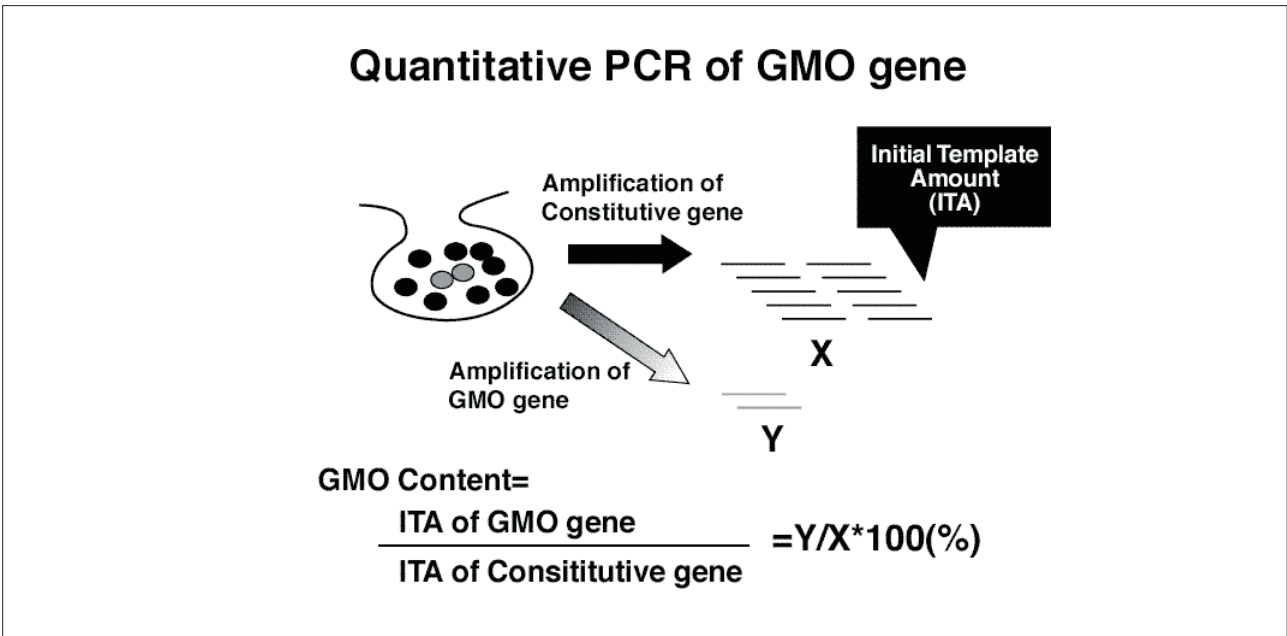
콩, 옥수수가 아닌 다른 유전자 조합된 작물에 대해서는 별도의 서술을 상세히 해주시기 바랍니다. 또 PCR로 얻은 산물을 제한 효소로 절단하고 direct sequencing으로 검사를 하는 것도 가능합니다. 이런 경우는 별도의 비용이 추가됩니다.

2. 정량검사

유전자 변형작물의 혼입정도를 TaqMan Chemistry법을 이용한 Real Time PCR법으로 정량하여 1%이내의 극히 낮은 정도의 혼입도 검출할 수 있습니다.

정성 검사만으로는 극소량의 유전자 변형작물이 비의도적으로 혼입(유통과정중 또는 관리상의 오류로)되더라도 GMO로 잘못된 판정을 내릴 수 있으므로 정확한 정량으로 GMO의 함량을 산출할 필요가 있습니다. 당사의 독자 기술은 0.01%의 GMO도 검출할 수 있으며, 1%의 GMO가 함유되어 있는 경우 0.5%에서 2%의 범위로 검출할 수 있습니다.

■ GMO 유전자의 정량 PCR



■ Quantitative PCR test를 이용한 Soybean의 결과

GMO contents	Control	Target	Target/Control	Average	Stav	CV(%)
1%	1.98E+0.1	2.02E-0.1	1.1%	0.9%	0.001281	14.0%
	1.35E+0.1	1.30E-0.1	1.0%			
	3.57E+0.1	2.67E-0.1	0.7%			
	1.77E+0.1	1.46E-0.1	0.8%			
10%	2.04E+0.1	1.90E+0.0	9.3%	9.2%	0.00952	10.3%
	1.92E+0.1	2.04E+0.0	10.6%			
	1.84E+0.1	1.78E+0.0	9.7%			
	1.80E+0.1	1.32E+0.0	7.3%			
20%	2.70E+0.1	3.44E+0.0	12.7%	16.7%	0.04241	25.4%
	2.07E+0.1	4.09E+0.0	19.8%			
	1.56E+0.1	3.46E+0.0	22.2%			
	1.88E+0.1	2.30E+0.0	12.2%			
50%	2.74E+0.1	1.27E+0.1	46.4%	45.5%	0.0364	8.0%
	1.45E+0.1	6.79E+0.0	46.8%			
	1.69E+0.1	6.46E+0.0	38.2%			
	2.41E+0.1	1.22E+0.1	50.6%			
100%	1.10E+0.1	10.5E+0.1	95.5%	101.7%	0.0596	5.9%
	1.49E+0.1	1.58E+0.1	106.0%			
	2.37E+0.1	2.59E+0.1	109.3%			
	1.26E+0.1	1.21E+0.1	96.0%			

