

재조합 Retrovirus Vector의 일과성 생산 시스템

Retrovirus Packaging Kit Eco

TaKaRa Code 6160

Retrovirus Packaging Kit Ampho

TaKaRa Code 6161

재조합 retrovirus vector를 이용한 표적 세포로의 유전자 도입은 목적유전자를 숙주염색체에 삽입하므로 장기적이고 안정적으로 발현할 수 있다. 이런 이유로 retrovirus vector는 유전자 치료 뿐만 아니라 많은 분야에 널리 이용되고 있다. TaKaRa에서는 retrovirus vector를 이용한 유전자도입 효율을 높일 수 있는 재조합 fibronectin fragment인 RetroNectin®(TaKaRa Code T100A/B)과 자동 복제능력을 갖고 있는 retrovirus(RCR)의 출현 가능성을 줄인 retrovirus vector pDON-AI DNA(TaKaRa Code 3650)를 공급하고 있다.

종래 retrovirus vector의 생산에는 virus의 구조 유전자인 *gag*, *pol*, *env*를 발현하는 packaging세포에 재조합 retrovirus vector plasmid를 도입하여 고역가 virus 생산주를 선정해야 하는 조작이 필요하였으며 재조합 virus 생산 세포주를 수급하는데 1개월 이상의 기간이 소요되었다. TaKaRa에서는 서울대학교의 김선영 교수팀이 개발한 일과성 재조합 retrovirus 입자 생산 시스템을 공급하고 있으며, 이 시스템을 이용함으로써 재조합 retrovirus 생산세포를 만들 필요가 없으며 transfection으로부터 48시간 후 고역가의 재조합 retrovirus액을 얻을 수 있다. 본 시스템을 사용하여 virus를 제조하는데 필요한 시간을 대폭 단축할 수 있다.

■ 본 제품에 대하여

Packaging vector로 retrovirus의 구조유전자인 *gag*, *pol* 및 *env*의 발현 vector를 포함하는 kit이다. Kit에는 mouse, rat 세포에 감염 가능한 ecotropic virus를 생산하는 Retrovirus Packaging Kit Eco (TaKaRa Code 6160)와 많은 포유동물세포에 감염 가능한 amphotropic virus를 생산하는 Retrovirus Packaging Kit Ampho (TaKaRa Code 6161) 두 종류가 있으며 목적 표적세포에 적합하게 사용할 수 있다.

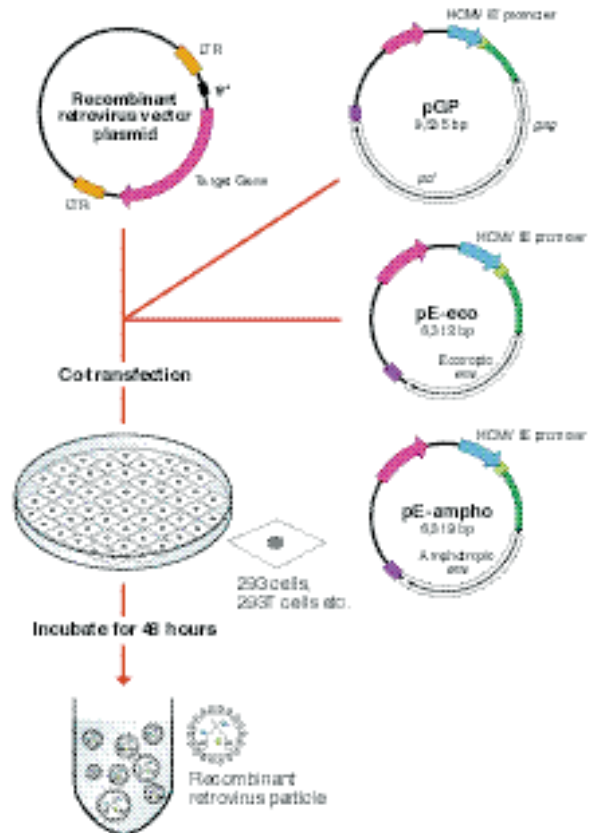
■ 특징

본 kit는 다음과 같은 packaging vector와 transfection 시약을 포함한다.

- *gag-pol* 발현 vector : pGP Vector
- *env* 발현 vector : pE-eco Vector, pE-ampho Vector

이들 vector는 virus 입자형성과 복제에 필요한 retrovirus의 구조 유전자인 *gag*, *pol* 및 *env* 이외에 retrovirus 유래의 서열을 전혀 포함하지 않으므로 재조합 retrovirus vector와의 상동조작에 의한 RCR 출현 가능성이 매우 낮다. 본 packaging vector는 즉시 transfection에 사용할 수 있도록 고순도로 정제되어 있으며 첨부된 transfection시약을 이용하여 목적 유전자를 넣은 재조합 retrovirus vector와 함께 293 세포나 293T 세포 등에 함께 도입하여 일과성으로 고역가의 virus액을 얻을 수 있다(60 mm plate 10회분).

■ 조작법



- ① 재조합 retrovirus 생산에 이용하는 숙주세포(293 세포나 293 T세포 등)를 하루 전날 plate에 seeding한다.
- ② 목적유전자를 삽입한 재조합 retrovirus vector plasmid와 pGP Vector, pE-eco 또는 -ampho Vector의 혼합액을 만든다.
- ③ Kit에 첨부된 transfection buffer를 ②의 vector 혼합액에 첨가하여 섞은 후 전날부터 배양한 세포에 뿌린다.
- ④ 48시간 배양 후 배양상청을 거두어 filter로 여과한다.
- ⑤ 여과액을 모아 재조합 retrovirus 용액으로 한다.

