

Precoated type으로 Human Laminin을 신속, 간편하게 정량 !!

Precoated type Laminin EIA Kit

Precoated type Laminin EIA Kit

TaKaRa Code MK107 96회

지금까지 사용하여 왔던 Laminin EIA Kit(TaKaRa Code MK007)가 precoated type으로 바뀌었다.

고상항체 코팅처리로 blocking 조작이 필요 없어 측정하고 싶을 때 바로 측정할 수 있다. 조작시간은 약 2시간 30분으로 동시 재현성과 일차 재현성도 만족할 만한 수준이다. 발색기질은 기존의 OPD(o-phenylenediamine-2HCl) 정에서 조제 TMBZ 용액으로 변경되어 별도로 조제할 필요가 없으며 사용 후 폐기물 처리에도 신경을 쓸 필요가 없고 발색감도도 증가하였다. 본 고에서는 새로운 Laminin EIA kit에 대해서 간단하게 소개한다.

■ Laminin에 대해서

Laminin은 기저막을 구성하는 고분자 단백질로 세포접착, 신경, 세포간 신호전달, 정상세포 및 암세포 증식, 세포분화 유도, 암세포 전이 등 많은 세포기능에 관여하고 있다. Laminin은 3개의 다른 subunit에서 생성되며 각각 disulfide 결합 구조로 십자가 구조 형태이다. 1994년 Burgeson 등에 의해 laminin 가닥의 새로운 명명법이 제안되어 A사슬은 α 1사슬, B1사슬은 β 1사슬, B2사슬은 γ 1사슬이라고 한다. α 사슬 5종류, β 사슬 3종류, γ 사슬 2종류의 타입이 동정되어 이미 11종류의 laminin이 보고되어 있다. 이들 laminin은 collagen과 heparin, proteoglycan, 그 외 성분과 서로 결합하여 기저막 구조를 형성하고 있다. Laminin은 각종 배양세포에서 분비되며 특히 침윤성 높은 암세포에서 laminin receptor가 단리되어¹⁾ 암세포의 전이를 위한 기저막 laminin으로의 접착을 제 1 전이 단계라고 판단된다. 전이가 진행되면 기저막 파괴가 일어나며 혈중 laminin의 방출로 질환의 기저막 분해정도를 알 수 있으므로 laminin이 주목받기 시작하였다. 그 후 혈중 뿐만 아니라 단편화된 laminin이 소변 내에 배출되어 있음을 발견하여²⁾ 보다 고감도의 측정체계를 요구하게 되었다.

■ Precoated type Laminin EIA Kit

본 kit는 laminin γ 1가닥(B2가닥)을 인식하는 monoclonal 항체를 사용하고 있다. 체액 내의 laminin을 측정하기 위한 kit로 완전 laminin 뿐만 아니라 단편화된 laminin도 정량할 수 있다. 조작법도 신속하고 간편하며 측정대상은 인간의 혈액 및 소변에서 측정 가능하다(토끼 항원과의 교차 반응하므로 토끼 검체 측정도 가능하다). 또 소 항원과는 교차반응하지 않으므로 소 태아혈청(Bovine Serum Albumin)을 함유하는 배지에서 배양한 세포의 상청을 그대로 측정 시료로 사용할 수 있다.

■ Kit의 내용

1. 항 human laminin monoclonal 항체 plate
96 well(8 well×12 strips)×1
2. Peroxidase 표식 항 laminin 항체(동결건조품)
11 ml용×1
3. 표준품(human laminin ; 동결건조품) 1 ml용×1
4. 검체희석액 11 ml×2
5. 기질액(TMBZ ; 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine) 12 ml×1
6. 반응정지액(1 N 황산) 12 ml×1

■ 조작법

시료	100 μ l ×2 strip
↓ 25°C, 1시간	
세정 3회	
↓	
효소표식 항체액	100 μ l
↓ 25°C, 1시간	
세정 4회	
↓	
기질액	100 μ l
↓ 실온, 15분	
반응정지액	100 μ l
↓	
450 nm 측정	

■ 특징

1) 검출감도

최소 검출감도는 5.0 ng/ml이다. Laminin 각 농도에서 A₄₅₀ 측정값을 표 1에 나타내었다.

표 1 Laminin 각 농도 A₄₅₀값

HLN 농도(ng/ml)	320	160	80	40	20	10	5	0
A ₄₅₀	2.712	1.418	0.700	0.385	0.215	0.145	0.104	0.075

2) 동시재현성 및 일차재현성

동시재현성 : CV 4.0~5.7%(3배 농도로 n=16에서 측정)

일차재현성 : CV 0.3~5.1%(3배 농도로 3일간 측정)

3) 첨가회수율

90.7~110.8%

4) 검체의 희석 직선성

5종류의 사람 혈청 검체의 희석 직선성을 그림 1에 나타내었다. 혈장 및 혈청내의 laminin은 고농도로 검체 측정 시 6~10 배 희석해야 한다. 소변 내의 laminin 측정은 정상군의 경우 원액측정이 가능하다.

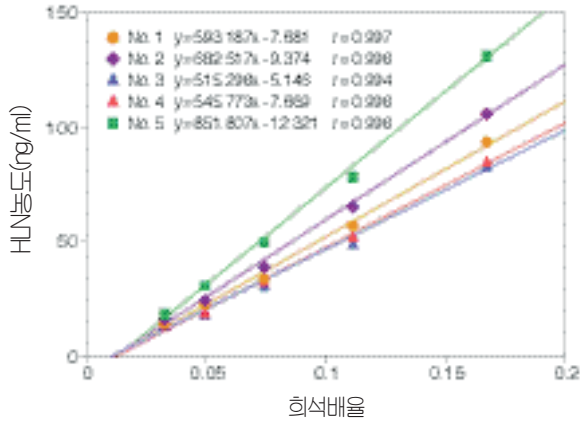


그림 1 희석 직선성

■ 측정예

(1) Human 각종 세포를 혈청배지에서 배양한 후 본 kit를 사용하여 배양 상청 내에서 laminin을 측정하여 그림 2에 나타내었다. 본 kit는 소 태아 혈청(Bovine Serum Albumin) 존재 하에서도 측정할 수 있다.

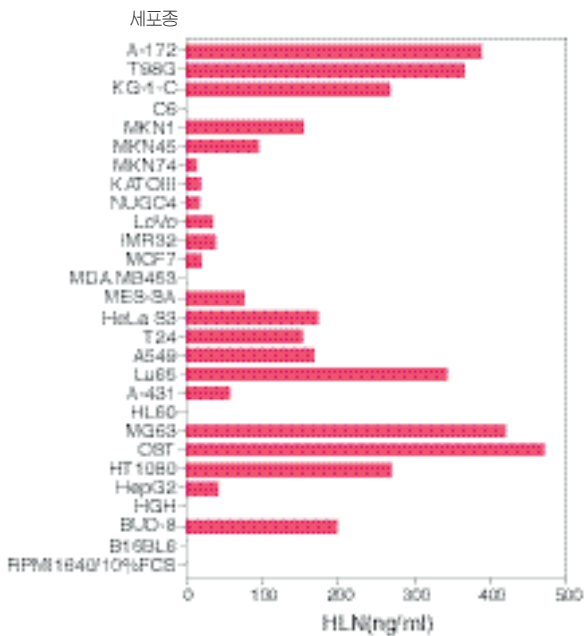


그림 2 각종 세포의 배양 상청 내의 laminin 측정

(2) 개인의 소변 내에 존재하는 laminin과 그 의 소변 내 단백질의 일차변동 및 하루 총 배설량을 표 2와 표 3에 나타내었다. 아래 data는 기존 kit를 사용하여 측정된 것으로 소변 내에 존재하는 fibronectin(UFN), laminin(ULN), E-cadherin (UEcad)을 동시에 측정된 data는 거의 보고되어 있지 않아 참고로 나타내었다. 또 그림 3과 같이 기존 kit(TaKaRa Code MK007)와 본

kit와의 상관성이 매우 높으므로 본 kit로 측정했다고 해도 data 해석상 무리가 없을 것이다.