Q1 PCR에서 inosine(dITP)가 포함된 primer를 사용할 수 있는지?

A1 3' → 5' exonuclease 활성를 가진 *Taq* (TaKaRa *Ex Taq*TM, TaKaRa *LA Taq*, TaKaRa *Z-Taq*TM, *Pyrobest*[®] DNA polymerase)를 사용하는 경우, dITP함유 primer를 사용하면 반응성은 현저히 떨어집니다. Primer에 dITP가 들어간 경우에는 TaKaRa *Taq*TM (TaKaRa code R001A/B/C)를 사용해 주세요.

Q2 형광검출용 Differential Display Kit의 형광표식 primer의 파장은?

A2 Fluorescein version (TaKaRa Code 6625)의 여기파장은 495 nm, 형광파장은 535 nm이고, Rhodamine version (TaKaRa Code 6626)의 여기파장은 580 nm, 형광파장은 605 nm 입니다.

Q3 pET System으로 막단백질을 발현하고자 할 때는 어떤 vector를 사용하면 좋을까요?

A3 대부분의 pET vector를 사용할 수 있습니다. 단 막단백질은 소수성이 강한 영역을 가지므로, periplasm에 분비 발현할 수 있는 vector (pET12, pET20, pET22)를 사용할 경우 단백질 막에 유입할 때 Signal Sequence에서의 절단이 일어나기 어렵습니다. 따라서, periplasm 영역에 분비발현 하는 vector는 사용하지 않습니다.

Q4 *In situ* Apoptosis Detection Kit (TaKaRa Code MK500)에서 배양세포를 사용할 경우,

A4 배양 반응액의 침투를 좋게 할 수 있는 방법은? Permeabilization Buffer에 의한 침투단계 전에 -20 °C 70% EtOH속에서 30분이상 두시면 침투성이 좋아 집니다.

Q5 20 bp DNA Ladder (TaKaRa Code 3409 A/B)는 변성 polyacrylamide gel에서도 사용할 수

A5 있을까요?

변성 polyacrylamide gel에서는 DNA가 단일 가닥으로 존재하기 때문에, 두가닥일때는 이동도가 달라집니다. 이런 경향은 짧은 DNA일 경우 일어나기 쉽고, 염기 조성의 차이 등에 의해 band가 됩니다. 그러므로 20 bp DNA ladder의 경우는 변성 polyacrylamide gel에서 사용하기 힘듭니다. 한편 agarose gel로 전기영동 할 경우에는 3 ~ 4 % NuSieve 3:1 Agarose로 8V/cm 조건에서 1-2시간 영동해 주세요.

Q6 BioWhittaker사의 정상 사람 표피각화세포 (Keratinocyte)의 전용 기본배지 (KBM[®]-2) (TaKaRa Code B3103)에 들어있는 CaCl₂의 농도는?

A6 Keratinocyte 전용 기본배지의 CaCl₂의 농도는 0.15 mM입니다. Keratinocyte의 분화는 Ca의 농도에 영향을 받으므로 Ca의 농도가 아주 중요합니다. CaCl₂의 농도를 변경하시려면 Ca free 기본배지 (KBM w/o Ca⁺⁺) (TaKaRa Code B3104)를 사용해 주시기 바랍니다.

Q7 *Trans IT*[®] 로 transfection할 때의 세포 농도는?

A7 기본적으로 40~70% confluent 한 상태인 1~3 × 10⁶개의 cell을 1회 transfection에 사용합니다. 세포의 종류에 따라 transfection 효율이 다릅니다.

Transfection 효율은 세포의 증식단계나 계대횟수에도 영향을 받으므로 최적의 조건을 monitor한 후 사용하여 주세요.

NEW

종래엔 곤란하였던 세포독성 유전자 삽입 제조합 아데노바이러스의 제작이 가능!