■ 실험예 :

본 kit을 사용하여 얻어진 virus액의 역가 검토

Red-shift GFP(rsGFP)를 pDON-AI DNA 에 삽입하여 정제된 재조합 retrovirus vector pDON-AI-rsGFP^{2,3)}을 본 kit을 사용하여 293T 세포⁴⁾에 도입하고 일과성으로 virus액을 조제하여^{5,6)} 그 역가를 NIH/3T3세포를 이용하여 조사하였다.

【방법】

(1) Virus액 조제 protocol

전날

293T 세포를 60 mm plate에 2×10⁶개/plate 밀도로 seeding하여 배양한다.

[1일째 : transfection]

- ① 배지교환
(10% FBS, 25 μM chloroquine 함유 DMEM, 3 ml)
- ② DNA혼합액을 조제한다.

pDON-AI-rsGFP(1 μg/μl 수용액)	10 μl
pGP Vector	5 μl
pE-eco Vector 또는 pE-ampho Vector	5 μl
2 M CaCl ₂	62 μl
멸균증류수	418 μl
- ③ Calcium phosphate 침전을 형성한다.
침부된 Transfection Buffer 500 μl를 취하여 ②의 DNA혼합액에 부드럽게 첨가한다. 첨가 후 즉시 피펫을 사용하여 bubbling한다(10~20초).
1~2분 이내에 ①의 plate에 균일하게 떨어뜨려 배지와 혼합한다.
- ④ 37°C의 5% CO₂ incubator에서 9시간 배양한다.
- ⑤ 배지를 교환한다(10% FBS함유 DMEM, 4 ml).

2일째

Transfection 후 24시간째에 배지를 한번 더 교환한다(10% FBS함유 DMEM, 4 ml).

3일째

Transfection 후 48시간째에 상청을 0.45 μm filter로 여과하고 virus액으로 한다.

(2) Virus 역가의 측정(G418 colony assay)

- ① 감염하기 하루 전날 NIH/3T3 세포를 6 well pate에 5×10⁴개/well 밀도로 seeding하여 배양한다.
- ② 다음날 polybrene 9 μg/ml을 함유하는 혈청배지 900 μl로 배지를 교환한다. 혈청배지에서 10⁴~10⁶배로 단계 희석한 virus액을 well에 100 μl 첨가하여 virus를 감염시킨다 (polybrene 최종 농도 8 μg/ml). 37°C의 CO₂ incubator에서 4~6시간 배양한 후 1 ml의 혈청배지를 첨가한다.
- ③ 다음 날 G418(400~800 μg/ml)을 포함하는 혈청배지로 교환하고 3~4일 간격으로 배지를 교환한다.
- ④ 감염 약 2주일 후에 methylene blue액이나 Giemsa액 등으로 세포를 염색하여 G418 내성 colony 수를 세어 희석배율을 곱한 후 역가(cfu/ml)를 계산한다.

【결과】

표 1과 같이 transfection후 48시간만에 고역가의 재조합 virus액을 조제할 수 있었다.

본 실험에 숙주로 사용한 세포는 293 세포에 SV40의 T항원유전자를 도입하여 제작한 293T 세포이다. 293T 세포는 일과성 transfection 효율이 뛰어나고 293 세포보다도 높은 역가의 virus액을 얻을 수 있다.

표 1 본 kit를 사용한 virus액 역가

사용한 Kit	역가
Retrovirus packaging Kit Eco	2.5×10 ⁷ cfu/ml
Retrovirus Packaging Kit Ampho	4.4×10 ⁶ cfu/ml

【참고문헌】

- 1) *Life Science & Biotechnology* 10호 11-13
- 2) *Life Science & Biotechnology* 15호 10-12
- 3) *Life Science & Biotechnology* 16호 30
- 4) Dubridge R. B., Tang P., Hsia H. C., Leong P. M., Miller J. H. and Calos M. P. (1987) *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 379-387.
- 5) Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L. and Baltimore D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 8392-8396.
- 6) Yang S., Delgado R., King S. R., Woffendin C., Barker C. S., Yang Z. Y., Xu L., Nolan G. P. and Nabel G. J. (1999) *Hum. Gene Ther.*, **10**, 123-132.

■ 제품 리스트 및 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Retrovirus Packaging Kit Eco	6160	10회분
Retrovirus Packaging Kit Ampho	6161	10회분
pDON-AI DNA	3650	20 μg
RetroNectin [®] (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	T100A	0.5 mg
RetroNectin [®] (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	T100B	2.5 mg
RetroNectin [®] Dish(RetroNectin [®] Pre-coated Dish, 35 mm φ)	T110A	10 dishes

293 세포용 유전자 도입시약 **Trans IT[®]-293**

TaKaRa Code V2700

PanVera사의 제품입니다.

배양세포에 유전자를 도입하는 화학적인 방법에는 liposome법, calcium phosphate법, DEAE-dextran법 등이 있다.

그 중 liposome법은 조작이 간단하며 다수의 시료를 처리하는 경우에도 적합하여 널리 이용되고 있다.

Trans IT[®] Polyamine Transfection Reagents는 진핵세포용 유전자 도입시약으로 독성이 낮고 효율이 높으며 조작이 간단하여 발매 이래 호평을 받고 있다.

금번, 기존의 Trans IT[®] Polyamine Transfection Reagents 시리즈에 293세포 전용 유전자도입시약 Trans IT[®]-293을 새로 출시하였다. Trans IT[®]-293은 293세포용으로 개발된 시약으로 세포독성이 매우 낮고 조작도 간단하여 고효율로 유전자를 도입할 수 있다.

■ 특징

Trans IT[®]-293은 293세포 유전자 도입시약으로 아래와 같은 특징이 있다.

