

IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0

— 대장균 DNA Chip 소개 —

IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0

TaKaRa Code X003

(근일발매)

TaKaRa는 7종류의 IntelliGene™ 시리즈의 line-up으로서 금번 대장균 단백질의 coding region DNA(Open Reading Frame : ORF)를 DNA Chip화 하여 발매할 예정이다. 본 고에서는 제품의 개요와 이를 이용한 실험례를 소개한다.

■ 대장균

대장균의 genome 연구는 1987년 Ohara의 물리 지도 작성과 clone의 제작¹⁾으로 시작하여 1989년에 sequencing project가 개시²⁻³⁾되었고, 1997년에는 전체 염기서열이 결정되었다.⁴⁾ 또 1999년 Nara 첨단과학기술대학원·유전자교육연구센터 생체정보팀의 Mori 교수진은 Archive plasmid vector⁵⁾에 대장균 K12 W3110주의 전체 ORF를 clone화 하였다. 전체 염기수는 4,641,445 bp이며 추정되는 ORF의 수는 transposon 등의 중복되는 부분을 제외하였을 때 약 4,300개이다. 그러나 연구가 아주 많이 이루어져 있는 대장균일지라도 예측 ORF의 거의 반수에 해당하는 약 2,000개 ORF의 기능은 미해석 상태이고 특히 전체중 1/4의 ORF는 기능의 유추조차 불가능하다. 표 1에 예측 ORF의 기능 분류를 나타내었다.

표 1 대장균의 예측 ORF의 기능 분류

기능	ORF수	비율(%)
Transport/Binding proteins	366	8
Energy metabolism	363	8
Cell envelope	307	7
Outer membrane	188	5
Translation	160	4
Central intermediary metabolism	158	4
Biosynthesis of cofactors, prosthetic group, carriers	129	3
Amino acid biosynthesis	128	3
Nucleotide metabolism	115	3
Regulatory functions	106	2
Cellular processes	106	2
Replication	91	2
Fatty acid/Phospholipid metabolism	61	1
Transcription	49	1
기능 미해석	2,061	47

출처 : 참고 문헌 5)

■ IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0

대장균 K12 W3110주의 ORF가 cloning된 Archive plasmid에서 전체 길이에 해당하는 ORF를 포함하는 DNA 단편을 조제한 후 그 DNA 단편을 정렬·고정화한 DNA chip이다. Version 1.0은 추정 가능한 ORF의 약 94%에 상당하는 4,027 종류의 DNA 단편을 chip으로 고정한 것이다.

그림 1에 IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0의 hybridization 화상을, 그림 2에 slide glass(1×3 inch) 위에 spot한 DNA 단편의 위치를 나타내었다.

또 control로써 아래의 DNA 단편을 spot해 놓아 signal 강도의 보정과 signal cut off 값을 결정할 때 이용할 수 있다.

【Control spot】

• Positive control spot

(대장균 genome DNA 및 어느 정도 발현이 예상되는 유전자의 spot, signal 강도의 보정에 이용 가능):

대장균 유래 DNA 단편(7종류)

<i>E. coli</i> genomic DNA	32 spots
<i>lpp</i> , Major outer membrane lipoprotein	16 spots
<i>ompA</i> , Outer membrane protein	16 spots
<i>hns</i> , DNA-binding protein H-NS	16 spots
<i>prfA</i> , Peptide chain release factor 1	16 spots
<i>adk</i> , Adenylate kinase(EC 2.7.4.3)	16 spots
<i>rplA</i> , Ribosomal protein L1	16 spots

• Negative control spot :

다른 생물에서 유래하는 DNA 단편(3종류)

Human transferrin receptor(TFR 1000)	16 spots
Human β -actin	16 spots
Calf thymus DNA	162 spots

• 기타 control spot

(대장균 rRNA와 cross hybridization한다. Hybridization 조건 검토의 지표로서 이용 가능)

Tomato 25S rRNA	16 spots
-----------------	----------

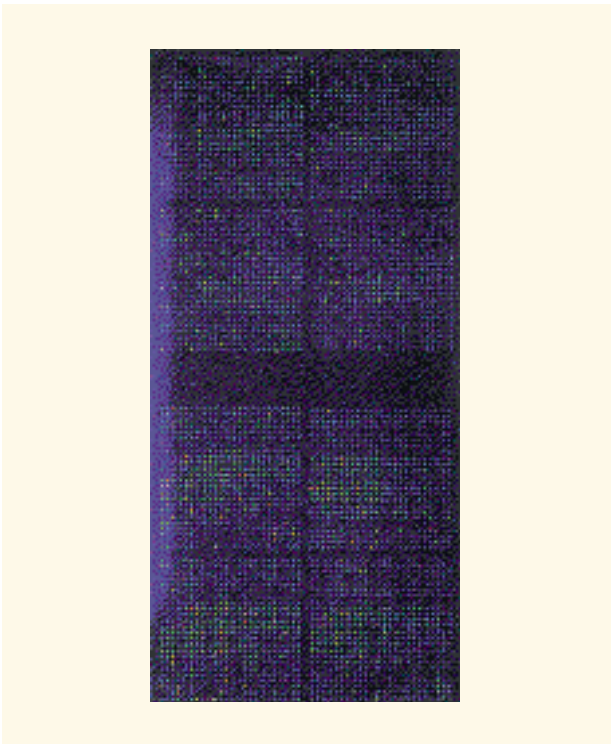


그림 1 IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0

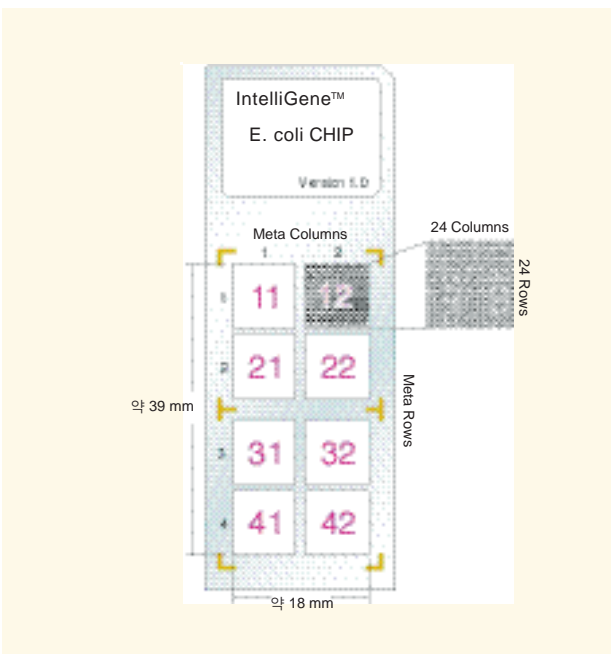


그림 2 Spot한 DNA 단편의 위치

DNA chip상의 spot 위치 정보는 당사의 일본 본사 바이오 홈페이지 (<http://www.takara.co.jp/bio/>)의 「DNA chip 관련」에서 download할 수 있다.

또 각 ORF에 대한 상세한 정보는 Nara 첨단과학기술대학원·유전자 교육연구센터 생체정보의 GenoBase version 2.0 [*Escherichia coli* K-12 W3110] (<http://ecoli.aist-nara.ac.jp/>)를 참조한다.

■ 실험예

대장균 K12주를 LB 배지 및 M9-CAA 배지에 배양하여, IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0을 이용하여 각 균체의 유전자발현을 해석하였다.

【방법】

· 배지 조성

LB 배지(1 l 당):

bacto tryptone 10 g, bacto yeast extract 5 g,
NaCl 10 g (pH7.0)

M9-CAA 배지:

48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl,
19 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂,
50 µg/ml tryptophan, 2.5 µg/ml thiamin,
0.2% casamino acid, 0.2% glucose

· 배양 조건

각 배지 200 ml에 전 배양한 대장균 K12주 1 ml를 접종하고 37°C에서 OD₆₀₀=1까지 진탕배양하였다.

· RNA 추출

취한 5 ml의 배양액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 집균하였다. 액체 질소를 넣은 유발안에서 균체를 파쇄하고 RNeasy Midi Kit(QIAGEN사 제품)을 이용하여 RNA를 정제하였다(최종 용출량 : 700 µl). 700 µl의 RNA 용액을 30 U의 RNase-free DNase I(TaKaRa Code 2215A)로 37°C에서 40분간 처리하고, Phenol/Chloroform 추출 후 에탄올 침전한 뒤 풍건하여 200 µl의 RNase-free H₂O로 용해하였다.

· 형광 표식 반응(표식 probe의 조제)

IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0의 설명서에 따라 M9-CAA배지 및 LB 배지로 배양한 균체에서 정제한 RNA 15 µg을 각각 Cy3™, Cy5™로 역전사 반응으로 표식하였다. 양쪽의 표식 시료를 혼합하여 에탄올 침전, 풍건한 후 20 µl의 hybridization buffer(4× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt's 용액, 0.1 µg/µl denatured salmon sperm DNA)로 용해하였다. 이 용액을 95°C에서 2분간 가열 후 실온에 방치하여 냉각하고, 실온에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 이 상청을 hybridization용 probe 용액으로 사용하였다.

· Hybridization

IntelliGene™ E. coli CHIP Version 1.0에 prehybridization buffer(4× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt's 용액, 1 µg/µl denatured salmon sperm DNA)를 넣어 실온에서 1.5시간 incubation한 후, probe 용액을 넣고 65°C에서 12시간 hybridization하였다.

· 세정

Hybridization 종료 후 DNA chip을 2× SSC, 0.2% SDS 속 에서 65°C, 30분간×2회 세정한 후, 0.05× SSC로, 실온에서 5분간 행군 다음 저속 원심분리하여 수분을 제거하였다.

· Scanning 및 data 해석

Affymetrix® 418 Array Scanner로 scanning하여 얻은 형광 signal을 해석 software ImaGene™ (TaKaRa Code BD001)으로 해석하였다.

【결과】

그림 3에 Cy3™(570 nm), Cy5™(660 nm) 각각의 검출 파장으로 scanning하여 얻은 화상을 나타내었다. 그림 4는 각 검출 화상에 녹색과 적색의 유사색을 붙여 중합시킨 것(False Color Overlay)이다(Adobe Photoshop 5.0 사용). 두 검출 파장에 있어서 negative control(human transferrin receptor 및 human β-actin)의 형광 signal의 평균값 +1 SD 이하의 spot은 무효로 판단하여 그들을 제외한 유효 signal의 중간값(median)을 이용하여 두 화상위의 각 signal의 spot 강도를 보정하였다.

각 spot의 보정 후 Cy3™, Cy5™ 형광 signal 값을 Scatter Plotting한 것을 그림 5에 나타내었다. 그림 5의 적색 실선은 Cy3™와 Cy5™의 signal비가 1:1인 경우에 이론값을 나타낸 것이고, 녹색의 실선은 그들의 비가 2:1 또는 1:2인 경우, 검은 점선은 10:1 또는 1:10인 경우의 이론값을 나타낸 것이다. LB 배지로 배양한 경우와 M9-CAA 배지로 배양한 경우에서 각 유전자의 발현량 차이를 조사해 본 결과 전자의 조건에서 10배 이상의 발현 상승을 나타낸 유전자는 39개, 후자의 조건에서 10배 이상의 발현 상승을 나타낸 유전자는 13개였다(그림 5).

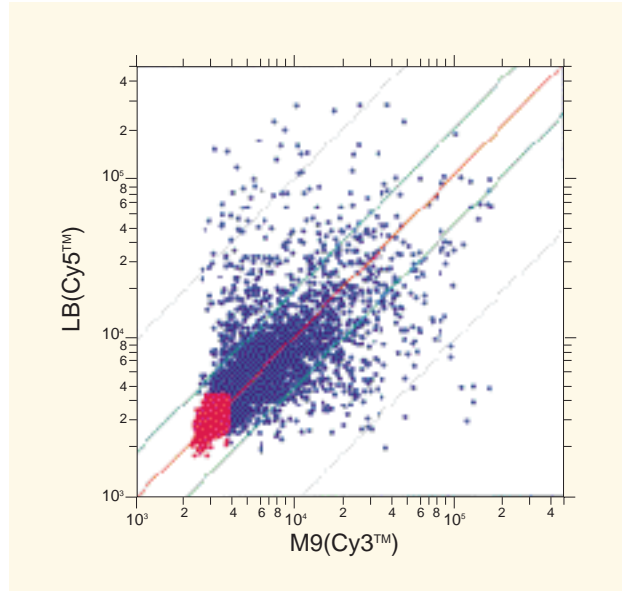


그림 5 Scatter Plot

X축은 Cy3™ signal(M9-CAA 배지 배양균체 유래), Y축은 Cy5™ signal(LB 배지 배양균체 유래)를 나타낸다. 그래프 안의 적색 실선은 Cy3™와 Cy5™의 signal비가 1:1인 경우 이론값의 선을 나타내고 녹색의 실선은 그들의 비가 2:1 또는 1:2인 경우, 검은 점선은 10:1 또는 1:10인 경우의 이론값의 선을 나타낸다. 유효 signal은 청색으로 plot되고, 무효 signal(Negative control signal의 평균치 +1 SD 이하)은 분홍색으로 plot되어 있다.

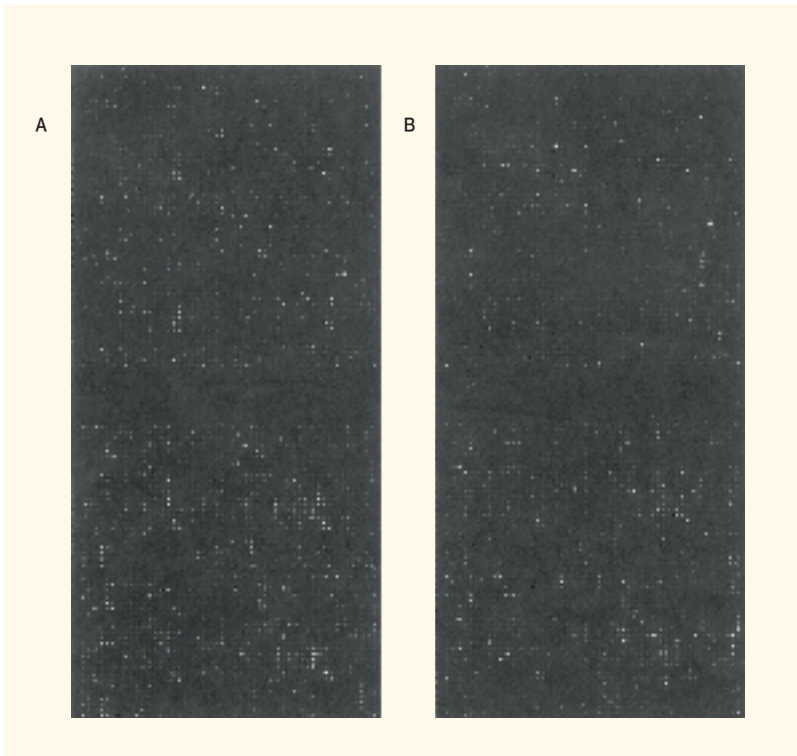


그림 3 Scanning 화상
A : M9-CAA 배지로 배양한 균체의 유전자 발현 pattern(Cy3™ 표시)
B : LB 배지로 배양한 균체의 유전자 발현 pattern(Cy5™ 표시)

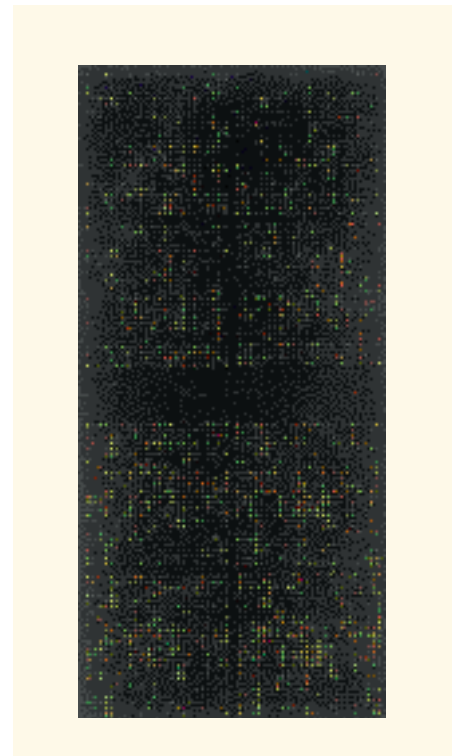



그림 4 2개의 형광 화상(그림 3)의 False Color Overlay
녹색 : M9-CAA 배지 배양균체에서 유래한 signal
적색 : LB 배지 배양균체에서 유래한 signal

■ Adobe Photoshop 5.0을 이용한 False Color Overlay의 작성 방법

Affymetrix® 418 Array Scanner 등으로 해석한 16 bit TIFF 형식의 2종류의 화상을 한쪽은 적색으로, 다른 쪽은 녹색으로 하여 중합함으로써 깨끗한 presentation용 화상을 얻을 수 있다. 그 방법은 아래와 같다.

- ① 중합하고자 하는 2개의 화상(16 bit, TIFF 형식)을 Adobe Photoshop에서 연다.
- ② 「image」 → 「mode」 → 「8 bit/channel」을 선택하여 각각의 화상을 8 bit로 떨어뜨린다.
- ③ 한쪽의 화상에 대해서 「선택 범위」 → 「전체 선택」을 한다.
- ④ 「편집」 → 「복사」를 한다.
- ⑤ 「파일」 → 「신규」에서 「화상 모드 : RGB, 초기내용표시 : 흰색」을 선택하고 중합용 신규 파일을 작성한다.
- ⑥ 작성한 중합용 신규 파일을 가장 앞면으로 표시한 상태에서 「window」 → 「channel을 표시」를 선택하고 channel pallet를 표시한다.
- ⑦ 적색이나 녹색의 channel을 선택하고 「편집」 → 「붙여넣기」로 화면을 붙인다.
- ⑧ 다시 한쪽의 화상을 선택하고 「선택 범위」 → 「전체 선택」, 「편집」 → 「복사」를 한다.
- ⑨ 먼저 작성한 중합 화상의 파일을 window에서 선택하고 channel pallet가 녹색이나 적색(어느 쪽인지 남은 쪽의 색)의 channel에 붙인다.
- ⑩ 중합 화상의 청색 channel을 선택한다.
- ⑪ 「편집」 → 「모두 칠하기(사용 : 검은색, 불투명도 : 100%, 묘화 mode : 보통)」을 한다.
- ⑫ Channel bar의 이 RGB 위치에 표시되도록 클릭한다.
- ⑬ 양쪽의 channel에서 signal이 강하게 나오는 spot을 보고 두개의 화상이 깨끗하게 겹치는지를 확인한다. 어긋나 있으면 한쪽의 channel을 선택하고 tool box의 이동 tool을 사용하여 한쪽의 화상을 이동시켜 깨끗하게 중합한다.
- ⑭ Signal 강도를 보정하는 경우는, 보정하고 싶은 색을 선택하고 「image」 → 「색조 보정」 → 「tone curve」로 출력과 입력의 관계를 변화시킨다.
- ⑮ 완성

【참고문헌】

- 1) Kohara, Y., Akiyama, K. and Isono, K. (1987) *Cell* **50**, 495-508.
- 2) Yura, T., Mori, H., Nagai, H., Nagata, T., Ishihama, A., Fujita, N., Isono, K., Mizobuchi, K. and Nakata, A. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3305-3308.
- 3) Fujita, N., Mori, H., Yura, T. and Ishihama, A. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 1637-1639.
- 4) Blattner, F. R. Plunkett III, c. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Coeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. (1997) *Science* **277**, 1453-1471.
- 5) <http://ecoli.asit-nara.ac.jp/>

■ 관련제품(근일발매)

	제품명	TaKaRa Code	포장량
	CyanoCHIP Version 1.0	X001	10매
	Human Apoptosis CHIP Version 1.1	X101	20매
	Human Cancer CHIP Version 2.0	X102	20매
	Human DNA CHIP for Endocrine Disruption Study Version 1.0	X103	20매
	Arabidopsis CHIP I Version 1.0	X0021	10매
	TestARRAY Version 2.0	X000	20매
	RNA Fluorescence Labeling Core Kit	TX807	10반응
판매중	Label IT® Cy3™ Labeling Kit	V3625	1 kit(25 µg용)
판매중	Label IT® Cy3™ Labeling Kit	V3600	1 kit(100 µg용)
판매중	Label IT® Cy5™ Labeling Kit	V3725	1 kit(25 µg용)
판매중	Label IT® Cy5™ Labeling Kit	V3700	1 kit(100 µg용)
	λ polyA ⁺ RNA-A	TX802	10 µl
	λ Control Template & Primer Mixture-A	TX803	50 PCR 반응

Label IT[®]를 이용한 mRNA 직접 형광 표식 probe의 DNA Chip에 응용

Label IT[®] Cy3[™] Labeling Kit

TaKaRa Code V3625 1 Kit (25 μ g)

TaKaRa Code V3600 1 Kit(100 μ g)

Label IT[®] Cy5[™] Labeling Kit

TaKaRa Code V3725 1 Kit (25 μ g)

TaKaRa Code V3700 1 Kit(100 μ g)

Label IT[®]는 혼합하는 것만으로 핵산을 비효소적으로 표식할 수 있는 one step non-RI 핵산표식용 시약이다. 핵산을 열처리 하지 않고 intact한 상태로 표식 할 수 있어 다양한 hybridization에 이용할 수 있다. 현재 아래의 제품을 판매하고 있다.

- Label IT[®] Rhodamin Labelling Kit (TaKaRa Code V3125, V3100)
- Label IT[®] Fluorescein Labelling Kit (TaKaRa Code V3225, V3200)
- Label IT[®] Digoxin Labelling Kit (TaKaRa Code V3325, V3300)
- Label IT[®] Biotin Labelling Kit (TaKaRa Code V3425, V3400)
- Label IT[®] Cy3[™] Labelling Kit (TaKaRa Code V3625, V3600)
- Label IT[®] Cy5[™] Labelling Kit (TaKaRa Code V3725, V3700)
- Label IT[®] DNP Labelling Kit (TaKaRa Code V3825, V3800)

본 고에서는 Label IT[®] Cy3[™] Labelling Kit와 Label IT[®] Cy5[™] Labelling Kit을 이용하여 mRNA에 직접표식한 probe를 제작하여 DNA Chip 상에서 hybridization한 data를 소개한다.

■ DNA Chip에서의 형광표식

DNA chip을 이용한 유전자 발현해석 실험에서는 2개의 시료에서 추출한 mRNA를 각각 다른 형광물질로 표식하여 chip 상에서 경쟁적으로 hybridization하여 각각의 형광을 scanning함으로써 mRNA의 발현량에 관한 정보를 얻는다. 흔히 사용하는 형광 표식 방법은 역전사효소로 mRNA에서 cDNA를 합성할 때 형광기질 analog(Cy3-dUTP, Cy5-dUTP 등)를 도입하는 것이다. RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)는 이 방법을 이용한 kit로 소량의 형광기질 analog로 고효율의 형광표식 probe를 제작할 수 있다. 다른 형광표식법은 Label IT[®]로 핵산을 직접 표식하는 것이다. 역전사효소를 이용한 형광표식법과 Label IT[®]를 이용한 직접 형광표식법의 개념을 그림 1에, Label IT[®]를 이용한 형광표식 probe의 제작 과정을 그림 2에 나타내었다. 그림 1에서 보는 바와 같이 Label IT[®]를 이용하면 cDNA를 합성할 필요없이 mRNA를 직접 표식할 수 있으므로 조작이 매우 간단하다.

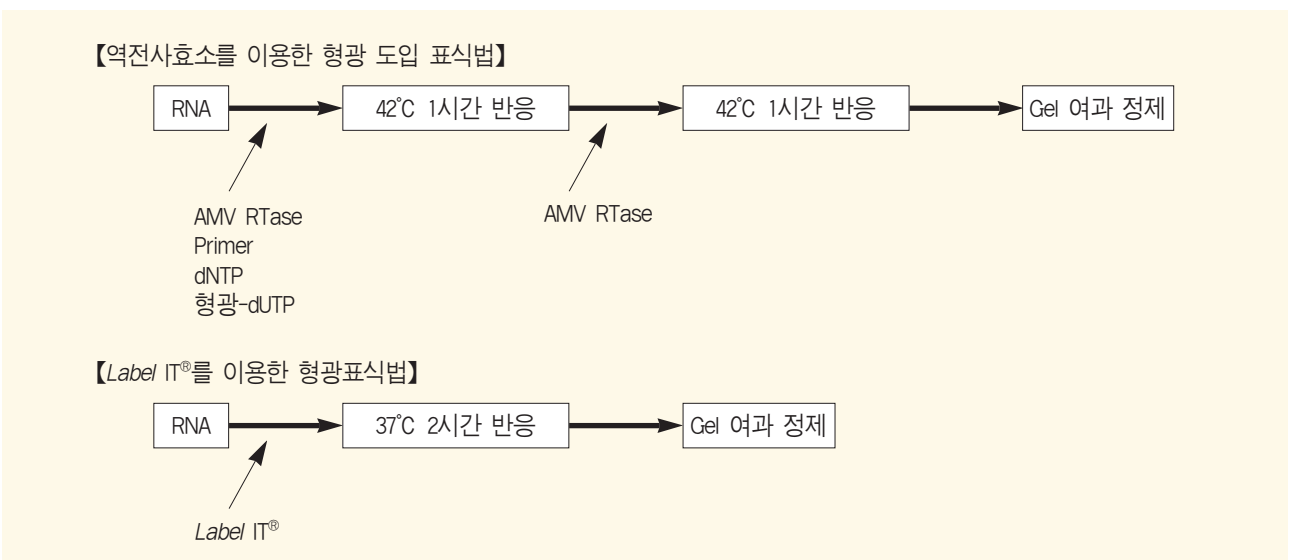


그림 1 역전사효소를 이용한 형광 도입 표식법과 Label IT[®]를 이용한 형광표식법의 개요

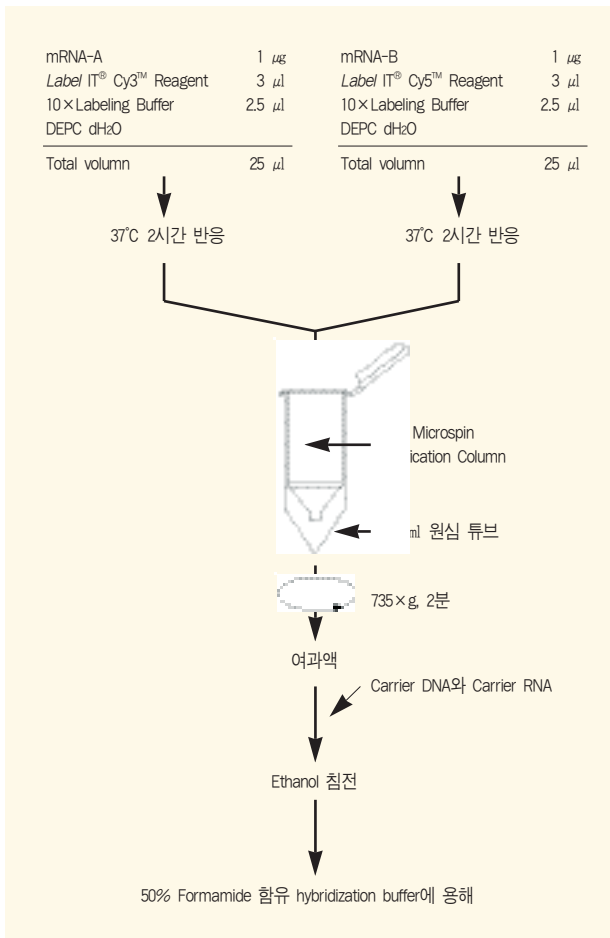


그림 2 Label IT[®]를 이용한 형광표식 probe 제작 과정

■ 실험 1

역전사효소에 의한 형광도입 표식법과 Label IT[®]에 의한 직접형광표식법으로 probe를 제작한 후 DNA chip 실험에 사용하여 유전자의 발현 차이를 조사하였다.

【실험방법】

배양세포 HL60 및 K562에서 실험을 하여 total RNA를 추출한 후 *Oligotex[™]-dT30 (Super)* mRNA Purification Kit을 이용하여 Poly(A)⁺ RNA를 정제하였다. 얻은 Poly(A)⁺ RNA 1 μ g을 이용하여 아래의 두 방법으로 형광표식 probe를 제작하여 DNA chip상에서 hybridization하였다.

1) RNA Fluorescence Labeling Core Kit을 이용하여 각각의 Poly(A)⁺ RNA를 Cy3[™], Cy5[™]로 표식하고 혼합한 후 kit 내에 첨부한 column으로 정제하였다. 정제물에 Carrier(15 μ g Human Cot1 DNA, 8 μ g poly dA 및 10 μ g yeast tRNA)를 첨가하여 ethanol로 침전하고, 10 μ l의 hybridization buffer(6× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt's 용액, 0.1 μ g/ μ l denatured salmon sperm DNA)로 용해하였다. 용액을 95°C에서 2분 가열한 후 실온에서 냉각하여 15,000 rpm, 10분간 원심분리 하였다. 그 상층액을

hybridization용 probe로 사용하였다. TaKaRa IntelliGene[™] Human Cancer CHIP Version 1.0(TaKaRa Code X102)를 prehybridization buffer(6× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt's 용액, 1 μ g/ μ l denatured salmon sperm DNA)로 실온에서 2시간 incubation한 후 probe 용액으로 65°C에서 12시간 hybridization하였다.

2) 그림 2에 나타난 과정에 따라 Label IT[®]로 각각의 Poly(A)⁺을 Cy3[™]와 Cy5[™]로 표식하여 혼합한 후 kit 내에 첨부한 G50 Microspin Purification Column으로 정제하였다.

정제한 산물에 Carrier DNA(15 μ g Human Cot1 DNA, 8 μ g poly dA 및 10 μ g yeast tRNA)를 첨가하여 ethanol로 침전한 후 10 μ l의 hybridization buffer(6× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt's 용액, 0.1 μ g/ μ l denatured salmon sperm DNA)로 용해하였다. 용액을 65°C에서 10분간 가열한 후 실온에서 냉각시켜 15,000 rpm, 10분간 원심분리하였다. 이 상등액을 hybridization용 probe로 사용하였다. TaKaRa IntelliGene[™] human Cancer CHIP Version 1.0을 prehybridization buffer(6× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt's 용액, 1 μ g/ μ l denatured salmon sperm DNA)로 실온에서 2시간 incubation한 후 probe 용액으로 42°C에서 12시간 hybridization하였다.

Hybridization이 끝난 후 DNA chip을 2× SSC, 0.2% SDS로 55°C에서 30분간 2회 세정한 후 2× SSC, 0.2% SDS로 65°C에서 5분간 세정하였다. 0.05× SSC에서 5분간 행군다음 저속 원심분리로 수분을 제거하였다. 이어 Affymetrix[®] 418 Array Scanner로 scanning을 하여 얻은 형광 signal을 해석 software ImaGene[™](TaKaRa Code BD001)으로 해석하였다.

【결과 및 고찰】

각 형광파장(Cy3[™] : 570 nm ; Cy5[™] : 660 nm)에서 검출영상(β -actin를 지표로 형광강도를 보정)을 모아 그림 3에 나타내었다. 각 표식법으로 조제한 probe를 이용한 경우에 있어서 각 spot의 Cy3[™], Cy5[™] 형광 signal 비율 Scatter Plot을 그림 4에 나타내었다(β -actin을 지표로 signal 강도를 보정하고, negative control pUC18 유래 형광 signal의 2배 이하의 spot은 제거하였다).

그림 4에 나타난 바와 같이 두 가지 형광표식법으로 제작한 probe간에 좋은 상관관계를 볼 수 있다. 2종류의 시료간 mRNA 발현량의 차이를 DNA chip으로 조사하는 경우, 기존에는 역전사효소를 사용하는 표식법을 주로 이용하였지만 그 결과와 Label IT[®]로 표식한 probe로 얻은 결과의 상관관계로부터 Label IT[®] 표식법의 유용성을 알 수 있었다.

Label IT[®]를 이용한 mRNA 직접 형광 표식 probe의 DNA Chip에 응용

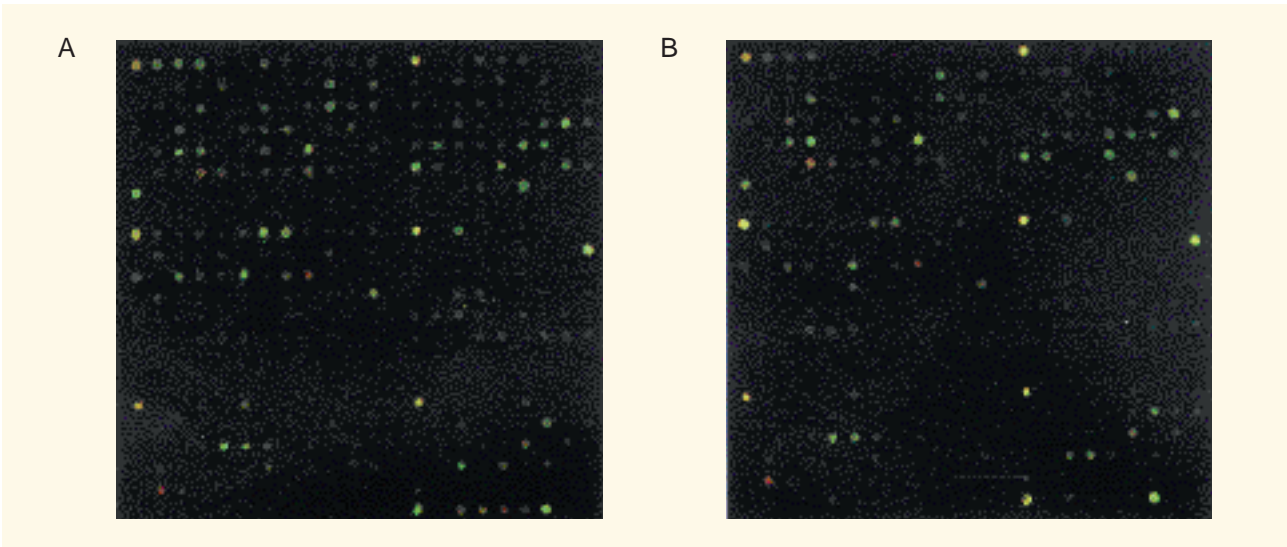


그림 3 각 형광파장(Cy3[™] : 570 nm, Cy5[™] : 660 nm)의 검출영상을 중첩한 그림
 A : 역전사효소를 이용한 형광표식법으로 제작한 probe를 사용한 경우
 B : Label IT[®]를 이용한 형광표식법으로 제작한 probe를 사용한 경우
 각 그림에서 빨간색은 HL60 mRNA를 Cy3[™]로, 녹색은 K562 mRNA를 Cy5[™]로 표식한 것이다.

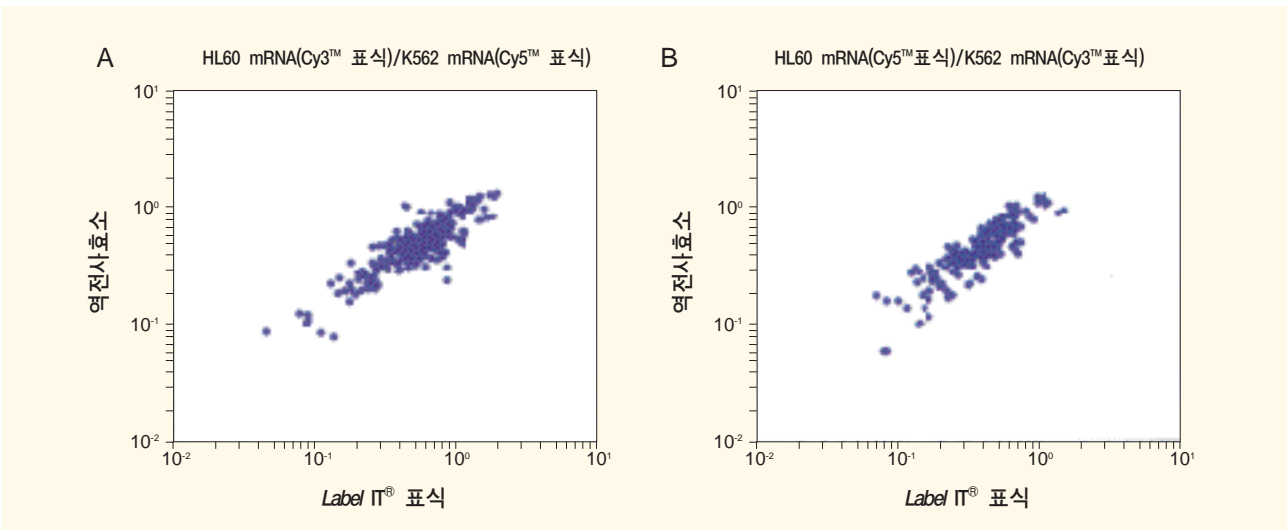


그림 4 Cy3[™], Cy5[™] 형광 signal 비율의 Scatter Plot
 A : HL60 mRNA(Cy3[™] 표식)/K562 mRNA(Cy5[™] 표식)비율을 plot
 B : HL60 mRNA(Cy5[™] 표식)/K562 mRNA(Cy3[™] 표식)비율을 plot
 각 그림에서 X축은 Label IT[®]를 이용한 형광표식법으로 제작한 probe를, Y축은 역전사효소를 이용한 형광표식법으로 제작한 probe를 사용한 것이다.