Adenovirus Cre/loxP Kit

(본지 2~4 페이지 참조)

TaKaRa Code 6151 1 Kit (5회용)

NEW

Adenovirus Cre/loxP - Regulated Expression Vector Set

(본지 2~4 페이지 참조)

TaKaRa Code 6152 1 Set

본 제품은 Adenovirus Expression Vector Kit(TaKaRa Code 6150)과 Adenovirus Cre/LoxP Kit(TaKaRa Code 6151)의 set이다.

NEW

Mouse 생체 내세포용 유전자 도입시약

Trans IT[®] In Vivo Gene Delivery System

(본지 23 페이지 참조)

TaKaRa Code V5125 25 injections

PanVera사의 제품입니다

NEW

갈색 지방세포의 조제가 용이!

Rat 갈색 지방세포 배양배지 Kit 및 Rat 갈색 지방세포 전용배지 set

(본지 24 페이지 참조)

Rat 갈색 지방세포 배양배지 Kit

TaKaRa Code MK422 1 Kit 근일발매

Rat 갈색 지방세포 배양배지 Set

TaKaRa Code MK423 1 Set 근일발매

NEW

Candida albicans 유래 항원 및 항체

(본지 25 페이지 참조)

Candida albicans 유래항원

세포벽 Type A Mannan

TaKaRa Code MG001 5 mg

분비성 산성 Protease(SAP2)

TaKaRa Code MG002 0.2 mg

Mn형 Superoxide Dismutase(Mn-SOD)

TaKaRa Code MG003 0.1 mg

항체

항 SAP2 monoclonal antibody

TaKaRa Code M166 0.2 ml

항 SAP2 rabbit polyclonal antibody

TaKaRa Code M167 0.2 ml

항 Mn-SOD rabbit polyclonal antibody

TaKaRa Code M168 0.2 ml

NEW

FP Screen-for-Competitors Kit, ER-β High Sensitivity

TaKaRa Code MK900 1 Kit (300회)

내용 :

1. ES1-ER (β) Complex Solution 1.1 ml \times 18 tubes
2. Standard (17 β -Estradiol) Solution 50 μ l \times 8 tubes
각 tube마다 농도가 다름 (50 mM, 5 mM, 500 μ M, 50 μ M, 500 nM, 50 nM, 5 nM 각 1개)
3. ES1 Solution 110 μ l \times 5 tubes
4. Screening Buffer 30 ml

본 제품은 형광편광도 측정 시스템 Full-Range BEACON[®] 2000을 사용하여 estrogen과 estrogen competitor를 방사성 물질을 사용하지 않고 screening하기 위한 kit이다. Estrogen receptor β 와 결합하는 신규화합물의 동정이나 내분비 교란물질 (환경호르몬)의 *in vitro* 연구에 유용하다.

NEW

Human IL항체 시리즈

항 human IL-1 β mouse monoclonal 항체 clone 54E12	
TaKaRa Code ME001	1.0 mg
항 human IL-1 β mouse monoclonal 항체 clone 11C5	
TaKaRa Code ME002	1.0 mg
Biotin화 항 human IL-1 β mouse monoclonal 항체 clone 11C5	
TaKaRa Code ME003	0.5 mg
항 human IL-3 mouse monoclonal 항체 clone 8A12	
TaKaRa Code ME004	1.0 mg
항 human IL-3 mouse monoclonal 항체 clone 30H12	
TaKaRa Code ME005	1.0 mg
Biotin화 항 human IL-3 mouse monoclonal 항체 clone 30H12	
TaKaRa Code ME006	0.5 mg
항 human IL-6 mouse monoclonal 항체 clone 2A10	
TaKaRa Code ME007	1.0 mg
Biotin화 항 human IL-6 mouse monoclonal 항체 clone 2A10	
TaKaRa Code ME008	0.5 mg
항 human IL-6 mouse monoclonal 항체 clone 57F2	
TaKaRa Code ME009	1.0 mg

NEW

Human recombinant protein Estrogen Receptor- β 1, rHuman

TaKaRa Code V2718 750 pmol

PanVera사의 제품입니다

본 제품은 PanVera사의 Estrogen Receptor(β), rHuman (V2466, V2504)의 N 말단에 53 개의 아미노산을 부가한 완전 길이의 Estrogen Receptor- β 로, 재조합 baculovirus를 감염한 곤충세포에서 조제한 것이다. 59.2 kDa의 호르몬 유도성 전사 인자로 이것의 DNA binding domain은 Estrogen Receptor- α 와 상당히 높은 상동성을 가진다.