- (1) 고효율로 유전자를 도입할 수 있다.
- (2) 세포에 대한 독성이 낮다.
- (3) 조작이 매우 간단하다(혈청을 포함한 배지에서 유전자 도입이 가능하여 배지를 교환할 필요가 없다).
- (4) Transient 및 stable한 transformant를 얻을 수 있다.

■ 실험예 :

Trans IT[®]-293에 의한 293세포에의 유전자 도입

【방법】

개량 GFP(red-shift GFP) 발현 vector인 pQBI 25(TaKaRa Code 3131)를 그림 1의 방법으로 293 세포에 유전자를 도입하였다.

【결과】

그림 2와 같이 Trans IT[®]-293을 이용하여 유전자를 도입한 293 세포에서 도입유전자의 발현을 확인하였다. 이와 같이 Trans IT[®]-293을 이용하여 간단하고 효율적으로 293세포로 유전자를 도입할 수 있었다.

또한 Trans IT[®]-293을 첨가한 후 발현확인 때까지 배지를 교환할 필요가 없다. 이러한 낮은 세포독성은 transfection 후의 세포 상태가 중요한 유전자의 발현 연구에 이상적이다.

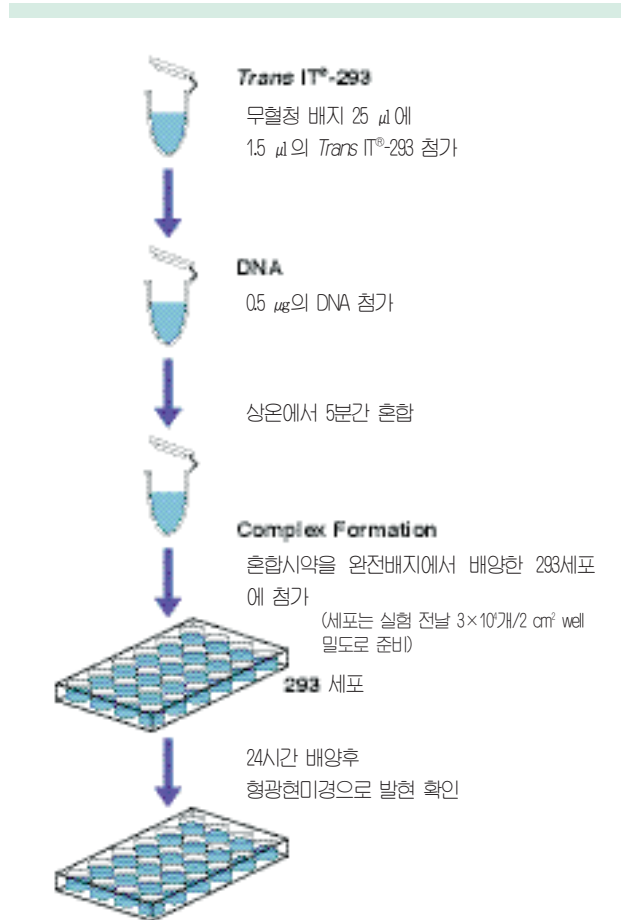


그림 1 실험방법 flow chart

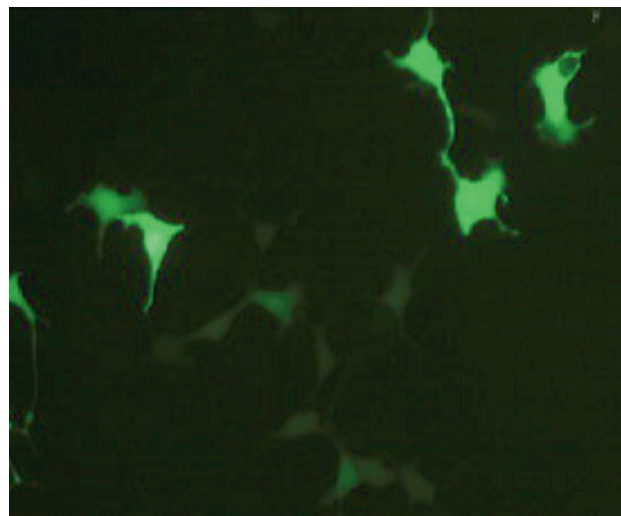
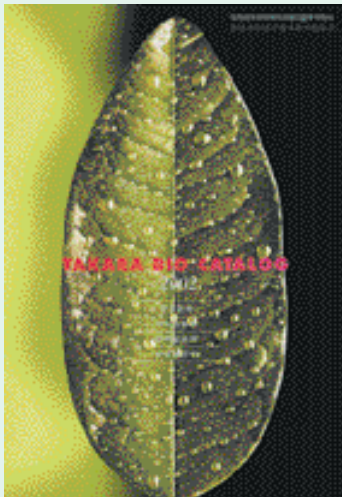


그림 2 Trans IT[®]-293을 이용하여 도입한 vector(pQBI25)의 293 세포 내 발현

【관련제품】

제품명	TaKaRa Code	포장량
진핵세포용 유전자 도입시약 (Trans IT® Polyamine Transfection Reagent)		
Trans IT®-LT1	V2304T	~200회분(35 mm dish), 0.4 ml
Trans IT®-LT1	V2300	~500회분(35 mm dish), 1 ml
Trans IT®-LT2	V2404	~200회분(35 mm dish), 0.4 ml
Trans IT®-LT2	V2400	~500회분(35 mm dish), 1 ml
Trans IT®-PanPak	V2510	~250회분(35 mm dish), 각 0.2 ml
Mouse 생체내 세포용 유전자 도입시약		
Trans IT® In Vivo Gene Delivery System	V5125	25 injections
개량 GFP 발현 vector (rsGFP vector)		
pQBI 25	3131	20 µg
pQBI 63	3132	20 µg
pQBI PGK	3133	20 µg
pQBI Pol II	3134	20 µg
BFP vector		
pQBI 50	3135	20 µg
pQBI 67	3136	20 µg

TaKaRa BIO CATALOG 2002 발행!! On-Line Catalog 이용 안내



이용의 편의성을 생각하여 얇고, 가볍게 제작하였으며, 신제품 정보를 수록하고 있습니다.