■ 실험 2

다음으로 Label IT[®] 표식법으로 제작한 probe를 이용하여 얻을 수 있는 유전자 발현 data의 유용성을 control RNA의 spike(첨가) 실험으로 검토하였다.

【실험방법】

그림 5에 spike 실험의 개요를 나타내었다. 시료 tube를 2개 1조로 준비하고 배양세포 HL60 유래의 일정량(1 µg) mRNA와 다른 양의 poly(A)⁺ λ RNA(spike RNA)를 각 tube에 첨가하여 실험 1과 동일하게 Label IT[®]를 이용하여 tube 내의 RNA는 Cy3[™]로, 다른 한쪽은 Cy5[™]로 직접 표식하였다. 각

spike RNA의 양비는 1:3이 되도록 조합하였다(표 1). 각조의 Cy3[™] 및 Cy5[™] 형광표식 probe를 혼합하여 실험 1과 동일하게 TaKaRa IntelliGene[™] Human Cancer CHIP Version 1.0으로 hybridization과 washing을 하고, Affymetrix[®] 418 Array Scanner로 scanning하여 Cy3[™], Cy5[™]의 형광영상을 얻었다. 얻은 형광영상을 ImaGene[™]으로 해석하고, 각 spot에 대한 Cy3[™]와 Cy5[™]의 형광 signal의 양을 계산한 뒤 signal 값을 Scatter Plotting하였다. 또한 각 영상에서 negative control(pUC18) 형광 signal의 2배 이하인 spot은 제거하였고, 각 형광 signal의 강도는 spike signal을 제외한 모든 signal에 대하여 Cy3[™]/Cy5[™] 비율의 중앙값(median)을 보정하였다.

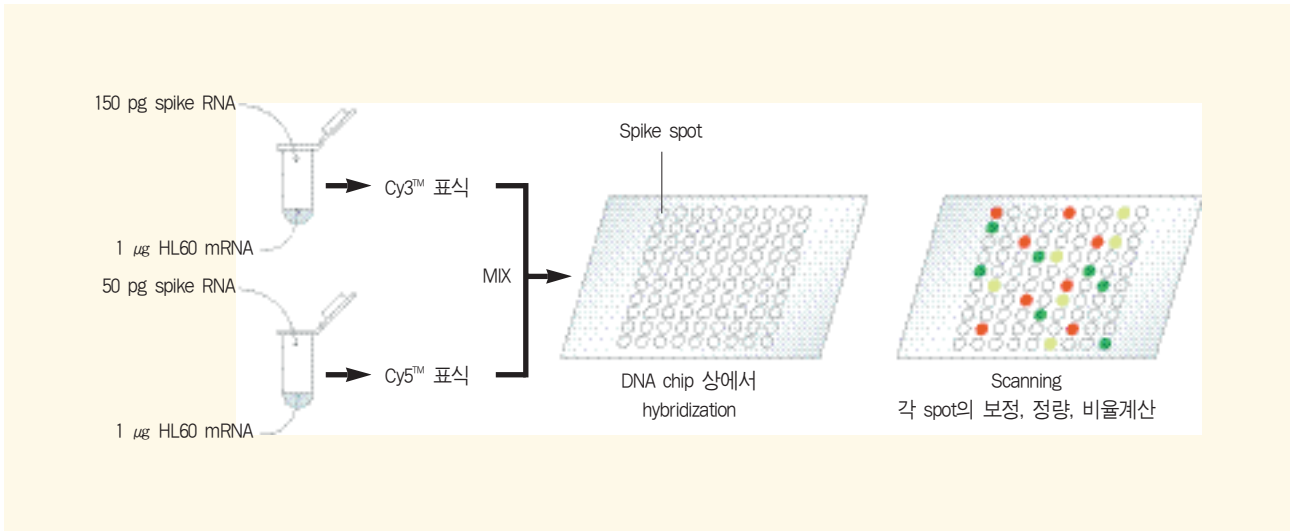


그림 5 Spike 실험의 개요

표 1 Poly(A)⁺ λ RNA의 spike(첨가)량

DNA Chip No.	λ RNA의 spike 양	
	Cy3 [™] 표식	Cy5 [™] 표식
1	150 pg	50 pg
2	50 pg	150 pg
3	30 pg	10 pg
4	10 pg	30 pg
5	24 pg	8 pg
6	8 pg	24 pg
7	12 pg	4 pg
8	4 pg	12 pg
9	6 pg	2 pg
10	2 pg	6 pg
11	3 pg	1 pg
12	1 pg	3 pg

【결과 및 고찰】

그림 6에 Scatter Plot의 결과를 나타내었다. 동일한 HL60 유래의 mRNA를 동량(1 μg) 형광표식하였으므로 spike RNA의 spot 이외의 signal은 이상적으로는 Scatter Plot 상에서 1:1의 선상에 결집하고 spike RNA의 spot signal은 3:1 또는 1:3의 선상에 결집할 것으로 기대된다. 그림 6의 검정색 plot는 spike signal 이외의 plot에 각색의 plot은 각 spike 양의 signal에 대응한다. Spike signal 이외의 plot은 99% 이상의 spot이 1/2 ~2배의 범위에서 plot되어 역전사 반응으로 형광표식한 probe를 사용한 data와 동일한 불균일성을 보였다. Spike signal의 경우 시료의 양이 많은 경우에는 3:1 또는 1:3의 선상에 결집하고, 양이 적어짐에 따라 내측(양비가 낮아지는 방향)으로 shift되며 12 pg:4 pg(또는 4 pg:12 pg) 이하에서는 반정도의 spot이 불균일성의 범주에 들어가게 된다. 이로부터 3:1의 signal비를 얻을 수 있는 최소량은 24 pg:8 pg 정도이며 이것은 역전사반응으로 형광표식한 probe를 이용한 경우의 것과 동일한 수준임을 알 수 있었다.

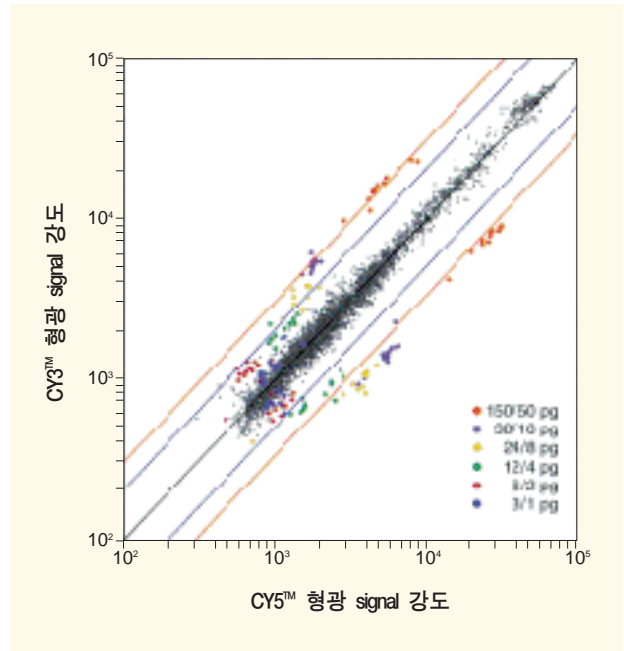


그림 6 Scatter Plot

X축은 Cy5[™] signal, Y축은 Cy3[™] signal을 나타낸다. 그래프중 파란선은 Cy5[™]와 Cy3[™]의 signal 비가 2:1또는 1:2인 경우의 이론값을, 빨간선은 그 비가 3:1 또는 1:3이 되는 경우를 나타낸다. 각 spike RNA의 spot signal은 대응하는 색으로 plot되고 그 이외의 spot signal은 검은 점으로 plot되어 있다.

■ 결론

본 실험을 통해 Label IT[®]로 직접 형광표식한 probe로도 DNA chip상에서 유전자발현 해석실험이 가능하고 또 감도에 있어서도 역전사효소로 형광표식한 probe의 경우와 손색이 없을 정도로 동등함을 알 수 있었다. Label IT[®]을 이용한 표식법은 mRNA를 직접 표식하므로 RNA가 분해되지 않도록 하는 조작상의 주의를 해야하지만 작업시간을 단축할 수 있으므로 유용한 방법으로서 적극 권장한다.

자동 세균 검사 장치

RiboPrinter[®] System을 이용한 세균오염 tracking data의 유용성

RiboPrinter[®] System

TaKaRa Code DP100

Qualicon사 제품입니다. RiboPrinter는 Qualicon사의 등록상표입니다.

자동세균검사장치 RiboPrinter[®] System(그림 1)은 세균의 리보솜 RNA 유전자 주변의 유전자다형을 이용하여 세균의 finger printing(Ribotyping)을 자동으로 실시하는 장치이다(본 장치의 개요에 대해서는 15호 24페이지 참조).

본 고에서는 RiboPrinter[®] System을 이용한 세균오염의 tracking(오염원 및 오염경로의 해명)에 관하여 소개한다.

■ 세균오염의 tracking

식품이나 의약품 제조현장에서는 최종제품에 세균에 의한 오염이 발견되는 경우가 있다. 이런 경우 현장에서는 신속하게 오염원의 발견과 오염경로를 파악해야 한다. 따라서 즉시 미생물검사를 해야 하지만 동종의 균이 복수의 point에서 검출되므로 오염원이나 오염경로를 확인할 수 없는 경우가 많다. 이렇게 되면 생각할 수 있는 모든 오염원과 오염경로에 대해 오염방지 대책을 수립해야 하므로 시간과 비용을 낭비하게 된다. 특히 그 기간만큼 공장 가동을 중지함에 따라 회사는 큰 손실을 입을 수 있다.



그림 1 RiboPrinter[®] System

RiboPrinter[®] System은 종(種) 수준은 물론, 주(株) 수준에서의 차이도 검출할 수 있다. 그림 2에 나타난 13주의 *Listeria monocytogenes*균의 RiboPrinter[®] System에 의한 해석 pattern(RiboPrinter[®] Pattern)을 보면 다수의 band들은 13주 모두에서 공통으로 관찰되나, 일부는 주에 따라 특징적으로 나타남을 알 수 있다. 그 특징적인 band에 착안하여 세균을 strain 수준까지 식별할 수 있다.

상기의 오염검사로 검출한 균도 strain 수준까지 정밀하게 식별하면 최종제품의 오염원을 밝혀낼 수가 있다. 아래의 RiboPrinter[®] System을 이용하여 세균오염의 tracking 사례를 소개한다.

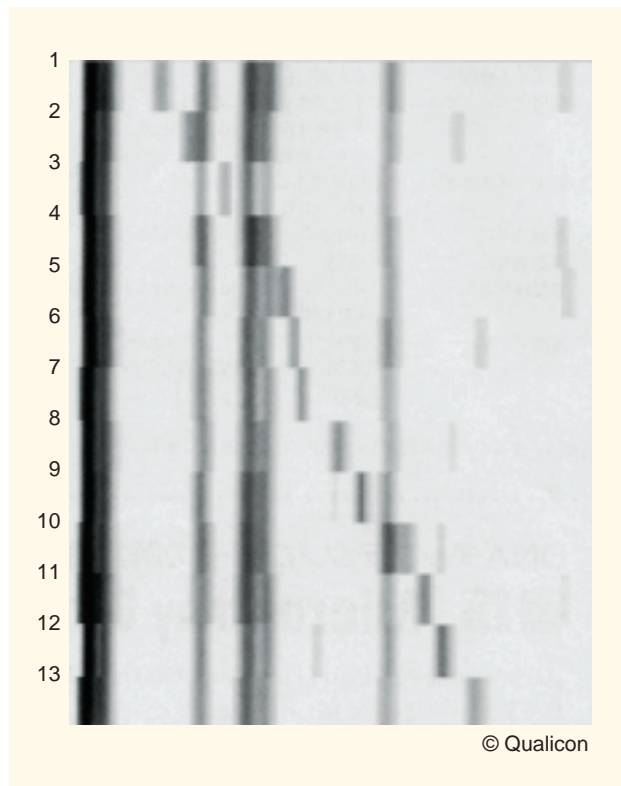


그림 2 13주의 *Listeria monocytogenes*의 RiboPrinter[®] pattern 비교

■ 사례 1

어느 식품 가공공장에서 생산한 2개의 제품에서 *Staphylococcus*균이 검출되었다. 품질관리부는 이전의 방법으로 오염원의 확인을 시도하였으나 *Staphylococcus epidermidis*균이 여러 재료에서 검출되어 결론을 내릴 수 없었다. 따라서 품질관리부는 RiboPrinter® System을 이용하여 *Staphylococcus* 분리균의 strain 수준에서 정보를 얻었다. 2개의 제품에서 분리한 균의 Riboprinter® pattern은 일치했지만 원료유래의 것과는 다른 것이었고, 제품오염균의 Riboprinter® pattern과 일치하는 것이 한 개 있었다. 그것은 종업원의 손에서 유래한 것이었다(그림 3). 이후 종업원은 손을 씻고 장갑을 착용함에 따라 오염을 방지할 수 있었다. 이렇게 오염원을 발견할 수 있었기에 공장은 오염원을 제거하기 위한 가동중지를 피할 수 있었다.

■ 사례 2

어느 회사는 가공육류를 구입한 후 피자의 토핑으로 가공하는데 성공하였다. 어느 날 보건소가 실시한 검사에서 피자 토핑으로부터 *Listeria monocytogenes*가 검출되었다. 원료인 육제품이 오염원이라고 생각하였으나 공급원을 변경하기 전에 Riboprinter® System으로 균종을 해석하였다. 여러 개의 원료고기에서 *L. monocytogenes*가 검출되었지만 보건소가 검출한 것과는 다른 주였다. 다시 면밀히 조사해보니 세제와 소독약 등을 보관하는 창고에서 보건소에서 검출한 것과 동일한 *L. monocytogenes*가 검출되었다(그림 4). 이 회사는 외부업자에게 야간 청소를 의뢰하였는데 청소업자의 청소원에 대한 교육 훈련 수준이 굉장히 낮아 고기창고가 오염의 원인이었던 것이다. 새로운 청소업자로 바꾼 후 문제는 해결되었다.

■ 결론

위와 같이 자동세균검사장치 RiboPrinter® System을 이용함으로써 신속하게 오염균을 동정할 수 있고 오염원도 제거할 수 있었다. RiboPrinter® System은 식품제조현장의 위생관리에 매우 유용한 시스템이다.

“This is a translated re-print from the RiboPrinter® System Customer ApplicationProfile by Qualicon Inc. Copyright© 2000 by Qualicon Inc. All rights reserved.”

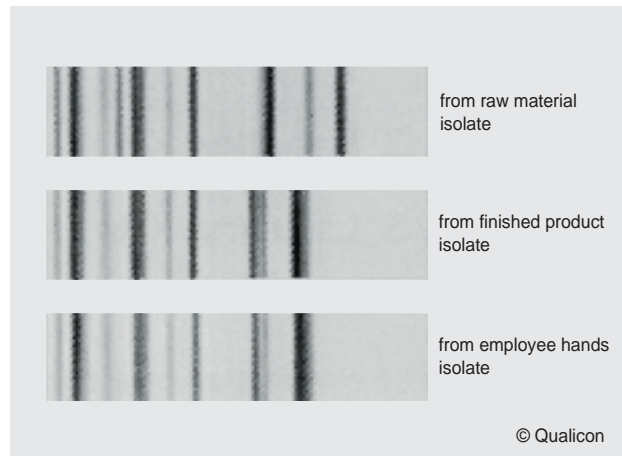


그림 3 검출한 *Staphylococcus epidermidis*의 Riboprinter® pattern

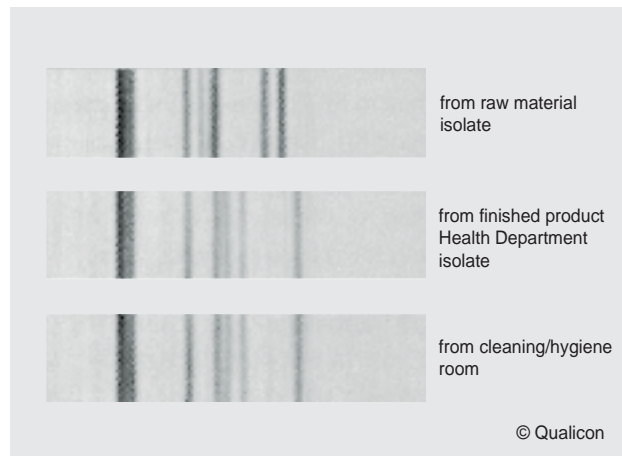


그림 4 검출한 *Listeria monocytogenes*의 Riboprinter® pattern

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code
RoboPrinter® 전용시약	
RiboPrinter® System Sample Preparation Pack	DP001
RiboPrinter® System <i>EcdR</i> I Batch Kit	DP002
RiboPrinter® System <i>Pst</i> I Batch Kit	DP003
RiboPrinter® System <i>Pvu</i> II Batch Kit	DP004

PCR 산물의 Subcloning

H. Nakayama

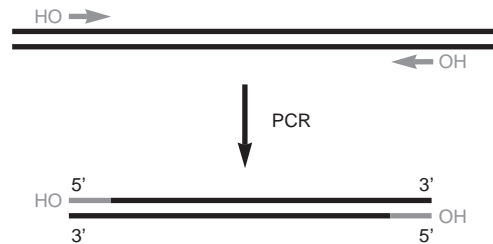
1. PCR 산물 cloning시의 문제점

PCR로 증폭한 단편을 plasmid에 subcloning 할 때에는 다음과 같은 문제점이 있다.

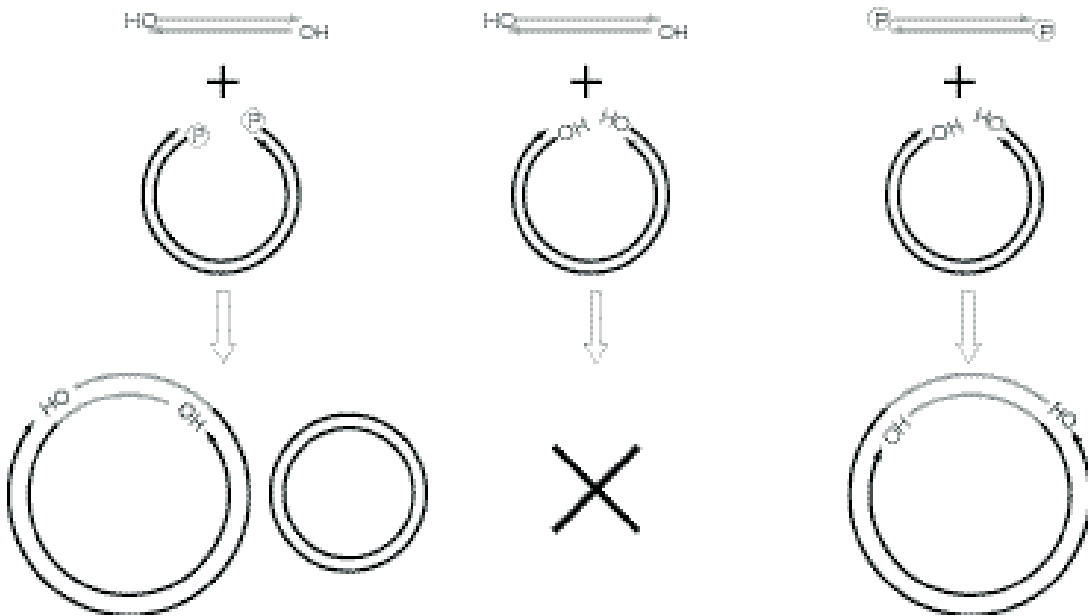
문제점 1 : 단편의 5' 말단이 인산화 되지 않는다.

통상 DNA 합성기로 합성한 oligonucleotide에는 5' 말단에 인산기가 붙어 있지 않아 그 oligonucleotide를 primer로 하여 합성한 PCR 산물도 5' 말단에 인산기가 없으므로 그대로는 ligation 기질로 사용할 수 없다.

물론 ligation하는 상대측 DNA의 5' 말단이 인산화 되어 있으면 DNA의 한쪽 가닥은 연결될 수 있지만 vector에 넣을 때는 vector의 self ligation을 방지하기 위해 미리 vector를 탈인산화 하므로 ligation을 기대할 수 없다. 따라서 PCR 산물을 그대로 ligation 기질로 이용할 때에는 5' 말단의 인산화가 필요하다.



통상의 oligonucleotide를 primer로 증폭한 PCR 산물은 5' 말단에 인산기가 없다.



Vector는 self ligation이 많다.

Ligation 할 수 없다.

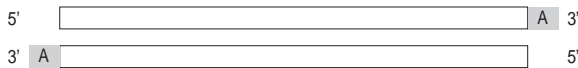
Vector의 self ligation은 일어나지 않는다.



문제점 2 : 단편의 3' 말단이 돌출되어 있다.

Taq polymerase는 일종의 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) 활성을 갖는다.

이 활성은 주형 DNA에 상보적인 DNA 가닥을 합성한 후 blunt end로 된 말단에 1염기의 nucleotide를 첨가하는 것으로 DNA extendase라든가 terminal extendase 활성이라고도 한다. Taq polymerase가 이러한 활성을 갖고 있어 PCR 산물의 대부분은 3' 말단이 돌출, 효율이 나쁜 blunt end로서의 cloning 효율은 현저하게 나빠진다.



PCR 산물은 Taq polymerase의 TdT 활성 때문에 3' 측이 1염기 돌출된 형태를 갖는다.

2. Subcloning의 다양한 방법

앞에서 서술한 바와 같이 PCR 산물을 cloning할 때의 문제점을 해결하기 위해 여러 가지 방법이 고안되어 실용화되고 있다. 여기서는 실제 이용하는 실험법 중에서 일반성이 있다고 판단되는 제한효소 인식서열의 부가와 TA cloning법을 중심으로 자세히 설명하고 다양한 방법의 원리를 설명한다.

2-1. Blunt end ligation

PCR 산물을 cloning할 때에 우선적으로 선택할 수 있는 방법이지만 **1. PCR 산물 cloning시의 문제점**에서 서술한 것 모두가 문제시 된다.

2-1-1. 5' 말단의 인산화

PCR 산물을 blunt end vector에 넣으려고 할 때 가장 먼저 생각해야 하는 것은 PCR 산물의 5' 인산화이다. DNA의 5' 말단을 인산화하는 polynucleotide kinase의 효율은 single strand 말단 \geq double strand 5' 돌출 말단 $>$ double strand 평활 말단 $>$ double strand 3' 돌출 말단의 순서로 낮아진다. PCR 산물의 대부분은 1염기의 3' 돌출 말단을 갖고 있어 인산화의 효율이 높지 않다. 따라서 이 방법으로 subcloning을 하고자 할 때는 PCR을 하기 전에 primer의 5' 말단 인산화 하는 것이 좋다. Primer의 인산화에는 polynucleotide kinase를 이용할 수도 있지만 oligonucleotide의 최종 합성 단계에서 인산화용 amidite를 이용하여 미리 인산화 oligonucleotide로 합성하는 것이 효율적이다.

2-1-2 말단의 평활화

또 한가지 중요한 점은 단편의 말단 형상이다. 1염기의 3' 돌출 말단을 가진 PCR 단편을 blunt end vector에 넣기 위해서는 말단의 평활화가 필요하다. 말단의 평활화에는 T4 DNA polymerase 등 3' \rightarrow 5' exonuclease 활성을 갖는 것을 dNTP와 함께 사용한다. Taq polymerase 뿐만 아니라 Klenow 효소를 포함한 대부분의 DNA polymerase는 TdT 활성을 갖는다(따라서 말단 평활화에 Klenow 효소를 이용하는 것은 그다지

좋은 방법은 아니다). T4 DNA polymerase와 Pfu polymerase는 TdT 활성을 갖지 않으므로 말단의 평활화에는 어느 것을 사용해도 좋다.

2-2. 제한효소 인식서열의 부가

다음의 그림과 같이 5' 말단에 제한효소의 인식서열을 갖는 adaptor 서열을 부가한 primer를 만든다. PCR primer는 5' 말단 쪽에 mismatch가 있어도 거의 문제없이 기능하므로 이 primer를 이용하여 PCR 한다. 얻은 PCR 산물은 양말단에 제한효소 인식부위를 갖고 있어 제한효소로 절단하면 5' 인산기를 가진 점착성 말단이 양쪽에 만들어진다. 이렇게 해서 얻은 PCR 산물은 탈인산화된 vector에 쉽게 넣을 수 있다. 또 2개의 primer에 다른 제한효소 부위를 부가해 두면 vector에 넣을 때 PCR 산물의 방향을 결정할 수 있으므로 편리하다. 이 방법을 이용할 때의 주의 사항은 2-2-1 이후에 설명하였다.

Column

Taq polymerase의 TdT 활성

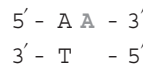
최근의 자료(STRATEGIES in molecular biology, Vol. 7, p. 8)에 따르면 Taq polymerase의 TdT 활성은 말단에 오는 nucleotide의 종류에 따라 다르다.

이 자료에 기초한 두가닥의 말단 구조를 아래에 표시하였다. 말단이 C 또는 G인 경우는 복수의 종류가 있지만 이 경우는 가장 왼쪽의 구조가 될 빈도가 높다.

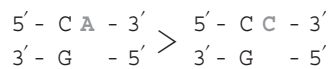
또 말단이 T인 경우는 T를 빼고 대신 A를 부가한다. 이 경우는 이론상 TA cloning vector가 잘 작동될 수 없지만 필자의 경험으로는 문제없이 cloning을 할 수 있었다.

Primer를 디자인할 때는 5' 말단이 A가 되지 않도록 하는 것이 좋다.

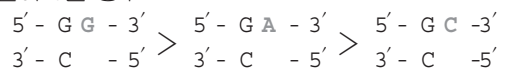
말단이 A인 경우



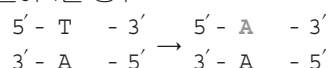
말단이 C인 경우

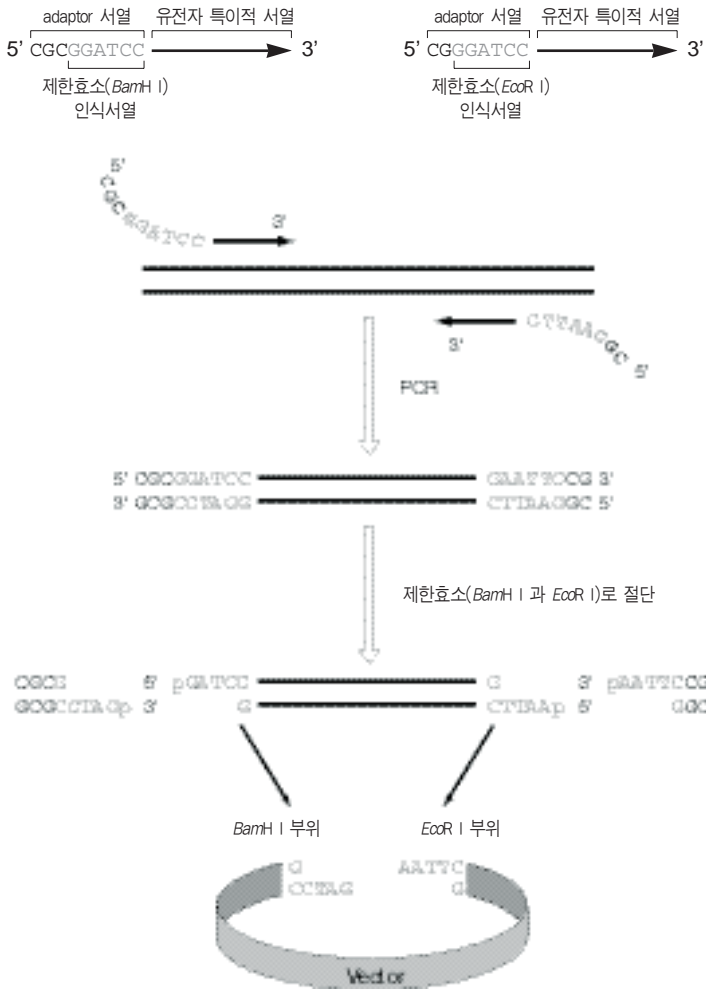


말단이 G인 경우



말단이 T인 경우





2종류의 제한효소를 이용하기 때문에 vector에 넣는 방향이 결정된다.

2-2-1 여분의 nucleotide의 추가

제한효소는 직쇄 DNA의 말단에 있는 인식서열은 절단하지 않는 경우가 있으므로 인식서열의 바깥쪽에 몇 base 정도 여분의 염기를 추가한다. 구체적으로 어떤 염기를 여분으로 추가해야 할지는 제한효소의 종류에 따라 다르지만 예를 들면 *BamH I*의 경우, 그림 ①과 같이 인식서열의 바깥쪽에 2염기씩 튀어나온 oligonucleotide는 2시간 이내에 90% 이상이 절단되지만 그림 ②와 같이 1염기가 튀어나온 것은 20시간 반응하여도 25%밖에 절단되지 않는다.

- ①
- 5' - CGGGATCCCG - 3' ○
3' - GCCCTAGGGC - 5'
- ②
- 5' - GGGATCCC - 3' ×
3' - CCCTAGGG - 5'

*1 위에 기재한 *BamH I*의 data는 특정회사의 카다로그에 기초한 것이다. 각 회사의 카다로그만큼 좋은 교과서는 없으므로 적극적으로 활용하는 것이 좋다.

Oligonucleotide 내의 인식서열과 고분자 직쇄 DNA 말단의 인식서열은 절단 효율에 있어 차이가 있으나 그 경우에도 oligonucleotide에서 절단할 수 있는 경우는 고분자 DNA라도 거의 동등하게 절단할 수 있다. 아래의 표는 oligonucleotide의 절단효율이 높은 효소에 한해서 정리한 것이다.

효소	oligonucleotide 서열	절단 효율 (%)	
		2시간 후	20시간 후
Afl III	CCACATGTGG	> 90	> 90
	CCCACATGTGGG	> 90	> 90
Asc I	GGCGCGCC	> 90	> 90
	AGGCGCGCCT	> 90	> 90
Ava I	CCCCGGGG	50	> 90
	CCCCGGGGG	> 90	> 90
BamH I	CGGATCCG	10	25
	CGGGATCCCG	> 90	> 90
BssH II	TTGGCGCGCAA	50	> 90
Cla I	CCATCGATGG	> 90	> 90
EcoR I	GGAATTC	> 90	> 90
	CGGAATTCG	> 90	> 90
	CCGAATTCGG	> 90	> 90

효소	oligonucleotide 서열	절단 효율 (%)	
		2시간 후	20시간 후
Kpn I	GGGGTACCCC	> 90	> 90
	CGGGGTACCCCG	> 90	> 90
Sac II	TCCCCGCGGGGA	50	> 90
Sma I	TCCCCGGGGGA	> 90	> 90
Spe I	GACTAGTC	10	> 90
	CGACTAGTCG	10	> 90
Stu I	AAGGCCTT	> 90	> 90
	GAAGGCCTTC	> 90	> 90
	AAAAGGCCTTTT	> 90	> 90
Xba I	GCTCTAGAGC	> 90	> 90
Xma I	CCCCCGGGGGG	50	> 90
	TCCCCGGGGGGTA	> 90	> 90

제한효소의 인식서열을 음영으로 표시하였다.

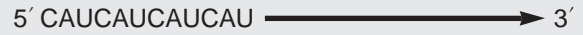
2-2-2 Tm의 추정값

PCR의 최초 2 cycle 동안은 제한효소의 인식서열을 포함하는 adaptor 부분은 primer의 annealing에 영향을 미치지 않으므로 Tm의 추정값은 adaptor 부분을 제외한 유전자 특이적 영역을 기준으로 계산한다. 3 cycle째 이후에는 adaptor 부분에 상보적인 서열이 합성되므로 실제의 annealing은 더욱 높은 온도에서 되지만 통상은 처음의 설정대로 하여도 문제는 없다.

2-3 Uracil DNA glycosylase를 이용한 cloning

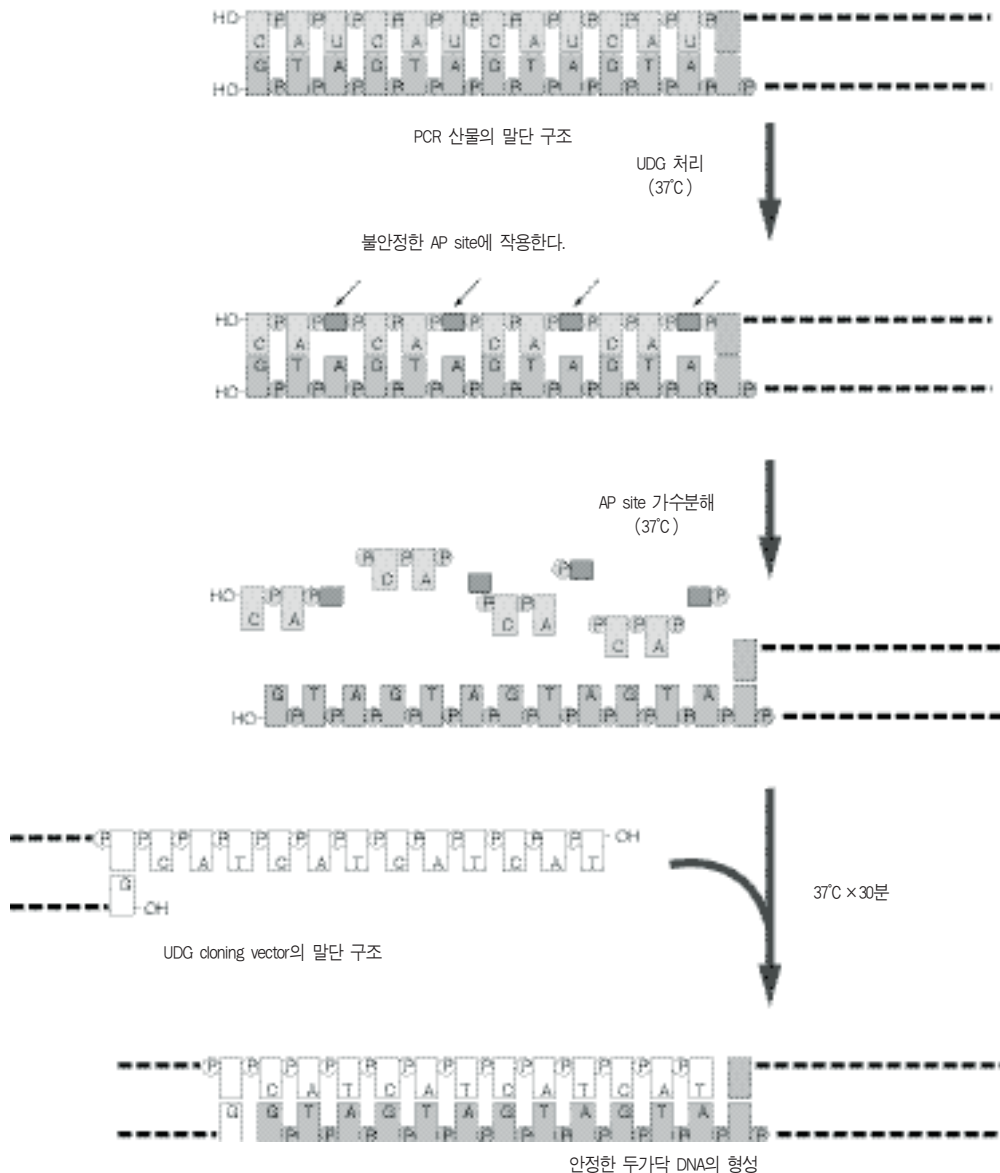
2-2 제한효소 인식서열의 추가에서 서술한 방법과 같이 유전자 특이적 서열 뒤에 adaptor 서열을 붙인다는 점은 같지만 adaptor 부분은 dUMP를 포함한 다음과 같은 서열로 한다.