표 2 개인의 소변 내에 존재하는 laminin(ULN) 등의 일차변동*

		ULN (ng/ml)	Cr (g/l)	ULN/Cr (μ g/gCr)	UFN/Cr (μ g/gCr)	UEcad/Cr (mg/gCr)
1. female	day 1	756	1.284	598	76.8	2.82
	day 2	425	1.004	42.3	66.2	3.66
	day 3	36.1	0.605	59.7	75.4	4.33
	day 4	948	1.514	62.6	134.4	2.69
	day 5	81.6	2.346	34.8	57.5	3.42
	day 6	93.1	1.915	48.6	48.9	4.20
	day 7	87.3	1.313	66.5	99.8	3.89
	day 8	61.4	0.483	127.2	106.6	6.08
2. male	day 1	543	1.195	45.4	58.5	0.73
	day 2	9.6	0.43	23.9	0.0	0.17
	day 3	61.5	1.016	60.5	56.4	0.86
	day 4	640	1.397	45.8	78.9	0.93
	day 5	168	0.422	39.9	5.7	1.37
	day 6	433	0.561	77.2	18.2	0.14
	day 7	53.4	1.466	36.4	21.6	1.17
	day 8	525	0.645	81.4	42.9	1.61

표 3 개인의 하루 laminin(ULN) 등의 총 배설량*

	소변량 (ml)	ULN (ng/ml)	Cr (g/l)	ULN/Cr (μ g/gCr)	UFN/Cr (μ g/gCr)	UEcad/Cr (mg/gCr)
3. male	270	1148	1.760	65.2	113.4	0.40
	525	542	1.100	49.3	172.6	0.26
	70	101.7	1.489	68.3	44.7	1.04
	570	36.0	0.897	40.1	12.5	0.47
4. female	80	83.3	1.331	62.6	13.1	0.94
	100	135.0	1.441	93.7	28.0	0.80
	180	59.7	1.478	40.4	15.1	0.58
	200	52.8	0.974	54.2	46.8	1.52
	180	77.8	1.466	53.1	26.2	0.63

* · 낮 동안 수시로 소변을 채취하여 검체로 사용하였다.
· 소변 내 fibronectin(UFN), laminin(ULN)의 측정시 소변원액 그대로 사용하였다.
· 소변 내 E-cadherin(UEcad)의 측정시 소변을 9배 희석하여 사용하였다.
· UFN, ULN 및 UEcad의 측정시 TaKaRa Code MK015, MK007 및 MK017을 각각 사용하였다. 또 creatinine(Cr)도 동시에 측정하였다.

(3) 기존 조제 타입 kit(TaKaRa Code MK007)과 본 kit의 상관성을 그림 3에 나타내었다.

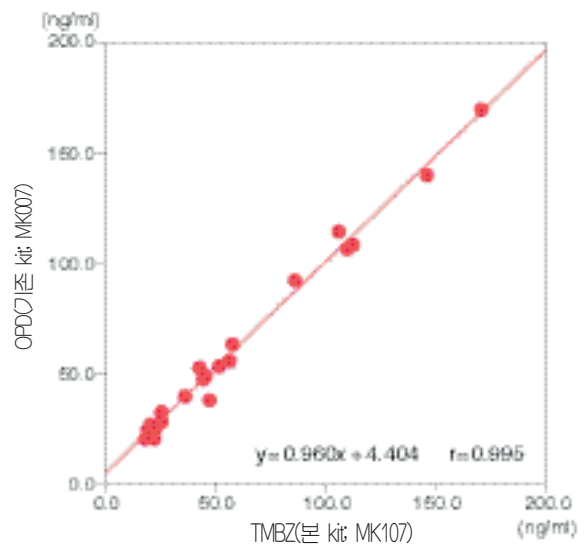


그림 3 기존 kit(MK007)와 본 kit(MK107)와의 상관성

【참고문헌】

- 1) Rao, C. N., et al. (1989) *Biochemistry* **28**, 7476-7486.
- 2) Katayama, M., et al. (1992) *Br. J. Cancer* **65**, 509-514.

백혈병의 염색체 이상 typing kit

Hema Vision™

TaKaRa Code DT001 1 kit

DNA Technology A/S사의 제품입니다.

Hema Vision™은 multiplex RT-PCR로 백혈병에서 특정 염색체의 전좌 및 재구성을 광범위하게 검출하기 위한 kit이다. 본 고에서 본 제품의 개요를 소개한다.

■ 본 제품의 특징

본 kit는 백혈병에 관련된 28종에 이르는 염색체 전좌 및 재구성(80종의 breakpoint 및 splice variant)을 typing할 수 있는 kit이다. 본 kit는 우선 8종의 Master primer를 사용하여 multiplex RT-PCR로 염색체 이상을 screening한다. 연속으로 이상이 검출된 group에 대해 3~6종의 Splitout primer를 사용한 PCR로 염색체 이상의 type을 분석한다.

최대의 감도를 얻기 위해 Master PCR 증폭과 Splitout PCR 증폭은 nested PCR도 가능하다. 또 Hema Vision™에 관해서는 Pallisgaard, N., et al. (1998) *Blood* **92**, 574-588에 보고되어 있다.

■ 백혈병에서 염색체 이상과 임상적 의의

백혈병이나 악성 림프종에는 여러 가지 염색체 이상이 확인되어 있다. 염색체 전좌의 대부분은 백혈병이나 악성 림프종의 병형을 갖고 있으며 각각의 병형은 치료효과나 예방에 밀접한 관계가 있다. 염색체 이상을 정확하게 판정하고 병형을 결정하는 것은 임상적으로 매우 중요하다.

■ 해석 순서

해석 순서와 실험에는 다음과 같다(그림 1 참조).

- (1) 혈액 또는 골수에서 RNA를 추출한다.
- (2) cDNA primer*와 역전사효소*를 사용하여 cDNA 합성을 한다.
- (3) 8종(M1~M8)의 Master primer*를 사용하여 Master PCR 한다.
- (4) Agarose 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출한다. 반응액 중에 control primer가 포함되어 있어 PCR 반응 여부를 positive control의 증폭 유무로 확인할 수 있다. 염색체 이상이 있는 경우에는 특이적인 증폭산물의 검출이 가능하다. 그림 1의 경우 시료 1은 M3(lane 3), 시료 2는 M2(lane 2)에서 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있다.
- (5) Splitout primer*를 사용하여 Splitout PCR을 한다. 그림 1의 시료 1은 M3A~M3D 4종, 시료 2는 M2A~M2E 5종의 Splitout primer로 PCR 하였다.
- (6) Agarose 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출한다. 그림 1의 시료 1은 M3B(lane 2), 시료 2는 M2A(lane 1)에서 특이적인 증폭을 확인할 수 있다. 표 1의 판정표에서 시료 1은 t(17;19)(q22;p13), HLF:E2A 전좌, 시료 2는 t(1;11)(p32;q23), AF-1p;MLL1 전좌가 있다고 분석되었다.

* : 본 kit에 포함되어 있다.

[사용상의 주의]

- 본 제품은 연구 목적 이외에는 사용할 수 없다.