당사 또는 가까운 지역전문 대리점으로 신청하세요.

신개정판 카탈로그는 제품에 대한 최소한의 정보만을 수록하였습니다. 기존의 제품 상세정보(Protocol, Application, Reference)는 TaKaRa On-Line Catalog에 수록되어 있습니다.

새로워진 On-Line Catalog는 각제품에 대한 상세정보와 신제품 정보를 데이터베이스화 하여 검색이 보다 쉬워졌습니다.

TaKaRa On-Line Catalog
www.takara.co.kr

*** 지역별 전문대리점 연락처**

서울/경기/강원/충청	코아바이오시스템(주)	02-841-7530
부산/경남지역	대한과학	051-247-2875
대구/경북지역	(주)브니엘	053-959-3611
전주/전남지역	삼화교역	063-227-3700
광주/전북지역	진성에스엠알	062-672-7631

DNA chip data mining용 소프트웨어

GeneSight™ Version 2.0

TaKaRa Code BD003

BioDiscovery사의 제품입니다.

GeneSight™ Version Up!!

복수의 DNA chip의 해석에서 얻는 방대한 양의 발현 data를 여러 관점에서 통계학적으로 해석하려면 전용 해석 소프트웨어가 필요하다. TaKaRa에서는 미국 BioDiscovery사의 GeneSight™를 도입하여 제공하고 있다.

GeneSight™가 version up되어 새로운 기능이 추가되고 조작성이 대폭 향상되었다.

■ 특징

1) File 입력

ImaGene™ Version 4.0으로 해석한 결과의 수치 file은 물론 Microsoft Excel 등 표계산 소프트웨어로 가공한 수치정보의 text file도 유연하게 대응할 수 있다. 얻어진 복수의 file data는 일련의 실험 data set로 관리할 수 있다.

2) Data 가공(그림 1)

Signal 강도나 비율로 얻은 data를 이용하여 실제로 clustering 등의 해석에 사용할 data로 추출하여 가공할 수 있다. 구체적으로 background·subtraction(background 값을 제거), signal 강도의 역치 설정, signal 강도의 비율화, 비율대수로의 변환, normalization 등이 가능하다. 또한 같은 시료에서 얻은 반복 실험의 결과를 평균하여 하나로 정리할 수 있다.

기존에는 이런 data 가공 조작에 많은 노력과 시간을 들여 chip의 수치화 file로 만들어야 했으나, 이 기능의 추가로 복수의 chip data를 한번에 가공할 수 있다.

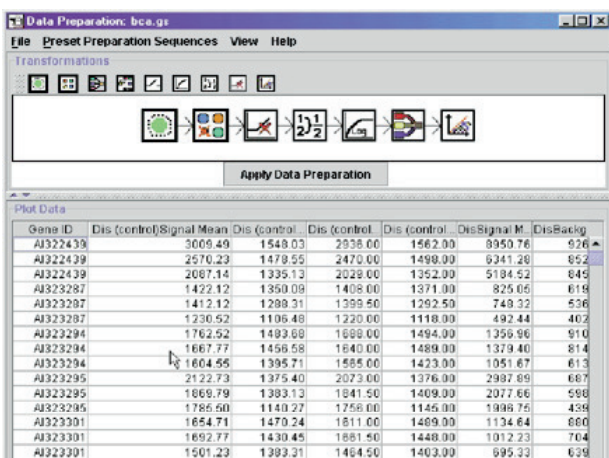


그림 1 Data의 가공

3) Data의 신뢰성 해석(그림 2)

같은 시료를 사용하여 얻은 발현비율의 data가 복수로 존재하는 경우 그 값으로부터 각 발현비율의 신뢰성을 조사할 수 있다. 이 기능으로 변동을 나타내는 유전자 중에서 통계학적으로 유의한 것을 추출할 수 있다.

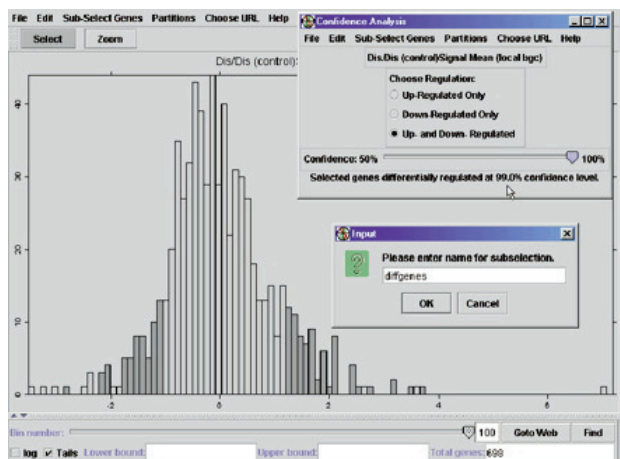


그림 2 Data의 신뢰성 해석

4) Clustering(그림 3, 4)

Microarray의 논문에서 흔히 접할 수 있는 계층적 clustering(그림 3)이나 자기조직화 지도(SOM), K-means에 의한 clustering(그림 4)이 가능하다.