Uracil을 포함한 adaptor 서열이 붙은 primer



이 primer를 이용하여 얻은 PCR 산물은 primer에서 유래한 5' 말단 부분에 uracil를 함유하는 DNA가 된다. 이 DNA에 uracil DNA glycosylase(UDG)^{*1}가 작용하여 DNA에 포함된 uracil을 제거한다. 그 결과 생기는 탈염기부위(AP site)는 약 알칼리성 조건에서 쉽게 가수분해되어 3' 측에는 12염기가 긴 한가닥 영역이 형성된다.

*1 uracil DNA glycosylase는 AP endonuclease와 같이 Cytosin의 탈 amino화로 생기는 이상 염기인 uracil를 제거·수복하는 기능을 갖는다.



BRL사에서 판매하는 UDG cloning vector는 이 한가닥 영역에 상보적인 영역을 포함하는 특수한 3' 돌출 말단을 갖고 있어*, PCR 산물과 쉽게 두가닥을 형성한다. 이 두가닥 영역은 37°C에서 안정하므로 ligation 하지 않고 직접 competent 세포에 도입하면 대장균내의 수복계로 결합되어 그대로 형질전환체를 얻을 수 있다. Insert를 포함하지 않은 vector의 self ligation은 이론상 있을 수 없으므로 얻어진 subclone은 insert를 가질 확률이 매우 높다.

이 방법은 조작이 간단한 반면에 특별한 adaptor 서열을 가진 primer가 필요한 것과 vector의 자체 제작이 불가능하다는 단점이 있다.

* 이 3' 돌출부분의 서열은 vector에 따라 CATCATCATCAT와 CTACTACTACTA의 2종류가 있고 vector에 넣을 때에 PCR 산물의 방향을 결정할 수 있도록 되어 있다.

2-4 TA cloning

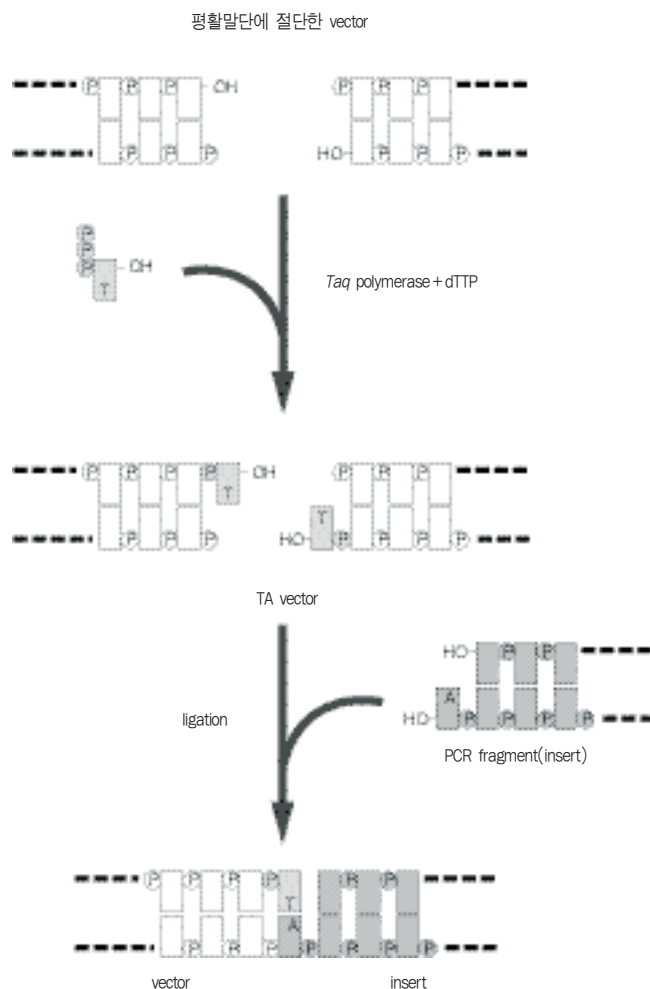
1. PCR 산물 cloning시의 문제점에서 서술한 바와 같이 Taq polymerase나 Tth polymerase는 평활말단에 1염기만 추가하는 TdT 활성을 갖지만 4종류의 nucleotide 전부를 동일한 확률로 추가하는 것이 아니라 A를 추가할 확률이 가장 높다. 따라서 대부분의 분자는 3' 말단에 A가 1염기 돌출한 구조를

하고 있다. 이에 역으로 3' 측에 T가 1염기 돌출한 vector를 만들면 PCR 산물과 vector가 AT 수소결합을 하므로 쉽게 결합할 수 있다.

이 cloning법을 TA cloning이라 하며 전용 TA cloning vector (TaKaRa Code NV004)도 Novagen사에서 판매하고 있다. 이 vector를 이용하면 PCR 산물을 더 이상 조작할 필요없이 쉽게 subcloning할 수 있어 애용자도 많지만, 보통의 제한효소 처리로는 그 vector를 만드는 것이 곤란하므로 구매를 하는 것이 좋다. 그러나 이 vector와 같은 원리에 기초한 vector(T vector)를 특별한 시약을 이용하지 않고 자체 제작하는 방법은 이미 1991년에 발표되었고(Marchuk *et al. Nucl Acid Res* Vol.19, p. 1154, 1991)*1, "Red Book"의 애칭으로 유명한 "Current Protocols in Molecular Biology"에도 소개되었다. 본고에서는 이 방법을 PCR 산물을 subcloning할 때의 표준적인 방법의 하나로 소개한다.

Taq polymerase는 4종류의 nucleotide가 공존할 때에는 대부분 A를 추가하지만 다른 nucleotide를 추가하는 활성이 전혀 없는 것은 아니고 dTTP만을 포함한 반응계에서는 충분한 시간을 주면 T를 1개씩 추가한다. 그래서 blunt end로 절단한 vector에 Taq polymerase와 dTTP를 작용시키면 T vector가 가능한 것이다.

이 vector는 3' 말단이 돌출되어 있어 self ligation이 일어나지 않고, 5' 말단에는 인산기가 붙어있어 인산화하지 않은 PCR 산물을 cloning할 수 있다. 또 PCR 산물에는 A가 돌출하고 있고 5' 말단에는 인산기가 없기 때문에 PCR 산물끼리의 ligation에 의한 concatamer 형성이 일어나지 않는다는 장점이 있다. 이 방법은 일단 vector을 대량으로 만들어 두면 PCR 산물에 어떤 수식을 하지 않고도 subcloning할 수 있으므로 매우 편리하다.



TA Cloning

1. T vector의 조제

▶ 준비

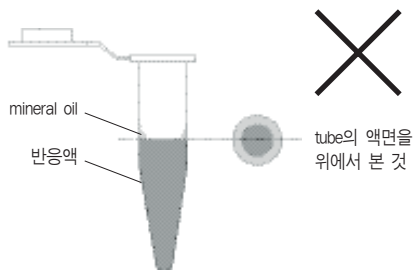
- Plasmid vector
- PCI
- Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25 : 24 : 1
- *Taq* polymerase(5 U/ μ l)
- 10 \times *Taq* buffer
- dTTP(100 mM stock 용액)
- MgCl₂(25 mM stock 용액)

▶ 방법

- 1) 사용하는 vector의 multicloning site를 blunt end를 형성하는 적당한 제한효소*1로 절단하여 직쇄형태로 만든다.*2
- ↓
- 2) Vector를 전기영동하여 직쇄상 형태 III만을 gel에서 정제한다.*3
- ↓
- 3) 0.5 ml의 microtube에*4 아래의 반응액을 최종 농도에 맞춰 만든다.

	첨가량	최종농도
10 \times <i>Taq</i> buffer	_____ μ l	1 \times
MgCl ₂ (25 mM stock)	_____ μ l	1.5 mM
Vector(_____ μ g)	_____ μ l	50 ng/ μ l
dTTP(100 mM stock)	_____ μ l	2 mM
<i>Taq</i> polymerase(5 U/ μ l)	_____ μ l	5 U/100 μ l
ddH ₂ O	_____ μ l	
total	_____ μ l	

- 4) 반응액이 증발하지 않도록 mineral oil을 증층한다.*5



- 5) 70 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation한다.
(_____ : _____ ~ _____ : _____)
- ↓
- 6) Mineral oil층 아래 반응액의 전부를 새로운 1.5 ml microtube로 옮긴다.*6
- ↓
- 7) 동량의 PCI을 넣어 vortex로 혼합한다.
- ↓

*1 사용하는 제한효소의 종류에 따라 완성한 vector의 유입 효율이 다르다. pBluescript의 경우, *EcoR* V 쪽이 *Hinc* II 보다 효율이 좋다.

*2 10 μ g 정도 잘라 많이 만들어 두면 편리하다.

*3 step 2)는 생략할 수도 있지만 최소한 시료의 일부를 전기 영동하여 완전절단을 확인해 들 것

*4 용기는 incubator 형태에 맞춘다. Thermal Cycler 등의 PCR 장치를 이용하면 간단하므로 0.5 ml microtube로 만들면 좋다. 또 급격한 온도 변화가 일어나는 것은 아니므로 PCR과 달리 수백 μ l를 하나의 tube에 넣어도 좋다.

*5 액량이 많은 경우에는 통상의 PCR처럼 mineral oil을 1방울 떨어뜨려서는 액면을 덮을 수 없으므로 주의해야 한다. Mineral oil이 적으면 oil이 소수성의 polypropylene tube 벽에 흡착하고 액면의 중심이 노출된다(왼쪽 그림 참조).

*6 가열한 tube의 덮개는 느슨하게 되어 phenol chloroform을 처리할 때 액체가 샐 수도 있고 mineral oil도 제거해야 하므로 새로운 tube로 옮긴다. 또 다소 흡입된 mineral oil은 다음 step에서 제거할 수 있으므로 신경쓰지 말고 반응액을 가능한 한 완전하게 회수하도록 한다.

- 8) 15,000 rpm으로 5분간 원심분리한다.
(_____ : _____ ~ _____ : _____)
↓
- 9) 수층(상층)을 새로운 micro tube에 옮긴다.
↓
- 10) Step 7) ~9)를 반복한다.
↓
- 11) 아래의 시약을 넣는다(isopropyl alcohol 침전)^{*7}
3 M Sodium acetate 0.1 vol (_____ μ l)
Isopropyl alcohol 1 vol (_____ μ l)
↓
- 12) Vortex Mixer로 잘 섞은 후 실온에 10분간 둔다.
(_____ : _____ ~ _____ : _____)
↓
- 13) 15,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 핵산을 침전한다.
(_____ : _____ ~ _____ : _____)
↓
- 14) 상층액을 micropipetting 또는 aspiration으로 제거한다.
↓
- 15) 70% 에탄올을 0.5 ~ 1 ml 넣고 vortex로 가볍게 혼합한다.
↓
- 16) 15,000 rpm, 4°C에서 2분간 원심분리하여 핵산을 침전한다.
(_____ : _____ ~ _____ : _____)
↓
- 17) 상층액을 micropipetting 또는 aspiration으로 제거한다^{*8}.
↓
- 18) Microtube를 paper towel 위에 거꾸로 세워 수분을 완전히 제거한다.
↓
- 19) 원심 건조기로 pellet를 완전히 건조한다.
↓
- 20) 50 ng/ μ l 정도의 농도가 되도록 TE에 용해한다.
↓
- 21) 10~수십 μ l 씩 분주하고^{*9}, -20°C에서 보존한다.

^{*7} 고농도의 dTTP가 함유되어 있기 때문에 ethanol 침전보다는 isopropylalcohol 침전 쪽이 dTTP의 공침을 예방할 수 있으므로 좋다.

^{*8} 70%의 에탄올로 rinse한 후에는 DNA pellet이 떨어지기 쉬우므로 주의할 것.

^{*9} T vector는 보존성이 그다지 좋지 않으므로 동결 용해를 피하기 위해서 소분해두는 것이 좋다(4. TA cloning법의 주의사항 2 참조).

2. T vector용의 insert 조제

▶ 방법

- 1) Mineral oil층 아래의 PCR 반응액으로부터 5 μ l을 취하여 mini gel로 전기영동하여 목적 단편의 증폭여부를 확인한다^{*1}.
↓
- 2) PCR 후, 시료 20~50 μ l^{*2}를 agarose gel^{*3}에 전기영동하여 목적 band를 잘라낸다^{*4}.
↓

^{*1} 증폭되는 것이 거의 확실한 시료이면 step 1)을 생략해도 좋다.

^{*2} 10 μ l의 반응액에서 시작하여도 cloning은 가능하다.

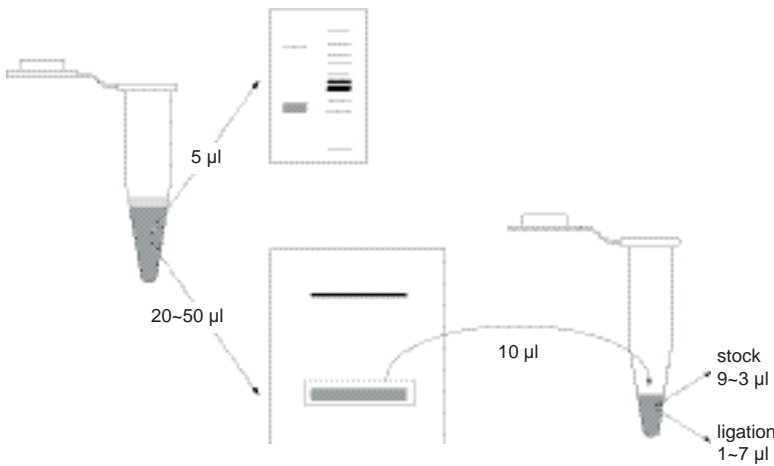
^{*3} GTG grade의 agarose를 사용하는 것이 좋다.

^{*4} PCR 산물을 직접 Phenol/Chloroform 처리, 에탄올 침전한 경우에는 primer dimer 등의 저분자 물질이 혼입하여 cloning 되기 쉬우므로 gel에서 정제하는 것이 좋다. 전기영동에서 main band밖에 보이지 않는 경우라도 저분자의 혼합물은 DNA의 염색 효율이 나빠 보이지 않을 수도 있다.

3) Gel에서 잘라낸 DNA를 정제하고 에탄올 침전한다*5.



4) 10 μl의 TE 또는 ddH₂O*6에 용해하여 DNA 시료로 하고, 이 중의 1~7 μl*7을 ligation에 이용한다.



*5 단 PCR 산물과 같은 수백 bp의 짧은 단편의 정제에 이용하는 Low melting agarose(NuSieve GTG agarose 등)은 수층이 섞이기 쉬우므로 phenol처리를 여러 번 한 후에 PCI처리를 하는 것이 좋다.

*6 다음 단계에서 다량으로 ligation에 이용하는 경우는 ddH₂O로 녹인다. 통상은 TE에 용해하고 극히 일부를 ligation으로 돌리고 남은 것은 보관해 둔다(왼쪽 그림 참조).

*7 수~십수 μl의 PCR 용액에 상당한다.

3. Ligation

▶ 방법

1) Microtube에 아래의 시약을 순서에 따라 넣어, ligation 반응액을 만든다.

□ 10× Ligation Buffer*1	1 μl
□ ddH ₂ O	_____ μl
□ Vector	1 μl
□ 제한효소로 절단하고 정제한 PCR 단편	1~2 μl
□ T4 DNA ligase	1 μl
total	10 μl



2) 16°C에서 30분~1시간 정도*2 반응한다.



3) Competent cell에 transformation한다.

*1 ATP를 함유하고 있는 ligation buffer를 예로 보여주고 있다. Buffer에 ATP를 함유하지 않는 경우는 필요한 양만큼의 ATP를 첨가 해주어야 한다.

*2 Ligase의 maker나 competent cell의 condition에 따라 시간이 다를 수 있다.

4. TA Cloning 법의 주의사항

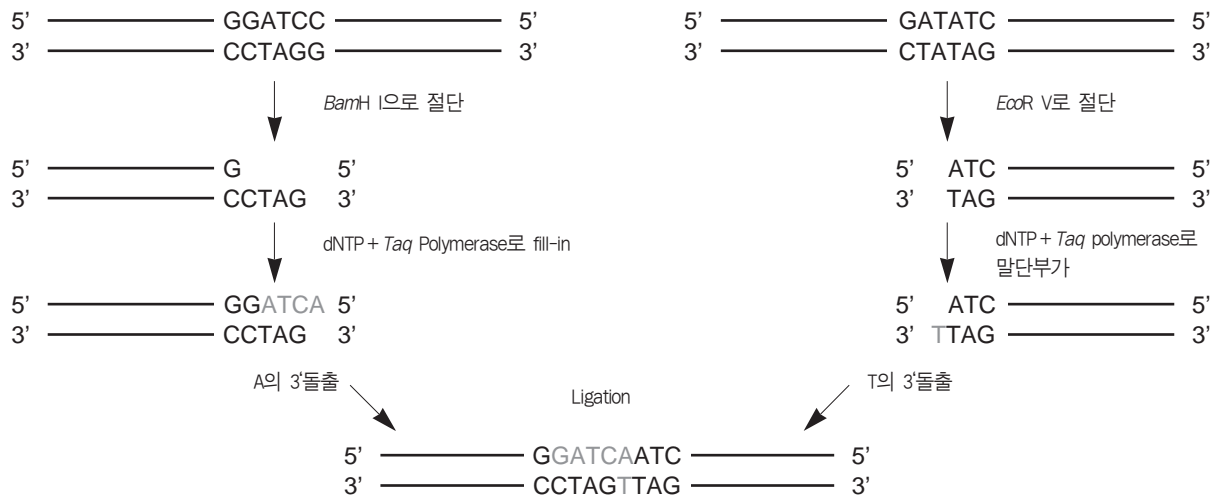
1. T Vector를 이용하여 실험하는 경우 반드시 ① ligation 하지 않은 vector 시료와 ② vector를 self ligation한 시료 2개를 control로서 동시에 transformation하여 vector의 “성능”을 확인해야 한다. ②의 colony가 많을 경우는 말단에 T의 부가가 안된 상태로 이 경우는 vector를 다시 ethanol 침전하여 1. **T Vector 조제** (step 3)의 T 부가반응을 다시 하는 것이 좋다.
2. T vector는 그다지 보존성이 좋지 않아, 동결용해를 반복할 경우 insert를 함유하지 않은 self ligation의 비율이 증가할 수도 있다. 그 이유는 보존 중에 서서히 말단의 T가 떨어져 나오기 때문이라고 생각된다. 이 경우에는 vector를 재조제해야 한다. T vector의 조제과정에서 제한효소에 의한 완전절단과 직쇄 DNA의 정제 단계가 중요한 것이므로 T의 재부가 반응에 의한 vector의 “재생”은 시간을 절약해 준다.
3. TA cloning의 원리에서 보면 insert의 방향은 완전히 random하게 되므로 실험에서 얻을 수 있는 subclone을 다수의 sequence로 볼 때 PCR 단편이 들어가기 쉬운 방향이 결정되어 있는 경우가 많다. 그 방향이 자신이 찾는 방향과 반대의 방향일 경우가 많아 screening이 필요하다.

4. PCR 산물의 방향을 결정하여 vector에 도입하고자 하는 경우에는 2-2 제한효소 인식 서열의 부가에서 설명한대로 primer에 제한효소 인식서열을 포함하는 adaptor를 도입하면 쉽고 빠르게 insert의 방향을 screening할 수 있다.

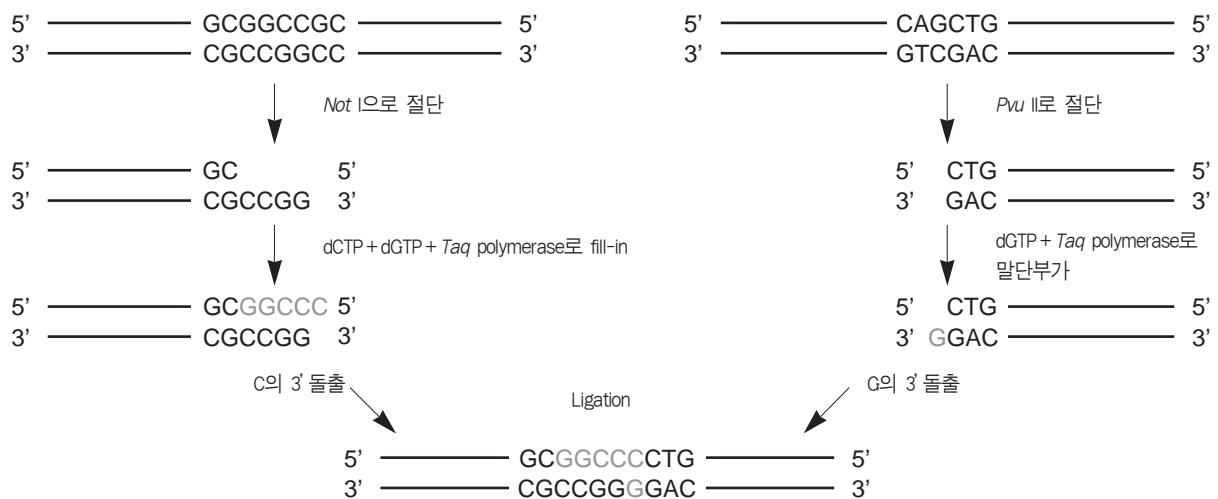
5 일반적인 Subcloning의 응용

PCR 산물을 subcloning할 경우 적절한 제한효소부위가 없으므로 말단의 평활화와 blunt end ligation을 해야만 하는 경우가 자주 있다. 이런 경우 문제가 되는 것은 blunt end ligation의 효율이 나쁘다는 것이다. 여기서 소개한 T vector계는 blunt ligation보다 효율이 좋은 방법으로 전부 blunt end ligation에 응용할 수 있다. Blunt end는 제한효소로 절단한 DNA나 T4 DNA polymerase로 평활화한 DNA단편을 1. T Vector의 조제에서 서술한 방법으로 incubate하면 T의 3' 돌출이 되고 dTTP의 자리에 dATP를 부가하여 incubate하면 A가 돌출되므로 쉽게 ligation을 할 수 있다.

또한 5' 말단이 돌출한 경우는 T4 DNA polymerase의 대신에 Taq polymerase를 이용하여 말단을 fill-in 하면 자동적으로 A의 3' 돌출말단이 생성된다. 이러한 방법으로 5' 돌출말단을 blunt end로 만드는 방법을 기억하면 도움이 될 것이다.



또한 다른 방법으로서 Taq polymerase의 TdT 활성이 DNA 말단의 염기에 따라 좌우됨을 이용하여 TA염기 뿐만아니라 CG 염기를 이용하여 ligation할 수도 있다. 아래의 모식도에 그 일례를 나타내었다.



국내 배추 유전체 연구의 현황과 앞으로의 전략

임 용 표

충남대학교 농과대학 원예학과

생명공학산업은 IT산업과 함께 21세기 들어 가장 중요한 산업으로 부상하면서 국내외를 막론하여 정부 및 산업계에서 앞다투어 투자를 하고 있는 핵심 산업분야이다. 생명공학산업은 특히 분자생물학과 관련된 정보화산업의 발달로 하루가 다르게 진보하고 있고, 이러한 결과는 금년에 인간의 유전체 염기서열을 발표함에 따라 그 정점에 이르러 화려한 꽃을 피우고 있다.

유전체 연구(Genome Project)란 유전자들을 포함하고 있는 염색체의 유전자 지도작성 및 유전자 배열을 결정하고 궁극적으로는 유전자의 기능을 밝히는 연구다. 이 연구는 생명공학관련 기술에 기본적으로 필수적인 정보를 제공하며, 생명공학 산업을 위한 정보자원 및 유전자원의 확보를 가능하게 하는 첨단 연구분야이다.

인간의 유전체 구조가 밝혀짐으로써 이제 많은 연구자들은 post-genomic시대에 들어갔다고 말들을 하고 있다. 그러나 자연계에는 인간 외에도 250만종 이상의 수많은 생명체가 있으며 이러한 모든 생명체의 유전현상을 밝혀내는 것도 대단히 중요한 일일 것이다. 특히 식물의 유전체 연구는 먹거리의 가장 근원인 농작물의 경제성과 전략성으로 인해 세계 각국에서 관심을 가지고 집중적인 투자를 하고 있는 것이 현실이다.

식물 유전체 연구는 식량확보라는 단순하면서도 전략적인 차원에서 가장 절실히 요구되는 기본 과학기술 연구 분야이다. 식물 유전체 사업은 벼와 *Arabidopsis*를 중심으로 일본 및 미국을 중심으로 많은 투자가 이루어져 이미 염기서열분석이 거의 완료되거나 본격적으로 시도되고 있는 단계이며 이 2가지 작물에 대한 functional genomic연구에 집중하고 있다. 따라서 유전체에 대한 연구가 전무하다시피한 한국의 경우 이미 주도권을 상실한 작물 외에 제 2세대 유전체 연구 사업의 대상으로 한국 실정에 맞으며, 독창적이며, 경제성이 있는 주요 작물을 대표할 수 있는 알맞은 식물을 선택하여 유전체 연구를 시작해야 할 시점이 되었다고 생각한다.

유전체 연구에는 어떤 것이 있는가?

유전체 연구는 크게 몇 가지 단계로 나누어진다고 볼 수 있다. 우선 유전체 연구를 위한 대상 생물을 선정하고, 이 생물체에 대한 유전자지도를 작성하여야 한다. 이러한 기본적인 자료가 완성되어야 본격적인 유전체 연구를 시작할 수 있을 것이다. 확보된 자료를 기반으로 전염기서열을 결정하는 Structural Genomics 연구와 유용 유전자의 기능을 탐색하는 Functional Genomics 연구로 나누어 설명될 수 있다.

- Structural Genomics

전염기서열을 분석을 통한 유용유전자 탐색을 기본 목적으로 하며, 이를 위한 핵심기술로는 기본 유전자 지도 작성과 거대 DNA를 함유한 유전자 은행을 제작하는 기술 (BAC library 작성), 이 BAC Library를 이용하여 염색체내 전 염기서열의 배열을 순서대로 결정하는 물리지도 작성(physical mapping), 물리지도 작성에 의해 순서화 된 유전자의 염기서열 분석(DNA sequencing), 확인된 염기서열 분석을 통한 신규 유전자 탐색기술 등이 있다.

- Functional Genomics

최근에 선진국을 중심으로 인간을 비롯한 여러 생물에서 대부분의 염기서열이 밝혀짐으로서, 앞으로 이러한 염기서열로 구성된 유전자의 기능에 관한 연구인 Functional Genomics가 post genomic 연구의 핵심분야로 부상하고 있다. 이러한 Functional Genomics연구를 위해서는 신규 유전자의 기능을 탐색하기 위한 BAC-end sequencing법, unigene을 이용한 cDNA chip기술, Proteomics, 돌연변이를 이용한 신규 유전자 탐색(T-DNA insertional mutation, transposon tagging, promoter 및 enhance trapping, enhancer activation 등), 생물 대사 관련 유전자의 탐색을 위한 metabolome, 거대 DNA 형질전환기술 등 여러 기술이 사용 될 수 있다. 특히 특정 생명체의 염기서열이 밝혀지면 이를 통하여 같은 생명체의 변이를 추정하고 진화적 경로를 확인하기 위하여 유전자마커의 개발이 필요하며 그 예로써 SNP, SSR marker들이 개발 이용되게 된다.

한국적 현실과 게놈연구 방향

이러한 게놈 연구는 맨하탄 프로젝트, 아폴로 프로젝트와 함께 세계 과학사의 3대 업적으로 일컬을 정도로 엄청난 투자와 연구 장비를 요구하는 연구로서 한국적 현실에서 선진국의 엄청난 투자에 경쟁하기는 거의 불가능하다(배추 전염기서열 분석 시 3,000억원 정도 소요예상). 따라서 한국적이며 독창적인 게놈 연구 전략의 필요성이 있다. 이미 인간, 벼, 야기장대풀의 염기서열이 결정된 바 있고, 한국의 경우 벼의 국제적인 게놈 연구사업(RGP)에 25%의 기여를 했을 뿐 타 생물체의 연구에서는 전혀 참여하지 못한 것이 현실이다. 따라서 앞으로의 게놈 연구는 functional genomics연구를 중심으로 한 게놈 연구에 그 전략을 맞추어야 한다. 그러나 이러한 전략에도 불구하고 기본적인 염기서열 분석도구가 없다면 그 연구의 실효를 거둘 수 없다. 따라서 적은 연구비를 가지고 할 수 있는 기본적인 연구방향은 우선 대상 생명체의 유전자

지도작성, BAC library작성 및 이를 이용한 기본 물리지도작성 자료를 확보하여 앞으로 진행될 functional genomics연구의 기반을 제공하여야 할 것이다(그림 1).

본 고에서는 그동안 본 연구실을 포함하여 국내 여러 실험실에서 수행되어 왔던 배추 유전체 연구의 결과를 종합하여 검토하고 앞으로의 연구방향에 대하여 논해 보고자 한다.

배추 게놈 연구의 모식도

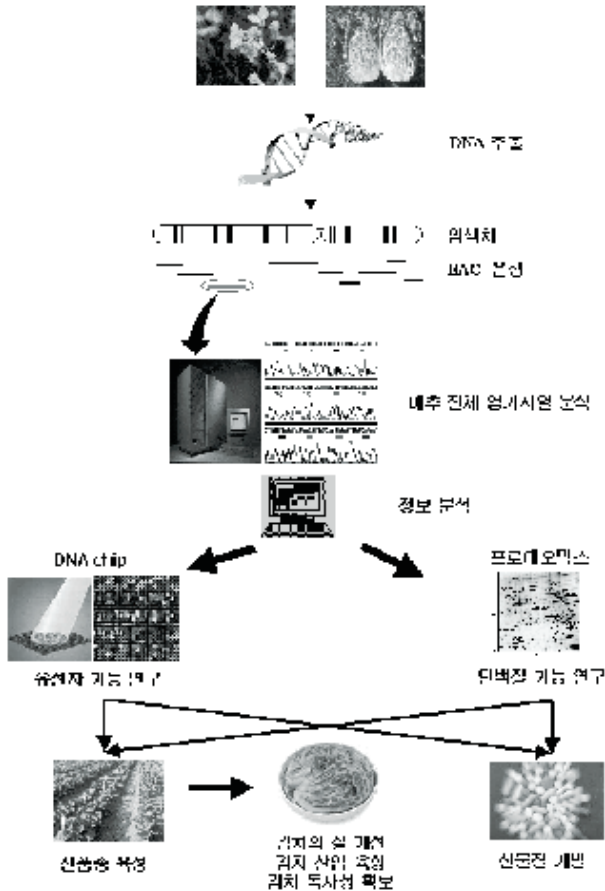


그림 1 유전체 연구의 전략

배추 유전체연구의 중요성

국내에서 유전체 분석연구를 독창적으로 수행할 수 있는 대상작물로서 배추를 중심으로 한 배추과작물을 들 수 있다. 배추과에는 쌍자엽식물 유전체연구의 모델 식물로서 이미 거의 유전체연구가 완료된 아기장대풀을 위시하여, 배추 (*Brassica campestris*, 2n=20, AA genome), 무(*Raphanus sativus*, 2n=18), 양배추(*B. oleracea*, n=9, CC genome), 배추와 양배추가 교잡된 유채(*B. napus*, 2n=4×=38, AACC genome), 배추와 흑겨자가 교잡된 갯 (*B. juncea*, 2n=4×=36, AABB genome) 등 전세계적으로 주요 채소류, 식물성 유지, 향신료, 사료 등 유용한 경제작물들이 속해 있는 *Brassica*속 등이 포함되어 있다.

이 중에서도 배추는 배추속 (*Brassica*) A 게놈의 대표적 식물로 유전적·진화적 연구 가치를 지니며, 경제적으로 볼 때, 우리나라 4대 채소작물 중의 하나이며 한국 고유 식품

인 김치의 주원료로서 국민의 식생활에 없어서는 안되는 주요 채소이다. 우리나라의 배추생산은 약 4만 ha에서 약 240만 톤을 연간 생산한다. 또한 배추는 국내 시장만 해도 약 1조 원에 달하고 있는 주요 경제작물이다. 그리고 최근에는 김치 산업이 발전하여 1억불 이상의 대외 수출을 기록하고 있으며 급속한 증가추세에 있다.

역사적으로는 우장춘 박사의 U's triangle(중의 합성이론)이라는 유명한 배추 및 관련 십자화과 식물의 게놈 진화이론의 개발 등을 포함하여 전통적으로 세계 최고 수준의 고전 유전학적, 육종학적 연구가 진행되어 있어 유전체연구 진행 및 결과 활용에 세계적으로도 유리하며 독창적인 위치에 있다.

특히 유전체연구의 경제성과 관련하여 가장 중요한 지표인 유전체 크기에 있어서 다른 생물체 [옥수수(30억 염기쌍), 밀(150억 염기쌍), 마늘(150억 염기쌍) 및 인간(30억 염기쌍)]에 비해 배추의 유전체 크기(7억 염기쌍)는 매우 작은 편으로 연구에 경제적인 재료이다. 또한 배추 유전체연구가 국내 연구자들에 의해 진행이 되어 오고 있어 연구 수행을 위한 기본 인력 및 기술, 재료가 확보되어 있으며 국제적으로도 이미 독보적 위치를 확보하고 있다.

유전자지도 작성

유전체연구를 위한 기본 자료로써 유전자지도의 작성이 필수적이다. 우리가 원하는 유용유전자의 위치 확인 및 유전자 확보를 위해 지도를 작성하게 되며 이러한 기초 자료를 바탕으로 유전자의 염색체내의 서열을 확인하고, 육종에 이용할 수 있으며, 유전체 연구의 방향을 설정 할 수 있을 것이다.

배추의 경우 본 연구실과 충남대 성장근, 최관삼 교수 연구실에서는 연구 재료로서 유전적 거리가 가장 먼 것으로 추정되는 남방형배추(권심계)와 북방형배추(지부계)를 이용하여 약배양을 통하여 doubled haploid(DH) line 133개체를 확보하였다. 133개의 DH line 중 89계통을 사용하여 RAPD 및 AFLP를 이용한 유전적 분석에 의해 분자표지를 이용한 유전자지도를 작성하였다. 현재 총 389개의 marker를 개발하여 2,694 cM 크기의 유전자지도(<http://branet.cnu.kr>)를 완성한 바 있으며, 농업과학연구원 세포유전과 김호일 과장팀에서도 서울종묘의 장원배추를 이용하여 유전자 지도를 작성하여 400여개의 RFLP지도를 작성하였으며, 몇 가지 주요 표현형에 대해서도 지도를 만들었다. 이러한 지도들은 앞으로 물리지도와 함께 육종 및 주요 유전자탐색에 기본적으로 사용될 것이며 이러한 2가지 유전자 지도 작성용 표준집단의 통합화가 앞으로 수행해야 할 과제이며 동시에 적어도 수천개의 유전자 고밀도 지도를 작성하도록 공동 노력을 기울여야 할 것이다.

물리지도작성

유전자 지도에 위치한 변이 유전자들의 분리와 염기서열의 결정을 위하여 물리적 지도를 작성해야 한다. 물리적 지도는 유전체의 일부 혹은 전체를 포함하는, 순서가 결정된 DNA조각들로 구성되며 전체 유전체연구의 중추적인 역할을

하게 된다.

유전체의 물리지도 작성 기술을 위하여 BAC(Bacterial Artificial Chromosome, 세균인공염색체) library작성기술을 이용하였다. BAC library는 생물체의 genomic DNA를 100 Kb이상 큰 크기로 절단하여 벡터에 클로닝하여 대장균에 형질전환하여 만들게 되는데, 생물체의 유전체를 연구하기 위해 반드시 사용되어야 하는 기본 기술로서, 유전자 클로닝, 물리지도 작성, 염기서열 분석, 유전자기능연구 등 유전체연구에 필수적인 핵심기술이다(그림 2).