NEW

전자 Fingerprinting을 이용한 자동세균 검출장치

RhiboPrinter[®] System

TaKaRa Code DP100 1대

RhiboPrinter[®] 전용시약

RhiboPrinter[®] System Sample Preparation Pack

TaKaRa Code DP001

RhiboPrinter[®] System *EcoR* I Batch Kit

TaKaRa Code DP002

RhiboPrinter[®] System *Pst* I Batch Kit

TaKaRa Code DP003

RhiboPrinter[®] System *Pvu* II Batch Kit

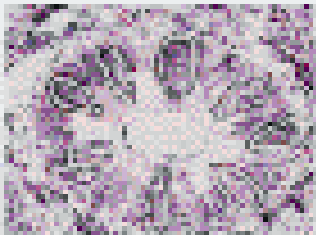
TaKaRa Code DP004

Qualicon사의 제품입니다

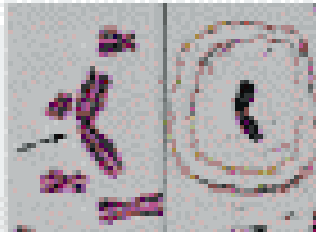
P L A M[®] Robot-MicroBeam

the state of the art laser system for non-contact
microsurgery, microdissection and microinjection

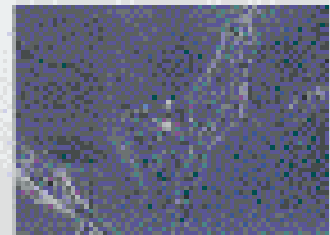
Preparation of single cells



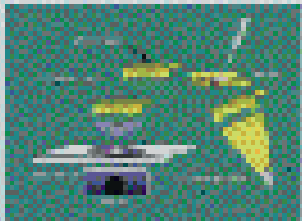
Isolation of chromosomes



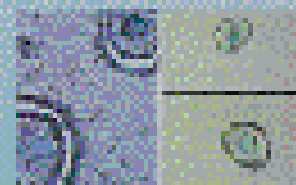
Microinjection into living cells



Principle of laser
pressure catapulting

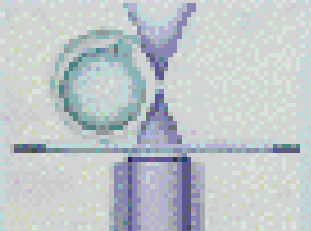


Preparation of cell clusters

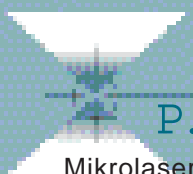
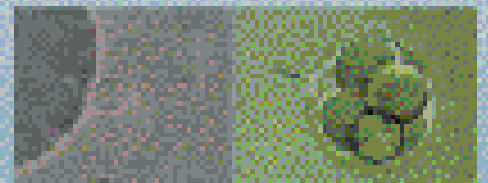


Single cell preparation from
cervical mucus smear
(prenatal diagnosis)

Principle of
laser zona drilling



Extrusion of polar body, laser zona
drilling to assist embryo hatching



P.A.L.M.

Mikrolaser Technologie

(주) 비엠 퍼시픽

Tel : (02)578-1302~4

Fax : (02)578-1305

Homepage : www.bmpacific.com

e-mail : info@bmpacific.com

메디컬 사이언스
함유물질 'U-Fucoidan'의 Super Power

「다시마 드링크」로 암을 잡는다?

일본에서 다시마 섭취량이 가장 많은 오키나와현은 암 사망율이 일본에서 가장 낮다. 다시마에는 암세포에만 자살(Apoptosis)을 촉진하는 물질인 「U-Fucoidan」이 함유되어 있다.

다시마는 깊이 5~7 m의 해저에서 생장하며, 길이가 긴 것은 10 m가 넘는다.

다시마는 건강에 기쁨을 주는 바다의 선물

일본에서 다시마는 경사스러운 일에 빠지지 않는 길조의 음식이다. 어렸을 때 어머니께서는 '배 속을 깨끗하게 하니까', '머리카락이 검어지니까 먹어라'라고 하셨다. 옛날부터 다시마는 몸에 좋은 대표적인 음식이었다.

그런데 '무엇이 좋은가?' 라는 질문에는 대답하기 어렵다. 대답을 얻지 못한다고 한다면 먹고 싶지 않다. 현대사회에서 구전을 운운하는 것으로는 사람들이 납득하지 않는다. 그래서 다시마의 정체 해명에 성공한 기업을 소개하고자 한다.

Takara Shuzo Co., Ltd.의 바이오 연구소가 바로 그곳이다. 이 연구소는 다시마의 정체는 물론, 다시마에 함유된 성분이 「암세포의 자살」을 유도하는 것까지 발견했다. 1996년 6월의 일이다. 그리고 1997년 1월에는 그 성분을 함유한 건강 음료를 발매하였다. 장래에는 의약품으로 개발하고자 연구를 계속하고 있다고 한다.