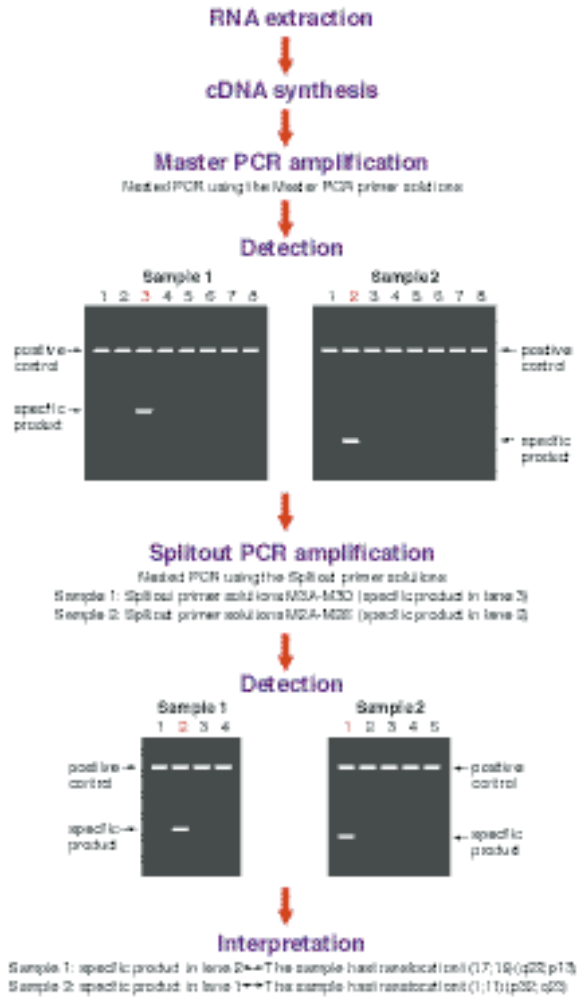


그림 1 해석순서의 flow chart

표 1 판정표

M1		
Mix	Translocation	Genes
M1A	t (X;11)(q13;q23)	MLL1(11q23) AFX1(X;q13)
M1B	t (6;11)(q27;q23)	MLL1(11q23) AF6(6q27)
M1C	t (11;19)(q23;p13.1)	MLL1(11q23) ELL(19p13.1)
M1D	t (10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)

M5		
Mix	Translocation	Genes
M5A	t (4;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF4(4q21)
M5B	t (10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)
M5C	t (11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)
M5D	t (9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)
M5E	t (1;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF1q(1q21)

M2		
Mix	Translocation	Genes
M2A	t (1;11)(p32;q23)	MLL1(11q23) AF-1p(1p32)
M2B	t (11;17)(q23;q21)	MLL1(11q23) AF-17(17q21)
M2C	t (11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)
M2D	t (10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)
M2E	t (9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)

M6		
Mix	Translocation	Genes
M6A	inv(16)(p13;q22)	CBFb(16q22) MYH11(16p13)
M6B	t (9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL(9q34)
M6C	t (9;12)(q34;p13)	TEL(12p13) ABL(9q34)
M6D	t (5;12)(q33;p13)	TEL(12p13) PDGFRb(5q33)
M6E	t (12;22)(p13;q11)	TEL(12p13) MN1(22q11)

M3		
Mix	Translocation	Genes
M3A	t (1;19)(q23;p13)	E2A(19p13) PBX1(1q23)
M3B	t (17;19)(q22;p13)	E2A(19p13) HLF(17q22)
M3C	t (12;21)(p13;q22)	TEL(12p13) AML1(21q22)
M3D	TAL1d (40 kb deletion)	SIL1(1p34) TAL1(1p34)

M7		
Mix	Translocation	Genes
M7A	t (6;9)(p23;q34)	DEK(6p23) CAN(9q34)
M7B	t (9;9)	SET(9q34) CAN(9q34)
M7C	inv (16)(p13;q22)	CBFb(16q22) MYH11(16p13)
M7D	t (3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVI1(3q26)

M4		
Mix	Translocation	Genes
M4A	t (8;21)(q22;q22)	AML1(21q22) MGT8(8q22)
M4B	t (3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVI1(3q26)
M4C	t (16;21)(p11;q22)	TLS(16q11) ERG(21q22)
M4D	t (15;17)(q21;q22)	PML(15q22) RARa(17q21)

M8		
Mix	Translocation	Genes
M8A	t (11;17)(q23;q21)	PLZF(11q23) RARa(17q21)
M8B	t (3;21)(q26;q22)	AML(21q22) EVI1(3q26)
M8C	t (15;17)(q21;q22)	PML(15q22) RARa(17q21)
M8D	t (5;17)(q35;q21)	NPM(5q35) RARa(17q21)
M8E	t (3;5)(q25.1;q34)	NPM(5q35) MLF1(3q25.1)
M8F	t (9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL(9q34)

신기능(Quick Mode)을 추가한

TaKaRa PCR Thermal Cycler SP

TaKaRa Code TP400

금번 TaKaRa에서는 TaKaRa PCR Thermal Cycler SP에 새로운 소프트웨어를 추가 공급하게 되었다. 기존 Thermal Cycler로 PCR 할 때는, 사용하는 효소나 목적 증폭 영역 및 크기를 알고 있어도 시간·온도 조건을 상세하게 검토한 후 실험해야 하는 번거로움이 있었다. TaKaRa는 현재 판매하고 있는 5종류의 효소, 즉 *TaKaRa TaqTM*, *TaKaRa Ex TaqTM*, *TaKaRa LA TaqTM*, *PyrobestTM* DNA Polymerase, *TaKaRa Z-TaqTM*의 증폭 크기에 따른 적절한 시간과 온도 조건을 확립하여 그 프로그램을 TaKaRa PCR Thermal Cycler SP에 추가하였다. 이 소프트웨어를 이용하여 효소를 선택하고 증폭 크기를 입력하면 기계가 자동으로 시간·온도 조건을 선택하여 반응을 시작한다*. 새로운 소프트웨어에는 새로운 Quick MODE(조건 검토 없이 간편하게 조작 가능), 종래의 Program MODE(연구자가 자유롭게 시간·온도 조건 설정 가능) 및 Z-Taq MODE(*TaKaRa Z-TaqTM* 전용의 모드로 최단 시간에 PCR 가능) 등 3종류로 구성되어 있다. 본 고에서는 새롭게 기능이 추가된 TaKaRa PCR Thermal Cycler SP로 PCR 한 결과를 소개한다.

*: Primer 및 주형에 따라 증폭 효율이 나쁜 경우가 있다. 그런 경우 Program MODE로 조건을 설정한다.

■ 새로운 소프트웨어의 추가 기능

Quick MODE

사용 효소	증폭 크기
<i>TaKaRa TaqTM</i>	~10 kb
<i>TaKaRa Ex TaqTM</i>	~20 kb
<i>TaKaRa LA TaqTM</i>	~30 kb
<i>PyrobestTM</i> DNA Polymerase	~10 kb
<i>TaKaRa Z-TaqTM</i>	~20 kb

■ 실험예

λ DNA를 주형으로 *TaKaRa TaqTM* 및 *TaKaRa LA TaqTM*을 사용하여 Quick MODE로 반응하였다.

【증폭 크기】

[*TaKaRa TaqTM*의 경우]

0.5, 2, 4, 6, 8, 10(kbp)

[*TaKaRa LA TaqTM*의 경우]

0.5, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20(kbp)

【PCR 반응액 조성】

[*TaKaRa TaqTM*]

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	5 μl
2.5 mM dNTP Mixture	4 μl
Primer mix(10 pmol/μl each)	1 μl
λ DNA(0.1 ng or 1 ng/μl)*	1 μl
<i>TaKaRa TaqTM</i>	0.25 μl
H ₂ O	38.75 μl
Total volume	50 μl

[*TaKaRa LA TaqTM*]

10× LA Buffer II(Mg ²⁺ free)	5 μl
25 mM MgCl ₂	5 μl
2.5 mM dNTP Mixture	8 μl
Primer mix(10 pmol/μl each)	1 μl
λ DNA(0.1 ng or 1 ng/μl)*	1 μl
<i>TaKaRa LA TaqTM</i>	0.5 μl
H ₂ O	29.5 μl
Total volume	50 μl

*: 증폭 크기가 10 kbp 미만인 경우는 0.1 ng/μl, 10 kbp 이상인 경우는 1 ng/μl를 사용하였다.