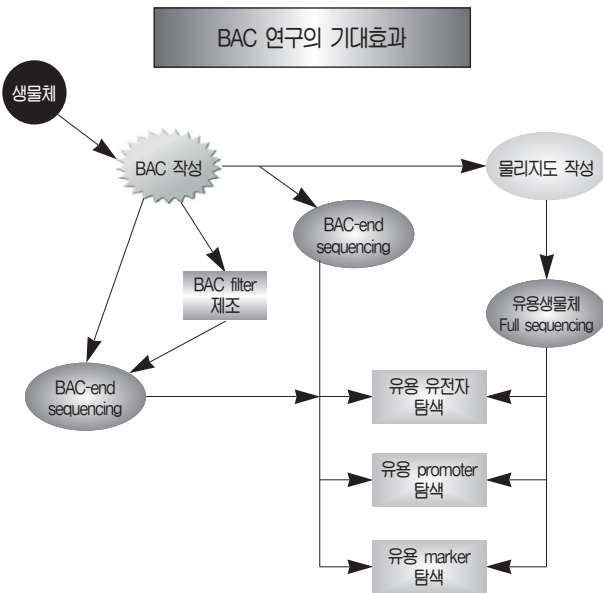


그림 2 유전체 연구를 위한 BAC 연구의 기대 효과

미국 Caltech의 Dr. Melvin Simon Lab.에서 1991년도에 처음으로 개발되었고 현재 전세계적으로 일반화되고 있는 BAC vector를 이용하여 배추 BAC library를 작성하였다. 이 BAC library는 평균 115 Kb의 길이를 갖는(그림 3) 56,592개의 clone으로 구성되어 있으며(<http://branut.cnu.ac.kr>) 이는 전염기의 약 9배 정도를 함유한 것으로서, 본격적인 유전체연구의 기본 자료로서 결정적인 역할을 할 것으로 사료된다.

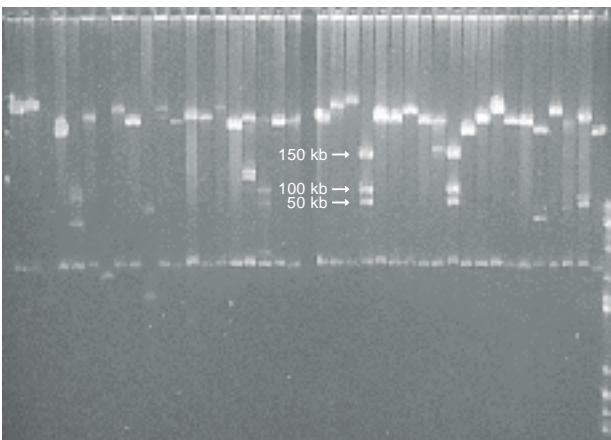


그림 3 제한효소 처리된 배추의 BAC clone.

각 clone의 순서를 결정하는 물리지도는 restriction fingerprinting analysis법 및 FPC program을 기본으로 하여 유전자지도와 상호 관련하여 진행시켜 작성하게 된다. 이렇게 작성된 물리지도는 유전자 지도상에 위치한 여러 변이 유전자를 분리하는데 이용될 수 있으며, 특히 중요한 유전자가 관련된 유전체 부위의 구조를 연구하고 이들 유전자를 분리하여 궁극적으로는 새로운 유전자의 염기서열을 확보하여 산업적으로 응용할 수 있을 것이다.

최근에는 BAC library를 이용한 물리지도가 인간, 벼, Arabidopsis 등에서 거의 완성되었으며, BAC clone의 shotgun method를 이용한 전염기서열의 분석이 인간, 벼 등에서 끝난 상태에 있다. 배추의 경우 충남대학교 생물과 허윤강 교수와 공동으로 수행중이며 이 연구는 적어도 2년내에 완성시킬 수 있도록 노력중이다. 동시에 전염기서열 분석을 위한 shotgun method등 전염기서열 분석법을 확립하였으며, 물리지도 및 염기서열분석이 진행되는 대로 본 연구실의 web site에 게재될 것이다.

EST(expressed sequence tag) 분석

생물체의 여러 조직에서 분리한 mRNA를 이용하여 제작한 cDNA library에서 random하게 cDNA클론을 얻어 개개 클론의 염기배열을 수백bp 단위로 해독하여 유용 유전자를 찾는 EST 연구는 인간(약 300만가지), 동식물에서 수많이 작성되어 있다. 해독한 염기배열의 정보는 현재까지 알 수 있는 다른 생물의 염기배열과 비교 혹은 cDNA를 상호 비교하는 것으로 발현유전자의 동정이나 조직 특이적 유전자의 탐색을 하고 있으며 DNA chip 등에 이용하고 있으나, 최근 BAC end sequencing 등 새로운 기술에 의해 대체되고 있는 추세이다.

지금까지 캘러스, 뿌리, 잎, 꽃, 공변세포 등의 library에서 농촌진흥청 농업과학기술원을 중심으로 포항공대 남홍길 교수, 서울대 최양도 교수와 이종섭 교수 등 몇 개 대학연구실에서 2,800개 이상의 EST해석이 끝났으며, 경상대에서도 과학재단 소재은행의 지원으로 배추 유전자은행(조무제 소장)을 설립 총 8,000개 정도의 EST를 분석한 것으로 보고하고 있다. 본 연구실에서는 EST RFLP용 재료로 현재 500개 정도의 EST해석이 끝났으며, 이 염기서열은 RFLP 분석용으로 사용될 것이다. 현재 여러 군데 산재되고 다양한 계통을 이용한 EST data를 종합화하고 앞으로의 체계적이고 조직적인 연구를 위해 계통을 통일화시키는 것이 앞으로의 숙제가 될 것이다. 현재까지의 EST자료는 재구축중인 본 연구실의 <http://branut.cnu.ac.kr>이나 농과원, 명지대 남백희 교수 (<http://bioserver.myongji.ac.kr>)의 홈페이지에 게재되어 있다.

BAC-end sequencing

제작된 BAC library로부터 모든 BAC clone의 거대 DNA를 추출하여 각각의 양 끝의 염기서열을 읽는 것으로서, 아직 세계적으로 몇 실험실에서만 집중적으로 연구되기 시작한 기술이다. 본 기술을 이용한다면 그림 2와 같이 전 염기서열 분석을 위한 기초자료가 확보되며, cDNA의 EST가 가지고 있는 근본적 단점 (발현되지 않거나 발현량이 아주 적은 유

전자의 탐색 불가 등)을 획기적으로 보완 대체할 수 있고, 결국 모든 유전자의 단편을 확인할 수 있어 이를 통한 유용 유전자의 탐색이 가능하며, 동시에 DNA chip의 재료로서 이용될 수 있다. 또한 promoter의 확보가 가능하며, 이 clone중 반복염기서열을 밝혀 SSR, SNP marker 등 유용 분자마커를 대량으로 확보할 수 있는 유용한 기술이다.

배추의 경우 BAC-end sequencing기술을 확보하여 이미 완성된 BAC library의 56,592개 clone으로부터 염기서열 분석을 실시하고 있으며 조만간 본 연구실의 web system에 게재될 예정이다.

분자 세포유전학적 연구

충남대 생물과 방재욱 교수에 의해 수행되고 있는 배추의 핵형분석 연구는 기존의 carmine 염색법 및 FISH, GISH법 그리고 더 나아가 microdissection법에 의한 특정유전자의 분리연구를 수행하고 있다. 현재 배추에서 이 방법을 이용하여 핵형분석을 완료하였고, Gimsa banding에 의해 각 염색체의 band pattern을 확립하였으며, 특정유전자(5S, 45S rRNA gene)를 이용한 FISH에 의한 배추의 유전분석을 수행한 바 있다.

특히 최근에 배추의 BAC clone을 이용한 BAC-FISH에 성공(그림 4)하여 앞으로 배추의 BAC clone을 이용한 물리지도 완성에 획기적인 발전을 기대할 수 있게 되었다.

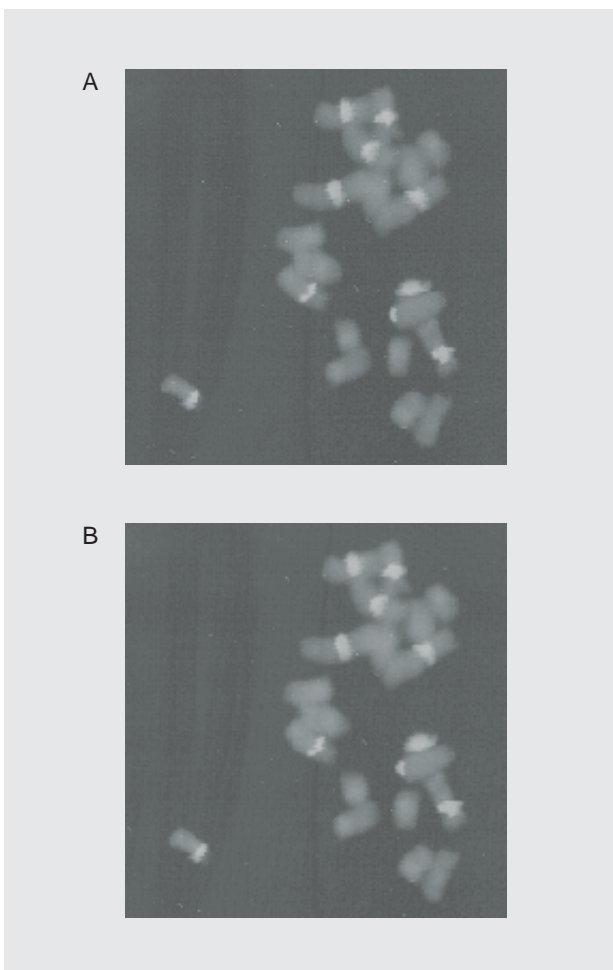


그림 4 배추의 BAC-FISH 결과 (A) BAC clone을 Dig-label한 BAC-FISH (B) 2개의 BAC clone을 이용한 multi color BAC-FISH

Functional Genomics

유전자의 기능을 분석하기 위한 연구로서 최근에 가장 관심을 끄는 기술은 역시 DNA chip일 것이다. 그러나 이러한 chip 작성을 위해서는 유전자의 염기서열이 기본적으로 확보되어야 한다. 동시에 새로운 유전자의 기능을 확인하기 위한 유전자 tagging기술의 개발 및 유용 돌연변이주의 확보도 중요한 분야가 될 것이다.

배추의 경우 본 연구실에서는 현재 진행되고 있는 BAC-end sequencing 자료가 나오는 대로 DNA chip용으로 사용될 것이며, 최근에 transposon tagging을 위한 옥수수의 Ac/Ds element를 형질전환하여 돌연변이 유기를 시도하고 있다. 거대 DNA 형질전환 기술을 확립하여 미지의 거대 DNA를 식물에 형질전환 함으로써 그 기능을 확인하는 genetic complementation기술도 강원대 임학대 교수, 순천대 이효연 교수 등과 협동으로 연구하여 일부 확보된 상태로, 앞으로 이러한 일련의 연구를 기반으로 수많은 유용유전자들이 확보될 것으로 기대된다.

형질전환을 통한 GMO 작물의 육성은 주로 농업과학기술원 세포유전과(김호일 과장)에서 수행하고 있으며 현재까지 bt유전자를 삽입한 내충성 배추를 개발하였고, 제초제 저항성, 웅성불임성 등 여러 가지 유전자의 삽입을 통한 유용 품종육성을 시도하고 있다. 동시에 새로운 종류의 promoter 탐색을 통하여 화분 특이 발현 promoter를 개발하는 개기도 올린 바 있다.

배추의 중요한 연구대상인 자가불화합성연구를 위하여 중앙대 이수성 교수, 순천대 노일섭 교수, 고려대 정용윤 교수 등이 상호 협의하여 연구를 진행하고 있으며, 최근에 PCR 분석법을 이용해 자가불화합성 유형의 분류 체계가 완성된 바 있다.

결론

유전체 연구의 궁극적 목적이 유전체 기능의 확인 (Functional Genomics)이며 또한 한편으로 이를 이용한 작물의 개선 및 유용물질 대량생산에 있기 때문에, 유전체 연구는 유전자 기능 확인을 위한 기초재료의 확보와 관련 기술의 개발 및 기능성 유전자의 대량 확보 방향으로 전개되어야 한다.

따라서 이미 선진국에서 진행되어 왔듯이 우선적으로 거대 genomic library를 작성하고, 유전자지도 및 물리지도를 작성한 후 이를 이용하여 genome sequencing를 하는 structural genomics가 되어야 이로부터 Functional Genomics가 출발할 수 있을 것이다.

최근에 유행처럼 번지는 DNA chip관련 분야도 결국은 유전자의 염기서열을 확보하지 못하면 아무 소용이 없다는 것은 상식이다. 이러한 염기서열의 확보를 위해서는 각 생명체에 대한 유전자지도작성, BAC library구축 및 염기서열분석이 반드시 선행되어야 할 것이다.

국내에서 배추에 대해 RAPD, AFLP 및 RFLP를 이용한 유전자지도의 완성, 배추의 BAC library 및 full length cDNA library 작성확보 및 이를 이용한 물리지도가 완성이 되어 이를 배추의 Functional Genomics 연구에 활용할 경우, 배추 및 연관된 십자화과작물(유채, 양배추, 무 등)의 연구에 세계적

위치를 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 한국의 독창적 배추 유전체 연구는 일본의 배 연구, 미국의 인간 유전체 연구 등과 필적한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

또한 배추의 육종에 필요한 정보를 국내 종묘회사에 제공하게 됨으로서 한국의 배추 및 관련 작물의 육종 및 신품종 육성이 세계적 우위를 점하게 될 것이며, 김치 산업과 관련된 주요 유전자는 물론, 십자화과 식물의 특성상 의약품 등 특수 소재용 유용 유전자의 확보도 가능할 것이다.

동시에 이러한 기술은 전 생명체에 응용될 수 있을 것으로 여겨지며, 본 연구실에서는 이미 인삼, 마늘 등을 포함한 국내 유용 채소 및 약용자원과 미생물 수집종에 대하여 BAC library 작성을 이미 작성중이거나 수년 내 완료할 예정으로 있고, 이미 확보된 여러 가지 핵심기술의 특허화 및 국내 연구자들에 대한 제공을 계획하고 있어, 앞으로 이를 이용한 유용유전자의 염기서열 확보 및 특허화를 통해 한국 생명공학산업의 핵심적 역할을 담당할 수 있으리라 기대하고 있다.



임용표
식물분자유전 박사
충남대학교 원예학과 교수

서울대학교 농과대학 원예학과 학사, 석사
미국 Univ. of Rhode Island 식물분자유전 박사

1987. 9~1988. 6 미국 Yale University 생물과 Post. Doc.
1988. 6~1992. 3 한국인삼연초연구소 유전생리부 선임연구원
1994. 8~1994. 8 미국 CALTECH 초청연구원
1994. 12~1995. 2 일본 농업생물자원연구소 초청연구원
1997. 1~1998. 12 식물조직배양학회 편집위원장

1999. 4~현재 Brassica 2000(3rd International Society of Horticultural Science, International Symposium on Brassicas)
12th Crucifer Genetic Workshop Scientific Committee

1999. 1~현재 Journal of Plant Biotechnology Executive Editor

1999. 5~현재 2006 27th International Horticultural Congress International Organizing Committee Secretary(간사)

1999. 5~현재 농업과학기술원 유전자변형체 안전위원회 위원

Life Scientist를 위한 바이오식품 특별 가격할인

보한바이오메디칼(주)에서는 홈페이지(www.bohan.co.kr)를 방문하시는 Life Scientist를 대상으로 바이오 건강음료 [아포이당-U]의 특별 가격할인을 실시합니다.

새로운 차원의 바이오 건강음료 [아포이당-U]는 건강을 지향하시는 분들에게 꼭 필요한 제품입니다. 특히, 여름철 보양을 하시는 분들이나 추석 때 웃어른들께 의미있는 선물이 될 수 있을 것입니다.

- ◎ 품목 : 바이오 건강음료 【아포이당-U】
- ◎ 기간 : 2000년 8월 21일(월) ~ 9월 6일(수) (17일간)
- ◎ 대상 : 보한(TaKaRa-Korea) 홈페이지를 방문하시는 Life Scientist
- ◎ 자격 : 인터넷으로 주문하신 분에 한하여 가격할인
- ◎ 가격할인
 - 1세트 : 165,000원 → 148,500원 (10% D/C, 16,500원 할인)
 - 2세트 : 330,000원 → 280,500원 (15% D/C, 49,500원 할인)
 - 3세트 : 495,000원 → 396,000원 (20% D/C, 99,000원 할인)
 - 4세트 이상 : 정가의 20% D/C

자세한 내용은 보한 홈페이지(www.bohan.co.kr) 초기화면을 참조하시거나 지역별 전문대리점에 문의하시기 바랍니다.

추석선물고

걱정 끝!

1. Rat 갈색 지방세포에서 UDP-1 유전자의 발현

Rat 갈색 지방세포 배양 Kit

TaKaRa Code MK422 1 Kit

갈색 지방전구세포가 지방세포로 분화할 때 UCP(uncoupling protein:UCP-1, UCP-2, UCP-3)유전자 중 UCP-1의 발현이 유도된다고 알려져 있다. Rat 갈색 지방세포 배양 Kit (TaKaRa Code MK422)을 사용하여 배양한 갈색지방세포에 노르아드레날린을 첨가하여 3종류 유전자의 발현양에 특징적인 차이를 보이는지 비교 조사하였다. 또 갈색 지방조직을 rat에서 절단하여 3종 UCP 유전자의 발현에 관하여 검토하였다.

■ 실험 1 : 갈색 지방 배양세포에서 UCP유전자의 발현

【방법】

Kit 내의 전구세포를 용해하여 증식배지로 2.5×10⁵ cells/100 mm φ plate의 농도로 배양을 개시하였다. 증식밀도가 약 50~60% 정도 된 후(약 1일 후), 분화 배지로 교환하여 배양을 계속하였다(약 48시간). 또 계대배지로 교환하여 3일간 배양한 후 노르아드레날린을 최종농도 2 μM이 되도록 배지에 첨가하였다. 경시적(증식배지만으로의 배양 6일 후(대조) ; 노르아드레날린 첨가 후 0, 2, 4, 6, 21 시간째)으로 세포를 회수하고 아래의 protocol에 따라 RNA를 추출한 뒤 각 목적에 맞는 primer를 사용하여 RT-PCR 하였다. RT-PCR에는 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1(TaKaRa Code R019A)와 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(TaKaRa Code TP3000)을 사용하였다. 형광 image analyzer FMBIO® II Multi-View를 사용하여 증식 band의 형광강도를 측정하였다. β-actin의 양으로 각 시료의 mRNA양을 보정한 후 각 UCP 유전자의 발현량을 비교하였다.

배양 세포

- 배지 제거
- 0.02% EDTA/PBS로 세포를 바리
- 원심분리(3000 rpm×5분)
- Plate를 PBS로 2회 세척

세포 Plate

- Total RNA 추출
- OD₂₆₀을 측정하여 농도를 계산

RNA

- RT-PCR로 목적유전자 증폭
- 전기영동
- FMBIO® II Multi-View를 이용하여 증폭 band의 형광강도를 측정

각 UCP유전자의 발현양 비교

【결과】

전기영동 결과를 그림 1에, FMBIO® II Multi-View로 조사한 3종의 UCP 유전자의 상대발현량(상대형광강도)을 그림 2에 나타내었다. 노르아드레날린 처리로 UCP-1 유전자가 선택적으로 유도됨을 확인하였다.

■ 실험 2 : 갈색 지방조직에서 UCP 유전자의 발현

【방법】

Rat(SLC:SD ♂3W)에서 갈색 지방조직을 절단하였다. 실험 1과 동일하게 RNA를 추출하여 각 target에 대응하는 primer를 사용하여 RT-PCR한 후 전기영동하여 증폭 band를 확인하였다.

조직

- Total RNA 추출
- OD₂₆₀을 측정하여 농도를 계산

RNA

- RT-PCR로 목적유전자 증폭

전기영동

【결과】

전기영동 결과를 그림 3에 나타내었다. Rat 갈색 지방조직 내에 UCP-1, UCP-2, UCP-3 모든 유전자가 발현함을 확인하였다.

【참고문헌】

- 1) Emilsson, V., Summers, R. J., Hamilton, S., Liu, Y.-L., and Cawthorne, M. A. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**, 450-454
- 2) Sasaki Noriyasu, Uchida Eizi, Niiyama Masami, Saito Masayuki (1996) *가축생화학* **33**, No. 1, 13-18

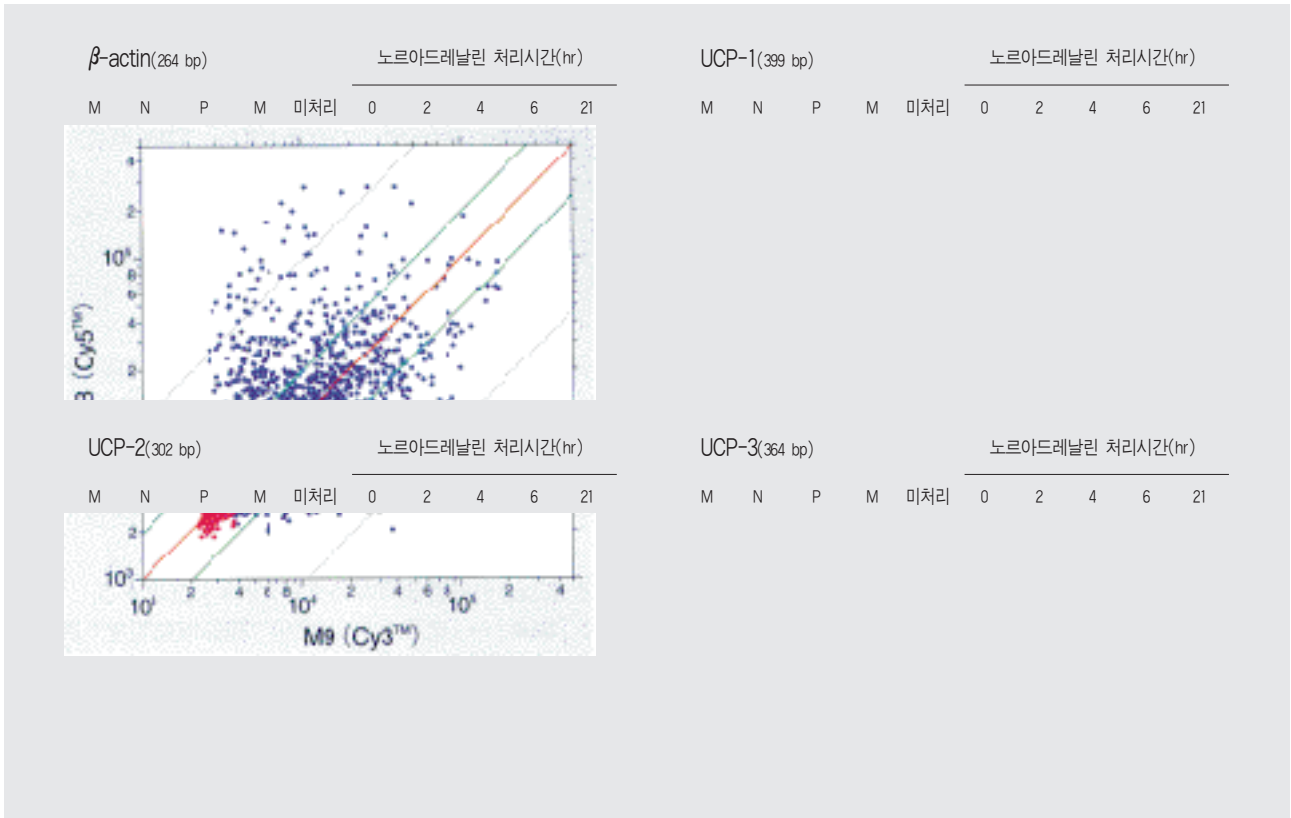


그림 1 노르아드레날린을 처리한 갈색 지방세포에 있어서 3종의 UDP 유전자의 발현

전기영동 조건 : 3% NuSieve® 3:1 Agarose gel(TAE buffer), 시료 각 5 μ l.

Lane N : Negative control(검체 RNA 대신에 DEPC-H₂O를 첨가)

M : 100 bp DNA Ladder, 100 ng(band의 size는 아래로부터 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp(진한 band))

P : Positive control

미처리 : 증식배지만으로 6일간 배양한 세포

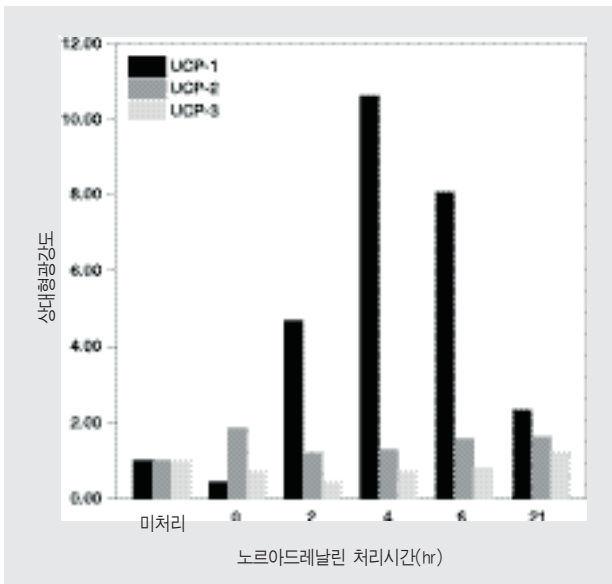


그림 2 배양세포에 있어서 3종의 UCP 유전자의 상대발현

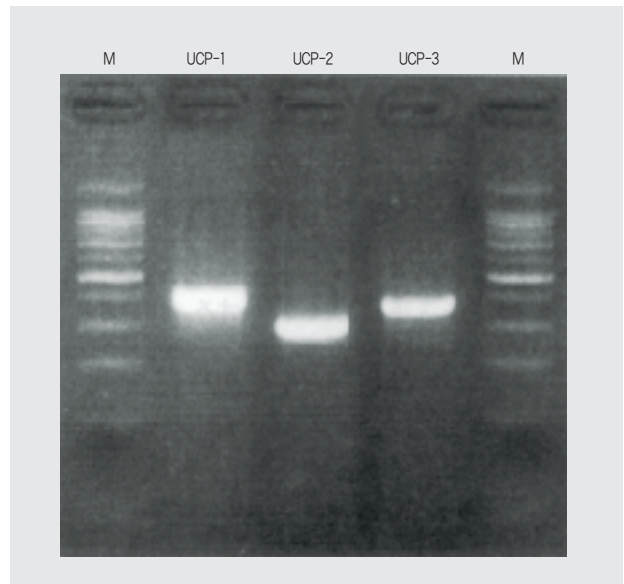


그림 3 Rat 갈색 지방조직에서 3종 UCP 유전자의 발현
전기영동 조건은 그림 1과 동일

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Rat 갈색 지방세포 전용배지 Set	MK423	1 Set
Rat 갈색 지방전구세포	MK424	1 vial

2. 단백질의 in gel S-Carboxymethylase와 Deblocking Aminopeptidase 소화

Pfu Deblocking Aminopeptidase(DAP) TaKaRa Code 7338 50 µg

단백질의 아미노산 서열해석에 있어서는 SDS-PAGE로 분리한 단백질의 내부서열을 결정해야 하는 경우가 종종 있다. 단편 peptide의 회수효율로 보면 gel 내에서 그대로 특이적 protease로 소화하여 용출한 단편 peptide를 HPLC로 분리, 분취하여 분석하는 것이 최상이다¹⁾. 그러나 사용하는 protease나 단백질에 따라서는 gel 내에서 환원 S-carboxy methylase(S-CM)화 해놓아야만 하는 경우도 있다. 본 고에서는 in gel에서 단백질을 환원 S-CM화 하는 방법과 S-CM화 단백질의 gel로부터의 용출 및 Deblocking Aminopeptidase 소화로의 응용에 대해 소개한다.

■ in gel S-CM화

SDS-PAGE로 단백질을 분리하는 경우, 시료 단백질을 통상 2% SDS를 함유하는 Tris-HCl 용액(pH6.8) 내에서 95°C, 3~4분간 처리한다. 이 경우 통상 DTT나 mercaptoethanol 등의 환원제는 공존시키지만, S-CM화 등의 보호조작은 하지 않는다. 그러나 gel 속에서 단백질을 소화하는 경우 어떻게든지 환원 S-CM화 해주어야만 하는 경우가 있다.

특히 exopeptidase를 이용해서 소화하는 경우가 여기에 해당한다. Gel 속에서의 환원 S-CM화의 과정은 아래와 같다.

- ① CBB 또는 단백질의 수식이 일어나지 않는 다른 적당한 염색법으로 염색한 spot을 gel에서 잘라내어 원심 튜브에 넣는다.
- ② 500 µl의 50% Acetonytryl/0.1 M Tris-HCl 용액(pH8.0)을 첨가하여 gel을 세정(10분, 2회)한다. 세정액을 끝이 가는 pasteur pipet으로 제거한다.
- ③ Gel 단편에 200 µl의 5 M guanidin-HCl/1 mM EDTA/2 M Tris-HCl(pH8.5) 용액(완충액 A)를 첨가, gel을 팽윤한다(약 1시간).
- ④ 20 µl의 10 mg DTT/0.3 ml 완충액 A를 다시 첨가하고 용기를 N₂ gas로 치환한 후 실온에서 약 2시간 방치한다.
- ⑤ 20 µl의 25 mg ICH₂COOH/0.3 ml 완충액 A를 첨가, 잘 혼합한다.
- ⑥ 용기 내를 다시 N₂ gas로 치환한 후 어두운 곳에서 약 30분간 방치한다.
- ⑦ 용기내의 모든 용액을 pasteur pipet으로 제거한다.
- ⑧ 500 µl의 0.1% HCOOH를 첨가하여 gel을 세정(10분, 2회)한다.
- ⑨ 500 µl의 50% acetonytryl을 첨가하여 gel을 세정(10분, 2회)한다.
- ⑩ 500 µl의 50% acetonytryl을 첨가하여 gel을 탈수한 후(2~3시간), 동결건조한다.

이상의 조작으로 gel 속의 단백질은 S-CM화가 되고, 또 탈수 건조함으로써 gel로부터의 단백질의 용출 효율이 상승한다.

■ Deblocking Aminopeptidase 소화

Deblocking aminopeptidase나 trypsin 등의 저분자형 endo-protease로 gel 속의 단백질을 소화하는 경우는 단백질을 반드시 S-CM화 할 필요는 없다. 그러나 gel 속의 단백질을 aminopeptidase나 carboxy peptidase등의 고분자형 exoprotease로 소화하는 경우는 단백질을 환원 S-CM화 하고, 동시에 gel로부터 용출해 둘 필요가 있다. N말단 보호단백질인 소의 superoxide dismutase(SOD)를 SDS-PAGE로 분리하고, gel 속에서 환원 S-CM화 한 후 aminopeptidase의 일종인 Deblocking Aminopeptidase(DAP)²⁻⁴⁾를 이용하여 소화, 분리한 예를 아래에 나타내었다(분석 결과는 그림 1에 소개).

- ① 소의 SOD를 SDS-PAGE로 분리한 후 전술한 방법에 따라 환원 S-CM화 하고 다시 gel을 원심 튜브 내에서 탈수 건조한다.
- ② 200 µl의 0.1 % SDS/100 mM N-ethyl morpholine(NEM) 완충액(pH10.0)을 첨가하여 gel을 팽윤한다(1~2 시간).
- ③ 이 용액 속에서 gel을 잘게 파쇄하고 50°C에서 2시간 진탕한 후 Ultrafree C3GV(Millipore사)로 여과하고, 여액에 함유된 S-CM화 단백질을 농축 건조한다.
- ④ 400 µl의 0.2 mM CoCl₂/100 mM N-ethyl morpholine(NEM) 수충액(pH7.8)을 첨가한 후 여기에 DAP를 효소/기질의 비가 1/5이 되도록 첨가하고, 50°C에서 48시간 소화한다. 소화물을 농축건조한다.
- ⑤ 소화물을 10 µl SDS-PAGE용 시료 용해액에 용해한 후 SDS-PAGE를 한다. 목적단백질 band를 gel에서 잘라내고 전향 ⑨~⑩ 및 본항 ②~③의 조작하여, 소화 단백질을 추출하여 아미노산 서열해석에 사용한다.

한편 step ②에서 이용한 완충액에 0.1% SDS를 넣는 이유는 DAP가 이 농도의 SDS에 내성을 가짐과 동시에 단백질의 추출효율이 증가하기 때문이다. 단, 사용하는 protease에 따라서는 SDS를 사용할 수 없는 경우도 있다. 또 step ④는 DAP 고유의 소화 조건이며, 이용하는 protease에 따라 조건을 변경할 필요가 있다.

Step ⑤에서는 DAP의 특성상, 효소/기질의 비를 1/5로 이용하고 있어 DAP를 다시 SDS-PAGE로 제거하지만, Pfu N-acetyl deblocking aminopeptidase(Ac-DAP)(근일 발매 예정)을 이용하거나 protease를 보다 작은 효소/기질비(1/10 이하)로 사용하는

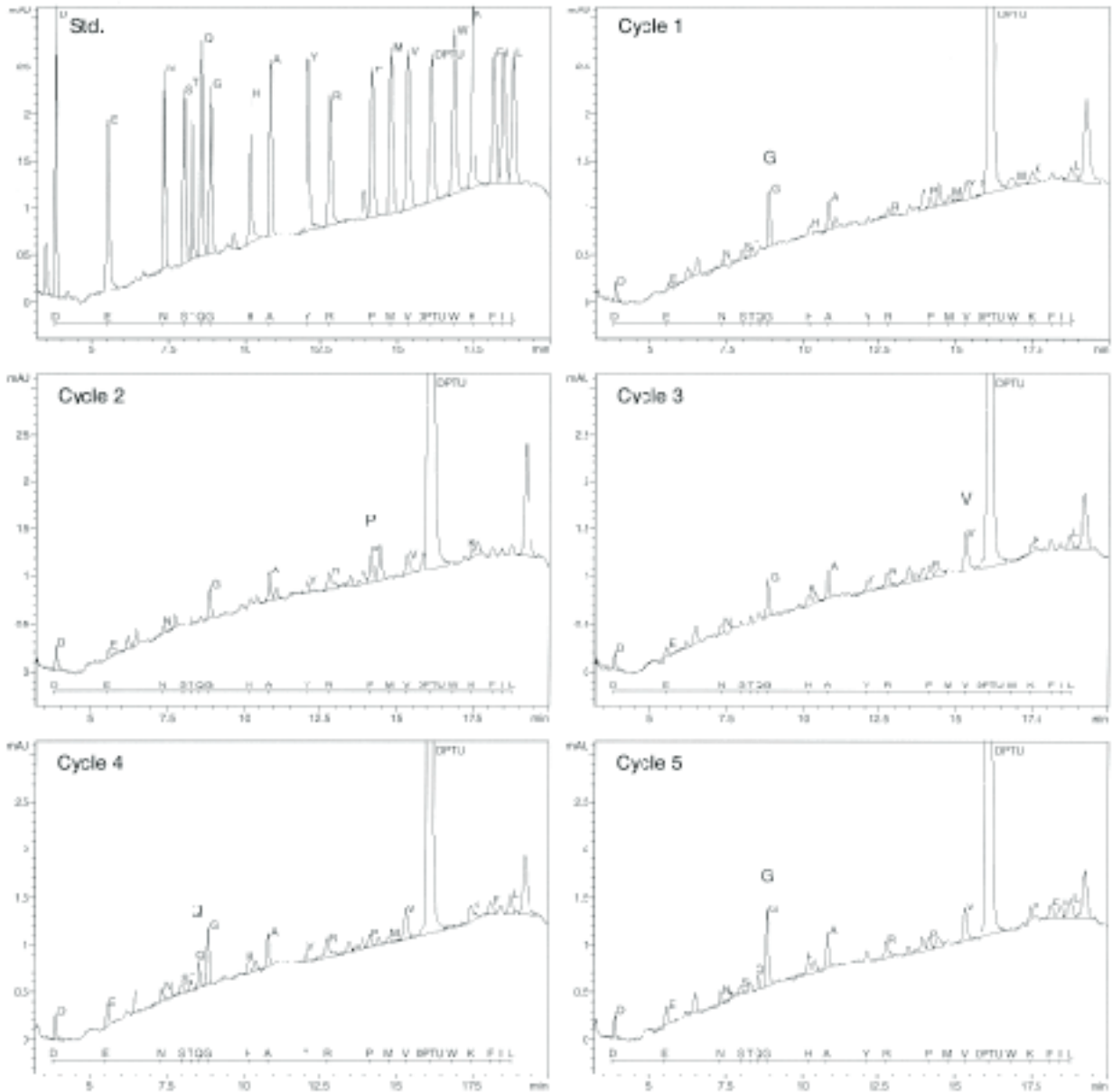


그림 1 DAP로 소화한 S-CM화 소 SOD의 아미노산 서열 해석

SOD의 N말단 아미노산 서열 ; 초기 시료량 ; 300 pmol

Ac-ATKAWCLKGDGPVQGTIHFEAKGDTWVITGSITGL ... (진한 이탤릭체로 표기한 아미노산이 해석되었다)

경우는 이 조작이 필요없다. 또 S-CM화 단백질이 극히 미량인 경우에는 시료의 손실을 고려해서 step ④에서 얻은 소화물을 그대로 아미노산 서열해석에 사용하는 방법(DAP의 N말단 아미노산 서열은 이미 알고 있으므로 이것이 가능)도 고려할 수 있다.