또한 해석결과도 개개의 cluster에 속하는 유전자 리스트를 보존할 수 있다.

5) Time Series Plot(그림 5)

경시적 변화 등을 알아보는 실험의 경우, 각 유전자의 발현 profile을 한눈에 알아볼 수 있도록 그래프화 할 수 있다. 또한 어떤 특정 유전자와 profile이 유사한 유전자군을 검색하여 그 목록을 작성 할 수 있다.

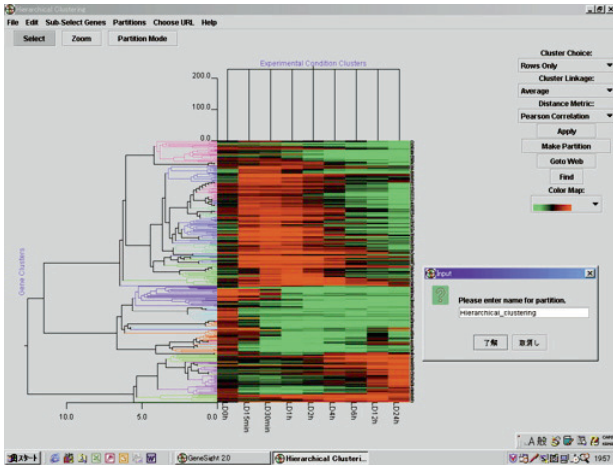


그림 3 계층적 clustering

6) Query Builder 기능

각종 해석이나 annotation 정보에서 얻은 유전자 목록 중에서 보다 흥미 있는 유전자를 압축할 수 있다. 예를 들면 clustering 결과에서 같은 cluster에 속하는 유전자 중, 특정 조건 하에서의 발현비율이 3 이상의 것을 추출할 수 있다.

7) Partition 기능(그림 3, 4)

유전자의 목록화 기능 외에 clustering 등의 해석결과에 따라 유전자군의 분할과 group화(partition)를 할 수 있다. 이 group의 결과를 다른 해석 결과에 넣을 수 있어 다른 해석방법의 결과와 비교할 수 있다. 예를 들면 K-means에 의한 clustering에서 9개의 group으로 분할된 유전자가 계층적 clustering에서는 어떠한 형태로 나누어져 있는지 등을 조사할 수 있다.

8) Report 기능

각 기능을 사용하여 얻어진 가공 data를 Microsoft Excel 등의 표계산 프로그램에 사용할 수 있는 text file로 보존할 수 있다.

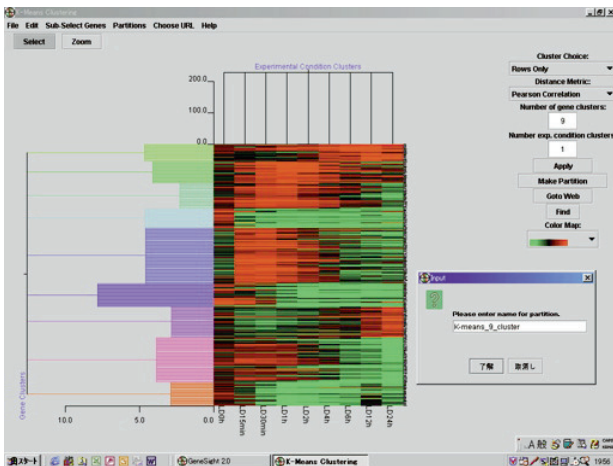


그림 4 K-means에 의한 clustering

【동작 환경】

OS 환경 : Windows® 95/98/NT and 2000

최소 환경 : 300 MHz Pentium®, 128 MB RAM, Hard Disk 가용 용량 100 MB, CD-ROM drive

권장 환경 : 450 MHz 이상 Pentium®, 512 MB RAM 이상, Hard Disk 가용 용량 200 MB, CD-ROM drive

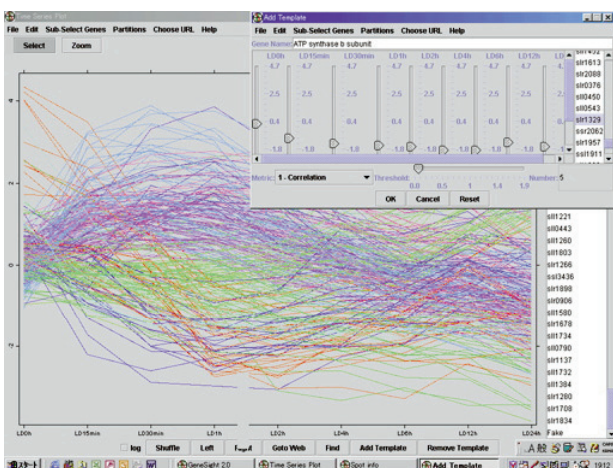


그림 5 Time Series Plot

DNA chip 발현 해석용 소프트웨어

ImaGene™ PremiumPack

ImaGene™ FLEXPack

ImaGene™ PremiumPack

TaKaRa Code BD012

ImaGene™ FLEXPack

TaKaRa Code BD011

BioDiscovery사의 제품입니다.

자동 해석 기능을 추가한 강력한 ImaGene™ option !!

최근 DNA chip을 이용한 해석이 널리 이루어지고 있으며 다양한 실험조건에 대응하고, 해석할 data수가 많아져 화상해석에 많은 시간이 소요된다.

지금까지 TaKaRa에서는 다양한 DNA chip 해석 요구에 대응하기 위하여 화상해석 자동화 소프트웨어 "AutoGene™"을 공급하고 있으며, ImaGene™ PremiumPack과 ImaGene™ FLEXPack을 새롭게 출시하였다(PremiumPack, FLEXPack은 ImaGene™ Ver. 4.1 이상이 필요하다. 또한 이 세 가지를 준비함으로써 AutoGene™ 과 동등한 기능을 갖는다).