우선은 왜 다시마에 착안을 한 것인가를 바이오 연구소의 가토 이쿠노신 소장에게 물어 보았다.

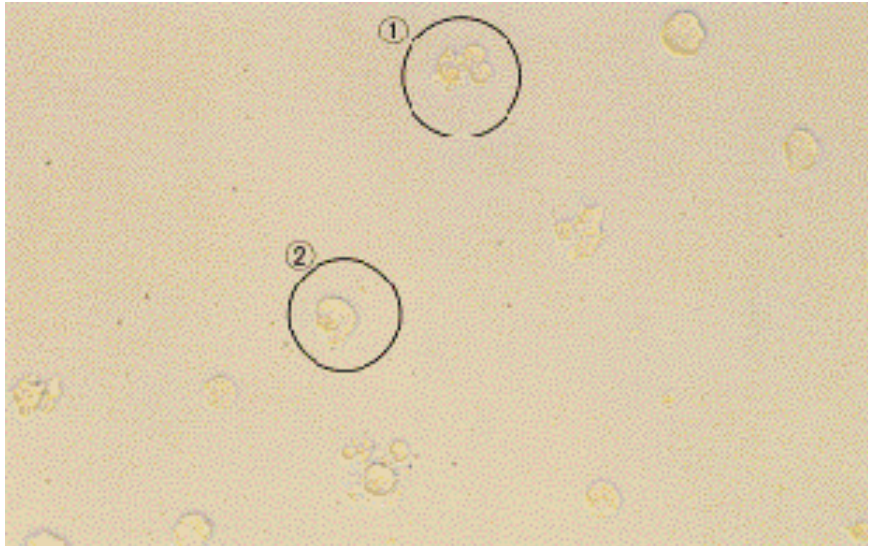
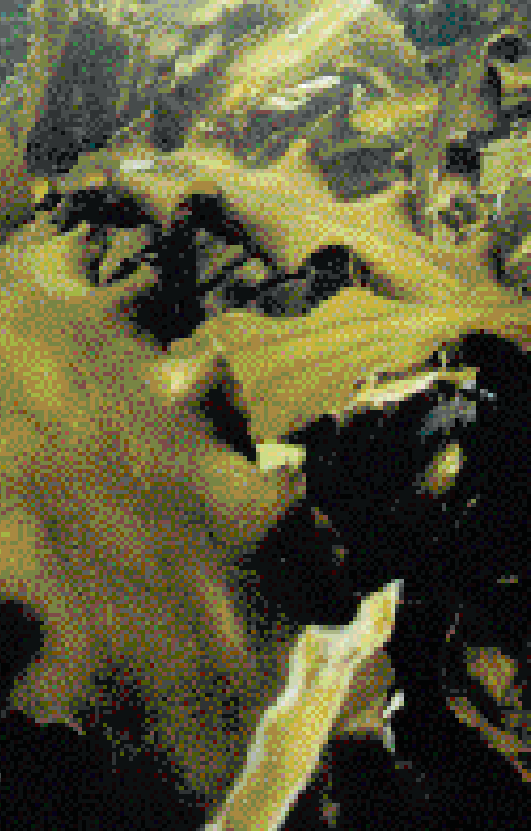
“실은 바이오 연구에서 무엇보다도 뒤져있는 것이 다시마의 주성분인 『糖』(설탕 등을 포함한 탄수화물의 총칭)의 분

야였습니다. 그 중에서도 해조에 함유되어 있는 『Fucoidan』이라고 하는 당에는 옛날부터 수정 저해작용이나 콜레스테롤 저하작용, 항종양작용 등 기묘한 보고가 있어 많은 연구자들이 흥미를 가지고 있었습니다. 그러나 Fucoidan의 구조는 너무 복잡하여 해명할 수가 없었습니다. 순수한 샘플도 입수되지 않아 실험 조차도 불가능한 일이었습니다. 그렇다면 도전을 해보자라는 생각으로 10여년 전부터 연구를 시작하였습니다.”

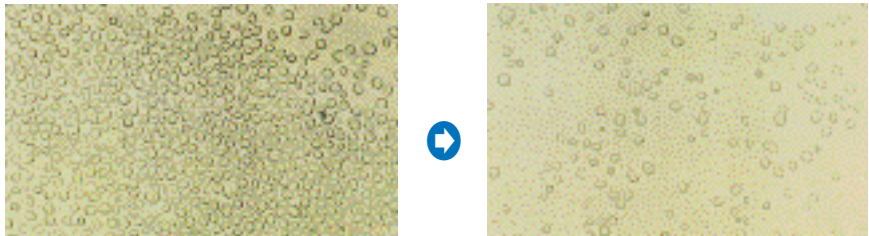
Fucoidan이라고 하는 것은 몇 종류의 단당(더 이상 분해할 수 없는 당류)이 줄어들어 늘어진 매우 복잡한 고분자의 「다당」이다. 우선은 이 복잡하게 얽혀 있었

U-Fucoidan이 암세포를 사멸시킨다!!