【참고문헌】

- 1) [http:// donatello.ucsf.edu/ingel.html](http://donatello.ucsf.edu/ingel.html) 등
- 2) BIOVIEW (1998) **24**, p10-12.
- 3) S. Tsunasawa (2000) 단백질, 핵산, 효소 **45**. 186-192.
- 4) T. Tanigawa 등 (1999) 생화학 **71**, 862.

【관련제품】

제품명

Pfu N-acetyl deblocking aminopeptidase(Ac-DAP)

(근일 발매 예정)

3. Retrovirus vector pDON-AI에서 개량 GFP(red-shift GFP)의 발현

pDON-AI DNA

TaKaRa Code 3650 20 µg

해파리에서 분리한 green fluorescent protein(GFP)는 비방사성으로 경시적인 검출이 가능한 분자 marker로 최근 유전자 발현의 reporter 분자로 많이 이용되고 있다. TaKaRa는 야생형 GFP의 여기파장 및 형광파장을 각각 shift한 개량 GFP를 발현하는 vector로 red-shift GFP(rsGFP) vector 및 blue fluorescent protein(BFP)를 판매하고 있다. rsGFP와 BFP는 야생형 GFP보다 강한 형광을 발산한다. 본 고에서는 rsGFP를 retrovirus vector pDON-AI에 삽입하고 retrovirus packaging 세포 GP+E86에 일시적으로 도입했을 때의 plasmid vector 유래의 transient expression 및 그 상층액에서 조제한 vector virus로 NIH/3T3 세포에 유전자를 도입하였을 때의 stable expression을 확인하였기에 소개한다.

■ pDON-AI-rsGFP의 구축

rsGFP 발현 vector pQBI25(TaKaRa Code 3131)에서 제한효소 Sca II, Xba I으로 rsGFP를 잘라내어 평활말단화한 후, pDON-AI의 BamH I 부위(평활화)에 삽입하여 pDON-AI-rsGFP를 구축하였다(그림 1).

■ Packaging 세포 GP+E86으로의 transient transfection 및 재조합 retrovirus의 조제

35 mm dish에 3×10^6 cells의 GP+E86 세포를 접종한 후 다음 날 cationic liposome으로 transient transfection하고 48시간 후에 상층을 회수하여 virus액으로 사용하였다. Transient expression에서는 현미경으로 강한 형광을 관찰할 수 있었다(그림 2).

■ NIH/3T3 세포에서의 안정 발현

조제한 virus액에 polybrene을 8 µg/ml이 되도록 첨가하고 NIH/3T3 세포에 감염한 후 감염세포를 500 µg/ml G418의 존재하에서 선택한 세포집단을 FACS로 분석하였다. 안정적으로 발현한 rsGFP를 FACS로 검출할 수 있었다(그림 3).

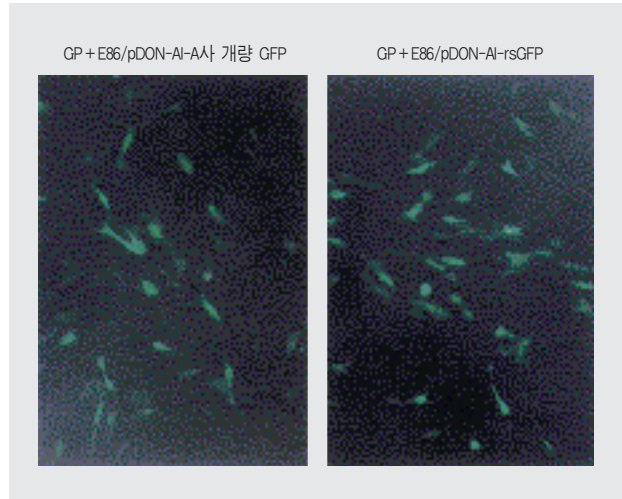


그림 2 GP+E86 세포에서의 transient expression(high copy)

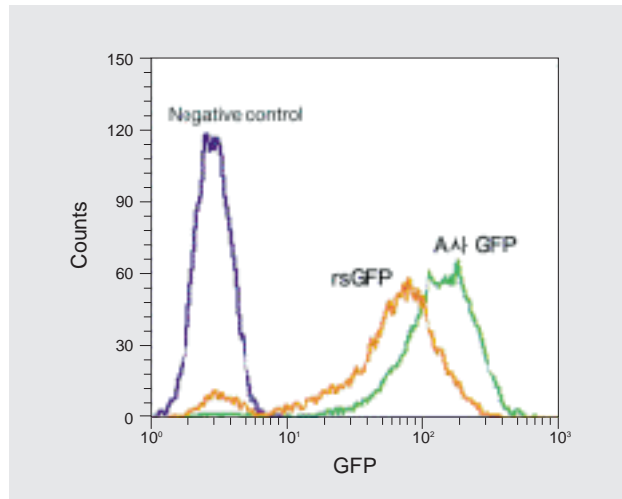


그림 3 NIH/3T3 세포에서 안정적으로 발현(1 copy 유도)한 경우 GFP의 형광강도 비교(FACS 분석)

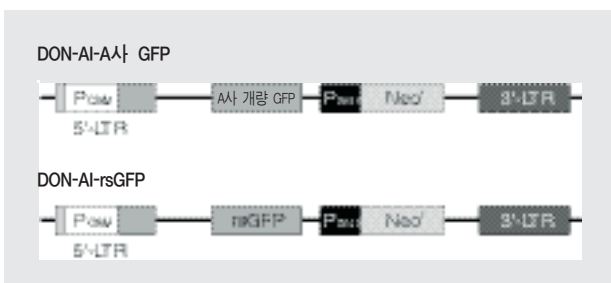


그림 1 GFP 발현 retrovirus vector plasmid

【관련제품】

제품명	TaKaRa Code	포장량
rsGFP vector		
pGBI 25	3131	20 µg
pGBI 63	3132	20 µg
pGBI PGK	3133	20 µg
pGBI Pol II	3134	20 µg
BFP vector		
pGBI 50	3135	20 µg
pGBI 67	3136	20 µg

Real Time Monitoring이 가능한 정량 PCR SYSTEM

TaKaRa Code SC100

Smart Cycler[®] System

Smart Cycler[®] System은
다양한 기능을 가진
정량 PCR System입니다.
「Real Time PCR을
monitoring하고자 하는데
가격이 너무 비싸서...」라고
구매를 미루던 분께
금번 TaKaRa에서
적절한 가격으로 제공합니다.



▶ 특징

- 고속가열 및 냉각으로 증폭시간 단축
- 한번에 16가지 program 실행가능
- Real Time으로 Monitoring
- 4가지 색깔의 형광을 동시에 검출
- 6대까지 증설 가능
- 표식시약이나 hybridization 등 기존의 검출 system에 대응 가능
(TaqMan Probe^{*1}, Molecular Beacon, SYBR^{*2} Green 등)

^{*1} PE Biosystem사의 등록상품입니다.

^{*2} Molecular Probes사의 등록상품입니다.

▶ 사양

본 체	305(W)×305(D)×250(H)mm
중 량	10 kg
전 원	100~240 VAC, 50/60 Hz, 350 W
온도제어능력	가열시(최대) : 10°C/초(50~95°C) 냉각시(최대) : 2.5°C/초(95~50°C)
온도제어정도	+0.5°C(60~95°C)

본 제품은 개량을 위하여 예고 없이 변경될 수도 있습니다.

Cepheid사의 제품입니다.

TaKaRa Ex Taq의 탁월한 성능을

지난 한국산업미생물학회(4월 28일) 춘계학술대회를 시작으로 “한번 써 봅시다. TaKaRa Ex Taq” 무료제공 행사가 6월 30일 여러분의 뜨거운 성원 속에 끝났습니다. 총 100여 기관에서 700여 분이 Ex Taq을 신청하여 주셨습니다. 행사에 참여하여 주신 여러분의 성원에 다시 한번 감사 드립니다.

TaKaRa Ex Taq은 LA PCR™의 원리를 응용한 3' → 5' exonuclease 활성(proof reading 활성)을 갖는 내열성 DNA polymerase로. 통상의 PCR 조건 하에서 종래의 Taq DNA polymerase와 비교하여 높은 증폭효율, 낮은 mismatching율, 보다 긴 증폭을 실현한 제품입니다.

말로만 듣던 성능을 직접 소비자의 실험을 통해 한번 확인 해볼까요?

● 사례 1

서울대 천연물 연구소 김영식 교수님실 김완석 선생님

미생물로부터 정제된 단백질로부터 얻은 두개의 internal sequence를 바탕으로 각각에 대한 두 가지의 primer를 설계하여 합성하였다. 이 primer로 이 미생물의 genomic DNA를 주형으로 하여 screening probe로 사용할 특정 단편을 얻기 위한 PCR을 실시하였다. 기존에 보유하고 있던 B사의 Taq polymerase를 사용한 PCR에서는 만족할 만한 결과를 얻지 못

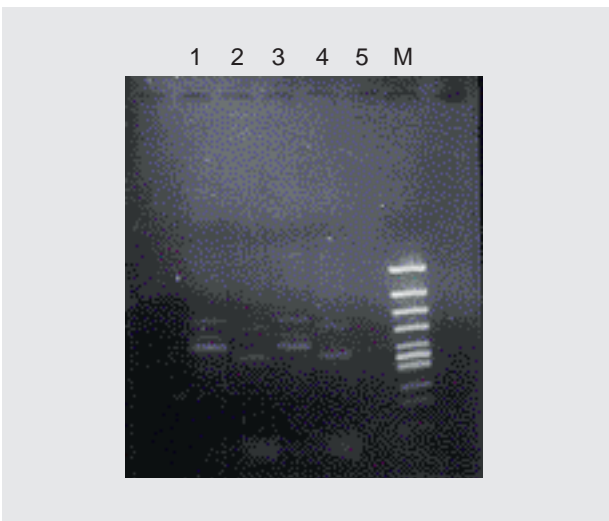
하였다. 그런데 TaKaRa에서 Ex Taq sample을 무료로 사용할 기회를 준다는 행사내용을 보고 신청하여 Ex Taq으로 같은 조건에서 PCR을 수행한 결과 기존의 B사의 Taq을 가지고 실험을 하였을 때는 얻지 못한 하나의 특정 단편을 증폭하는 만족스러운 결과를 얻게 되었다.

■ PCR 조건

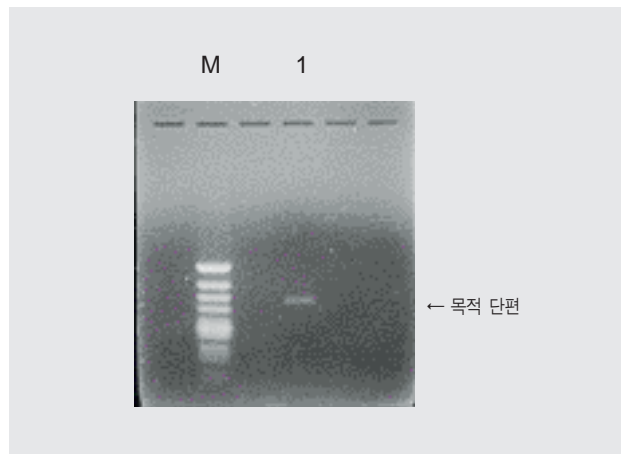
Denaturing :	94°C	10 min	}	30 cycles
Denaturing :	94°C	90 sec		
Annealing :	60°C	3 min		
Extension :	72°C	2 min		
Denaturing :	94°C	90 sec	}	1 cycle
Annealing :	60°C	3 min		
Extension :	72°C	10 min		
Store 4°C				

■ 결과

1. B사의 Taq polymerase를 사용한 PCR
(목적 단편을 얻지 못하고 다양한 밴드가 나타났다)



2. TaKaRa Ex Taq polymerase를 사용한 PCR
(목적하는 단일 밴드를 얻었다)



연구자 여러분이 직접 확인하였습니다.

● 사례 2

연세대 생화학과 핵산 생화학실 이연희 선생님

The PCR of *Caenorhabditis elegans* cosmid DNA

□ Cosmid : T10B11

□ 길이: 32,314 bp

□ 농도 : 10 ng/ μ l

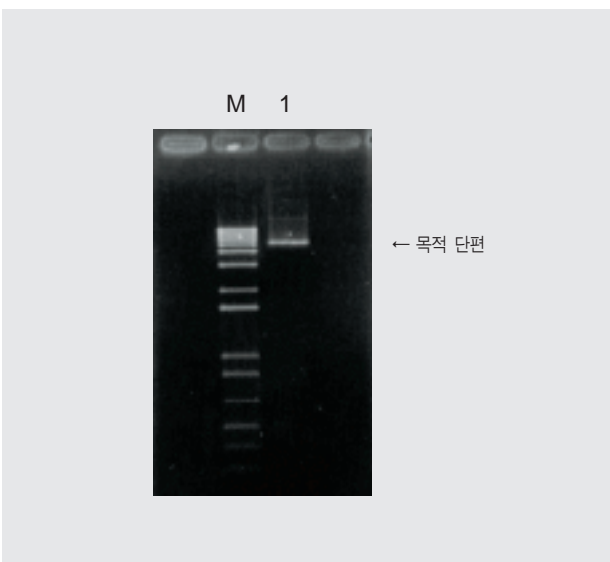
□ PCR reaction mixture

cosmid DNA	1 μ l
primer 1(10 pmol)	2 μ l
primer 2(10 pmol)	2 μ l
10 \times <i>Ex Taq</i> Buffer	2 μ l
dNTP	2 μ l
<i>Ex Taq</i>	0.5 μ l
dH ₂ O	10.5 μ l
total	20 μ l

■ PCR 조건

Denaturing : 94°C 5 min
 Denaturing : 94°C 30 sec
 Annealing : 55°C 40 sec
 Extension : 72°C 6 min
 (PERKIN ELMER PCR machine)
 Extension: 72°C 7 min
 Store 4°C

} 35 cycles



● 사례 3

서울대 미생물학과 이계준 교수님실 김연화 선생님

□ PCR pre-mix reaction mixture

primer 1(100 pmol/ μ l)	1.2 μ l
primer 2(100 pmol/ μ l)	1.2 μ l
10 \times <i>Ex Taq</i> Buffer	40 μ l
Template(up to 2 μ g)	4 μ l
<i>Ex Taq</i>	1.8 μ l
DMSO	40 μ l
dH ₂ O	92.6 μ l
total	220.8 μ l

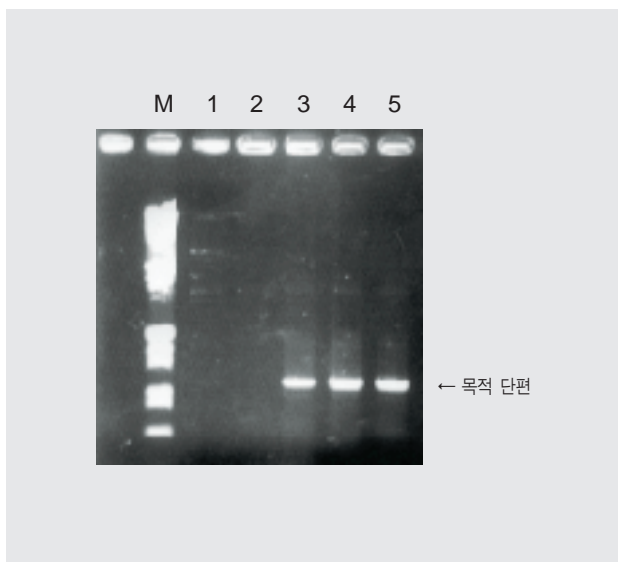
reaction mixture	26 μ l
dH ₂ O	24 μ l
total	50 μ l

■ PCR 조건

Hot start : 95°C 5 min
 Denaturing : 95°C 1 min
 Annealing : 57°C 1 min
 Extension : 72°C 90 sec
 Extension : 72°C 5 min
 Store 4°C

} 30 cycles

■ Electrophoresis 6 μ l / 50 μ l loading





Pyrithiamine 내성 유전자를 이용한 *Aspergillus* 형질전환용 Vector

Pyrithiamine 내성 Vector System (Vector & 선택약제 Pyrithiamine)

pPTR I DNA	TaKaRa Code	3621	20 μ g
pPTR II DNA	TaKaRa Code	3622	20 μ g
Pyrithiamine	TaKaRa Code	9001	5 mg

금번 곰팡이 *A. oryzae* 유래의 Pyrithiamine(PT) 내성유전자 *ptrA*¹⁾를 선택 마커로 하는 *A. oryzae*, *A. nidulans* 등의 *Aspergillus*속 진균을 숙주로 하는 사상균·대장균 shuttle vector인 pPTR I 및 pPTR II(그림 1)를 새로 개발하였다. PT 내성 형질전환 시스템은 thiamin analogue인 PT와 그 내성유전자를 선택 마커로 하는 vector를 조합한 형질전환 시스템이다. 약제내성형질에 의해 선택하므로 영양 요구성 marker를 필요로 하지 않으며, PT에 감수성을 보이는 야생주 *A. oryzae*를 필두로 *Aspergillus*속 진균에 폭넓게 이용할 수 있다. pPTR I은 숙주염색체 DNA에 삽입한 염색체 재조합형

vector이다. 또, *A. nidulans*의 복제 개시점 AMA1²⁾을 포함한 pPTR II는 숙주균체내에서 plasmid의 상태로 유지되는 자율 복제형 vector이다.

■ 실험례 1 : pPTR I 및 pPTR II vector를 이용한 *A. oryzae*의 형질전환

pPTR I 및 pPTR II를 protoplast-PEG법으로 *A. oryzae* RIB128(wild type)주에 각각 도입하였다. 선택배지는 0.1 μ g/ml의 PT를 포함한 Czapek-Dox(CD) 최소배지를 사용하였다. 형질전환 효율은 pPTR I로 6.6 형질전환체/ μ g plasmid DNA, pPTR II로 344 형질전환체/ μ g plasmid DNA였다. 그림 2와 같이 형질전환체는 명확한 colony를 형성하였다(그림 2).

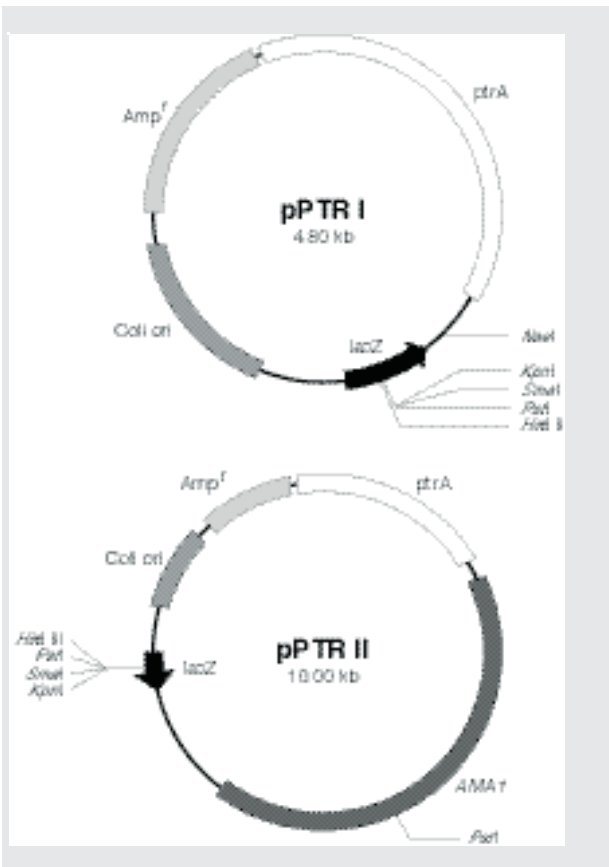


그림 1 pPTR I, pPTR II의 구조의 개략도

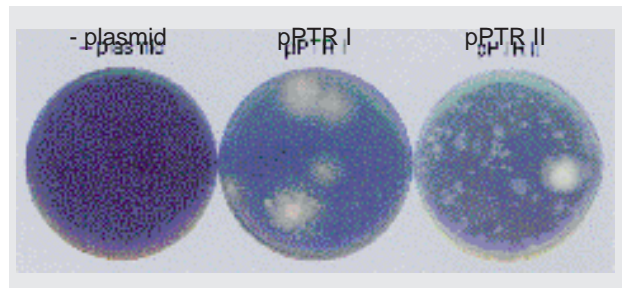


그림 2 CD 선택배지에 형성된 형질전환체의 colony

■ 실험례 2 : pPTR I 및 pPTR II vector를 이용한 GUS 단백질의 발현

pPTR I 및 pPTR II의 cloning site에 *A. oryzae*의 glucoamylase 유전자의 promoter와 *E. coli*의 β -glucuronidase(GUS) 유전자 및 terminator³⁾를 삽입하여 pPTR I-GUS, pPTR II-GUS를 각각 제작하고, *A. oryzae* RIB128주에 각각 도입하였다. 0.1 μ g/ml의 PT를 함유하는 CD 최소배지를 선택배지로 이용하여, 생성한 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체를 발현배지(1% maltose, 0.1 μ g/ml PT, 50 μ g/ml X-gluc을 함유하는 최소배지)에 10일간 배양하여 GUS 단백질의 발현에 의해 청색이 나타남을 확인하였다(그림 3). 또한 비교하기 위해 얻은 형질 전환체를 선택배지로 배양한 결과를 그림 3-I에 소개하였다.

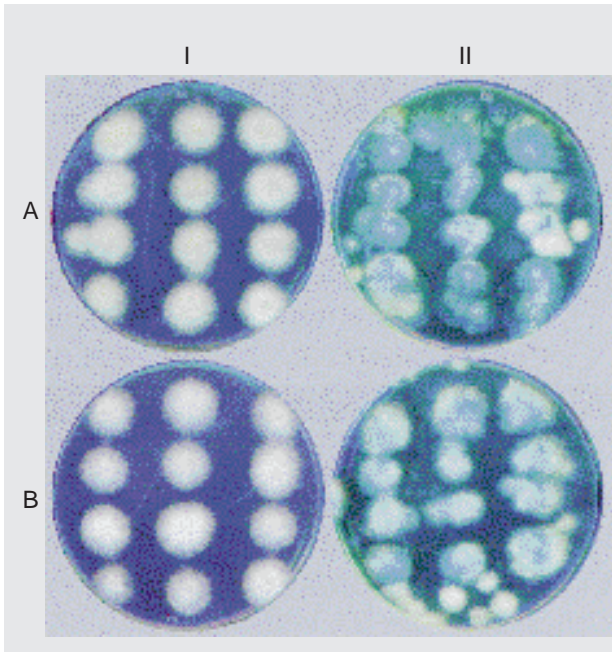


그림 3 pPTR I 및 pPTR II를 이용한 GUS 단백질의 발현
 · vector : A pPTR I-GUS
 B pPTR II-GUS
 · 배 지 : I CD + 1% maltose + 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PT(선택배지)
 II CD + 1% maltose + 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PT + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gluo(발현배지)
 · 배양조건 : 30°C, 10일간

■ Protoplast-PEG법에 의한 *A. oryzae*의 형질전환

- 1) 100 ml의 CD 액체배지*에 *A. oryzae*의 포자 현탁액을 접종하고, 30°C에서 20시간 진탕배양한다(진탕전용 삼각 플라스크로 격렬하게 진탕한다).
 - 2) 유리 여과기(3G1)로 여과하여 균사를 모은다. 멸균수로 세정한 후 spatula 등으로 눌러서 균사의 수분을 충분히 제거한다.
 - 3) 적당량의 균사를 50 ml polypropylene 원심관 내의 protoplast 용액을 넣어 현탁한다(첨가하는 균사의 양은 용액 속에서 교사가 가볍게 움직이는 정도).
 - 4) 30°C에서 2~3시간 부드럽게 진탕하여 protoplast화 한다(현미경으로 확인한다).
 - 5) 유리 여과기(3G2)로 여과하고, 여과액을 2000 rpm으로 5분간 원심분리하여 protoplast를 모은다.
 - 6) Protoplast를 0.8 M NaCl로 2회 세정한다.
 - 7) Protoplast를 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 되도록 Solution 1으로 현탁하고, 0.2 vol.의 Solution 2를 첨가하여 부드럽게 현탁한다(Solution 2는 점성이 높기 때문에 충분히 현탁한다).
 - 8) 0.2 ml의 protoplast 현탁액(10 ml 이상의 polypropylene 원심관에 넣는다)에 plasmid(20 μl 이하)를 첨가한다(plasmid는 최대 20 μg 까지 첨가한다).
 - 9) 얼음 속에 30분간 둔다.
 - 10) 1 ml의 Solution 2를 첨가하여 부드럽게 현탁한다.
 - 11) 실온에서 15분간 둔다.
 - 12) 85 ml의 Solution 1을 첨가하여 부드럽게 현탁한다.
 - 13) 원심분리하여 protoplast를 모은다. 상층액을 최대한 제거하고, protoplast를 0.2 ml의 Solution 1으로 현탁한다.
 - 14) Protoplast 현탁액을 5 ml(90 mm petri dish당)의 CD soft agar 선택 배지*로 현탁하고, CD 선택 plate*에 protoplast가 균일하게 분산하도록 신속하게 접종한다.
 - 15) 30°C에서 5~7일간 배양한다.
- 주) 반드시 thiamine을 함유하지 않는 CD배지를 사용한다(thiamine 존재하에서는 PT의 선택력이 감소한다). 기구 및 용액은 전부 멸균하고, 조작은 무균적으로 한다.

■ 결론

pPTR I 및 pPTR II vector는 *A. oryzae* 유래의 PT 내성유전자 *ptrA*를 선택 마커로 하는, *Aspergillus*속 진균형질전환용 vector이다. Thiamine을 함유하지 않은 PT 함유배지에서 형질전환체를 선택할 수 있다.

또 대장균의 blue/white selection으로 목적 유전자가 cloning site에 삽입된 plasmid vector를 선별할 수 있다.

[참고문헌]

- 1) Kubodera, T., et al *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press)
- 2) Gems, D., et al (1991) *Gene* **98**, 61-67
- 3) Hata, Y., et al (1992) *Curr. Genet.* **22**, (2), 85-91.

[관련제품]

제품명	TaKaRa Code	포장량
Yatalase™(사상균 세포벽 용해효소)	T017	2 g

[본 제품 사용상의 주의]

- 본 제품은 연구목적 이외에는 사용할 수 없습니다. 또, 본 제품을 이용하여 얻은 생물재료를 제 3자에 양도 할 수 없습니다.
- 본 제품을 연구목적 이외에 사용하는 경우에는 사전에 당사에 문의하여 주시기 바랍니다.

· 포자현탁액:

Plate 상의 *A. oryzae* 포자를 10 ml의 0.1% Tween 80, 0.8% NaCl로 현탁하고, 유리 여과기(3G2)로 여과하여 여과액을 모은다. 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 분생자를 침전시키고, 상층액은 버린다. 10 ml의 0.1% Tween 80으로 분생자를 2회 세정한 후 적당량의 멸균수로 현탁한다(포자현탁액).

· CD 배지(1 l 당) :

NaNO ₃	60 g
KCl	0.52 g
KH ₂ PO ₄	152 g
1 M MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 ml **
Glucose	100 g
Agar	200 g
Trace elements solution***	1 ml

1 N KOH로 pH6.5가 되도록 조정한다.

** MgSO₄ · 7H₂O는 별도로 autoclave한 뒤, 나중에 혼합한다.

*** Trace elements solution(1 l 당) :

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	88 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.4 g
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0.1 g
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.05 g

· CD 선택배지 :

CD 배지에 0.8 M NaCl과 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PT를 첨가한 것.

· CD soft agar 선택배지 :

CD 선택배지의 agar를 0.5%로 한 것. 약 50°C에서 보존한다.

· Protoplast화 용액 : 20 mg/ml Yatalase™(TaKaRa Code T017), 0.8 M NaCl, 10 mM Na phosphate buffer(pH6.0). 여과 멸균한다.

· Solution 1 : 0.8 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl(pH8.0)

· Solution 2 : 40%(w/v) PEG4000, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl(pH8.0). 여과 멸균한다.



Candida albicans 연구용 시약

- 신규 항원 Enolase 및 항 Candida 혈청 -

Enolase	TaKaRa Code	MG004	0.2 mg
항 Enolase 항체 (rabbit · polyclonal 항체)	TaKaRa Code	MG169	0.2 ml
항 Candida albicans 혈청 (rabbit 혈청)	TaKaRa Code	MG170	0.2 ml

근일발매 예정

*C. albicans*는 사람의 구강, 소화관, 생식기 등에 존재하고, 대부분의 사람은 본균 유래의 성분에 대한 면역 응답을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 구강(특히 치후, 치육)으로부터 분리한 *Candida*가 치주병의 주된 원인일 것으로 예측되어 화제가 되고 있다.

TaKaRa는 *C. albicans* 유래의 정제 항원으로서 세포벽 type A mannan, 분비성 산성 protease(SAP2), Mn형 superoxide dismutase(Mn-SOD)를 발매했다(14호 25페이지 참조). 이번 에 새롭게 *C. albicans* 유래의 정제 항원 enolase와 enolase 검출에 유용한 항체를 발매했다. 또 조직학적검사에 이용 가능한 anti-rabbit *Candida albicans* 혈청도 동시에 준비하였기에 소개한다.

■ C. albicans 유래 정제 항원 및 항원 검출용 항체

Enolase

C. albicans 유래의 분자량 43 kDa의 단백질로, *Candida* 감염 증 환자나 *Candida* · 알레르기 환자의 혈청을 이용한 실험으로 항원성이 밝혀져 있다^{1,2)}.

항 enolase항체

C. albicans 유래의 enolase를 인식하는 rabbit · polyclonal 항체이다.

항 Candida albicans 혈청

Candida albicans 사균 세포로 면역한 rabbit 혈청이다. Positive control로 *Candida albicans* 사세포를 첨부한다.

■ 실험례

1차 항체로 rabbit 항 *Candida albicans* 혈청을 이용하여 균사 형태로 생육한 *Candida* 세포(그림 A) 및 *Candida* 감염 mouse의 신장 조직절편(그림 C, D)을 면역형광염색한 예를 소개한다.

(1) Candida 세포의 면역형광염색

GlcNAc 배지(4 mM *N*-acetyl glucosamine, 0.5% 황산, 0.5% NaCl, 0.02% MgSO₄, 0.001% biotin)로 배양한 *Candida albicans* 를 3.7% formaldehyde로 1시간동안 고정후, 1% BSA 함유 PBS로 blocking 하였다. Rabbit anti-*Candida albicans* 혈청을 500배 희석되도록 첨가하고 1시간동안 반응하였다. PBS로 2회 세정한 후 FITC-labeled goat anti-rabbit sera를 첨가하고, 1 시간동안 반응하였다. PBS로 2회 세정한 후, 형광현미경으로 관찰하였다(그림 A).

(2) Candida albicans 감염 mouse의 신장 조직 절편 속 Candida 세포의 면역형광염색

꼬리정맥감염 mouse에서 채취, 조제한 신장 조직 동결절편에 1% BSA 및 0.3 % Triton X-100을 함유한 PBS를 첨가하고, 1시간동안 반응하였다. 조직에서 액을 취한 후, 500배 희석한 rabbit 항 *Candida albicans* 혈청을 첨가하고, 하룻밤 정치하였다. PBS로 3회 세정한 후 FITC-labeled goat anti-rabbit sera를 검체로 첨가하고 3시간 반응하였다. PBS로 3회 세정한 후, 형광현미경으로 관찰하였다(그림 C, D). 또한 그림 B는 신장 기저막의 PAS(Periodic acid/Shiff reaction) 염색상이다(면역형광염색상은 아님).

[참고문헌]

- 1) Ishiguro, A., et al (1992) *Infection and Immunity* **60**, 1550.
- 2) Mitsutake, K., et al (1996) *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1918.

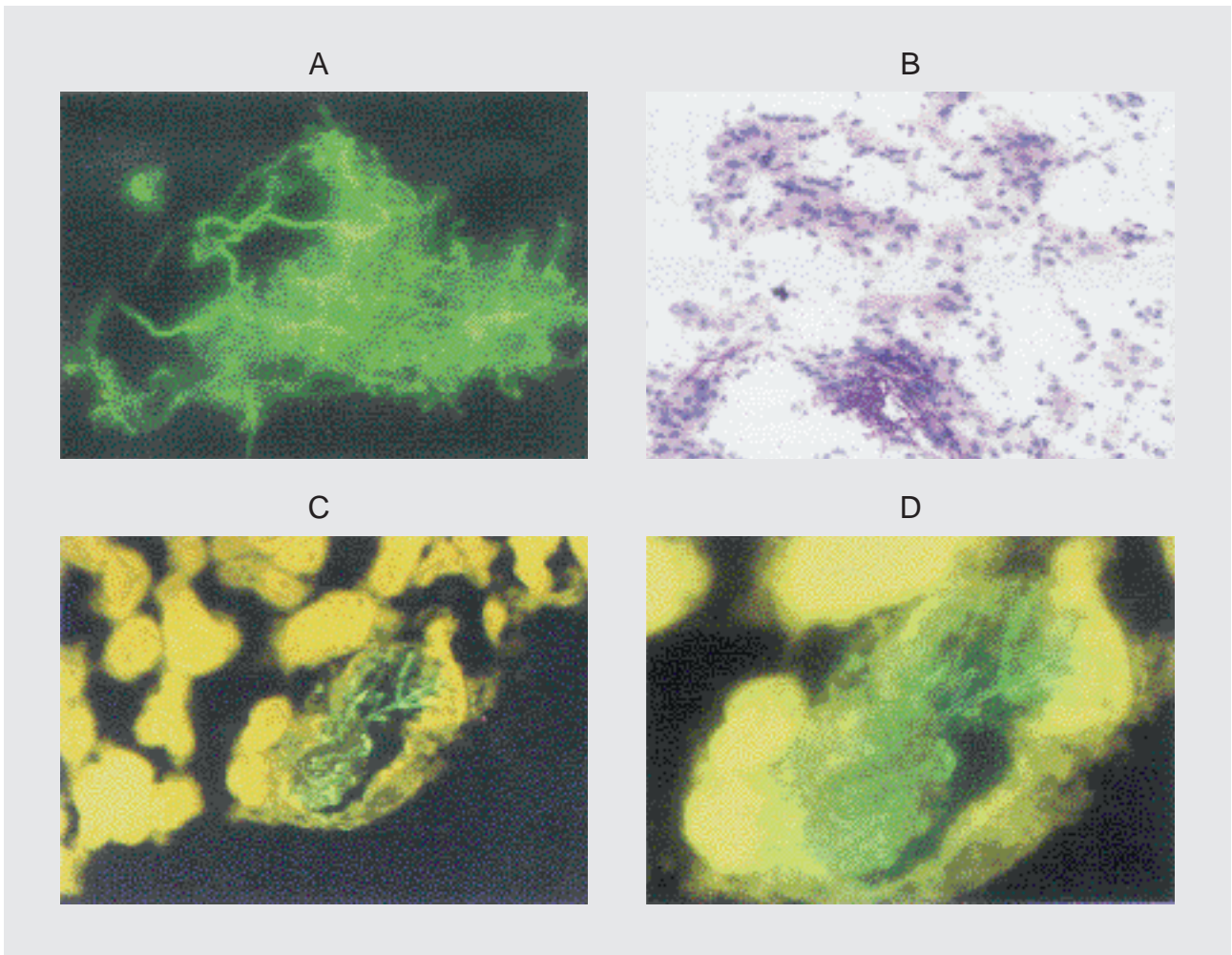


그림 Rabbit 항 *Candida albicans* 혈청을 이용한 면역형광염색의 예
 A : *Candida albicans* 세포의 면역 형광 염색상(×500)
 B : 신장조직 동결절편의 PAS 염색상(×200)
 C, D : 신장조직 동결절편의 면역 형광 염색상(C:×200 ; D:×500)

■ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
<i>Candida albicans</i> 유래항원		
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 ml
항 SAP2 rabbit · polyclonal 항체	M167	0.2 ml
항 Mn-SOD rabbit · polyclonal 항체	M168	0.2 ml

단백질의 2차원 전기영동

1990년대 후반부터 지금까지 다양한 생물의 genome 염기서열을 결정하고 있으며, human genome의 전체 염기서열 결정도 완성되었다. 그러나 genome 해석이 진행됨에 맞추어 그 기능을 추정할 수 있는 단백질은 의외로 적다. 따라서 post genome 연구로서 개개의 단백질 기능을 효율적으로 해석하는 방법의 개발이 시급하다.