이 ImaGene™ PremiumPack 및 FLEXPack은 AutoGene™과 같은 대량화상의 완전자동화 및 독자적인 algorithm을 이용하여 Spot Finding(spot signal의 결정, noise signal, contamination signal 제거) 기능을 갖고 있어 화상 data 해석에 많은 시간을 소비하던 연구자에게 아주 강력한 tool로 이용되고 있다.

또한 기존 AutoGene™에 비하여 각 기능이 version up되어 쉽게 사용할 수 있게 되었다. ImaGene™ Ver. 4.0을 기본으로 JavaScript에 의한 module 형식을 응용하여 유연성을 갖는다.

■ 제품과 특징

(1) ImaGene™ PremiumPack

Noise와 contamination signal을 제거하고 spot signal을 정량화하는 Auto Segmentation 기능(그림 1 참조)과 해석처리 후 data 품질을 확인할 수 있는 Quality Measurement 기능(그림 3 참조)으로 batch 처리 이외의 기능을 갖고 있다.

이 기능으로 항상 일정한 기준으로 data를 해석할 수 있으므로 해석자간의 오차를 방지할 수 있다. 해석하는 화상 수는 많지 않지만 복수 연구자가 화상해석에 관여하는 연구실에 적합하다.

(2) ImaGene™ FLEXPack

해석을 자동화 처리하는 Batch Processing 기능(그림 1 참조)을 갖고 있다. 기존 AutoGene™은 하나의 소프트웨어 당 정가였으나 Java Application이 됨으로써 사용빈도에 관계없이 이용회수에 맞추어 제품을 구입할 수 있다.

■ 각종 기능

【Advanced Automatic Segmentation Module】

화상 data를 정량화할 때 spot signal, noise와 contamination signal을 자동으로 구분할 수 있어야 한다. ImaGene™ PremiumPack에는 정량에 주로 사용하는 ImaGene™ Ver. 4.0의 algorithm을 사용하여 보다 신뢰성이 높은 데이터의 해석이 가능하고 기존 AutoGene™에 비해 약 15배의 빠른 속도로 해석이 가능하다(10,000 spot 처리가 약 1분 이내에 완료).

【Advanced Spot Quality Control and Assessment】

화상 data를 자동 해석한 후 해석결과의 타당성 여부를 검토해야 한다. ImaGene™ PremiumPack은 해석종료 후에 spot data를 check하는 기능이 추가되었다. 각 spot의 data를 평가하여 표시하는 Auto Flag 기능과 해석화상의 불균일로 발생하는 data의 분산을 방지하는 alert 기능이 있다.

【Batch Processing Module】

해석을 자동화하면 data 처리에 걸리는 시간을 절약하여 실험 효율을 높일 수 있다. ImaGene™ FLEXPack은 누구라도 간편하게 batch file을 작성할 수 있도록 batch editor가 추가되어 적은 노력으로 최대의 효과를 얻을 수 있다.

■ 각종 기능의 구체적인 예

① Auto Segmentation 기능

Spot signal을 정량화할 때 noise나 contamination signal을 제거하는 것은 data의 신뢰성을 높이는데 매우 중요하다. ImaGene™은 독자적인 algorithm을 이용하여 noise와 contamination signal을 자동 인식하여 spot signal에서 제거할 수 있다(그림 1a, b 참조).

그림에서 spot signal은 적색으로, background signal은 녹색으로 표시되어 있다. 검정 또는 회색으로 표시된 부분은 noise나 contamination signal로 인식되어 정량화 범위에서 제외된다.

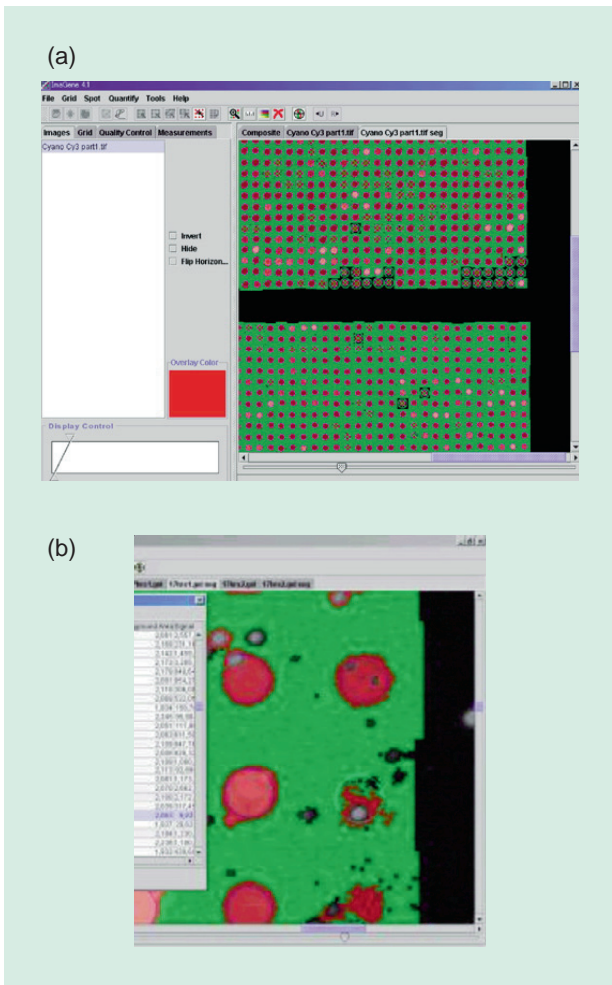


그림 1 (a) Auto Segmentation의 예
(b) Segmentation으로 contamination signal 제거

② Spot Quality Measurement 기능

Spot signal을 정량화할 때 실험조건의 변동이나 해석자간의 해석 오차 등에 의한 차이가 생길 수 있다. 이런 data의 분산을 방지하기 위해서는 항상 일정한 기준으로 해석할 필요가 있다.