· 사진제공: TaKaRa Shuzo Co., Ltd. 바이오연구소



①은 전형적인 Apoptosis(세포자살, 아포토시스)를 일으킨 암세포. ②는 Apoptosis를 일으키고 있는 암세포이다.



백혈병 세포(左)에 U-Fucoidan 1mg을 첨가한 후 48시간 경과(右). 백혈병 세포가 감소했다.



쥐의 암세포. 위의 세포는 비교용, 아래의 세포는 U-Fucoidan을 첨가한 것. 종양이 작아졌다.

던 다당의 시슬을 푸는 것부터 시작하지 않으면 안되었다.

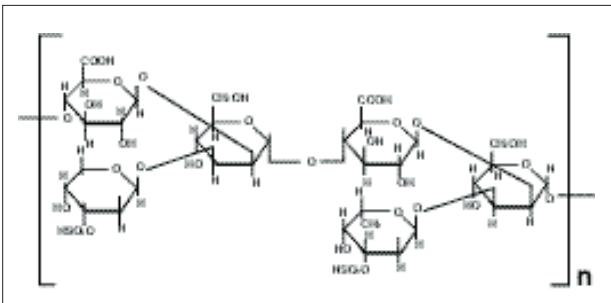
“저희들은 10년에 걸쳐서 망(網)과 같이 얽혀져 있는 당의 성분을 하나하나 상세하게 분석해 나갔습니다. 크기별로 분리하거나 물질마다 형광물질로 표시하기도 해서 정말 여러가지 방법으로 다

당의 성분을 걸러내었습니다.” (가또 이꾸노신 연구소장)

10년간의 연구의 성과

우선 첫번째 성과는 Fucoidan은 구조적으로 F-와 U-의 2종류가 있다는 것이

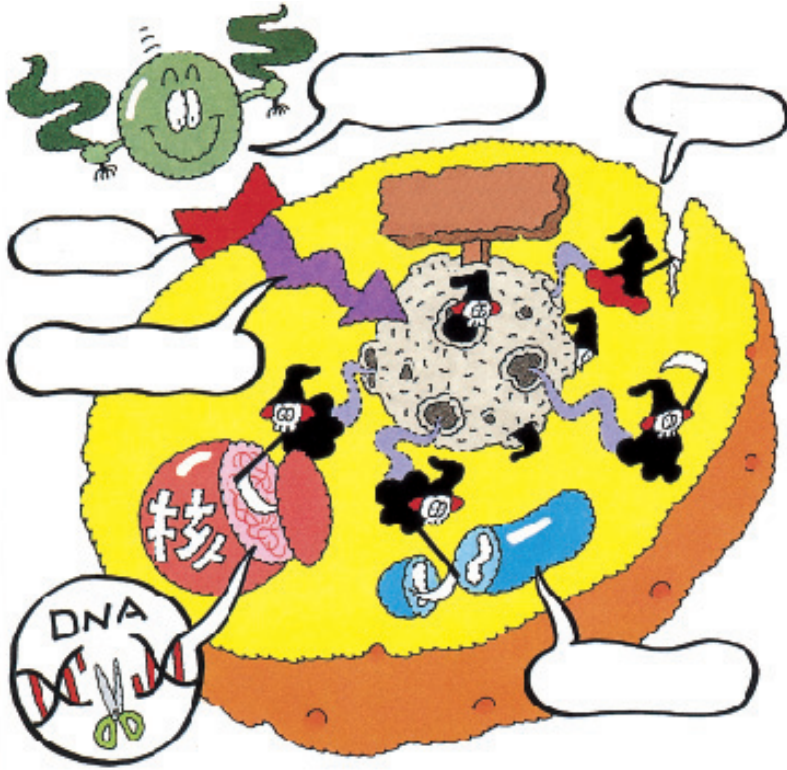
었다. 암세포를 죽게 하는 것은 그 중 「U-Fucoidan」이다. Fucoidan의 구조는 주로 맛을 내는 성분인 「Glucuronic acid」와 「Mannose」, 「Fucose」라고 불리는 단당이 반복 나열되어 있는 것이다. 다시마에서 추출한 천연의 U-Fucoidan을 1l 당 1g 농도로 녹여 결장암 세포 약 1만개를 넣은 petri dish에 주입한다. 그 결과 24시간 후에 암세포는 반으로 줄고, 72시간 후에는 거의 사멸하였다고 한다. 그것도 그 과정에서는 암세포의 DNA가 세포 자신의 DNA 분해 효소에 의해 절단되어 세포가 '차살'하는 「Apoptosis(아포토시스)」 현상이 일어났다.