단백질의 2차원 전기영동법은 조직이나 세포 내의 다수 단백질을 소량의 시료로도 높은 분리능력으로 분리하는 방법이다. 전기영동 후 gel을 염색하고 화상처리를 하는 등의 방법을 이용하면 환경조건의 차이로 발현이나 번역 후의 수식이 다른 단백질을 찾아낼 수 있고, 또 이런 단백질 spot을 gel 속에서 protease로 소화하여 질량분석장치로 해석함으로써 동정할 수도 있다. 따라서 2차원 전기영동법은 현재 genome과 단백질의 기능을 연결해 줄 수 있는 고효율의 방법으로서 proteom 해석에 주요한 방법으로 이용하고 있다. 본 고에서는 2차원 전기영동법과 이를 이용한 단백질의 해석방법에 대하여 설명한다.

■ 2차원 전기영동이란

일반적으로 단백질을 분리하는 것은 단백질이 가진 2가지 특징 다시 말하면 전하와 분자량의 차이를 이용하는 것이다. 2차원 전기영동은 통상 1차원적으로 등전점 전기영동(Iso Electric Focusing : IEF)을 하고, 단백질을 등전점으로 분리해서 다시 2차원적으로 SDS-전기영동(SDS-PAGE)으로 등전점이 같은 단백질을 분자량을 기준으로 분리하는 방법이다. 이 방법은 최초 O'Farrell¹⁾이 고안하였지만 지금은 1차원에서 높은 재현성을 얻을 수 있는 고정화 pH 구배(immobilized pH gradient : IPG) gel을 사용하므로 고도의 기술적 숙련도를 필요로 하지 않는다.

실제 2차원 전기영동에서는 다음에 기술하는 염색법을 사용하지만, 2000~8000개 단백질의 분리와 검출이 하나의 gel상에서 이루어질 수 있다.

■ 2차원 전기영동법의 실제

2차원 전기영동법에 대한 상세한 내용은 다수의 전문서적²⁾이나 internet site³⁾를 참조한다.

본 고에서는 2차원 단백질 전기영동법의 protocol을 소개한다.

(1) 시료의 조제

시료의 유래가 bacteria, 식물 또는 동물인지 혹은 그것이 세포나 조직이나에 따라서 그 조제법은 달라진다. 상세한 내용은 전문적인 internet site를 보면 내용을 확인할 수 있다. 특히 주의해야 하는 것은 시료가 완전히 용해되어 있는지의 여부와 시료 속의 염농도이다. 시료의 용해방법은 물론 시료의 유래(생

물중, 조직, 세포)에 따라서 다르지만, 기본적으로는 요소나 비이온성 계면활성제(예를 들면, Triton X-100 등) 또는 환원제(DTT 등)를 함유하는 용액(lysis buffer)을 이용한다.

한편 시료속의 염농도는 높은 전압(3500 V)에서 실시하는 1차원의 등전점 전기영동에서 발열을 피해야 하므로 50 mM 이하로 해야한다. 이 경우 필요하다면 투석이나 spin gel 여과 column, TCA 침전 등의 방법으로 시료용액을 탈염한다. 또 시료에 DNA나 RNA가 다량 함유되어 있는 경우는 시료를 용해할 때 DNase나 RNase를 넣고, 내재성 protease에 의한 단백질의 분해를 방지하기 위해서는 protease 저해제(PMSF, EDTA, Leupepains, Pepstatin 등의 혼합물)를 넣으면 깨끗한 전기영동 패턴을 얻을 수 있다. 조제 시료의 함유 단백질을 정량하는 것도 매우 중요하다. 이용한 염색법에 따라서 차이는 있지만, 필요한 단백질의 양은 18 cm × 18 cm의 gel일 경우 100~200 µg 정도이다.

(2) 1차원 전기영동

1차원 전기영동에서는 고정화 pH 구배(IPG) gel을 이용한다. 먼저 시료 용액(10 µl 정도)에 팽윤 완충액(각 회사의 manual에 따른다)을 첨가(18 cm × 18 cm gel의 경우 350 µl 정도)한 후 IPG 팽윤용 tray로 옮긴다. IPG 팽윤용 tray는 한 번에 하나의 IPG를 넣는 단일형과 여러 개를 넣는 다체형이 있다. 후자의 경우 종류가 다른 시료를 몇 개의 gel로 동시에 2차원 전기영동을 할 수 있어(물론, 2차원에서 SDS-PAGE를 여러 개 이용할 필요가 있지만) 자주 이용된다. 다음에 보호 필름을 제거한 뒤 시판 IPG를 gel면을 아래로 하여 IPG 팽윤용 tray에 넣는다.

이것에 실리콘 오일을 중층하고 20~25°C에서 8~12시간동안 gel의 팽윤과 시료의 흡착(gel 전면으로의 흡착)을 한다. 이렇게 제작한 gel을 tray에서 꺼내고 종이 타올로 여분의 실리콘 오일을 닦고난 후 등전점 전기영동조에 넣어 전기영동한다. 18 cm × 18 cm gel의 경우 200 V(3 h) → 400 V(2 h) → 800 V(2 h) → 1000 V(2 h) → 2000 V(2 h) → 3000 V(12 h)와 같이 전압을 순차적으로 변화시키면서 전기영동을 한다. 종료 후 gel을 꺼내어 다시 종이 타올로 여분의 실리콘 오일을 닦은 후 시험관으로 옮긴다. 또 다양한 pH 범위를 가진 IPG가 다수 시판되고 있지만(예를 들면, pH3~10, 4~5, 5~8등) 시료 속에 함유된 단백질의 분별이 어려운 경우는 우선 pH3~10와 같이 넓은 pH 범위로 전기영동을 한 후, 목적 단백질이 검출되는 영역의 pH 구배가 넓게 되는 IPG를 선택하는 것이 좋다.

- Proteome 해석에의 응용 -

(3) 2차원 전기영동

2차원 전기영동에서는 SDS-PAGE로 실시한다. 따라서 1차원 전기영동 후 IPG gel을 우선 시험관 내에서 평형화할 필요가 있다. 평형화 완충액 A[50 mM Tris-HCl(pH6.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.25% DTT, bromophenol blue(미량)] 속에서 gel을 실온에서 5분간 진탕한 후 액을 버리고, 평형화 완충액 B[0.25% DTT 대신 4.5% IAM(iodo acetoamide)을 함유하는 평형화완충액 A]로 gel을 실온에서 5분간 진탕한 후 미리 만들어 둔 평판형 SDS-PAGE gel의 농축용 gel상에 가볍게 영동용 완충액으로 가볍게 세정한 IPG를 살며시 넣는다(시료 중에 어느 정도의 분자량 범위를 갖는 단백질이 함유되어 있는지에 따라 분리용 gel의 농도를 정할 필요가 있다. 일반적으로는 7.5% 정도의 것이 적당하다). Gel의 두께도 영향을 미치므로, 전기영동시 1 mm 두께의 gel의 경우 20 mA/gel로 설정한다. 또 각 2차원 전기영동의 패턴을 화상처리하거나 목적 단백질의 대략적인 등전점이나 분자량을 알기 위해서는 몇 개의 marker 단백질을 동시에 영동할 것을 권장한다.

(4) 단백질 spot의 검출

2차원 전기영동에서 분리된 각 단백질의 검출을 위하여 일반적으로 염색법을 활용한다. 여러 가지 염색법이 개발되어 있지만, 검출된 단백질을 다음에 어떻게 해석하느냐에 따라 염색법을 선택할 필요가 있다. 가장 많이 이용하는 것은 CBB (Commassie Brilliant Blue) 염색법이다. 이 방법은 염색에 의해 단백질이 수식되지 않는다는 잇점이 있고, 또 이후의 단백질 해석(질량분석/protein sequencer)에도 지장을 주지 않는다. 그러나 검출감도가 약 5 ng 정도로 약간 낮아, 초미량 단백질로 질량분석을 주로 하는 최신의 분석법에는 부합하지 않는 면도 있어 최첨단을 지향하는 방법론자들은 선호하지 않는다. 그러나 시료가 적당량 있는 경우에는 우선적으로 선택할 수 있는 방법이다. 은 염색은 검출감도가 CBB 법의 약 20배로 환경변화에 의한 단백질의 이동(양적, 질적변동)을 확실히 관찰하고 싶은 경우에 자주 이용되지만, 단백질이 수식되므로 이후의 단백질 해석에는 부적합하다. 그러나 최근 그 개선법도 제안되고 있다. 2차원 전기영동 gel을 화상처리 하고자 하는 경우에는 형광염색을 흔히 이용한다. 이 방법의 검출 감도는 사용하는 색소에 따라 다르지만, 수 ng~50 pg 정도이다. 특히 SYPRO® Ruby는 검출 감도도 은염색과 비슷하며 단백질의 수식도 일어나지 않고, 또 탈염 조작할 필요가 없기 때문에 향후의 유력한 단백질 검출법이 될 가능성이 높다. 이 외에 단백질 spot을 투명하게 볼 수 있도록 해주는 negative 염색법이 있다. 단백질 수식이 없고 조작이 간단하여 이 방법도 단백질 해석의 전처리 염색법으로서 이용되고 있다.

■ 단백질 해석법

2차원 전기영동으로 분리한 단백질의 해석은 주로 다음과 같은 순서로 실시한다. 「① 환경변화에 따라 이동하는 단백질을 화상처리법 등을 이용해서 관찰한다. ② 단백질 spot을 잘라 gel 속에 특이적 protease(예를 들면, lysil endoprotease, Asp-N protease, trypsin, *S. aureus* V8 protease 등)로 소화하고 gel로부터 용출된 peptide 단편의 질량수를 질량분석으로 분석하여 data base에 access⁴⁾한다. ③ 경우에 따라서는 상기 peptide 단편의 아미노산 서열을 MS/MS법 혹은 PSD(post source decay)법으로 결정한다.」 이러한 순서대로 진행되는 방법을 peptide mass fingerprinting이라 부르며, 이 방법으로 기지 유전자와 단백질과의 대응관계를 추정할 수 있다. 그러나 실제로는 단백질의 기능을 해석하는 경우, 다수의 단백질에서 발생한 번역 후 수식 잔기를 결정하지 않으면 안된다. 또, N말단 또는 C말단 부위의 결정도 필요하다.

■ 결론

본 고에서는 2차원 전기영동법의 간단한 절차와 그 응용에 관해서 소개하였지만, 모두에서도 서술한 post genome 해석에서 가장 중요한 것은 각 단백질의 기능이나 그들의 관계를 밝혀내는 것이다. 그런 의미에서 2차원 전기영동법에서의 단백질의 해석은 환경변화에 의한 이동 단백질의 검출과 동정에는 유효하지만, 그 이상의 목적에는 활용할 수 없음을 유념해 둘 필요가 있다. DNA chip, protein chip 또는 보다 효율적인 단백질 기능해석법의 개발이 요망된다.

TaKaRa는 2차원 전기영동을 이용한 단백질의 proteome해석의 수탁을 개시하였다.

[참고 문헌]

- 1) O' Farrell, P. H.(1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- 2) 전기영동 최신 protocol(羊土社)(2000) 등
- 3) <http://rafael.ucsf.edu/2DPAGEhome.html>
<http://www.expasy.ch/ch2d/protocol> 등
- 4) <http://donatello.ucsf.edu/>
<http://www.expasy.ch/tools/#proteome> 등

형광편광도 측정에 의한 물질간

■ 서론

형광편광법은 receptor와 ligand간의 친화성 해석 등 물질간의 상호작용을 해석하는데 간단하고 유용한 방법이다. 본 고에서는 형광편광법의 원리와 그 응용예를 소개한다.

■ 형광편광법의 원리

형광편광도를 이용해 물질간의 상호작용을 해석하는 방법을 형광편광법이라고 한다. 용액 속의 형광물질에 편광 filter를 이용하여 편광한 여기광을 주면, 그 형광물질로부터 편광한 형광을 얻을 수 있다(그림 1). 그 형광편광의 정도는 형광 물질의 용액 중에서의 운동성, 다시 말하면 형광 물질의 크기에 의존한다. 용액중의 작은 분자는 심한 브라운 운동을 할 때 편광한 여기광을 주어 얻어진 형광의 편광성 일부가 손실되고 형광편광도는 낮아진다(이 현상은 형광편광해소라 부른다¹⁾). 그런데 큰 분자는 용액 속에서의 운동이 활발하지 않기 때문에 형광편광도가 크다(그림 2).

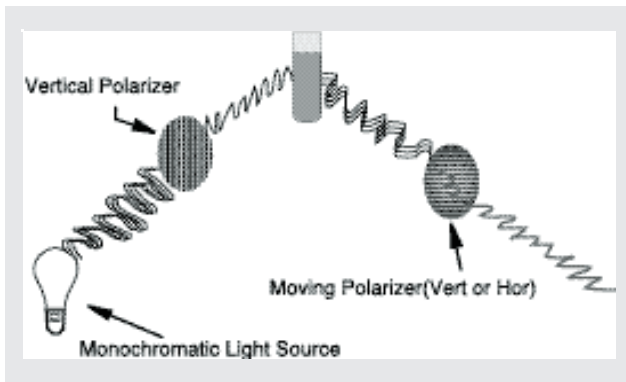


그림 1 형광편광도 측정의 원리

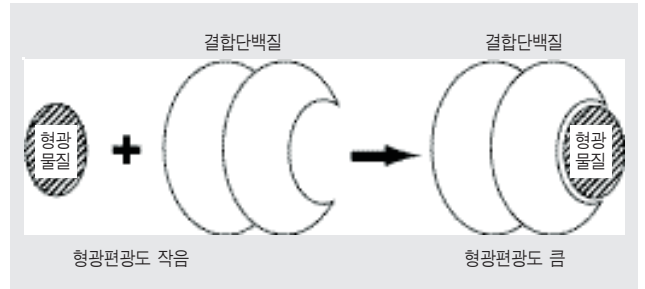


그림 2 분자의 크기와 형광편광도

이와 같이 편광도(P)는 분자의 회전 완화 시간에 비례하고 식으로 표시하면 다음과 같다.

$$P \propto \frac{3\eta V}{RT}$$

(η : 용액의 점도 ; T: 절대온도 ; V: 분자의 크기 ; R: 기체정수)

따라서 측정조건(용액의 온도, 점도)을 일정하게 하면 형광편광도(P)를 측정하여 분자의 크기(V)의 변화에 따른 정보를 얻을 수 있게 되고, 형광편광도의 크기로 분자의 대소를 측정할 수 있다. 또 그 계에서 균일한 용액계 그대로를 측정하므로 보다 천연에 가까운 환경 하에서 물질간의 상호작용(복합체 형성, 해리, 분해, 고차 구조의 변화 등)을 측정할 수 있다. 구체적으로 DNA-DNA(RNA) hybridization, DNA-단백질의 상호작용, 항원-항체반응, ligand-receptor와의 결합, 당(당쇄)-lectin의 결합, 효소(protease, nuclease 등)반응의 검출 등 모든 물질간의 상호작용을 측정할 수 있다²⁾. FITC를 표식한 분자를 이용해서 물질간의 상호작용 측정·해석이 가능한 예를 표 1에 나타내었다. 보통 형광편광법 실험에서 좋은 실험 결과를 얻기 위해서는 형광물질(또는 형광 표식한 분자)은 분자량이 낮은 편이

표 1 BEACON[®]로 상호작용을 측정할 수 있었던 예

FITC 표준화합물(분자량A)	Target 유전자(분자량B)	분자량의 비(A/B)
Phosphorylated peptide(1 kDa)	SH2SH3 domain(20 kDa)	20
Angiogenin(14)	RNase inhibitor(50)	3.57
cdc2Hs peptide(3)	Anti-cdc2Hs(mono)(150)	50
EGF(6)	Anti-EGF(poly)(160)	25
T7 primer(5)	complementary T7 primer(5)	1
TATA box(40)	TATA box binding protein(90)	2.25
trp repressor operator(16)	trp repressor(35)	2.19

상호작용의 해석

종교 그것과 고분자량의 물질이 상호작용하도록 계를 만드는 것이 중요하다. 고분자량의 물질간의 상호작용을 조사하는 경우(예를 들면 1차 항체와 2차 항체와의 반응)는 한쪽을 형광 수명이 긴 pyren 등으로 표식하여 측정하는 것이 좋다.³⁾

■ 형광편광법의 응용례

형광편광법의 응용으로 환경 호르몬을 분석한 예를 소개한다. 환경 호르몬(내분비 교란물질)의 대부분은 환경 estrogen이며, 그 작용은 estrogen receptor(ER)와의 결합에 의해 시작된다. 따라서 ER과의 결합성을 조사하는 것이 그 물질이 환경 호르몬 작용을 하는지의 여부를 조사하기 위한 첫 걸음이 된다. ER과 피험물질의 결합성을 조사하기 위해 경합 결합 시험법을 이용한다. 즉 형광 ligand(FES1)4와 ER α 를 10 nM씩 혼합하고 FES1-ER α 복합체를 형성하여, 그 혼합액 50 μ l에 각각 농도의 피험물질을 함유한 용액을 50 μ l 첨가하여 실온에서 약 1 시간 반응한 후 Full-Range BEACON[®] 2000을 이용하여 형광 편광도를 측정하였다. FES1의 분자량은 작고(분자량 362), 유리 상태의 형광편광도는 낮은 수치를 나타내지만, 분자량이 큰 ER α (분자량 66,000)과 결합해서 FES1-ER α 복합체를 형성하면 FES1의 운동이 제한되고 형광편광도는 상승한다. 피험물질이 ER α 에 대한 결합능이 있다면 ER α 의 ligand 결합부위로 FES1과 경합·치환되어 형광편광도가 감소한다.

천연 estrogen 17 β -estradiol(E2)을 피험물질로 한 경우를 그림 3에 나타내었다. 각각의 화합물을 피험물질로 한 경우를 표 2에 나타내었다. IC₅₀은 FES1-ER α 복합체 전량 중 50%의 FES1이 피험물질로 치환되어 피험물질-ER α 복합체를 형성한 포인트를 나타낸 것이며 RBA(Relative Binding Affinity)는 E₂·IC₅₀을 100으로 한 경우의 상대적 친화성을 표시하였다.

DES(Diethylstilbestrol)와 Tamoxifen은 ER α 과 결합하는 것으로 알려진 약제로 4-Nonylphenol, Bisphenol A, BBP(Benzylbutylphthalate)는 환경 호르몬으로 추정되는 화합물이다. ER α 에 대한 친화성은 표 2의 RBA의 수치로 확정하였고, DES는 E₂의 390배의 친화성을 가지고, BBP는 친화성이 비정상적으로 낮다는 것이 알려져 있다. 이는 ER α 에 대한 환경 호르몬 의혹 물질 risk로 말할 수 있다.

이와 같이 형광편광법은 환경 호르몬 활성을 가진 화합물의 1차 screening법으로 유용하고, 이외에도 표 1에 나타낸 것과 같은 응용 예가 있으며, 물질간의 상호작용을 해석·측정하는 수단으로 방법이 널리 응용되고 있다.

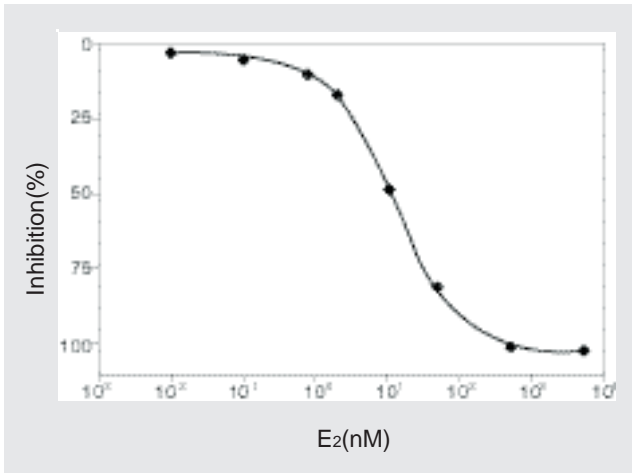


그림 3 FES1- ER α 에 대한 E₂의 경합결합 곡선

표 2 각종 화합물의 ER α 에 대한 친화성

화합물	IC ₅₀	RBA
E ₂	15.6 nM	100
DES	4.0 nM	390
Tamoxifen	240 nM	6.5
4-Nonylphenol	5.2 μ M	0.3
Bisphenol A	35 μ M	0.05
BBP	ND	ND

[참고 문헌]

- 1) Perrin, F. (1926) *J. Phys. Radium.* **7**, 390-401.
- 2) Fluorescence Polarization Applications Guide: PanVera Corporation, (1998) Edition.
- 3) Hwang, K. J., Carlson, K. E., Anstead, G. M., and Katzenellenbogen, J. A. (1990) *Biochemistry* **31**, 11536-11545.



pTriEx™ Multisystem Expression Vector

1개의 vector로 대장균, 곤충세포, 포유류 세포에서 발현 가능 !!

제품명	TaKaRa Code	포장량
pTriEx™-1.1 DNA	NV900	20 µg
pTriEx™-1.1 Cloning Kit*	NV901	1 Kit
TriEx Bacterial Expression System 1.1**	NV902	1 Kit
TriEx Baculovirus Expression System 1.1**	NV903	1 Kit
TriEx Mammalian Expression System 1.1**	NV904	1 Kit

*1 : pTriEx™-1.1 DNA 및 Clonables™ Ligation/Transformation Kit 포함
 *2 : pTriEx™-1.1 DNA, Origami™(DE3) pLacI 및 Tuner™(DE3) pLacI Competent Cells 포함
 *3 : pTriEx™-1.1 DNA 및 BacVector™-3000 Transfection Kit 포함
 *4 : pTriEx™-1.1 DNA 및 MamFectin™ Transfection Kit 포함

지금까지는 복수의 발현 system을 이용하는 경우 각각 다른 vector를 이용하여 recombinant를 구축하기 위해 상당한 노력이 필요하였다. 새로운 pTriEx™ system의 등장으로 1개의 vector를 이용하는 것만으로 목적단백질을 복수의 system에서 발현할 수 있다.

■ 서론

연구목적에 따라 목적 유전자를 복수의 system에서 발현할 필요가 있는 경우가 있다. 예를 들면, 목적 단백질의 용해성, 활성, 생산량, 번역 후 수식, folding, disulfide 결합의 형성, 독성, 또는 생산비용 등의 요건을 만족시키는 발현계를 선택하기 위해 대장균, 곤충세포 및 포유류의 계에서 목적 유전자를 각각 발현해서 비교하는 일이다. 그 경우 각각의 system에 적절한 vector에 목적 유전자를 cloning 해야 한다.

종래 Novagen사의 대장균 발현 vector(pET vector), 곤충세포발현 vector(pBAC™ vector 등), 포유류 세포용 발현 vector(pBacMam vector)는 다른 시스템의 vector에 효율적으로 cloning 하기 위해 cloning 방법이나 제한효소 부위 등을 상호 이용할 수 있도록 설계되어 있지만, 이번에 새롭게 개발한 pTriEx™ System은 하나의 vector로 대장균, 곤충세포 및 포유류세포 등 모든 계에서 목적단백질을 발현 할 수 있다.

■ 장점

- 대장균 발현계에서는 pET vector와 동일한 T7lac promoter로 발현한다. *in vitro* 번역/전사도 가능하다.
- Baculovirus를 감염한 곤충세포 발현계에서는 강력한 p10 baculovirus promoter로 발현한다.

- 포유류세포 발현계에서는 CAG promoter(CMV ie enhancer와 chicken β-actin promoter 유래)와 rabbit β-actin terminator를 이용한다.
- CAG promoter로부터 생성한 RNA는 mRNA의 processing과 transport를 촉진하기 위해 설계한 intron을 함유하게 된다.
- 3-ORF multicloning site를 이용할 수 있으므로 모든 평활 말단 insert의 in-frame cloning이 가능하다.
- C말단측의 HSV·Tag과 His·Tag 서열을 이용하여 검출 및 정제할 수 있다.
- Baculovirus DNA 단편(ORF603, ORF1629)을 함유하므로 상동재조합에 의한 recombinant baculovirus의 구축을 위한 transfer plasmid로 이용할 수 있다.
- 모든 시스템에서 기능하는 전사 terminator와 polyA signal을 갖는다.
- pUC 유래로 high copy이다.

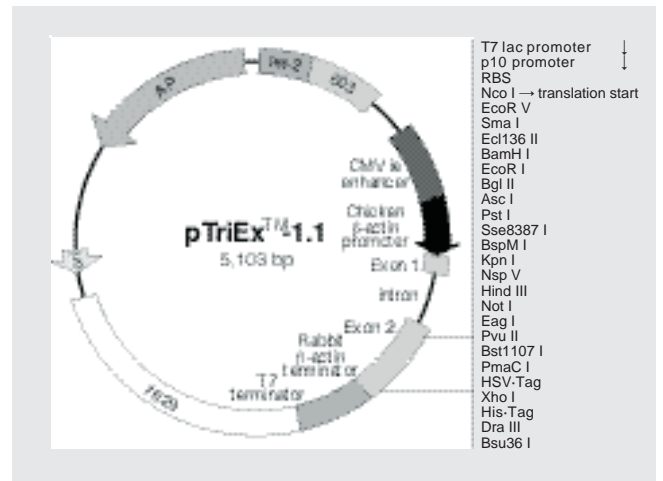


그림 1 pTriEx™-1.1 Vector의 map
 pTriEx™-1.1의 전 염기서열 및 상세한 map은 Novagen사의 홈페이지(<http://www.novagen.com/>)를 참조.

■ Cloning 방법

pTriEx™-1.1 Vector는 multicloning site에 다수의 제한효소 인식 부위를 갖고 있으며 어떠한 평활말단 insert에도 in-frame으로 cloning 할 수 있는 2개의 “3-ORF” site가 있다(그림 2 참조). 각각의 3-ORF site는 평활말단을 생성하는 3종류의 제한효소 site를 갖고 있으며 적절한 제한효소를 선택함으로써 N말단 및 C말단에 vector 유래의 ORF와 in-frame cloning이 가능하다. Insert가 stop codon을 갖지 않는 경우에는 C말단 쪽의 HSV·Tag과 His·Tag을 이용할 수 있다. HSV·Tag은 HSV·Tag monoclonal 항체를 이용해서 western blot으로 검출 할 수 있다. His·Tag을 포함하는 단백질은 His·Bind Resin(IDA, NTA)을 이용함으로써 간단히 정제할 수 있다.

■ 대장균에서의 발현

대장균에서의 발현은 IPTG 유도성의 T7lac promoter에 의해 엄밀하게 제어된다. pET Vector와 같이 pTriEx™-1.1 Vector는 목적 단백질의 발현에 T7 RNA polymerase를 공급할 수 있는 숙주를 이용한다. pTriEx™-1.1 Bacterial Expression System 1에는 pTriEx™의 대장균 내에서의 발현에 적절한 2종류의 숙주 Tuner™(DE3) pLacI와 Origami™(DE3) pLacI가 포함되어 있다. 이들 숙주는 lacUV5 promoter에 의해 제어하는 T7 RNA polymerase 유전자를 가진 λ phage의 용원균이고, 또 pLacI plasmid를 갖고 있어 충분한 양의 lac repressor를 생산하므로 비유도조건에서는 발현이 강하게 제어된다.

Tuner™(DE3) pLac I은 lacY가 결손되어 있어 세포 내로의 IPTG의 유입은 그 농도에 의존한다. 따라서 발현 수준은 첨가하는 IPTG의 농도에 의존하므로 IPTG로 발현을 조절하는 경우에 적합하다.

Origami™(DE3) pLacI는 thioredoxin·reductase(trxB)와

glutathion·reductase(gor) 유전자 모두가 결손되어 있으므로 세포질 내에서의 disulfide 결합 형성이 잘 일어난다.

따라서 그 숙주는 적절한 folding과 활성발현을 위해 disulfide 결합 형성을 필요로 하는 단백질을 발현하는 경우에 적합하다.

■ 곤충세포 내에서의 baculovirus의 발현

pTriEx™-1.1 Vector는 2개의 baculovirus DNA 단편(ORF603과 ORF1629)을 포함하고 있고, 그 사이에 promoter, cloning site, 전사 terminator가 존재한다. 따라서 재조합 pTriEx™은 polh locus의 여러 곳에서 baculovirus와의 상동재조합을 일으킬 수 있으므로 재조합 baculovirus 제작을 위한 transfer plasmid로서 사용할 수 있다. 이와 같이 얻은 재조합 baculovirus는 곤충세포에 감염하여 곤충세포 내에서 p10 promotor로부터 목적단백질을 발현할 수 있다.

■ 포유류 세포 내에서의 발현

pTriEx™-1.1 Vector는 여러 종류의 세포에서 강력하게 작동하는 구성적인 CAG promoter에 의해 포유류 내에서의 transient expression이 가능하다. 번역개시가 적절히 일어나도록 ATG 개시 codon을 정하고, Nco I site를 encode 하는 Kozak 서열이 삽입되어 있다. pTriEx™-1.1을 이용한 발현은 일반적인 plasmid·transfection법 또는 BacMam™ System으로 실시할 수 있다. BacMam™ System은 baculovirus가 세포 독성을 일으키지 않고 효율적으로 포유류 세포를 형질전환하여 포유류 promotor의 조절하에서 목적 단백질을 발현할 수 있다는 점에 근거하여 개발한 것이다.

pTriEx™-1.1을 이용하여 구축한 재조합 baculovirus를 감수성 포유류 세포의 배양액에 첨가함으로써 목적유전자를 간편하게 도입할 수 있다.

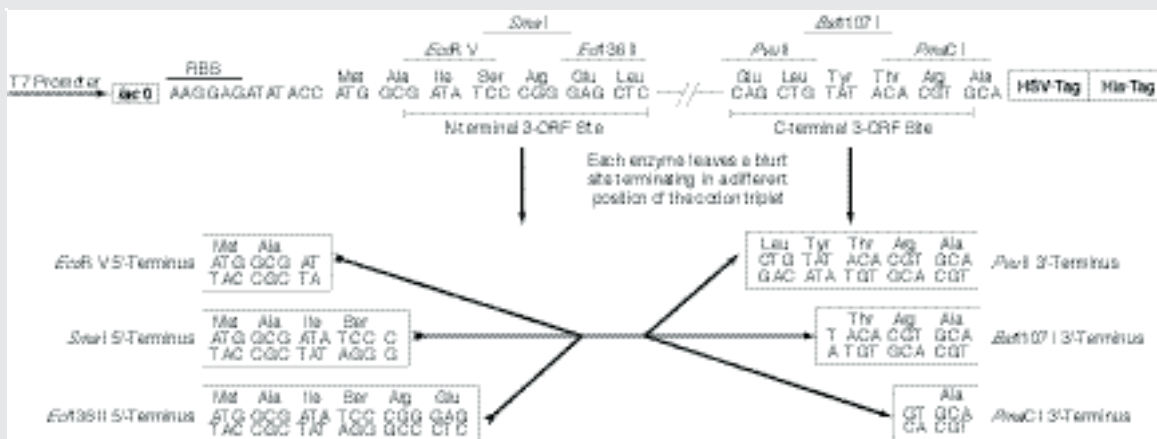


그림 2 모든 평활말단을 in-frame으로 cloning 할 수 있는 3-ORF site

■ 실험예

종래의 Novagen사 발현 vector 및 pTriEx™-1 Vector를 이용하여 대장균, 곤충세포 및 포유류 세포 내에서 목적 단백질을 발현하여 그 발현 효율을 비교하였다.

그림 3, 4, 5에서 알 수 있듯이 pTriEx™-1 Vector는 모든 발현계에서 종래의 시스템을 이용한 경우와 비교했을 때 동등 수준 이상의 발현 효율을 보여주었다.

이와 같이 pTriEx™-1은 종래의 pET, BacVector™ 및 BacMam™ System의 이점을 모두 겸비하여 다양한 용도로

이용할 수 있는 vector이다. 본 vector를 이용한 대장균, baculovirus 및 포유류 세포 발현용의 각종 kit을 준비하였으므로 목적에 맞게 이용할 수 있다. 한편 pTriEx™-1.1 Vector는 기존의 pTriEx™-1 Vector를 개량한 것이다. 기능 등에는 변화가 없지만 sequence의 일부가 변경되었으므로 확인하고 사용해야 한다. 또 pTriEx™-1.1 DNA 외에 새롭게 pTriEx™-2, 3, 4 DNA도 개발하였다.

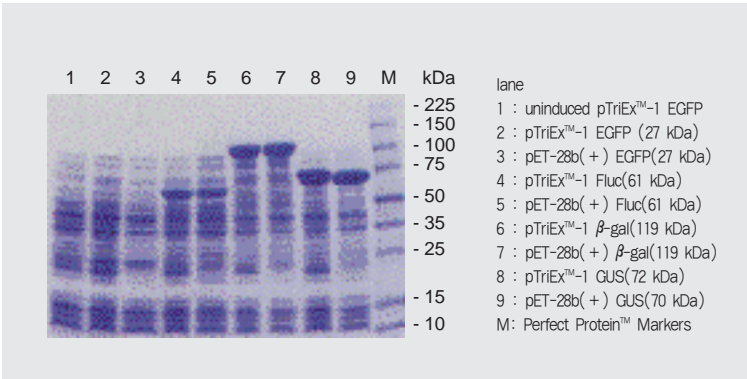


그림 3 pTriEx™-1과 pET-28b(+)에 의한 4종류 목적단백질의 대장균에서의 발현 비교

4종류의 목적유전자(EGFP, LUC, β -gal, GUS)를 pTriEx™-1과 pET-28b에 각각 cloning 하였다. 조합한 pTriEx™-1의 경우는 BL21(DE3) pLacI를, 조합한 pET28b는 BL21(DE3)를 숙주로 이용하였다. 대수 증식기의 중기에 1 mM IPTG를 첨가하여 유도하였다. 그 후에 37°C에서 3시간 배양하여 세포를 모아 1× SDS buffer에 용해하였다. Loading하는 전체 단백질 양을 동일하게 하여 4~20% gradient gel에 전기영동한 후 Coomassie Blue로 염색하였다.

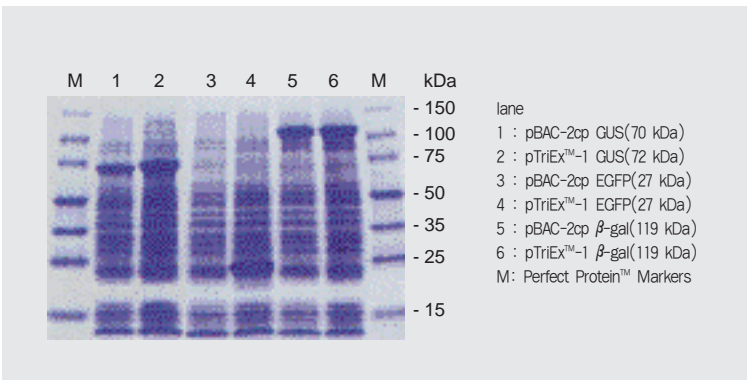


그림 4 pTriEx™-1 과 pBAC-2cp를 이용하여 제작한 재조합 baculovirus에 의한 3종류 목적단백질의 곤충 세포내에서의 발현 비교

3종류의 목적 유전자(GUS, EGFP, β -gal)를 pTriEx™-1과 pBAC-2cp의 *Nco* I site에 cloning 하였다. 이 재조합 plasmid와 BacVector™-3000 Triple cut Virus DNA를 상동재조합하여 재조합 baculovirus를 제작하였다. BacVector™ Insect Cell Medium으로 진탕배양한 Sf9 세포에 재조합 baculovirus를 MOI=5로 감염하여 목적단백질을 발현하였다. 세포를 모아 PBS로 용해하였다. 동량의 2× SDS buffer를 첨가한 후에 loading 하는 전체 단백질 양을 동일하게 하여 각 시료(2×10⁸)를 4~20% gradient gel에 전기영동한 후 Coomassie Blue로 염색하였다.