【전기영동 결과】

PCR 산물을 1% Agarose gel로 전기 영동하여 모든 반응에서 목적 증폭 단편을 확인할 수 있었다. 결과는 그림 1 및 그림 2와 같다.

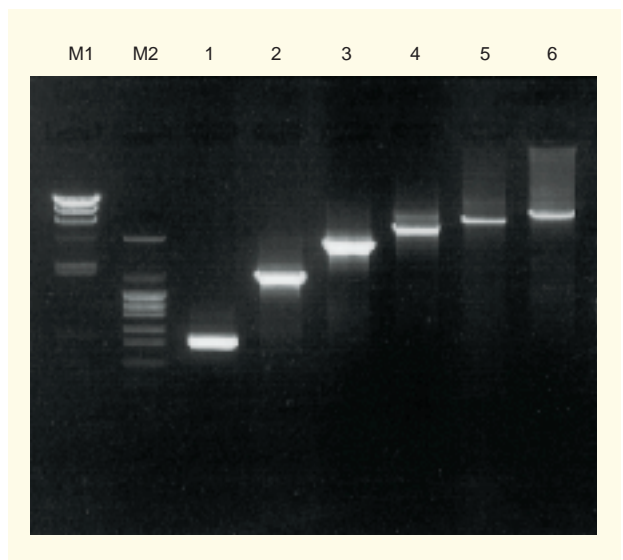


그림 1 *TaKaRa TaqTM*을 사용한 경우(각 5 μl 전기영동)

Lane

M1 : λ- Hind III digest

M2 : pHY Marker

1 : 0.5 kbp(증폭 크기)

2 : 2 kbp,

3 : 4 kbp

4 : 6 kbp,

5 : 8 kbp

6 : 10 kbp

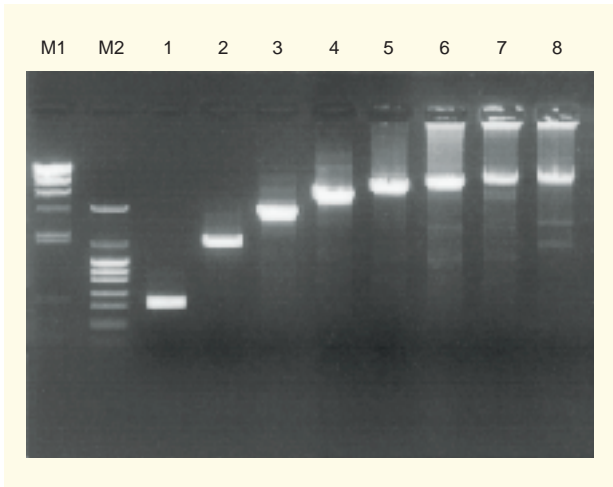


그림 2 TaKaRa LA Taq™을 사용할 경우(각 1 μl 전기영동)
 Lane
 M1 : λ-Hind III digest, M2 : pHY Marker
 1 : 0.5 kbp, 2 : 2 kbp, 3 : 4 kbp, 4 : 6 kbp
 5 : 8 kbp, 6 : 10 kbp, 7 : 15 kbp, 8 : 20 kbp

■ 결과

새로운 소프트웨어의 추가로 TaKaRa PCR Thermal Cycler SP는 연구자가 원하는 PCR을 보다 간편하게 실시할 수 있다. 이는 TaKaRa Taq™ 등의 효소에 관한 지식과 Thermal Cycler에 있는 온도 특성을 인식할 수 있는 TaKaRa만의 know-how로 앞으로 더 많은 연구와 개발로 연구자가 지향하는 Thermal Cycler를 개발, 판매할 예정이다.

또 기존 Thermal Cycler SP의 경우 새로운 소프트웨어를 추가할 수 있으며 자세한 내용은 보한바이오테크놀로지(주) 기술지원팀으로 연락바랍니다.

보한바이오테크놀로지

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

E-mail help@takara.co.kr

URL www.takara.co.kr

[관련 제품]

제품명	TaKaRa Code	포장량
TaKaRa Micro PCR Tube(0.2 ml Caps)	9047	1,000개
TaKaRa Micro Strip PCR Tube(8연)	9048	8 × 120개
TaKaRa Micro Strip Caps(8연)	9049	8 × 120개
TaKaRa PCR Tube Plate-24(0.2 ml 연결 tube)	9063	20매(3×8연/매)
TaKaRa PCR Tube Plate-48(0.2 ml 연결 tube)	9064	10매(6×8연/매)
TaKaRa PCR Tube Plate-96(0.2 ml 연결 tube)	9069	10매(12×8연/매)
TaKaRa PCR Tube Plate Caps-8	9050	8 caps × 120개
AmpliWax® PCR Gem 100	PE9080	200 Gems
AmpliWax® PCR Gem 50	PE9081	200 Gems

TaKaRa Thermal Cycler SP

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



Rat Gla형, Glu형 Osteocalcin 측정 kit

Rat Gla-OC Competitive EIA Kit	TaKaRa Code	MK121	96회
Rat Glu-OC Competitive EIA Kit	TaKaRa Code	MK122	96회
Rat Gla/Glu-OC Competitive EIA Set(MK121+MK122)	TaKaRa Code	MK123	1 set

Osteocalcin은 분자내에 γ -carboxylglutaminase 잔기(Gla)를 2~3군데 함유하며 아미노산 49잔기로 구성된 분자량 약 5,900의 비타민 K 의존성 칼슘결합·비콜라겐성 단백질이다. Osteocalcin은 주로 골아세포에서 합성되어 세포 내 vitamin K 의존성 calboxylase에 의해 Gla화된다. Gla화된 osteocalcin은 뼈의 hydroapatite와 결합하여 뼈에 남게된다. 뼈 속의 osteocalcin은 국소적으로 석회화를 조절하거나 뼈, 체액간 Ca²⁺의 움직임을 제어하는 등 뼈의 대사에 중요한 생리적 기능을 하고 있다.

■ 본 제품에 대하여

Rat osteocalcin은 bovine 외에 human과 가장 높은 상동성을 갖고 있다(그림 1). Rat는 수명이 짧고 취급이 용이하며 많은 개체가 필요한 실험에도 사용할 수 있어 뼈와 연관된 실험에 자주 사용된다.

1980년대부터 요오드로 표식한 osteocalcin immunoassay (RIA)법을 이용하였으며^{1,2)}, 최근에는 효소를 사용한 EIA 실험법이 널리 이용된다.³⁾ 그러나 rat의 경우 활성형(Gla형)과 불활성형(Glu형) 구분 없이 total osteocalcin의 양은 측정할 수 있으나 골아형성 marker인 Gla 잔기를 갖고 있는 활성형 osteocalcin만을 특이적으로 측정할 예는 없었다.

기존의 Gla-OC EIA Kit(TaKaRa Code MK111)⁴⁾와 Glu-OC EIA Kit(TaKaRa Code MK118)⁵⁾는 인간, 소, 토끼, 개, 염소 검체를 측정할 경우 상당히 유효한 EIA kit이지만 sandwich 법에 사용하고 있는 두 개의 monoclonal 항체 중에 1개가 rat, 말, 모르모트 항원에 대해 충분한 교차반응성 없어 rat 등의 실험에 사용할 수 없었다. 이번에 rat 등의 osteocalcin에 교차반응성을 갖고 있는 monoclonal 항체만을 사용한 경합반응의 확립으로 rat, 말, 모르모트의 Gla형 및 Glu형 osteocalcin의 분별정량이 가능하게 되었다.