당생물공학으로 확인한 구조식

Fucoidan은 SO₃를 함유하고 있는 황산화 다당류의 한 종류로 분자량은 20만 이상

U-Fucoidan이 세포의 「자살 스위치」를 누른다.

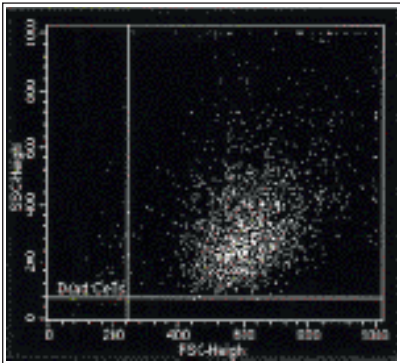


▲ 다시마 드링크의 원료인 가고메 다시마. 홋카이도産은 하꼬다테(函館)와 무로란(室蘭)이라는 곳의 해안지역에서 채취되며, U-Fucoidan의 함유량이 많다.

▼U-Fucoidan의 순수 표본. 상어 지느러미와 같은 은백색. 이것이 암을 파괴하는 힘의 근원이다.

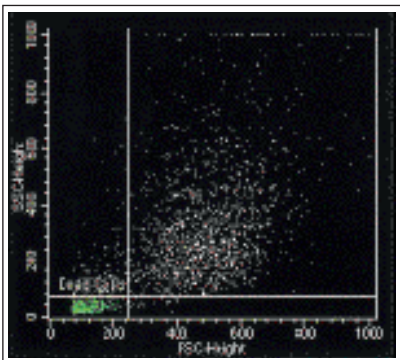


◀ 건강음료 「APOIDAN-U」. Apoptosis와 Fucoidan을 조합해서 명명한 것이다.

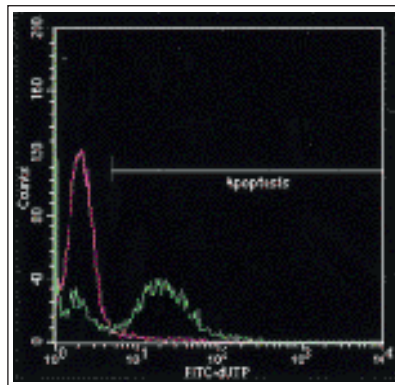


Apoptosis(세포의 자살)는 원래 세포가 갖고 있는 메카니즘으로 독물이나 물리적 손상에 의한 과사와는 전혀 다른 현상. 세포 표면으로부터의 신호에 의하여 핵이 단편화되어 세포가 사멸한다.

U-Fucoidan 첨가 전(붉은 선)과 첨가 후(녹색 선). 횡축은 Apoptosis로 세포가 파괴되어 밖으로 나온 DNA의 양. 종축은 세포수. 첨가 후는 자살한 세포의 DNA가 다량으로 나와 있다.



U-Fucoidan 첨가 전(위)과 첨가 후(아래). 세포가 Apoptosis를 일으키면 크기(횡축)도 밀도(종축)도 작아지나, 첨가 후는 자살을 일으킨 세포(녹색 점)가 첨가 전보다 증가하고 있다.
*자료제공 : Takara Shuzo Co., Ltd. 바이오 연구소



Apoptosis라고 하는 것은 생체에 있어서 불필요한 세포를 제거하기 위한 메카니즘의 하나로, 예를 들면 나무가 겨울에 스스로 낙엽을 떨어뜨려 가능한 한 적은 에너지로 겨울을 날 수 있도록 하

는 것도 Apoptosis이다.

“반대로 U-Fucoidan을 주입하지 않았던 경우는 암세포가 72시간 후에는 약 10만개로 증가하였습니다. 또한 골수성 백혈병 세포나 위암세포의 실험에서도 같은 결과가 나왔습니다. 무엇보다도 정상세포에 대해서는 Apoptosis 현상이 일어나지 않아 아무런 영향도 미치지 않는 것이 특징입니다.” (가포 이꾸노신 연구소장)

U-Fucoidan이 암에 효과가 있다는 것을 알았다. 그렇다면 U-Fucoidan의 무엇이, 어떻게 암세포의 자살을 유도하는 것일까? 실은 이것이 제2의 대발견이 되었다.

“저희들은 U-Fucoidan을 더욱 더 분해해서 어느 물질이 암에 효과를 나타내고 있는 것인가를 실험해 나갔습니다.