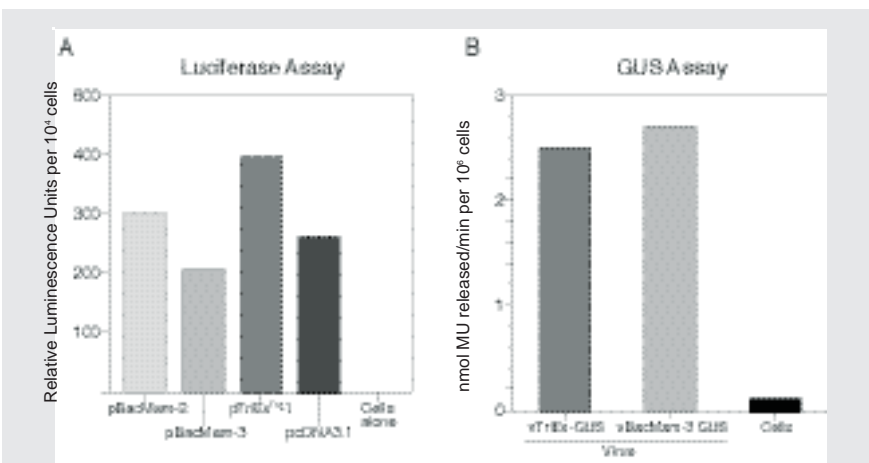


그림 5 pTriEx™-1과 pBacMam에 의한 2종류 목적단백질의 포유동물세포 내에서의 발현 비교

2종류의 목적유전자(LUC, GUS)를 pTriEx™-1, pBacMam 및 pcDNA 3.1에 각각 cloning 하였다. LUC 재조합체를 COS-7에 transfection하고 24시간 후에 세포 lysates 속의 LUC 활성을 측정하였다(A). GUS 재조합체의 경우는 BacVector™-3000 Triple Cut Virus DNA를 이용하여 recombinant baculovirus를 구축하여 100~200 pfu/cell의 비율로 COS-7 세포에 감염하였다. 24시간 후에 세포 lysates 속의 GUS 활성을 측정하였다(B).

Pellet Paint™ NF Co-Precipitant

형광 sequencing에 최적인 공침제

제품명	TaKaRa Code	포장량
Pellet Paint™ NF Co-Precipitant	NV281	125회용
Pellet Paint™ Co-Precipitant	NV625	125회용

Pellet Paint™ NF Co-Precipitant(이하 Pellet Paint™ NF라 함)은 핵산의 에탄올 침전시 이용하는 공침제이다. Pellet Paint™ NF는 비형광성의 색소로 표시 되어 있어 핵산의 alcohol 침전으로 생성된 침전물은 진한 청색을 띤다. 따라서 침전의 생성이나 용해를 눈으로 간단하게 확인 할 수 있다. 기존의 Pellet Paint™와는 달리 색소가 비형광성이기 때문에 형광 sequencing이나 형광 probe를 이용한 정량 PCR, FISH probe의 제작 등 형광검출을 필요로 하는 경우에도 사용할 수 있다. Pellet Paint™ NF는 특히 BigDye™ cycle sequencing 반응산물의 alcohol 침전제로 이용하면 효과적이다(BigDye™ : Perkin-Elmer사의 상표이다). 이 제품을 이용함으로써 ABI의 표준적인 ethanol 침전 protocol 보다도 간단하고 신속하게 미반응 BigDye™ terminator를 제거할 수 있다.

Pellet Paint™ NF는 sequencing 반응의 정확성이나 signal의 강도에 영향을 주지 않는다(그림 1). 또 침전물의 생성을 촉진하므로 보다 강한 signal 강도를 얻을 수 있다(표 1). 따라서 소량의 template로 sequencing을 하는 경우에 특히 효과적이다.

■ 특징

- 핵산 침전물의 색이 진한 청색이므로 침전의 생성이나 용해를 직접 눈으로 확인 할 수 있다.
- 비 형광성의 색소로 표시되어 있어, 형광 검출을 요하는 경우 alcohol 침전에도 사용할 수 있다.
- BigDye™ cycle sequencing 등의 형광 sequencing에서 반응액의 alcohol 침전에 효율적이다.
- Sequencing 반응에 영향을 주지 않는다.

■ 내용

Pellet Paint™ NF Co-Precipitant	250 μ l
3M Na Acetate(pH5.2)	1 ml

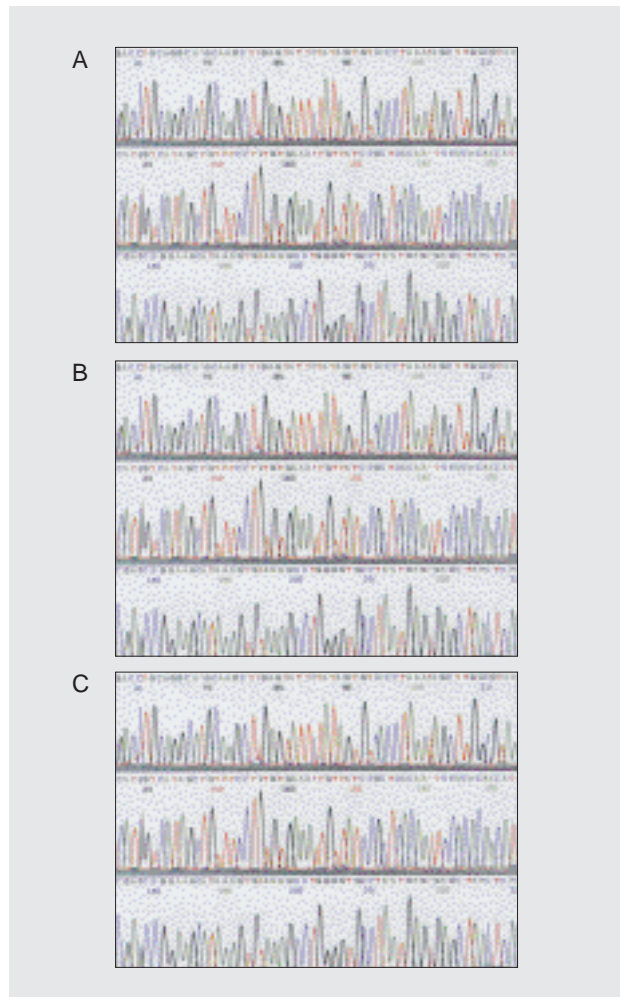


그림 1 Pellet Paint™ NF를 이용한 cycle sequencing

어떤 경우에도 같은 서열의 data를 얻을 수 있다.

A : Pellet Paint™ NF를 sequencing 반응 전 첨가

B : Pellet Paint™ NF를 sequencing 반응 후 첨가

C : Pellet Paint™ NF를 무첨가

표 1 Sequencing signal의 강도 비교

Pellet Paint™ NF의 첨가	침전 방법	G signal 평균치	A signal 평균치	T signal 평균치	C signal 평균치
A : sequencing 전 첨가	60% ethanol 첨가, 3,000×g, 2분 원심분리	1052	884	1159	652
B : sequencing 후 첨가	60% ethanol 첨가, 3,000×g, 10분 원심분리	727	647	827	553
C : 무첨가	60% ethanol 첨가, 3,000×g, 45분 원심분리 (표준적인 ABI protocol)	568	508	646	387

본 kit에 포함된 control template 및 primer를 이용하여 BigDye™ cycle sequencing 반응을 하였다. 반응은 MicroAmp® Tray를 이용해서 25 cycle(extension time 4분)로 하였다. Sequencing 반응 전 및 반응 후에 Pellet Paint™ NF를 첨가한 반응액과 무첨가 반응액의 3가지 경우에 대해 signal 강도를 비교하였다.



전기영동은 고품질의 BMA로

BMA는 보한바이오메디칼입니다 **BMA**

FMC사의 전기영동제품이 BMA(BioWhittaker Molecular Applications)로 새로 태어났습니다.
당사는 저렴한 가격, 상시 재고 보유, 철저한 기술지원 및 사후 보증으로 여러분이 만족하는 고품질의 제품을 BMA brand의 Agarose로 공급해 드리오니 변함없이 애용해 주시기 바랍니다.
현재 BMA PRODUCTS CATALOG 2000을 준비하여 배부하고 있으니 전문대리점 또는 보한 홈페이지 (www.BOHAN.co.kr)의 “기술지원신청”란을 통해서 신청하시면 우송해 드립니다.
또 홈페이지 On Line Catalog에도 제품정보를 소개하고 있습니다.

■ Agarose 사용 용도 일람

	Analytical Grade			Genetic Technology Grade(GTG)			
	SeaKem® LE	NuSieve® 3 : 1	MetaPhor®	SeaKem® Gold	SeaKem® GTG	NuSieve® GTG	SeaPlaque® GTG
사용농도	0.5 ~ 2%	2 ~ 6%	1.8 ~ 5%	0.3 ~ 1.2%	0.5 ~ 2%	2 ~ 6%	0.75 ~ 2%
분석범위	500 b ~ 20 kb	10 b ~ 20 kb	40 b ~ 1 kb	500 b ~ 10 Mb	500 b ~ 20 kb	10 b ~ 1 kb	500 b ~ 20 kb
1 kb 이하의 DNA / RNA 분리		○	○ (Fine Resolution)			○	
1 kb 이상의 DNA / RNA 분리	●		●	○	○		○
PCR 산물의 분리 · 해석	○	○	○	○	○	○	○
Southern blotting	●	○	●	○	○	●	▲
Northern blotting	●	○	●	○	○	●	▲
In gel 반응 (ligation, cloning, DNA labeling, 제한효소 처리, PCR, sequencing)						○	○
Fingerprinting	○						
Pulse field 전기영동	▲			○	●		●
DNA회수							
전기 용출	●	▲	▲	○	○	○	○
Phenol 추출						○	○
DEAE paper	●	▲	▲	○	○	○	○
Glass beads	●	▲	▲	○	○	○	○
SUPREC-01	●	▲	▲	○	○	●	○
β-Agarase						○	○

○ : 최상 ● : 충분히 적당 ▲ : 사용가능

■ BMA 주요제품 ■

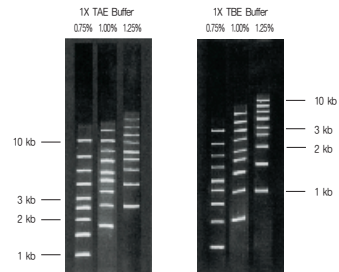
SeaKem® LE Agarose

SeaKem은 BMA사의 등록상표입니다.

- 용도 : 1 kbp 이상의 핵산 분석, blotting
- 특징 : ● 제품중에 DNase, RNase를 함유하지 않는다.
- EtBr, SYBR Green, GelStar로 염색한 경우 background가 낮기 때문에 선명한 band를 검출할 수 있다.
 - 낮은 gel 농도(0.5~2%)로 사용할 수 있어 100~23,000 bp의 DNA 단편을 해석하는데 사용한다.

F50001	25 g
F50000	125 g
F50004	500 g

SeaKem LE Agarose의 DNA 분리능력



Sample : 1-10 kb DNA Marker (Takara Code F50471) 5 µl/lane
 영동조건 : 6 V/cm, 2 hrs, 30 min (TBE Buffer) 2 hrs (TAE Buffer)

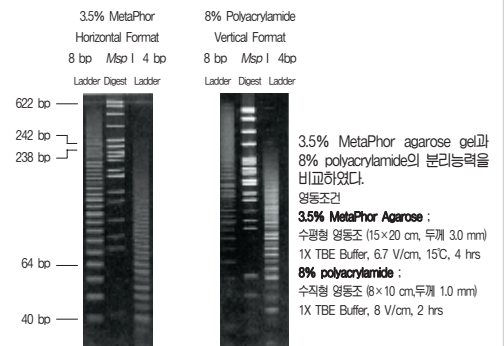
F50181	25 g	154,000원
F50180	125 g	502,000원
F50184	500 g	1,774,000원

MetaPhor® Agarose

MetaPhor는 BMA사의 등록상표입니다.

- 용도 : 짧은 DNA 단편의 해석, 특히 AMPFLPs, STRs, tri-, tetranucleotide repeats 등의 해석
- 특징 : ● 제품 중에 DNase · RNase를 함유하지 않고, DNA의 비특이적 흡착이 생기지 않음을 확인하고 있다.
- EtBr 염색을 한 경우 background가 낮기 때문에 영동 밴드의 검출이 용이하다.
 - 800 bp 부근에서 16 bp의 길이 차를, 200 bp 부근에서 4 bp의 길이 차를 확인할 수 있으므로, VNTRs, AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), allelic ladder 등 1,000 bp 이하의 범위에서 PCR 산물을 해석하고자 할때 사용할 수 있는 높은 분리능력을 가진 gel이다.

MetaPhor Agarose의 분리능력



3.5% MetaPhor agarose gel과 8% polyacrylamide의 분리능력을 비교하였다.
 영동조건
3.5% MetaPhor Agarose :
 수평형 영동조 (15×20 cm, 두께 3.0 mm)
 1X TBE Buffer, 6.7 V/cm, 15°C, 4 hrs
8% polyacrylamide :
 수직형 영동조 (8×10 cm, 두께 1.0 mm)
 1X TBE Buffer, 8 V/cm, 2 hrs

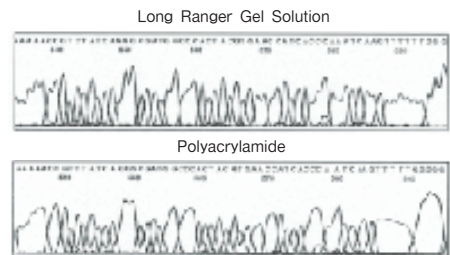
Long Ranger® 50% Gel Solution

Long Ranger는 BMA사의 등록상표입니다.

- 용도 : Sequencer 전용 gel
- 특징 : ● 같은 농도의 acrylamide gel 보다 더 많은 염기서열을 읽을 수 있다(예를 들면 PERKIN ELMER사 Applied Biosystems Prism 377 DNA Sequencer를 사용한 경우 98.5 % 이상의 정확도로 800 bp이상 판독할 수 있었다).
- 특이한 화학구조로 인하여 같은 농도의 acrylamide gel보다 더 균일하고 큰 pore를 형성하므로 영동시간을 약 50 % 단축할 수 있다.
 - Gel matrix의 안정성과 강도가 뛰어나 명료한 ladder 패턴을 얻을 수 있으며 판독도 약 30 % 더 길게 할 수 있다.

F50611	250 ml
F50615	1 l

Long Ranger와 Polyacrylamide gel의 sequencing 결과 비교



MDE® Gel Solution & Kit

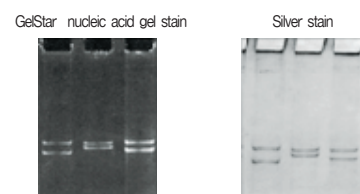
MDE는 BMA사의 등록 상표입니다.

별매 component

MDE Gel Solution	F50620	250 ml
MDE Heteroduplex Kit	F50622	250 ml 용
Heteroduplex Control DNA	F50630	60 µl
Triple Dye Loading Buffer (6×)	F50632	1.1 ml

- 용도 : SSC나 heteroduplex해석과 같은 변이 검출용
- 특징 : ● 검출감도가 매우 높아 고효율로 변이를 screening 할 수 있다. 변이가 발견된 시료만을 sequencing하면 되므로 시간을 대폭 단축할 수 있다.
- 본 제품은 2× 농도로 되어 있어 heteroduplex 해석용의 1× 농도와 SSCP 해석용의 0.5×농도로 간단하게 조절할 수 있다.

MDE gel을 이용한 300 bp DNA단편의 SSCP 해석



시료 : PCR 반응액 0.5 µl + 변성제 4.5 µl
 각 lane의 DNA 단편(300 bp)는 1 µl만의 차를 갖는다.
 영동조건 : 0.7×MDE0.6×TBE 사용 1mm 두께의 수평 min gel을 사용 300V로 1 시간 동안 영동하였다.



인터넷 세상



인터넷 용어

Homepage(홈페이지)

특별한 용도를 위해서 만든 하이퍼텍스트 문서를 말한다. 개인이나 기업 누구나 만들 수 있다. 기업에서는 주로 광고를 만들고 개인은 자기의 소개나 자신의 지식을 남에게 가르쳐 주는 용도로 만들고 있다.

Hypertext(하이퍼텍스트)

특정 데이터 항목이 다른 문서와 링크 관계를 가지고 있는 문서를 가리킴(하나의 문서에서 특정 항목(부분)을 선택하면 그와 관련된 문서로 연결되어 계속 정보를 볼 수 있다.)

JAVA

자바는 단적으로 말하면 프로그래밍 언어이다. 즉 BASIC, C, Fortran, Pascal 등과 같은 프로그래밍 언어이다. 더 나아가서 객체지향 프로그래밍 언어이며, 기본적으로 C++를 기반으로 만들어졌다. 처음 자바가 등장하면서 강조한 점은 웹에서의 인터랙티브 콘텐츠이다. 즉 정적인 웹페이지를 동적으로, 사용자와 상호 대화할 수 있도록 다이나믹하게 만들어 준다는 것이다.

Mailing List(메일링 리스트)

전자우편을 이용하여 관심있는 주제를 토론하는 서비스이다. 인터넷 이용자가 특정 호스트에 전자우편을 보내어 토론 그룹에 가입함으로써 토론 내용을 구독하고 글을 게시하는 방식으로 운영되고 있다. 예를 들어 '인터넷 기초'에 관련된 메일링 리스트에 가입하면 그에 관한 내용을 전자우편을 통하여 지속적으로 받아볼 수 있으며 동시에 자신이 글을 게재하여 토론에 참여할 수도 있다.

Mirror Site(미러 사이트)

말 그대로 거울이 되는 사이트를 말한다. 좋은 프로그램과 자료가 있는 사이트의 공개자료를 다른 호스트에 복사해 두는 것을 미러링한다고 하는데, 원래의 호스트에서 자료를 얻는 것보다 접속도 잘 되고 속도도 빠른 장점이 있다.

MUD(Multi-User Dungeon, Dimension)

인터넷에는 많은 온라인 게임들이 존재한다. 그 중에는 바둑이나 체스처럼 두 사람이 하는 게임도 있지만 다수의 사용자가 참여하는 게임을 머드(MUD) 게임이라 한다.

Packet(패킷)

네트워크에서 전송되는 데이터의 기본 단위. 데이터의 집단.

POP3(Post Office Protocol 3)

PC에서 유도라 또는 넷스케이프 메일과 같은 윈도우용 메일 프로그램을 이용해서 메일을 사용 가능하도록 해주는 프로토콜이다.

Protocol(프로토콜)

네트워크에서 어떠한 형식으로 데이터를 주고 받을 것인가에 대해서 약속한 규약.

Shareware(세어웨어)

프로그램을 사용해 보고 마음에 들면 요금을 지불하는 형태의 소프트웨어.

URL(Uniform Resource Locator)

WWW 정보의 주소 지정 방식으로 WWW의 기본이 된다. 이 통신 규약을 이용하여 WWW 하이퍼텍스트 문서 뿐만 아니라 FTP, Gopher, Usenet 등 인터넷에 존재하는 어떠한 형태의 정보라도 가져올 수 있다.

Whois

인터넷에 등록된 사용자, 도메인, 기관명에 관한 정보를 알려 주는 기능.

WSP(Web-hosting Service Provider)

자신의 서버에 다른 기관의 홈페이지를 등록하여 서비스를 제공하는 기관. 즉 웹서버 장비를 보유하고 있지 않거나 운영 능력이 없는 기관을 대상으로 웹 서비스 및 유지보수를 대행해 주는 기관을 말한다.

2000 TaKaRa Symposium 개최 안내

한국분자생물학회 추계학술대회의 공식일정으로 다섯번째 맞이하는 TaKaRa Symposium을 다음과 같이 개최합니다.

금년에도 예년과 같이 생명과학 분야에서 화제가 되고 있는 주제를 선택하여 전반적인 최신의 흐름을 이해할 수 있도록 정리하여 특히 대학원생을 비롯한 젊은 과학자에게 도움이 되도록 기획하였습니다.

이번 심포지움에서는 경상대학교 임동빈 교수가 Proteomics의 최근의 진보와 생명공학에의 응용, 과학기술부 21C 프론티어 인간유전체연구사업단장 유향숙 박사의 한국의 21C 기능유전체학, Takara 바이오연구소 Takesako 부소장의 Stem Cell Gene Therapy의 최근 동향 그리고 KAIST 김선창 교수의 차세대 생물공학용 인공균주 개발에 관하여 발표할 예정입니다.

주제 : Trends in Life Science & Biotechnology

일시 : 2000. 10. 12. (목) 오후 3:00-

장소 : 서울 교육문화회관 거문고홀

Organizer & Chair : Young Min Kim, Ph. D./Yonsei Univ.

Je Hyeon Lee, Ph. D./BOHAN Biomedical Inc.

1. Recent Progresses in Proteomics and its Application to Biotechnology

Dongbin Lim, Ph. D./Macquarie Univ. Australia/Gyeongsang Nat'l Univ.

2. 21C Frontier Functional Genomics of Korea

Hyang Sook Yoo, Ph. D./KRIBB

3. Current Situation of Stem Cell Gene Therapy

Kazutou Takesako, Ph. D./TAKARA Biomedical Research Labs., Japan

4. Genesis of Artificial Microorganisms for Future Biotechnology by Genome Engineering

Sun Chang Kim, Ph. D./KAIST

보한바이오메디칼(주)

TaKaRa

한국분자생물학회

지역별 전문대리점 구축(2000년 8월 1일부터)

당사는 연구자 여러분께 보다 신속하고 충실하게 제품과 서비스를 제공하고자 전국 주요 지역별 전문대리점을 구축하여 2000년 8월 1일부터 전국 1일 배송 서비스를 시작하였습니다. 특히 지방에 계시는 연구자 여러분들은 주문한 제품을 보다 빠르게 받으실 수 있습니다. 또한 당사가 제공하는 다양한 자료 및 정보들도 신속하게 제공해 드릴 수 있게 되었습니다.

당사의 제품을 주문하실 때는 아래의 각 지역별 전문대리점에 전화를 하시거나 또는 Bio21인터넷 쇼핑몰을 이용하여 주시기 바랍니다.

여러분의 성원과 관심 부탁드립니다.

www.BOHAN.co.kr

서울, 경기, 강원, 대전, 충청	(주)코아바이오시스템 02-841-7530 (서울) 031-286-8592 (수원) 042-472-3669 (대전)
부산, 경남	대한과학 051-245-6582
대구, 경북	(주)브니엘 053-959-3611
전주, 전북	삼화교역 063-227-3700
광주, 전남	(주)진성에스엠알 062-672-7631

Ex Taq 무료 증정 행사 성황리에 끝나

당사가 2000년 6월 30일까지 실시한 "TaKaRa Ex Taq을 무료로 드립니다" 행사가 여러분의 뜨거운 관심속에 끝났습니다. Ex Taq을 아직 사용해 보지 않았거나 까다로운 PCR 조건으로 고전을 하고 계시는 연구자 여러분께 한번 사용해 보실 수 있는 기회를 제공해 드리고자 하였던 본 행사에 모두 약 700개의 실험실이 춘계학술 대회 전시장 또는 홈페이지를 통해 신청을 하셨으며, 7월 중순까지 배송을 마쳤습니다.

한편 이미 사용해 보셨던 고객 중 몇 분의 사용례를 모아 본지에 게재하였습니다.

뛰어난 정확성과 효율성으로 정평이 나 있는 TaKaRa Ex Taq을 사용하여 보시기 바랍니다.

지역별 전문대리점 구축 기념 특별 이벤트 실시중 (2000년 9월 30일까지)

당사는 지역별 전문 대리점의 구축을 기념하기 위하여 특별 이벤트를 실시하고 있습니다.

그 특징은 당사의 주요제품들을 보다 저렴한 가격으로 공급하여 드립과 동시에 Bio21 인터넷 쇼핑몰을 이용하는 분께는 보다 많은 혜택을 드린다는 것입니다.

본 이벤트의 내용은 다음과 같습니다.

하나, 주요제품 특별 할인 판매(20% off)

둘, 주요 제한효소, 수식효소 특별 소포장 한정판매

셋, 합성 DNA 특별 가격할인 : mer 당 1,000원

넷, 인터넷 쇼핑몰 사용실적 마일리지 5% 특별 적립

다섯, 인터넷 주문을 처음으로 하는 분, Bio21 새내기 회원에게 기념품 증정

(본 행사에 관한 상세한 정보는 54페이지를 참조하세요)

할인혜택 자체는 전화주문의 경우와 쇼핑몰 사용의 경우 모두 드립니다만, 쇼핑몰을 이용하시면 추가로 5%의 마일리지를 적립해 드리는 등 보다 많은 혜택을 누릴 수 있습니다.

쇼핑몰을 이용하시려면 먼저 당사의 홈페이지(www.BOHAN.co.kr)를 통해 Bio21회원으로 가입하셔야 합니다. Bio21 클럽에 등록하시면 인터넷 쇼핑을 자유자재로 하실 수 있을 뿐만 아니라 당사의 최신바이오뉴스, 신제품, 각종 행사안내 등의 제반정보 및 Life Science & Biotechnology지를 무료로 받으실 수 있습니다.

2000년도 추계 학술대회 적극 참여

당사는 금년에도 변함없이 다양한 추계학술대회에 참여하여 연구자 여러분과의 소중한 만남을 가집니다. 다양한 정보 전달 및 이벤트가 펼쳐지는 전시장 설치 이외에 매년 분자생물학회와 공동으로 개최하는 Takara International Symposium도 준비하고 있으며, 특히 대한생화학·분자생물학회에서는 "Functional Genomics"를 주제로 하는 workshop도 개최합니다. 참여일정은 다음과 같습니다.

- ▶ 한국분자생물학회
2000년 10월 12일(목)~10월13일(금) 서울교육문화회관
- ▶ 한국생화학학회
2000년 10월 6일(금)~10월 7일(토) 대전, 인바이오넷
- ▶ 대한생화학·분자생물학회
2000년 10월 26일(목)~10월 27일(금) 한국과학기술회관 국제회의장

Bio21 인터넷 쇼핑물 대잔치 최우수 이용자 및 마일리지 수혜자 명단 발표

당사는 1999년 6월 1일~2000년 6월 30일사이 인터넷 쇼핑물로 100만원이상(시약에 한함) 구매한 고객에게 사은품을 드리고 최우수고객 2명에게는 당사 일본본사 연수의 특권을 드리는 행사를 실시하였습니다. 최우수 이용자 및 마일리지 사은품 수혜자의 명단은 아래와 같습니다.

일본 본사 견학 및 연수 - 최우수 이용자
이용금액 최고 유허진(genet-1)님
이용회수 최고 김태현(kimth)님

당사는 마일리지 적립 포인트에 따라 다양한 사은품(60페이지 참조)을 드립니다.

사은품 증정 시기인 매년 7월과 1월 초가 되면 e-mail 또는 전화로 안내해 드리오며, 그 시기에 사은품 신청을 하지 않는 경우 마일리지는 자동으로 계속 적립됩니다. 또 신청을 하시는 경우에는 전체 마일리지 포인트에서 해당포인트 만큼 감소하게 됩니다.

마일리지 적립 비율은 기본 2%이나, 2000년 9월 30일까지 실시하는 "지역별 전문대리점 구축 기념 특별 이벤트"에 참여 하시는 경우 특별 적립 5%를 해 드립니다.

24시간 어디서나 주문할 수 있고, 다양한 혜택을 드리는 Bio21 인터넷 쇼핑물을 꾸준히 이용하여 주시기 바랍니다.

*마일리지 포인트 계산례 : 1,000,000원어치를 구매하신 경우
마일리지 포인트는 그 2%에 해당하는 20,000입니다.

강석현	Neosukhy	98,982
고수민	kosu	29,656
고승준	ksj308	26,826
구태원	gootw	73,480
권범섭	kwonb	52,390
권석윤	sykwon	39,908
김기범	kibeom2000	28,754
김나정	pink5	33,704
김테리사	teresa	141,262
김성조	sungjo	80,608
김성찬	ksc	29,216
김수찬	kimsc7	53,838
김연숙	sugi1975	21,692
김예찬	cult	31,658
김완석	biochem	35,640
김용찬	ychan	77,488
김인숙	greenfish	33,594
김정미	batif92	22,342
김정수	kjsok	35,310
김중헌	jonghun	260,216
김태현	kimth	267,916
김해영	hykim06	49,412
김현호	lasvegase	36,344
김형준	cory	142,692
남희	Igf1	257,114
류기현	ryu-1	188,848
류병규	bkryu	29,304
문우철	wcmoon	38,412
박남용	nypark	49,236
박성효	anaislove	269,658

박용성	kokomo	35,706
박인철	pinc	21,076
박창신	parkshin	58,520
박현숙	mascot	24,288
배영안	anney	53,952
성봉현	bbong	28,908
소인섭	kist	24,856
송기준	songmicr	184,338
신령	khpaek	39,644
신은심	eunsimi	29,304
신종연	shin jy	40,128
안봉현	bhahn	22,836
양현정	ViroMed	631,224
엄태한	uth	88,594
여윤수	ysyeo	30,624
오용석	ahaspart	38,808
오을순	ohjeje	64,856
오대진	tjoh	31,306
우종규	apoptosis	21,384
우혜련	hrwoo	40,568
유영미	nssr	289,278
유정식	jungsik	312,422
유허진	genet-1	678,357
윤두학	dhyoon	241,824
윤웅한	uhyoon	33,088
이경재	dwbio	30,954
이계준	lkj12345	43,371
이명철	mclee	89,452
이미옥	miok74-1	351,023
이상근	lacos	179,211

이상현	shlee1004	20,218
이영춘	yclee	48,444
이원필	lwonpil	43,362
이은주	Elice	113,344
이종원	parasi	46,838
이형주	greenbay	37,236
장창환	veritas	274,296
전성훈	zanga	63,360
정미라	3hopes	59,768
정병석	byungs	68,090
정재성	jjung1	26,556
정진경	jungjk	25,608
정현주	chung1121	25,146
정효석	jhs69	97,152
조가연	jospeed	22,080
조남윤	reindeer	22,726
조소영	chosoll	172,058
진은경	thyroid	106,458
차상훈	chash	39,534
천광훈	pat	35,442
최신건	choisg	39,534
최우진	yalover	29,304
최인미	imchoi	31,636
최주연	pp1994	22,326
최혜선	hschoi	27,302
하연숙	hays11	25,498
한일근	lkhan	186,076
황규성	mannerhks	154,858

세포의료의 세계적 선두주자인 미국의 Nexell사와 유전 자치료의 기반을 목표로 제휴

Takara Shuzo사(사장: OMIYA HISASHI)의 바이오 사업부 문은 4월 28일 세포의료의 세계적 선두주자인 미국의 Nexell(N사)의 전 제품을 일본, 한국, 중국, 대만등에 독점 판매하기로 합의하였다. 또 유전자 치료기술의 세계적 표준이 되고 있는 당사 개발 RetroNectin과 N사가 개발한 가스 투과성이 높은 플라스틱 세포배양백을 조합하였다. 양사는 임상용 유전자 치료기술 공동개발에 합의하였다. 당사 바이오 연구소와 Nexell사가 개발한 유전자치료 기술은 세계최초의 유전자치료 성공사례가 되었다. 프랑스에서 유전자치료를 성공 사례를 2000년 4월 28일자 Science지에 최초로 발표되었는데 11개월과 8개월된 남아의 면역부전증 치료였다. 이 면역부전증은 SCID-X1라 부르며 cytokine 수용체 유전자 변이로, 면역에 필수적인 T세포나 NK세포가 생산되지 않아 면역부전으로 사망하는 병이다. 따라서 이 환자들은 병의 감염을 막기 위해 투명한 캡슐 내에 살거나 항상 밖과 격리된 곳에서 생활해야만 한다. 미국에서는 "Boy in a bubble disease"라고 부르고 있다. 프랑스의 국립위생연구소(INSERM)의 연구자들은 Retrovirus vector에 조합한 γ C유전자를 환자들의 조혈간세포에 도입하였다. 그중 통상적인 방법으로는 유전자도입효율이 저하되어 당사가 개발한 Retronectin법을 채용하였다. 당사가 개발한 Retronectin을 N사가 개발한 기체 투과성이 좋은 세포배양 상자(Lifecell, X-Fold™)의 내면을 코팅한 상태로 조혈간세포 유전자도입을 실행하였다. 두 환자는 치료 후 약 10개월이 지났지만, 특별한 보조치료 없이 일상생활을 하고 있다. 수 년전에 ADA (adenosindeaminase) 결손증을 유전자 치료로 성공한 적이 있는데, 결손된 ADA를 항상 투여하는 유전자 치료 최초 성공사례를 CNN 뉴스 등 세계 모든 뉴스가 보도하였다. 당사는 국가기관에서 정식으로 유전자치료 허가를 얻어 당사가 제조한 임상용 Retronectin을 무상제공해 주고 있다. 현재까지 미국, 독일, 프랑스, 이탈리아, 네덜란드, 일본 등 6개국 13 지역에 제공했다.

Nexell사의 세포배양 상자를 Retronectin으로 코팅하면 유전자 도입효율이 비약적으로 증가한다.

기체의 투과성이 높은 세포배양 상자 X-Fold™의 내면을 Retronectin으로 코팅하고 조혈간세포(CD34+)에 치료용 유전자를 넣은 Retrovirus vector를 감염시키면 그 효율은 Retronectin으로 하지 않은 경우와 비교하여 12배 증가하는 것을 알 수 있다.

이 결과는 미국 국립위생연구소의 Dr. Malech가 당사와 N사의 공동연구로 밝혀진 것이다. 당사와 N사는 지속적인 공동 연구를 통하여 유전자치료용 시스템을 개량해 나갈 것이다.

Nexell사의 주력제품은 혈액세포분리장치이다.

유전자 치료를 실시하기 전에 표적 세포를 모두 혈액 세포에서 선별해야 한다. Retrovirus를 vector를 사용하여 혈액세포의 근원인 조혈간세포에 유전자의 도입을 하기 위해 조혈간세포를 선별해야 한다.

이 조작은 N사의 분리장치 "Isolex 300i"로 항체 column을 이용한다. 이 장치는 의료용 기구 임상용으로 유럽에서는 1996년에 캐나다, 미국에서는 1999년에 각각 인가 되었다. 일본과 오스트레일리아에서는 현재 신청 중에 있고 금년내에 인가될 예정이다. 목적 세포를 선택분리하여 특정 유전자를 도입해 환자의 체내에 주입하는 것이 유전자 치료이다. 유전자 도입을 하지 않고도 조혈간세포를 그대로 백혈구항원에 적합한 환자에 주입하는 치료가 소위 "골수이식" 또는 "말초혈간세포이식"이라고 부르며, 악성 백혈병이나 재생불양성빈혈이나 면역부전증에 효과적인 치료법이다. 또 선택된 특정 세포를 증식하여 환자의 체내에 주입하여 치료하는 것도 생각하고 있다. 위의 치료법은 모두 체외 세포치료법이라고 부른다.

이 전략적 제휴가 의미하는 것

TaKaRa 바이오사업부문은 아시아를 중심으로 유전자 치료의 상업화를 목표로 한다. 이번 N사와의 제휴는 이 목적 달성을 하기 위한 필수 단계이다. 앞으로 유전자 치료나 말초혈 간세포이식 등을 포함하는 세포의료가 점점 확대되어, Isolex 300i 같은 혈액세포 분리장치의 수요도 증대되어 소모품의 판매를 포함해서 5년간 30억엔 정도의 매출을 기대하고 있다. 또 당사는 Retronectin의 물질 특허와 유전자 치료에 이용하는 응용특허를 보유하고 있다.

〈Nexell사의 개요〉

회사명 : Nexell Therapeutics Inc.

대표자 : Richard Dunning

설립 : 1997년

소재지 : 9 Parker, Irvine, CA 92618-1605, USA

직원 : 약 120명

사업개요 : 세포의료용 장치 및 소모품 등의 제조판매

고속 genome 해석 center dragon genomic사를 설립

TaKaRa 바이오 사업부문은 아시아 최대 규모의 민간 게놈 해석센터 「Dragon Genomics 주식회사」(DRAGON GENOMICS CO., LTD. DGC)를 2000년 7월 4일에 설립했다. 자본금은 50억엔(Takara Shuzo 100% 출자)으로 대표이사 회장에는 일본 본사 사장 OMIYA HISASHI, 대표이사 사장에는 부사장겸 바이오사업 본부장 KATO IKUNOSHIN이 취임하였다. DGC를 자회사로 분리하여 독립적인 체제로 만든 것은 이후 급속하게 사업이 확대될 것으로 예상되어 경영의 독립성을 보완하고 세계의 genome 경쟁에 유연한 대응 체제를 만들기 위해서이다.

새로운 회사는 MIEKEN YOKACHISHI 「SUZUKA-SANROKU reearch park」(용지 약 18,693평, 건평 3,050평, 상면적 3,800평 예정) 내에 건설예정으로 2000년 12월말 완공을

목표로 한다. 이와 동시에 이 DGC에 게놈 해석용 시료를 대량으로 공급할 예정으로 DNA 제조를 담당하는 TaKaRa Biotechnology(DALIAN) Co., Ltd.(자회사로서 중국 대련 소재 1993년 8월 설립)는 자본금을 10억엔에서 20억엔으로 늘려 2차 확장공사에 착공했다. DGC 새 사옥 완성까지 6개월 간은 당사 유전자 해석 센터(Miekensatsushi) 내에 새로운 설비를 보강하여 부분가동을 개시한다.