Rat Gla-OC Competitive EIA Kit(TaKaRa Code MK121)은 osteocalcin 17 위치의 Gla 잔기에 특이적인 monoclonal 항체를 코팅한 plate를 사용하여 biotin화한 Gla형 osteocalcin과 미지 시료를 항체 plate에 경합적으로 결합시켜 세정 후, avidin화 peroxidase로 정색반응 하여 시료내의 Gla형 osteocalcin(Gla-OC)을 정량한다. 측정대상은 rat, 말, 모르모트 Gla형 osteocalcin(골아형성 marker)이다. 하나의 항체로 항원을 보좌하기 때문에 다양한 크기의 Gla형 osteocalcin이 측정될 수 있으나 Gla형의 osteocalcin은 골아형성 marker이므로 주로 새로 형성된 완전체가 많이 측정된다.

Rat Glu-OC Competitive EIA Kit(TaKaRa Code MK122)은 osteocalcin의 21, 24위치가 탈탄산된 글루타민산잔기를 인식하는 monoclonal 항체를 코팅한 plate를 사용하여 biotin화한 Glu형 osteocalcin과 미지 시료와의 경합반응으로 Glu형 osteocalcin(Glu-OC)을 정량한다(측정원리는 Gla형의 경우와 같다). 측정대상은 rat, 말, 모르모트의 Glu형 osteocalcin(골아흡수 marker)이다.

이 kit는 96 well plate를 사용하고 있어 많은 시료를 동시에 측정할 수 있으며 같은 시료에 대해서 Gla형과 Glu형 두가지의 osteocalcin을 분별측정 함으로 골아형성과 골아흡수를 동시 monitoring 할 수 있다. 각 동물 유래의 측정 kit과 사용분류는 그림 1을 참조한다.

■ 측정원리

Biotin 표식한 osteocalcin과 미지 시료 내에 항원을 항체 코팅 plate에 경합적으로 결합시켜 세정 후 항체에 결합한 biotin 표식 osteocalcin에 peroxidase(POD) 표식 avidin을 결합시켜 POD에 의한 발색반응을 한 후 시료내의 osteocalcin을 정량한다. 하나의 항체 경합 ELISA의 원리를 그림 2에 나타내었다.



그림 1 각 동물의 osteocalcin의 1차구성

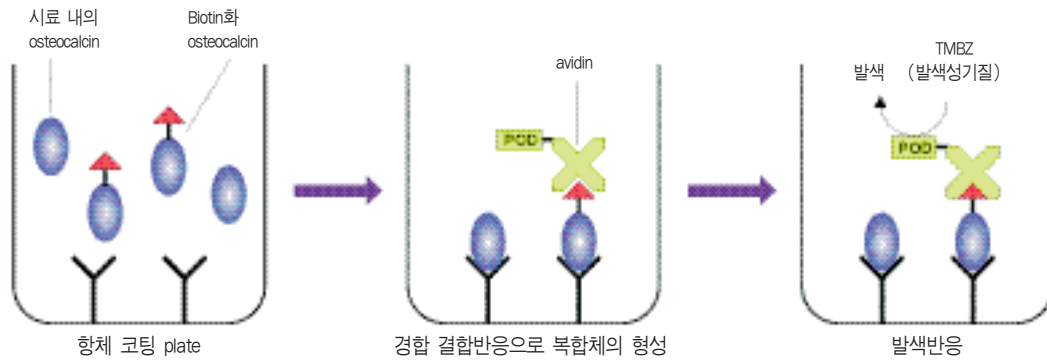


그림 2 측정원리

■ Kit의 내용

Rat · osteocalcin 측정 kit

1. 항 osteocalcin 항체 plate(Gla형, Glu형)	96 well(8 well×12 strips)×1
2. Osteocalcin 표준용액(Gla형, Glu형)	1 ml용
3. Biotin화 osteocalcin(Gla형, Glu형)	5.5 ml용
4. Peroxidase표식 avidin	11 ml용
5. 기질용액(TMBZ ; 3, 3', 5, 5'-tetramethyl benzidine)	12 ml
6. 반응정지액(1 N 황산)	12 ml

■ 특징

1) 검체의 희석 직선성

4 주된 rat 혈청을 시료로 희석 직선성을 조사하였다. Rat Gla형 osteocalcin을 측정할 경우 rat 혈청 3~4배 희석액을, rat Glu형 osteocalcin을 측정할 경우 rat 혈청 2~3배 희석액을 시료로 사용하면 검량선의 신뢰범위에 들어간다(그림 3 참조).

2) 공존물질의 영향

이 kit은 모두 biotin-avidin 계를 이용한 것으로 검출중에 avidin이 존재할 경우(예를 들어 조류의 혈청 등), avidin의 방해로 false positive signal이 발생하므로 주의한다(시료속의 avidin에 의해 biotin화 osteocalcin이 포착된 것처럼 보이며 항원과 결합한 듯한 결과를 얻는다). 또 rat Gla형 osteocalcin kit은 EDTA · 4Na, 구연산 · 2Na, 염화칼슘 등이 측정치에 영향을 주므로 항상 혈청시료 사용을 권한다.

3) Rat Gla형 osteocalcin 측정 kit의 최소 검출감도, 표준곡선 및 재현성

- 최소검출감도 : 50 ng/ml
- 표준곡선

Gla-OC(ng/ml)	2000	1000	500	250	125	62.5	0
A ₄₅₀	0.425	0.639	0.928	1.259	1.515	0.718	1.968

- 재현성(3배 농도의 rat 혈청 사용)

Rat 혈청	동시재현성(n=16)	일차재현성(n=3 days)
High	4.9	4.7
Middle	5.5	2.7
Low	6.5	5.7

주) 표안의 수치는 CV(%)를 나타낸다.

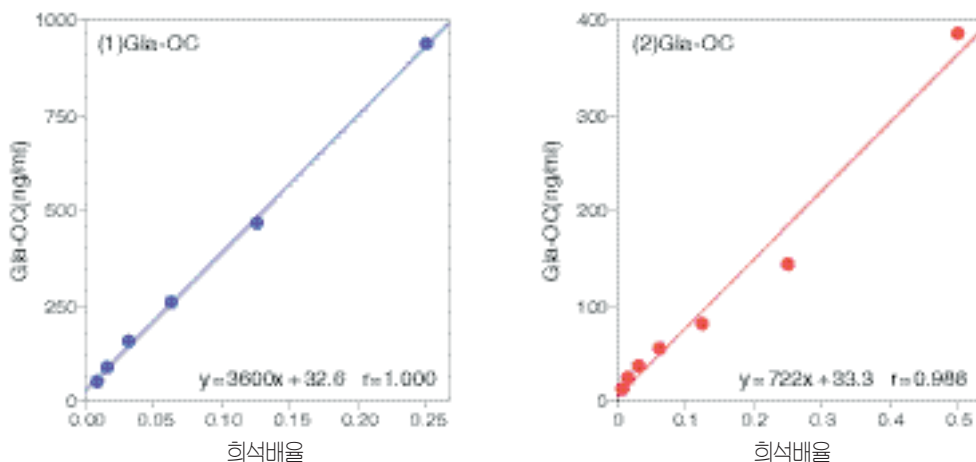


그림 3 Rat Gla-OC(Glu-OC)경합 ELISA의 희석 직선성

4) Rat Glu형 osteocalcin 측정 kit의 최소 검출감도, 표준곡선 및 재현성

- 최소검출감도 : 50 ng/ml
- 표준곡선

Glu-OC(ng/ml)	600	300	150	75	37.5	18.8	0
A ₄₅₀	0.350	0.511	0.759	1.119	0.425	1.673	1.925

- 재현성(3배 농도의 rat 혈청 사용)

Rat 혈청	동시재현성(n=16)	일차재현성(n=3 days)
High	7.8	1.9
Middle	6.3	4.5
Low	8.5	3.2

주) 표안의 수치는 CV(%)를 나타낸다.