ImaGene™ PremiumPack에서는 spot signal을 일정하게 유지시키기 위한 여러 가지 parameter를 갖고 있다(그림 2a). 자동 해석할 경우 임시로 각 spot에 대하여 parameter를 이용하여 class를 분류하고 flag를 세워 항상 같은 spot signal을 선별할 수 있다(그림 2b 참조).

③ Batch처리에 의한 자동해석

ImaGene™ FLEXPack은 batch 처리로 간단하게 대량의 화상 data를 해석할 수 있다. 자동해석 공정은 아래와 같다(그림 3).

- 1) Batch editor를 이용하여 필요한 정보(화상 data, GeneID File, grid 정보 등)를 바탕으로 batch file을 작성한다.
- 2) Batch file를 기동시켜 batch 처리한다.
- 3) 해석이 종료되면 지정한 폴더에 해석결과가 자동 보존된다. 하나의 화상 data당 세 개의 해석 결과(Auto Segmentation data, spot signal의 정량화 data, spot의 gridding data)가 작성된다. 동시에 각 화상해석시 오류 상황이 log.txt로 기록된다.

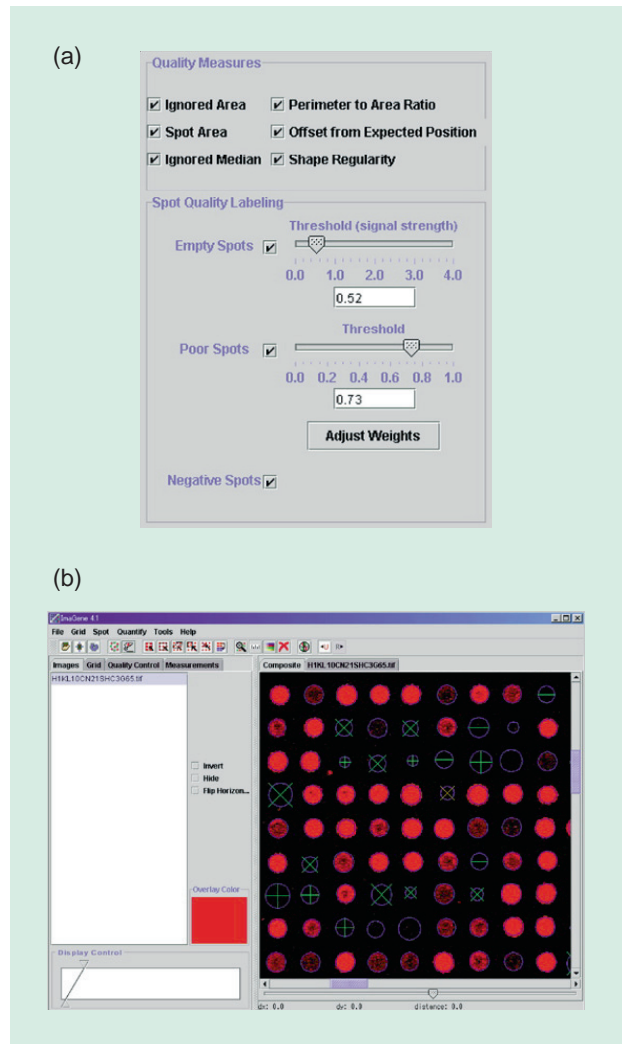
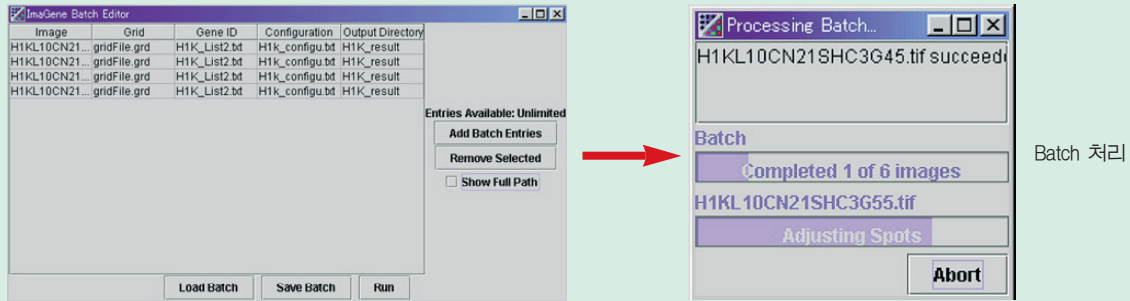


그림 2 (a) Quality Measurement에 이용하는 다양한 parameter
(b) Auto Flag의 한 예

- 4) 해석결과의 타당성 여부를 확인할 경우는 result review에서 결과 file을 연다. 수치화 data와 화상 data로 결과의 타당성을 확인할 수 있다. 수치화 data는 Excel의 표형식으로 표시된다. 여기에는 spot signal data는 물론 signal의 품질을 평가하기 위한 data도 표시된다. 또한 sort 기능도 있어 data검색에 편리하다. 화상 data로는 Auto Segmentation 및 Auto Flag 결과를 확인할 수 있다. 해석결과를 부분적으로 수정하고자 할 때는 수동으로 수정하여 재정량화한 후 간단하게 본래 data에 반영할 수 있다.