당초 주성분인, 앞에서 언급한 3종류의 당이 주역이라고 생각하고 있었습니다만 전혀 틀린 예상이었습니다. 길고 긴 3개의 당의 시슬이 전혀 활성을 보이지 않고, 그 시슬의 끝에 붙어 있던 작은 물질이 암세포의 자살을 유도했습니다. 결국, 제3의 물질을 정확하게 알아 낼 수가 있었으며, 그것도 이 물질은 다시마뿐 만 아니라 다른 식물에도 있는 것이었습니다. 단지 다시마에는 그것이 아주 풍부하게 함유되어 있기 때문에 몸에 좋은 것은 확실합니다.” (가또 이꾸노신 연구소장)

**우려 낸 국물이 아닌
'다시마'를 먹어야 한다.**

주변에서 쉽게 구할 수 있는 다시마의 효능을 식탁에도 올리고 싶다. 먹는 방법에 대해서 가또 이꾸노신 연구소장에게 물어 보았다.

“우선, 저희들이 사용하고 있는 것은 『가고메 다시마』라고 하는 다시마입니다. 여러 종류의 다시마 중에서도 압도적으로 많은 U-Fucoidan을 함유하고 있습니다. 가고메 다시마를 분쇄하여 탱크에 넣고 95℃의 열탕에서 약 3시간을 삶아서 U-Fucoidan을 추출합니다.” (가또 이꾸노신 연구소장)

사단법인 일본 다시마협회의 모리이 요시이쿠에 의하면 가고메 다시마의 주산지는 홋카이도(北海道)의 하코다테(函館)와 무로란(室蘭)의 해안지역으로, 주로 실 같이 얇게 하거나, 소금 뿌린 다시마, 조림 등의 재료로 사용된다고 한다.

“국물을 우려내는 정도로는 안돼요. 보통의 방법, 결국 끓어 오르기 직전에 꺼내서 너무 익히지 않는 것은 유효성분을 전혀 섭취할 수 없습니다. 다시마로 그대로 먹지 않으면 그 효과를 얻을 수 없습니다.” (가또 이꾸노신 연구소장)

그렇게 말하고 가또 이꾸노신 연구소장은 자료를 하나 꺼냈다. 일본의 행정 구역 단위별 다시마 구입금액과 구입량

의 통계자료였다.

“다시마의 소비량이 가장 많은 곳은 토야마市, 다음이 나하시市이지요. 그러면 행정구역 단위별 압에 의한 사망률을 봐 주십시오. 오키나와현이 가장 적고, 토야마현은 오히려 나쁜 쪽에 가까운데, 이것은 잘못된 섭취방법이 원인이라고 생각됩니다. 토야마에서는 다시마를 우려낸 국물을 마시나 오키나와에서는 다시마를 먹고 있기 때문입니다.” (가또 이꾸노신 연구소장)

그리고 보니 오키나와에서는 다시마가 채취되지 않음에도 불구하고 시장에 가면 많은 양의 다시마를 팔고 있었다. 여자영양대학 출판부의 『일본 제일의 장수지역 오키나와에서 배우는 건강 장수식』에 의하면 오키나와의 다시마 구입량은 1년간 전국 평균치의 1.5배이다. 건조 보존식품인 다시마가 더운 오키나와 풍토에 잘 어울려 태풍이 올 때의 비상 식으로도 귀하게 여겨졌던 역사를 가지고 있다. 그러나 역시 뉘니뉘니 해도 중요한 것은 맛이다. 채 썰은 다시마를 기

름으로 볶고, 돼지고기와 같이 찐 「쿠부(다시마) 이리치」를 비롯하여, 다시마와 돼지고기의 음식궁합은 맛, 영양가 모두 우수하다.

또한 가고메 다시마 등의 다시마류에 U-Fucoidan을 많이 함유하는 해조는 무엇이 있는지 가또 이꾸노신 연구소장에게 물어 보았다. 미역, 큰실말, 녹미채라고 한다. 모두 오키나와의 일상적인 요리의 재료이다. 오키나와의 식생활 실태 조사에서는 다시마, 큰실말, 녹미채 등의 해조를 일주일에 1~3번, 또는 그 이상 먹고 있다는 보고도 있다.

바로 의식동원(醫食同源)을 항상 실천하고 있는 바다 민족의 지혜라 할 수 있다. 단지 과식하면 요오드가 과다 섭취되어 몸에 좋지 않다.

Takara에서 발매한 바이오음료 「APOIDAN-U」는 요오드를 제거하였다고 한다. 「APOIDAN-U」 1병에는 가고메 다시마(생것) 15 × 70 cm에 상당하는 양이 들어 있으며, U-Fucoidan도 듬뿍 함유되어 있다.