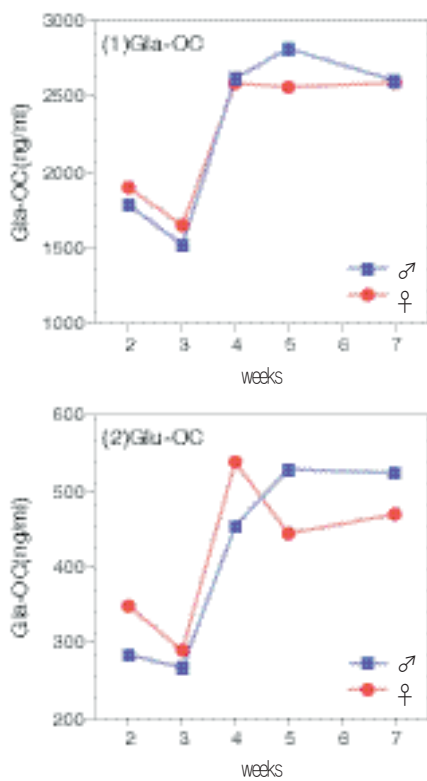


그림 4 신생 rat의 혈청내의 Gla-OC, Glu-OC의 경시적 변화

■ 실험예

- 1) 신생 rat(2~7주, SD계, 같은 부모에서 태어난 자웅의 새끼)의 혈청 내의 Gla형, Glu형 osteocalcin의 경시적 변화를 측정하였다(그림 4). 1주마다 자웅 1개씩 채혈하였다.
- 2) Retire rat(21~31주, SD계, 수컷 3개체)의 혈청 내의 Gla형, Glu형 osteocalcin의 경시적 변화를 측정하였다(그림 5). 개체별로 부분혈청하여 측정하고 개체마다 변화를 그래프로 나타내었다.

【참고문헌】

- 1) Price, P. A., et al. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**(7), 2938-2942.
- 2) Patterson-Allen, P., et al. (1982) *Anal. Biochem.* **120**, 1-7.
- 3) J. Y. Fu, et al. (1999) *Calcif Tissue Int* **64**, 229-233.
- 4) Koyama, M. (1991) *J. Immunol. Meth.* **139**, 17-23.
- 5) Vergnaud, P. (1997) *J. Clinical. Endocrinol.* **82**(3), 719-724.

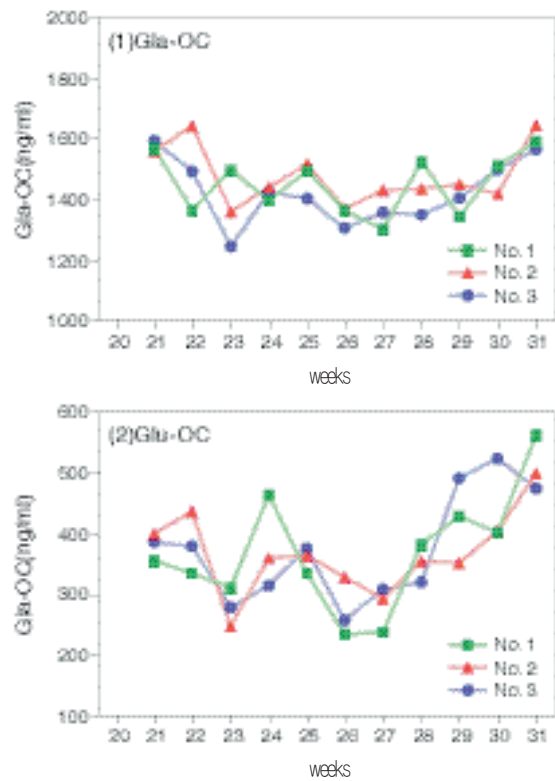


그림 5 Retire rat의 혈청내 Gla-OC, Glu-OC의 경시적 변화

■ 각종 동물에서 유래하는 혈청, 소변(尿) 중의 osteocalcin 측정시 최적 kit 선택 요령

Osteocalcin 측정 kit TaKaRa Code	측정대상으로 가장 적합한 동물검체	
	혈청검체	소변검체
MK111 (기존의 sandwich EIA types Glu-OC kit)	인간, 소, 토끼, 개, 양, 염소	모든 동물종이 측정불가* * 2개의 항체가 인식하는 epitope이 서로 떨어져 있어 단편화된 Glu-OC를 검출할 수 없다.
MK118 (기존의 sandwich EIA types Glu-OC kit)	인간, 소, 토끼, 개, 양, 염소	인간* * 2개의 항체가 인식하는 epitope이 근접해 있어 단편화된 Glu-OC도 검출가능. 다른 동물 종은 미검토
MK121 (경합 EIA types Rat Glu-OC kit)	Rat, 말, 모르모트, 돼지, (인간)* * 인간혈청검체는 고감도 MK111를 사용하는 것이 바람직하다.	Rat, 인간* * 1 검체 경합 EIA에 의한 측정이므로 단편화된 Glu-OC도 검출 가능. 다른 동물종은 미검토
MK122 (경합 EIA types Rat Glu-OC kit)	Rat, 말, 모르모트, 돼지, (인간)* * 인간혈청검체는 고감도 MK118를 사용하는 것이 바람직하다.	Rat, (인간)* * 다른 동물 종은 미검토 인간 소변 검체에 대해서는 고감도 MK118를 사용하는 것이 바람직하다.

pETBlue™ Vector

Blue/White selection이 가능한 새로운 타입의 T7 발현 vector 시스템

제품명	TaKaRa Code	포장량
pETBlue™-1 system	NV896	1 Kit
pETBlue™-2 system	NV897	1 Kit
pETBlue™-3 system	NV932	1 Kit
pETBlue™-1 Acceptor™ Vector Kit	NV875	40회
pETBlue™-1 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV883	40회
pETBlue™-2 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV884	40회
pETBlue™-3 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV934	40회
pETBlue™-1 DNA(uncut)	NV879	20 µg
pETBlue™-2 DNA(uncut)	NV880	20 µg
pETBlue™-3 DNA(uncut)	NV931	20 µg

지금까지 Blue/White screening이 가능한 high copy vector를 발현용 vector로 이용하는 데는 여러 가지 문제가 있었다. 금번 Novagen사에서는 종래의 문제점을 보완한 새로운 형태의 Blue/White screening이 가능한 high copy 발현 vector pETBlue™ Vector를 개발하였기에 소개한다.

■ 서론

pUC계 vector에 외래 유전자를 cloning하는 경우, 재조합체는 *lac* promoter와 *lacZα* peptide를 이용한 Blue/White screening으로 쉽게 확인할 수 있다.

lacZα peptide와 frame을 맞추어 insert를 cloning하면 원칙적으로는 이 vector를 단백질 발현용으로 사용할 수 있다.

그러나 실질적으로는 *lac* promoter는 발현량이 비교적 적으며 *lacZα* peptide와 복합형태로만 목적 단백질을 발현할 수 있다. 또한 screening을 하는 과정에서 단백질이 발현되어 목적 단백질의 독성이 강한 경우는 재조합체를 얻을 수 없는 경우도 있다. 또 pUC 유래 vector의 copy 수(수백 copy/세포)는 pBR322 유래 vector(15~20 copy/세포)에 비해 상당히 높다. High copy plasmid는 plasmid DNA의 조제에는 편리하지만 목적 유전자의 발현에 이용하는 경우, basal label의 발현량이 높게 되고, plasmid의 안전성이 좋지 못한 결점이 있다. 이러한 결점 때문에 종래 Blue/White screening이 가능한 high copy의 vector를 발현용으로 이용하지 않았으나, 금번 Novagen사에서 새로운 타입의 Blue/White screening이 가능한 high copy number 발현 vector인 pETBlue™ Vector를 개발하였다.

pETBlue™ Vector는 목적 단백질 발현에 이용하는 T7lac promoter와 *lacZα* peptide의 발현에 이용하는 *E. coli*(tet) promoter가 역방향으로 되어 있다(그림 1).