2002년 여름에는 DGC가 세계최대의 DNA염기서열 해석능력을 가진 미국 셀레라사의 약 6배의 능력을 갖춘 게놈 해석 센터가 될 것이다. 올해 2월에 오스트레일리아의 Nucleics Pty. Ltd에서 개발한 새로운 염기서열 해석법이 ASIN법을 활용함으로써 셀레라사의 능력을 능가할 것으로 기대하고 있다. DNA sequencer은 Amersham Pharmacia Biotech사 제품인 MegaBACE로 내년 시판 예정인 384 capillary sequencer(384 sample 동시해석)을 사용하기로 결정하였다. 전체 능력은 MegaBACE 환산으로 95대에 해당한다. DNA sequence에서 얻은 많은 정보를 처리하기 위하여 미쯔비시 스페이스 소프트웨어(주)와 공동으로 DNA 정보처리시스템을 개발중이다. Computer system은 미국 파라셀사 제품의 "유전자 해석용 super computer, GeneMatcher-plus™" 3대를 시작으로 다른 computer와 연결하여 2400 CPU에 해당하는 방대한 계산 처리능력을 가지게 되어, 아시아에서는 최대규모이다. 또 기억용량은 7 terabit(7×1012bit, personal computer 약 7000대에 상당)이다. 지난 2000년 6월 26일에 발표된 human genome data의 computer해석으로 게놈 해석 연구에도 활용할 수 있다.

세계의 연구기관이나 기업에서는 게놈 해석 project를 유료로 수탁하지만 DGC의 첫 번째 목적은 DGC가 독자적으로 게놈 해석 project들도 개시하는 것이다. 현재 계획하고 있는 자사 project는 유인원(약 30억 염기)의 게놈, 누에 게놈(약 5억 염기, 포유류의 1/6), 해양 생물 특히 갈조류, 마구로, 고래 등의 게놈 해석이다. 유인원과 누에는 각각 국립 유전학 연구소와 농수성의 양잠·곤충 농업기술연구소가 일부 연구를 시작하고 있다. Human에 연계해서 SNP 해석을 중심으로 project를 개시하고 공모할 예정이다.

〈Dragon Genomics 주식회사의 개요〉

- (1) 상호 : Dragon Genomics 주식회사
(영문명 : DRAGON GENOMICS CO., LTD. DGC)
- (2) 본점소재지 : MIEKEN YOKATUSHI SAKURACHO
(SUZUKASANROKU reearch park B구획 18,693평)
- (3) 자본금 : 50억엔, 주식수 : 100,000주
- (4) 출자구성 : Takara Shuzo 100% 출자
- (5) 직원 : 2001년 30명(2003년 70명 예정)
- (6) 임원구성 : 대표이사 회장 OMIYA HISASI
대표이사 사장 KATO IKUNOSHIN

Dragon Genomics 대규모 DNA sequence 수탁을 개시 !!

아시아 최대의 sequence 능력을 가진 Dragon Genomics에서는 대규모 sequence 수탁 서비스를 개시하였다.

본격 가동하는 2001년 4월까지의 Takara Shuzo사 유전자해석 센터의 sequence 능력을 대폭 보강하여 신속하게 대응할 것이다.

미생물·동식물의 전 게놈 sequencing외에 게놈 혹은 cDNA library의 체계적 sequencing등 여러 가지 요구에 대응하고 있다.

아가로 올리고당이 든 다이어트·보조 음료 「마시는 한천」 신발매

TaKaRa의 바이오 사업부문에 아가로 올리고당을 함유한 음료 「마시는 한천」 pouch type을 2000년 5월 15일 (월)부터 새롭게 발매하였다.

「마시는 한천」은 일본 본사 바이오 연구소에서 개발한 한천에서 얻어진 아가로 올리고당을 함유한 다이어트·보조 청량 음료수이다. 이번 음용방법의 다양화에 맞추어 휴대 등 보다 소비자의 이용도를 높이기 위해 고부가가치 상품 pouch type을 새롭게 발매하였다. 아가로 올리고당은 당의 흡수에 관여, glucosidase 활성을 저해하는 작용을 가진 활성산소의 일종으로 일산화질소의 체내로의 이상생산을 정상화하거나 prostaglandin E2의 생산을 억제한다. 종래의 올리고당 소재에 없는 뛰어난 기능을 가진 미용과 건강식품 소재로서 주목받고 있다.

본 제품 1개에는 두유한천(1 cm 입방) 약 1000개분의 아가로 올리고당이 함유되어 있다.

〈제품개요〉

- 제품명 : 마시는 한천
- 종 류 : 청량 음료수
- 하 자 : 180g × 30개/Box
- 발매시기 : 2000년 5월 15일(월)
- 아가로 올리고당 음료 「마시는 한천」 pouch

지역별 전문대리점 구축 기념 특별 이벤트 안내

www.BOHAN.co.kr

2000. 8. 21 ~ 2000. 9. 30(40일간)

당사는 지난 8월 1일부로 전국을 커버할 수 있는 지방 대리점 체계를 구축하였습니다. 금번의 새로운 대리점 체계의 구축으로 그 동안 불편을 겪었던 지방의 연구자 여러분들이 안심하고 보다 신속하고 편리하게 제품을 구입할 수 있음은 물론이고 다양한 서비스를 받게 되었습니다. 당사는 이 같은 대리점 체제를 널리 홍보하고 이용이 훨씬 편리해진 인터넷 쇼핑물의 이용율을 높이고자 다양한 특별 이벤트를 준비하였습니다. 많은 이용을 바랍니다.

하나

주요제품 특별 20% 할인판매 Off

주요 제한효소, 수식효소, 유전자 키트, PCR 제품, BMA(구. FMC) 전제품

일반적인 유전공학 실험이나 PCR 실험에 빈번히 사용하는 주요제품을 망라하여 20% 특별할인 판매합니다.

둘

주요 제한효소, 수식효소 특별 소포장 한정판매

처음 당사의 제한효소나 수식효소를 사용해 보시는 분을 위하여 특별 소포장을 한정 판매합니다. 성능에 대하여 염려하시거나 사용량이 적은 고객에게 특별히 권장합니다.

셋

합성 DNA 특별 가격할인 : mer 당 1,000원

합성 DNA 가격 이보다 쌀 수는 없습니다. 하지만 품질과 납기는 당사가 보증합니다.

넷

인터넷 쇼핑몰 사용실적 마일리지 5% 특별 적립 다양한 경품으로 또 하나의 기쁨

다섯

인터넷 주문을 처음으로 하는 분, Bio21 새내기 회원에게 기념품 증정



주요제품 특별 할인판매 20% off

제한효소, 수식효소, PCR 효소, 유전자 키트, 아가로스

제한 효소

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

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

유전자 키트

제품코드	품목명	규격	정상가격	할인가격
6021	DNA Ligation Kit Ver.1	50회	199,900	160,000
6022	DNA Ligation Kit Ver.2	50회	199,900	160,000
6025	DNA Blunting Kit	20회	150,000	120,000
6045	Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2	30회	220,000	176,000
6046	BcaBEST Labeling Kit	40회	180,000	144,000
6090	Mutan-Express Km Enzyme/Oligo Set	20회	330,000	264,000
6119	cDNA PCR Library Kit	20회	200,000	160,000
6120	cDNA Synthesis Kit	RNA 20 μ g 분	450,000	360,000
6121	3'-Full RACE CORE Set	20회	288,000	230,000
6122	5'-Full RACE CORE Set	10회	360,000	288,000
6123	Solid phase cDNA Synthesis Kit	25회	500,000	400,000
6125	Competitive RNA Transcription Kit	10회	129,600	104,000
6150	Adenovirus Expression Vector Kit	1 Kit	555,600	444,000
6624	Differential Display Kit(for RI)	1 Kit	920,000	736,000
6625	Fluorescence Differential Display Kit(Fluorescein)	1 Kit	920,000	736,000
6626	Fluorescence Differential Display Kit(Rhodamine)	1 Kit	920,000	736,000
9081	Dr. GenTLE(혈액용)	200회	205,700	165,000
9091	TaKaRa DEXPAT	100회	158,400	127,000
9092	PCR Extraction Kit for GMO Detection	100회	300,000	240,000
9410	EASYTRAP Ver.2	1 Kit	160,000	128,000
6030A	Kilo-Sequence Deletion Kit	5회	224,400	180,000
MK500	In situ Apoptosis Detection Kit	20회	216,000	173,000
MK600	ApopLadder Ex	24회	237,600	190,000

PCR 제품

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

BMA 제품 (구 FMC) 아가로스, 전기영동 전제 품

제품코드	품목명	규격	정상가격	할인가격
F50000	SeaKem LE Agarose	125 g	223,000	178,000
F50001	SeaKem LE Agarose	25 g	54,000	43,000
F50010	SeaKem ME Agarose	125 g	247,000	198,000
F50011	SeaKem ME Agarose	25 g	64,000	51,000
F50021	SeaKem HE Agarose	25 g	71,000	57,000
F50031	SeaKem HEEO Agarose	25 g	76,000	61,000
F50041	SeaKem HGT Agarose	25 g	69,000	55,000
F50070	SeaKem GTG Agarose	125 g	323,000	258,000
F50071	SeaKem GTG Agarose	25 g	74,000	59,000
F50080	NuSieve GTG Agarose	125 g	394,000	315,000
F50081	NuSieve GTG Agarose	25 g	115,000	92,000
F50090	NuSieve 3:1 Agarose	125 g	394,000	315,000
F50091	NuSieve 3:1 Agarose	25 g	118,000	94,000
F50101	SeaPlaque Agarose	25 g	162,000	130,000
F50111	SeaPlaque GTG Agarose	25 g	191,000	153,000
F50152	SeaKem GOLD Agarose	25 g	140,000	112,000
F50181	MetaPhor Agarose	25 g	154,000	123,000
F50513	SYBR GREEN I	10 x 50 μ l	191,000	153,000
F50611	50% Long Ranger Solution	250 ml	154,000	123,000
F50615	50% Long Ranger Solution	1 l	559,000	447,000



제한 효소, 수식 효소 특별 소포장 한정 판매

당사의 제품을 처음 사용해 보시거나 비교적 소량이 필요한 고객 여러분을 위하여 수량 한정으로 특별 소포장 제품을 공급하여 드립니다.

제품코드	품목명	규격	가격
1005S	Apa I	5,000 U	60,000
1007S	Ava I	250 U	40,000
1010S	BamH I	2,500 U	15,000
1012S	Ban II(HgiJ II)	1,000 U	48,000
1021S	Bgl II	500 U	24,000
1027S	BstX I	250 U	17,000
1034S	Cla I	500 U	42,000
1035S	Cpo I(Rsr II)	200 U	120,000
1037S	Dra I(Aha III)	2,000 U	54,000
1040S	EcoR I	5,000 U	30,000
1046S	Fok I	500 U	30,000
1053S	Hap II(Hpa II)	1,000 U	60,000
1056S	Hha I	1,000 U	39,000
1060S	Hind III	5,000 U	30,000
1064S	Hpa I	250 U	30,000
1068S	Kpn I	2,500 U	48,000
1069S	Mbo I	500 U	120,000
1070S	Mfl I(Xho II)	250 U	132,000
1073S	Pst I	5,000 U	33,000
1075S	Pvu I	100 U	42,000
1076S	Pvu II	1,000 U	30,000
1078S	Sac I	1,000 U	42,000
1079S	Sac II	500 U	30,000
1080S	Sal I	1,500 U	33,000
1082S	Sau3A I(Mbo I)	100 U	30,000
1085S	Sma I	1,000 U	30,000
1093S	Xba I	1,500 U	33,000
1094S	Xho I	2,500 U	36,000
1118S	Aor51H I(Eco47 III)	200 U	174,000
1119S	BssH II(BseP I)	150 U	44,000
1125S	EcoT22 I(Ava III)	1,000 U	60,000
1155S	Nae I	250 U	30,000
1160S	Nco I	250 U	50,000
1162S	Nhe I	250 U	36,000
1166S	Not I	250 U	42,000
1168S	Nru I	500 U	48,000
1180S	Sph I	200 U	54,000
2011S	T4 DNA Ligase	12,500 U	36,000
2021SS	T4 Polynucleotide Kinase	100 U	12,000
2140S	Klenow Fragment(E. coli DNA Pol I)	100 U	36,000
2150S	Ribonuclease H(RNase H)	500 U	36,000
2310S	Ribonuclease Inhibitor	2,500 U	54,000
2410S	S1 Nuclease	10,000 U	30,000
2520S	SP6 RNA Polymerase	1,500 U	39,000
2540S	T7 RNA Polymerase	2,500 U	36,000



합성 DNA 특별 가격 할인

행사기간 중 합성 DNA를 초저가로 공급합니다.
별도의 비용은 일체 없습니다.

- ▶ 50 nmole(PCR Grade, 2 OD 보증)
20잔기까지 20,000원
21~35 잔기 잔기당 1,000원
- ▶ 200 nmole(PCR Grade, 8 OD 보증)
20잔기까지 30,000원
21~35 잔기 잔기당 1,500원

* SEQ Grade의 경우는 200 nmole 합성으로 정제로 25,000원을 추가합니다.



인터넷 쇼핑몰 사용실적 마일리지 5% 특별 적립

행사기간 중 당사의 Bio21 인터넷 쇼핑몰을 이용하여 제품을 구매하시면 기본적인 20% 할인혜택(할인 대상품목 한정) 이외에 추가로 5%의 마일리지를 특별히(평상시 2%) 적립하여 드립니다.

본 행사기간에 적립된 5%는 평상시의 2%에 가산되어 이용실적에 따라 연 2회 원하시는 사은품 또는 상당금액의 제품으로 환원하여 드립니다.

인터넷 주문은 당사의 홈페이지(www.BOHAN.co.kr)에서 Bio21 회원에 가입하여 이용하실 수 있습니다.

보다 상세한 내용에 대해서는 다음 면을 참조하세요.

(단, 기기, 합성 DNA는 제외됨)



인터넷 주문을 처음으로 하는분, Bio21 새내기 회원에게 기념품 증정

행사기간 중 Bio21 회원으로 신규 가입하시거나 처음으로 인터넷 주문을 하시는 분께는 기념품(디스켓 또는 마커펜)을 드립니다.

Bio21 인터넷 쇼핑몰 마일리지 운용 안내

당사가 운영하는 Bio21 인터넷 쇼핑몰에서 제품을 구매하는 분에게는 2%(행사기간 5% 특별 적립)의 마일리지 적립하여 사은품 또는 제품으로 환원하여 드립니다. 마일리지 실적에 따라 아래의 사은품 중 또는 해당 금액의 제품을 선택하시면 우송해 드리며, 신청시기는 7월, 1월 초입니다.

20,000 Point 문 화상 품권/도서상 품권, 헤어드라이어, 전자계산기, 투스트기, 사오정 전화기 중 택1



헤어 드라이어(필립스)
110V/220V
소비전력 1000W



사오정 전화기(바텍시스템)
유선 전화기
내선통화기능, 플래쉬 기능

50,000 Point 커피메이커, 선풍기, 가습기, 핸디형 청소기 중 택1



커피메이커(브라운)
커피누출방지,
영구 필터,
정격 전압 : 220V



선풍기(오성사)
회전기능, 예약기능,
14인치, 3단계



가습기(르비앙)
히터 가열식,
350cc/hr



핸디형 청소기(동양아로나)
1단계필터, 연장관,
먼지봉투 교환 표시창,
물청소기능

100,000 Point 자동카메라, 카세트(일반), 믹서기, 전기밥솥, 테니스 라켓 중 택1



자동카메라(올림푸스)
35mm DX 코드부 필름
셀프타이머, 촬영날짜기록



카세트(LG전자)
연속재생기능, 구간반복,
취침예약기능, 콘덴서 마이크녹음,
라디오 순간 녹음



Novita 믹서기(삼성전자)
주서 500, 믹서 1000 ml
2중 안전장치



마이컴 전기밥솥(삼성전자)
예약 취사기능, 보온/재가열기능,
10인분

200,000 Point 자동카메라, 휴대용카세트, CD Player, MP3 Player, 전자 레인지, 진공청소기, 살균·식기건조기, TaKaRa 제품(20만원 미만) 구매



자동 카메라(삼성항공)
줌렌즈내장 전자동 35mm
렌즈 셔터, 적외현상 감소



휴대용카세트(LG전자)
3차원 입체음향, 미니콤팩 충전기
분리형 이어폰, 장시간 재생



CD Player(sony)
연속재생기능, 튜닝지기능,
무순위 연주, 스틱형 리모콘



ESOUND MP3 player(건잠머리)
내장 메모리 34M, 최대 메모리 64M
파일 전송속도 1.3 Mbps



전자레인지(삼성전자 RE-S60)
탈취기능, 잠금기능, 절전기능,
간편조리, 다이얼식



삼성 먼지따로 청소기(삼성전자)
저소음, 다단 스틸 연장관
안전장치 내장



살균 식기 건조기(삼성전자)
정격시간 기능, 자동 온도 조절기능
523×395×515mm

300,000 Point TV, VTR, 오디오, 냉장고, TaKaRa 제품(30만원 미만) 구매권 중 택1



명품 플러스원 TV(삼성 전자)
자동색 보정회로(AKB), 통합 리모콘
on/off 예약기능, 절전기능



고급형 VTR(sony)
6헤드, 예약녹화기능,
자동헤드 보호기능·클리닝 기능



LG 미니스타 오디오(LG 전자)
정격 출력 49W, 사운드 모드 4개,
CD 체인저 3개, CD 동시녹음



냉장고(삼성 전자)
232 l (냉동: 70 l, 냉장: 162 l)
578×1, 544×610mm

Q1 RNA-PCR을 하기 전에 total RNA 시료에 혼합된 genome을 제거하기 위한 DNase I(RNase-free)(TaKaRa Code 2215A)의 처리 방법은?

A1 ① 아래의 반응액을 조제한다(total 50 μ l).

Total RNA	20~50 μ g
1 M Tris-HCl(pH7.5)	2.5 μ l
25 mM MgCl ₂	20 μ l
RNase Inhibitor	20 U
DNase I(RNase-free)	2 μ l (10 U)

② 37°C에서 20~30분간 반응한다.
 ③ 50 μ l의 DEPC 처리수와 100 μ l의 Phenol/Chloroform(1:1) 용액을 넣어 혼합한다.
 ④ 실온, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한다.
 ⑤ 상층액을 새로운 tube로 옮기고 10 μ l의 3 M sodium acetate와 250 μ l의 cold ethanol을 넣어 -80°C에서 20분간 둔다.
 ⑥ 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 버린다.
 ⑦ 70% ethanol로 침전물을 세정하고 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층을 버린다.
 ⑧ 침전물을 건조한다.
 ⑨ 적당량의 DEPC 처리수로 녹인 뒤 전기영동으로 genome DNA가 제거되었음을 확인하고 농도를 측정한다(genome DNA가 완전히 제거되지 않은 경우에는 DNase의 양을 늘리거나 반응시간을 늘여서 다시 한다).

Q2 His·Tag 융합 단백질을 정제하기 위한 His·Bind Resin에는 2종류(NTA, IDA)가 있는데 어떤 차이가 있는가?

A2 NTA(nitriloacetic acid)는 금속 chelate site를 4개 갖고 있어 금속 chelate site를 3개 갖는 종래의 IDA(iminodiacetic acid)에 비해 보다 안정하게 금속(Ni²⁺)과 결합합니다. 따라서 NTA His·Bind Resin(NV1831~1833)은 20 mM 2-mercaptoethanol의 존재하에서 정제할 수 있습니다. 한편 IDA His·Bind Resin(TaKaRa Code NV5851, NV585)은 환원제 존재하에서는 정제할 수 없지만 수지를 재생할 수 있습니다. IDA type에는 이미 Ni²⁺가 결합되어 있는 cartridge type의 제품[His·Bind Quick Cartridges, His·Bind Quick Columns(TaKaRa Code NV648~650)]도 있습니다.

Q3 Agarose 전기영동을 실시할 때 TAE와 TBE중 어느 쪽의 buffer를 사용하는 것이 좋은가?

A3 DNA 단편의 크기가 작고(1,000 bp) DNA를 회수하지 않을 때는 TBE buffer를 사용하십시오. Agarose 농도가 적절한 경우에는 TBE buffer로 만

든 gel이 TAE buffer로 만든 gel보다 band가 뚜렷하고 깨끗하게 나옵니다.

한편 DNA 단편의 크기가 매우 큰 경우(15,000 bp 이상)에는 TAE buffer를 사용하면 DNA가 분리됩니다. 어떤 buffer를 사용하더라도 전기영동조에 넣는 buffer의 양은 액면이 gel 보다 3~5 mm 위까지 오도록 해야 합니다. 과잉량의 buffer를 넣으면 음극과 양극간의 저항이 작아져 gel 사이의 전압 구배가 감소하여 DNA의 이동이 늦어지고 과잉 발열과 band 변형의 원인이 됩니다. 또 DNA를 회수하는 경우에는 TAE buffer를 사용하십시오. TBE buffer를 이용하면 DNA 회수율이 낮아질 수도 있습니다.

Q4 정상 사람 골격근 세포(TaKaRa Code C2561)를 분화하는 방법은?

A4 정상 사람 골격근 세포는 통상 SkGM[®] BulletKit[®](TaKaRa Code B3160)으로 배양합니다만, growth factor의 양을 줄인 배지로 바꾸면 세포의 분화가 진행됩니다. 분화에 적합한 배지는 DMEM+2% horse serum+GA(0.5 mg/ml gentamycin, 0.5 μ g/ml amphotericin-B)입니다. Horse serum은 IGF-2를 함유하는데 세포분화를 일으키는 것으로 알려져 있습니다(SkGM에 0.2~0.3 μ g/ml IGF-2를 첨가한 배지도 분화를 일으킵니다). 배지는 격일로 교환하여 주십시오.
 골격근 세포는 2일 후부터 분화를 시작하고, 5~7일 후에는 50% 이상의 세포가 분화를 일으켜 myotubule를 형성합니다(BioWhittaker사의 보고).

Q5 Polyacrylamide gel을 SYBR Green 또는 Gel Star로 염색할 때의 방법은?

A5 전기영동 후 gel의 편면에서 glass plate를 빼냅니다. 희석한 염색액을 gel 위에 직접 올리나요? 아닙니다. Glass plate를 염색액에 담급니다. 염색 후 증류수로 세정하고 gel을 transilluminator위에 올려 DNA를 검출합니다. Gel에 직접 SYBR[®] Green 또는 Gel Star[®]를 넣어 염색하는 방법은 glass plate에 색소가 흡착해 버리므로 사용할 수 없습니다.

non-RI로의 고감도 DNA hybridization 검출에 !!

HybQUEST™ Complete (DNP) System

HybQUEST™ Complete (DNP) System

TaKaRa Code V6000 1 Kit

HybQUEST™ Label IT® (DNP) Kit

TaKaRa Code V6800 1 Kit

HybQUEST™ Hybridization & Detection (DNP) Kit

TaKaRa Code V6010 1 Kit

PanVera사 제품입니다.

본 시스템은 nylon membrane에 고정화한 DNA에 dinitro-phenyl(DNP) 표식 probe를 hybridization하여 hybridization signal을 AP 표식 항 DNA 항체와 화학 발광성 기질을 이용하여 고감도로 검출하는 시스템이다. Southern blot이나 colony hybridization 등 membrane 위에서의 특이적인 DNA hybridization과 그 검출을 고감도의 non-isotoping으로 실시할 수 있다. HybQUEST™ Label IT® (DNP) Kit(V6800)은 DNP 표식 probe의 제작에 필요한 시약을, HybQUEST™ Hybridization & Detection(DNP) Kit(V6010)은 hybridization과 검출에 필요한 시약을 모두 포함한 kit이다. HybQUEST™ Complete(DNP) system은 이것을 모두 포함한 set이다.

DNA 변이(다형) 검출 System

CFLP Scanning System Reagent Kit Ver.2

TaKaRa Code 6627 100회 반응

지금까지 호평을 받아온 CFLP® Scanning System Reagent Kit-S 및 Kit-L(TaKaRa Code 6620, 6621)이 새로워졌다. 본 제품으로 0.1 kb에서 1.7 kb까지의 PCR 산물에서 변이를 검출할 수 있다. 조건검토가 용이하여 높은 재현성으로 다검체를 처리할 수 있다.

Glycerol 3-Phosphate Dhydrogenase (GPDH) 활성 측정 Kit

TaKaRa Code MK426 96 Assays

Reporter Gene Expression Assay Kit

Beta-Gal Staining Kit

TaKaRa Code V2600 100 assays(35 mm dishes)

Enhanced Luciferase Assay Kit

TaKaRa Code V3500 100 assays(35 mm dishes)

PanVera사 제품입니다.

Beta-Gal Staining Kit는 reporter 유전자로서 세포 내에 감염한 β -galactosidase 유전자의 발현을 정색반응으로 *in situ*에서 간편하게 측정하기 위한 것이다. β -galactosidase 유전자의 발현을 개개의 세포 수준에서 직접 관찰할 수 있다. 또 Enhanced Luciferase Assay Kit는 reporter 유전자로서 세포 내에서 감염한 luciferase 유전자의 발현을 고감도로 신속하게 측정하기 위한 kit이다.

새로운 진균 형질전환 System

Pyrithiamine 내성 Vector System

본지 34페이지 참조

근일발매

신규항원 Endolase 및 candida 혈청

Candida albicans 연구용 시약

본지 36페이지 참조

효모로부터 고순도의 Genome DNA를 간단히 추출!!

Dr. GenTLE™(효모용)

TaKaRa Code 9084

50회

효모용으로 최적화한 것이나 세균에서도 PCR 주형으로 사용할 수 있는 수준의 genome DNA를 추출할 수 있다.

Ready-to-Screen Tissue Blots Series

Human Tumor Tissue Blots

TaKaRa Code GA111 1매

사람 종양 조직 유래:

Breast(유방), Cervix(경부), Colorectal(직장), Liver(간장), Lung(폐), Ovary(난소), Prostate(전립선), Skin(피부), Testis(정소), Thyroid(갑상선), Uterus(자궁), Stomach(위), Laryngopharynx(인두)

Human Cancer Cell Line Blots

TaKaRa Code GA112 1매

사람 종양 세포주 유래:

acute promyelocytic leukemia(급성 전골수구성 백혈병)
T lymphocyte lymphoma(T림프구성 림프종)
B cell lymphoma(B세포성 림프종)
mammary adenocarcinoma(유선암)
melanotic melanoma(melanin성 흑색종)
acute T cell leukemia(급성 T세포성 백혈병)
chronic myelogenous leukemia(만성 골수성 백혈병)
epidermoid carcinoma(편평상피암)
epitheliod carcinoma(유상피성암)
Burkitt's lymphoma(버킷 임파종)
prostate carcinoma(전립선암)
hepatocellular carcinoma(간세포암)
neuroepithelioma(신경상피종)

Geno Technology사 제품입니다.

본 제품은 사람 종양 조직 또는 종양 세포주에서 추출된 전체 단백질을 미리 blot한 premade type의 membrane이다.

Cellulose Cartridge Column Pack

TaKaRa Code 4404 10개

Cellulose Cartridge Glycan preparation kit의 column만을 포장한 경제적인 package이다(취급 설명서 및 accessory류는 첨부하지 않음). 이미 Cellulose Cartridge Glycan preparation kit(TaKaRa Code 4403)을 구매하였을 때 사용할 수 있다.

Novagen사 신제품

pTriEx™ Multisystem Expression Vector series

본 시스템은 1개의 vector만으로 대장균, 곤충세포 및 포유류 세포의 모든 계에서 목적 단백질을 발현할 수 있다(상세한 것은 본지 42페이지 참조). pTriEx™-1.1 series 이외에 Vector의 Tag 서열 및 promoter의 종류가 다른 pTriEx™-2, 3, 4시리즈를 새롭게 추가하였다.

pTriEx™-2 DNA	NV905	20 µg
pTriEx™-2 Cloning Kit	NV906	1 Kit
pTriEx™ Bacterial Expression System 2	NV907	1 Kit
pTriEx™ Baculovirus Expression System 2	NV908	1 Kit
pTriEx™ Mammalian Expression System 2	NV909	1 Kit
pTriEx™-3 DNA	NV910	20 µg
pTriEx™-3 Cloning Kit	NV911	1 Kit
pTriEx™ Bacterial Expression System 3	NV912	1 Kit
pTriEx™ Baculovirus Expression System 3	NV913	1 Kit
pTriEx™ Mammalian Expression System 3	NV914	1 Kit
pTriEx™-4 DNA	NV915	20 µg
pTriEx™-4 Cloning Kit	NV916	1 Kit
pTriEx™ Bacterial Expression system 4	NV917	1 Kit
pTriEx™ Baculovirus Expression system 4	NV918	1 Kit
pTriEx™ Mammalian Expression system 4	NV919	1 Kit

pET Expression system 43

본 제품은 가용화와 folding을 촉진하는 기능을 갖고 있는 Nus·Tag과 융합 단백질을 제작함으로써 목적 단백질을 고효율로 발현하는 새로운 pET system이다.

pET-43a(+) DNA	NV7951	10 µg
pET-43b(+) DNA	NV7952	10 µg
pET-43c(+) DNA	NV7953	10 µg
pET Expression System 43	NV794	1 Kit
pET Expression System 43 plus Competent Cells	NV7941	1 Kit

【근일발매】

pETBlue™-3 System

Blue/White color selection이 가능한 강력한 T7 발현 Vector system인 pETBlue™ system에 새로운 시리즈를 추가하였다.

pETBlue™-3 DNA는 N말단에 His·Tag과 S·Tag를 갖고 있어 이 Tag 서열은 protease로 절단할 수 있다.

pETBlue™-3 System	NV932	1 Kit
pETBlue™-3 DNA	NV931	20 µg

* 상기 vector의 전체 염기서열 및 map은 Novagen사의 홈페이지(<http://www.novagen.com>)를 참조하여 주십시오. 그 밖에도 다양한 신제품이 있습니다. Novagen사 제품 catalog은 전문대리점에 신청하여 주시기 바랍니다.

유전자 Fingerprinting을 이용한 자동세균검사장치 RiboPrinter® System



TaKaRa Code DP100 1 대

미국 Qualicon사의 자동세균검사장치 RiboPrinter® System은 세균의 ribosomal RNA 유전자 주변영역의 다형성을 이용한 유전자 fingerprint 해석(Ribotyping)을 자동으로 실시하여 단시간에 세균의 typing 뿐만 아니라 동정까지 할 수 있습니다. 해석결과는 RiboPrinter® pattern의 data로 표준화되어 data base화 할 수 있으므로 과거 data와의 비교 검사로 user간의 data 공유가 가능합니다. RiboPrinter® pattern의 data base에는 대장균, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* 등 약 1000 여종 이상의 세균에 관한 정보가 축적되어 있습니다. 이와 같이 본 시스템은 신속한 오염세균의 동정과 오염원의 확인이 요구되는 식품, 의약품의 제품공정관리 및 병원 등 시설의 위생 환경관리에 최적입니다.



■ 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 동정할 수 있다.
- User간의 network 연결로 data base를 간편하게 공유할 수 있다.
- 1000 종류 이상 세균주의 RiboPrinter® pattern이 이미 data base로 축적되어 있다.

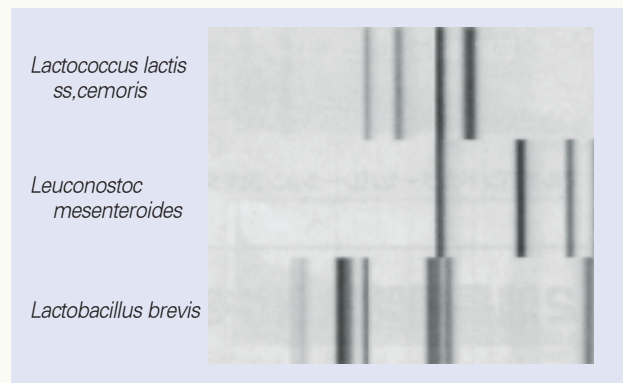
▶ RiboPrinter® System Process(전자동화)

- 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)

■ 관련제품

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

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



서울, 경기, 강원, 충청, 대전

02-841-7530(서울)
031-286-8592(수원)
042-472-3669(대전)
(주)코아바이오시스템

부산·경남

051-245-6582
대한과학

대구·경북

053-959-3611
(주)브니엘

전주·전북

063-227-3700
삼화교역

광주·전남

062-672-7631
(주)진성에스엘

DNA Chip 제작장치 & 해석장치

Functional Genomics 연구는 Affymetrix® 입니다.

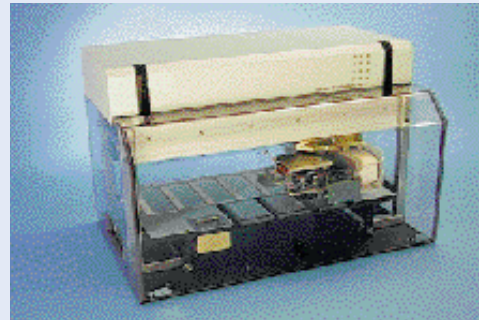


DNA Chip 제작장치

Affymetrix 417 Arrayer

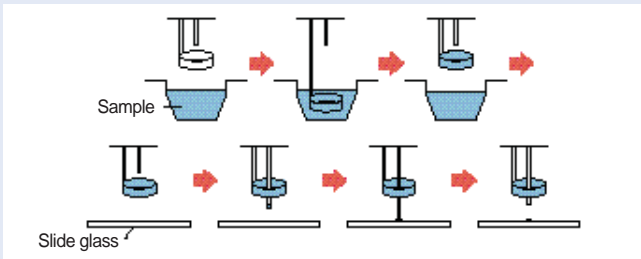
Affymetrix 417 Arrayer는 독자적으로 개발한 pin & ring 방식을 채용한 DNA chip 제작용 micro spotting 장치입니다. 96 well 또는 384 well titer plate 속의 시료용액을 slide glass 위에 50~300 μm의 크기로 spotting 합니다.

- ▶ 특징
 - 정확하고 재현성이 높은 spotting 실현
 - pin을 교환하므로 spot 크기 50 μm의 고밀도 array가 가능
 - 고속 spotting
 - soft touch spotting이므로 slide glass 뿐만 아니라 cover glass나 membrane filter에도 spot 가능

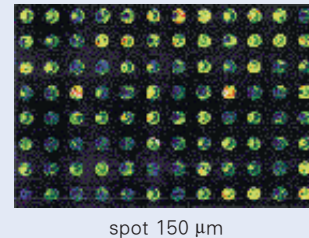


spot size : 50~300 μm
spot 간격 : 10 μm 단위로 자유설정
spot 속도 : 4 spot/sec
외형치수 : 80 cm(W)×53 cm(D)×49 cm(H)
기기중량 : 65 kg

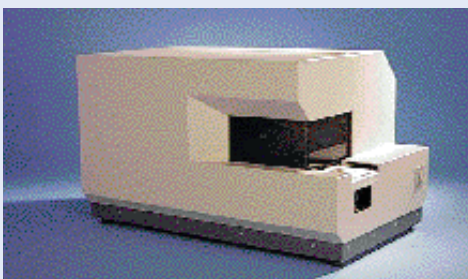
Pin & Ring 방식에 의한 spotting



Spot 예



Ring으로 reserve한 sample 용액을 42개의 slide glass에 동시에 spotting하므로 매우 신속합니다.



DNA Chip 해석장치

Affymetrix 418 Array Scanner

Confocal microscopy 기술을 근간으로 독자적 scanning 방식(wide field microscopy)을 채용한 DNA chip 해석용 형광 scanning 장치입니다.

- ▶ 특징
 - 고속 scanning
 - autofocus 기능으로 정확한 scanning
 - laser 출력 monitoring 기능으로 안정한 scanning
 - 대구경 렌즈를 채용한 높은 집광능력으로 고감도 scanning 실현

해 상 도 : 10 μm
scanning 속도 : 6.25분 이하/22 mm×75 mm/2파장
여 기 파 장 : 532 nm와 635 nm
검 출 방 식 : 광전자 증배관
외 형 치 수 : 38 cm(W)×61 cm(D)×38 cm(H)

발현 data 해석 Software

ImaGene™

서울, 경기, 강원, 충청, 대전	부산 · 경남	대구 · 경북	전주 · 전북	광주 · 전남
02-841-7530(서울) 031-286-8592(수원) 042-472-3669(대전) (주)코아바이오시스템	051-245-6582 대한과학	053-959-3611 (주)브니엘	063-227-3700 삼화교역	062-672-7631 (주)진성에스엠알