2개의 promoter를 역방향으로 제작하여 screening과 발현을 각각 독립적으로 할 수 있다. 목적 유전자를 multi-cloning site(MCS)에 cloning하고 그것을 NovaBlue나 JM109에 도입 하여 X-Gal과 IPTG를 포함한 plate상에서 재조합체는 white colony로 선별할 수 있다(IPTG는 숙주 F'에 암호화 되어 있는 *lacZ ω*단편의 도입이 필요).

목적 유전자는 T7lac promoter와 같은 방향으로, *E. coli* tet promoter와는 역방향으로 되어 있어 Blue/White screening시 숙주의 기능을 저해하지 않는다. 따라서 high copy 증폭에서도 plasmid의 안전성이 보존된다. 또 T7 RNA Polymerase 유

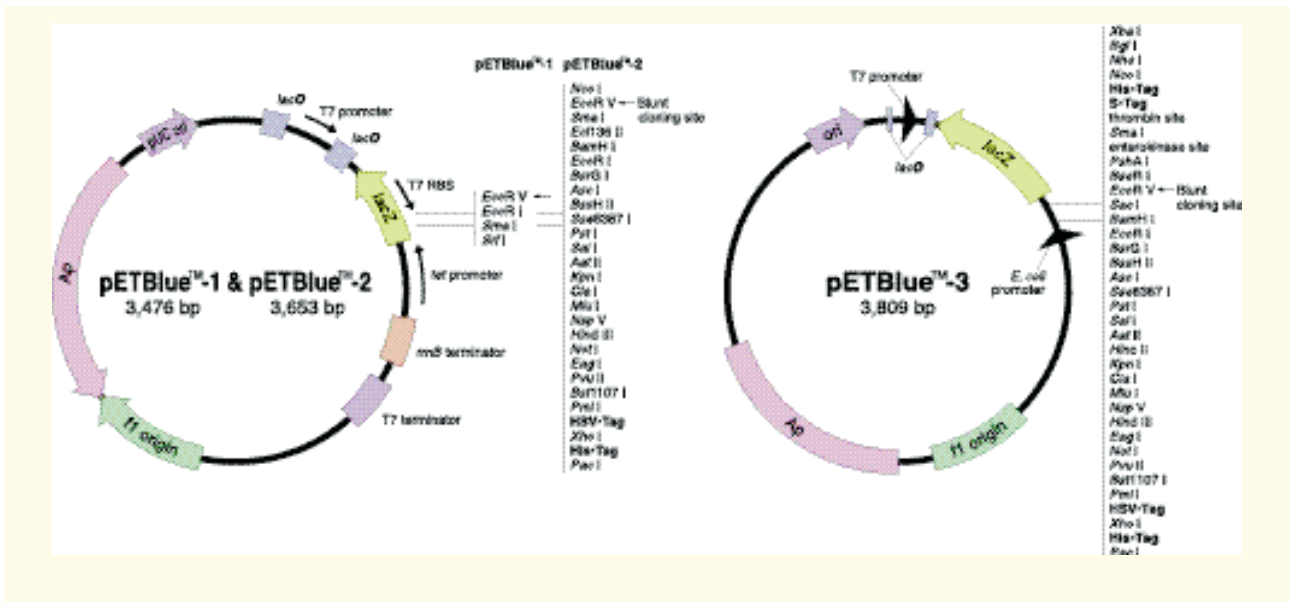


그림 1 pETBlue™ Vector의 구조

전자를 가지고 있지 않은 숙주에서 screening을 하는 경우, 이 단계에 IPTG도입으로 목적 유전자의 발현이 일어나지 않는다.

■ pETBlue™ Vector의 종류

pETBlue™ Vector에는 다음과 같은 cloning site에 특징을 가진 3종류의 vector가 있다.

pETBlue™-1

- Tag는 포함하고 있지 않다.
- Insert에 ATG codon이 필요(5' 말단을 ATG로 한 Sense Primer를 이용해서 증폭한 PCR 산물을 삽입하면 여분의 서열을 포함하지 않는 native한 단백질 발현이 가능)

pETBlue™-2

- C말단에 HSV·Tag®와 His·Tag® 포함
- 어떠한 평활말단 insert에서도 in-frame으로 cloning 할 수 있다. 2개의 "3-ORF" site를 갖는다(Life Science & Bio technology 16호, 43, 그림 2 참조).

pETBlue™-3

- N말단에 His·Tag®와 S·Tag™ 포함(protease로 절단이 가능)
- C말단에 HSV·Tag®와 His·Tag® 포함

■ Kit의 종류와 내용

pETBlue™ System, Perfectly Blunt™ Cloning Kit 및 AccepTor™ Vector Kit 3종류가 있다. 모두 Blue/White selection으로 재조합체의 screening과 IPTG에 의한 유도발현이 가능하다. pETBlue™ System은 말단이 절단된 pETBlue™ Vector(1, 2, 3)를 포함한 kit이다.

Perfectly Blunt™ Cloning kit는 PCR 산물의 평활 말단 cloning을 위한 kit이다.

또 AccepTor™ Vector Kit(pETBlue™-1)은 3' 말단에 dA가 부가되어 있는 PCR산물을 cloning하기 위한 kit(AccepTor™ Vector Kit에 대해서는 Life Science & Biotechnology 17호 26~27 참조)로 PCR 산물의 cloning이 신속하고 간편하다.

pETBlue™ System(pETBlue™-1, 2, or 3)

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| · pETBlue™ DNA(uncut) | 20 µg |
| · NovaBlue Singles™ Competent Cells | 0.2 ml |
| · Tuner™(DE3) pLac I Competent Cells | 0.2 ml |
| · SOC Medium | 2×2 ml |
| · Test Plasmid | 2 ng |
| · pETBlueUP primer | 500 pmol |
| · pETBlueDOWN primer | 500 pmol |

Perfectly Blunt™ Cloning Kit(pETBlue™-1, 2, or 3)(40회용)

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| · pETBlue™ Blunt Vector | 4×0.5 µg |
| · Positive Control Insert | 10 µl |
| · End Conversion Mix | 2×100 µl |
| · T4 DNA Ligase | 2×100 U |
| · Nuclease-free Water | 1.5 ml |
| · NovaBlue Singles™ Competent Cells | 44×50 µl |
| · Tuner™(DE3) pLac I Competent Cells | 4×0.2 ml |
| · SOC Medium | 9×2 ml |
| · Test Plasmid | 10 µl |

AccepTor™ Vector Kit(pETBlue™-1)

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| · pETBlue™-1 AccepTor™ Vector | 4×0.5 µg |
| · Positive Control Insert | 10 µl |
| · Clonabs 2× Ligation Premix | 4×55 µl |
| · Nuclease-free Water | 1.5 ml |
| · NovaBlue Singles™ Competent Cells | 44×50 µl |
| · Tuner™(DE3) pLac I Competent Cells | 4×0.2 ml |
| · SOC Medium | 9×2 ml |
| · Test Plasmid | 10 µl |

■ Blue/White screening 실험예

pETBlue™ Vector로 Blue/White screening을 위하여 아래와 같은 실험을 하였다. pETBlue™-2 Perfect Blunt™ Vector에 212 bp의 PCR 산물을 cloning하고 그 재조합 vector를 NovaBlue Singles™ Competent Cells에 도입하여 X-Gal과 IPTG를 함유하는 LB 배지에 도말하였다. 그 결과 pUC 등의 일반적인 Blue/White screening이 가능한 vector와 동일하게 blue colony와 white colony의 식별로 insert의 유무를 판별할 수 있었다(그림 2).

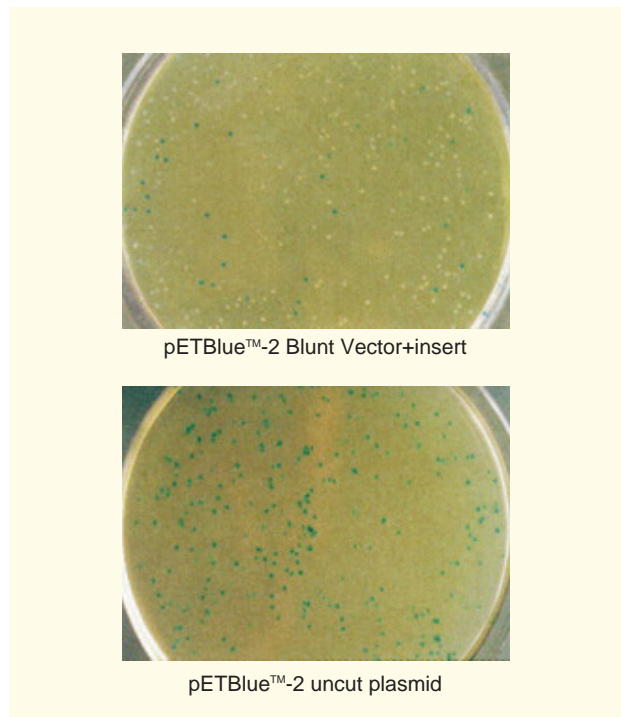


그림 2 Blue/White screening

■ Plasmid의 양

pETBlue™ Vector가 high copy plasmid인지를 확인하기 위하여 아래와 같은 실험을 하였다.

pETBlue™ Vector로 NovaBlue Singles™ Competent Cells을 형질전환하여 colony를 형성시켰다. Colony를 분리하여 LB배지에 배양한 후 균체에서 plasmid를 추출하였다. pSTBlue-1(high copy vector)와 pET23a(low copy vector)도 같은 방법으로 plasmid를 추출하였다. 같은 양의 배양액에서 조제한 각 plasmid의 용액을 동량으로, 아가로스겔에 전기영동하였다(그림 3). 그 결과 pETBlue™-1, pETBlue™-2 및 pSTBlue-1(pUC 유래)은 pET-23a (pBR322 유래)의 5~10배인 것을 확인하였다.

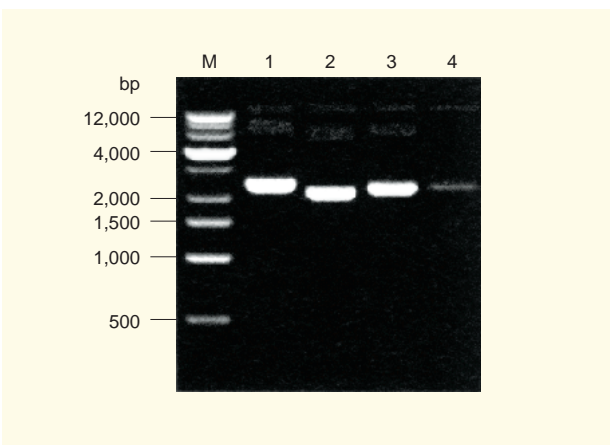


그림 3 Plasmid의 농도 비교

lane
M : Perfect DNA™ Markers
1 : pSTBlue-1(high copy)
2 : pETBlue™-1(high copy)
3 : pETBlue™-2(high copy)
4 : pET-23a(+) (low copy)

■ pETBlue™과 pET Vector의 발현량의 비교

pET-39b는 T7lac promoter를 가진 low copy pET vector이다. pETBlue™의 발현능력을 조사하기 위해 pETBlue™-1과 pET-39b를 이용하여 단백질의 발현량을 비교하였다.

발현 테스트로는 pET-39의 Tag 서열(Dsb·Tag에서 S·Tag™까지 서열)을 이용하였다.

pETBlue™-1에는 이 Tag 서열이 포함되어 있지 않아 pET-39b에서 그 서열을 pETBlue™-1의 EcoR V site에 삽입하였다. pET-39b는 Tuner™(DE3)에, pETBlue™-1 재조합체는 Tuner™(DE3) pLac I에 각각 도입하였다. pET-39b(+) colony의 경우는 1000 μM IPTG에서, 재조합 pETBlue™-1 colony의 경우는 여러 농도의 IPTG에서 37°C 3시간 유도배양한 후 집균하여 1× SDS Buffer로 용해하였다. 전기영동하는 전 단백

질을 동일하게 하여 각 시료를 4~20% Gradient-Gel로 전기영동하여 Commassie Blue로 염색하였다(그림 4-a). 그림 4-a와 같이 pETBlue™-1 colony에서는 저농도의 IPTG에서 목적 단백질이 발현되었다. 또 FRETWorks™ S·Tag™ Assay Kit를 이용하여 각 추출액 중의 S·Tag™을 정량하고, 분자량 54 kDa에서 발현된 목적 단백질의 양을 계산하였다(그림 4-b). 그 결과 200 μM, 1 mM, IPTG 조건에서 pETBlue™-1 colony에서 발현된 목적 단백질 양은 1 mM IPTG 조건에서 pET-39b(+) colony에서 발현된 양보다 60% 많은 것을 알 수 있었다. 또 pETBlue™-1의 경우 유도하지 않은 조건에서 basal level의 발현을 확인할 수 있다. 그 정도의 양은 독성 유전자를 코드화하는 재조합 plasmid를 얻는데 영향이 없다고 생각되지만, 이런 경우에는 λ CE6 감염으로 DE3를 포함하지 않은 숙주에서 도입하여 발현하는 편이 좋다(자료 미수록).

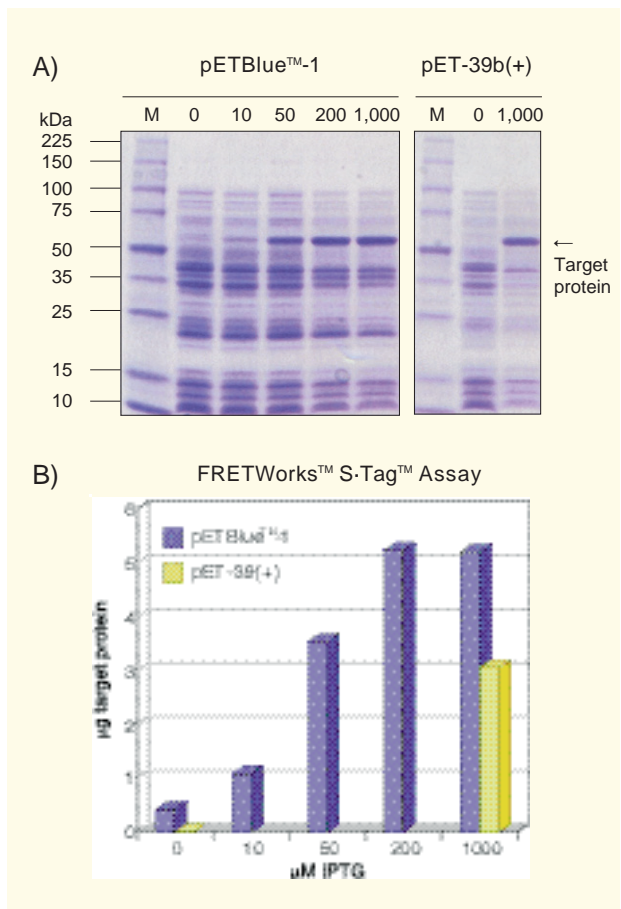


그림 4 pETBlue™-1과 pET-39b(+)의 발현 비교

A) SDS 전기영동으로 검출 B) S·Tag™ Assay