【사양】

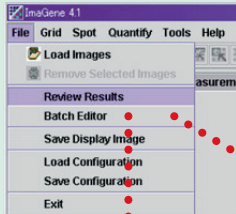
- OS 환경 : Windows® 95/98/NT and 2000
 최소환경 : IBM PC or 300 MHz Pentium®, 128 MB RAM, Hard Disk 가용 용량 100 MB, CD-ROM drive
 권장환경 : 450 MHz 이상 Pentium®, 256 MB RAM 이상, Hard Disk 가용 용량 200 MB, CD-ROM drive



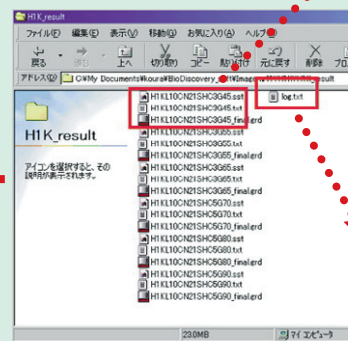
Batch Editor로 Batch File 작성

Batch 처리

Review Results에서
해석 결과 파일을 연다



해석 종료



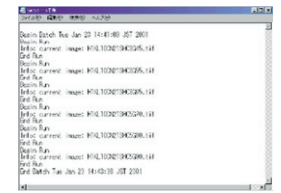
해석 결과가 자동적으로 보존된다

해석 결과

- H1KL10CN21SHC3G55.sst
- H1KL10CN21SHC3G55.txt
- H1KL10CN21SHC3G55_final.grd

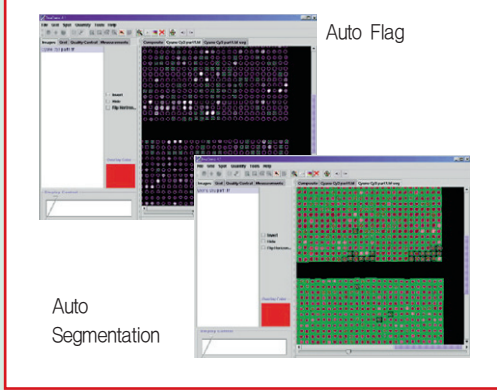
해석 결과로 376 file(auto segmentation data, spot signal data, grid data)이 작성된다

(log.txt)



해석 상황의 기록이 보존된다

화상 data 확인



수치화 file로 확인

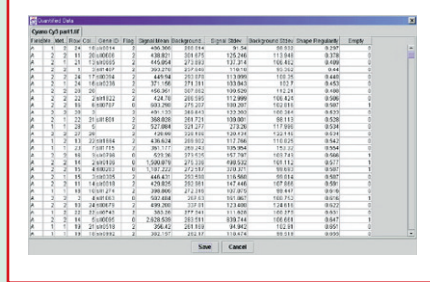


그림 3 Batch 처리로 자동해석 flow chart

【ImaGene™ FLEXPack 제품 리스트】

처리 화상수의 양에 맞추어 선택하여 주십시오.

제품명	Batch 처리 회수
ImaGene™ FLEXPack 200	200회
ImaGene™ FLEXPack 500	500회
ImaGene™ FLEXPack 2000	2000회
ImaGene™ FLEXPack 5000	5000회
ImaGene™ FLEXPack 10000	10000회
ImaGene™ FLEXPack Ultra	무제한(1년간)

【관련제품】

제품명	TaKaRa Code
ImaGene™ Ver. 4.1	BD001
CloneTracker™ Ver. 1.49	BD002
GeneSight™ Ver. 2.0	BD003

* 위 version은 2001년 3월 1일 현재 기준

RNA 추출용 시약

EASYPrep RNA

TaKaRa Code 9095 100 ml

EASYPrep RNA는 동물이나 식물조직 또는 미생물에서 고순도의 total RNA를 약 1시간에 분리할 수 있는, 유기용매를 기본으로 한 시약이다. EASYPrep RNA에는 변성제와 RNase inhibitor가 특정 비율로 혼합되어 있어 당당, 지방산, 단백질, RNase 등이 많은 조직에서도 고효율로 RNA를 분리할 수 있다. 분리하는 순서가 간단하여 다수의 시료를 동시에 처리할 수 있다.

■ 본 시약을 이용한 total RNA의 분리조작(그림 1)

신선 또는 동결조직(세포) 모두에 사용할 수 있다. 조직(세포)에 10배량의 EASYPrep RNA*를 첨가, 파쇄한 후 chloroform을 첨가하여 혼합하고 원심분리하면 세 개의 층으로 분리된다. 투명한 상층(수층)에는 RNA가, 중간층에는 DNA가, 색을 띠는 하층(유기용매 층)에는 단백질, 당당, 지방산, 세포잔사가 포함되어 있다. 단백질(RNase 포함)은 유기용매 층에서 변성되므로 protease를 처리할 필요가 없다. 상층(수층)을 모아 isopropanol로 침전하여 RNA를 회수하기까지 약 1시간에 완료할 수 있다.

* 본 제품은 40% phenol이 들어있으므로 주의하여 사용해야 한다(자세한 것은 시약에 첨부된 MSDS를 참조한다).

■ 분리된 RNA의 품질

본 제품을 이용하여 분리한 RNA는 단백질이나 DNA가 거의 없어 Northern blot analysis, nuclease protection assay, RT-PCR, mRNA의 분리, *in vitro* translation에 그대로 이용할 수 있다. RT-PCR에 이용하는 경우 미량의 DNA가 혼입될 수 있으므로 사용 전에 DNase I 처리한다.

■ 특징

- 한개의 tube에서 파쇄와 분리 조작을 실시한다.
- 신선조직, 동결조직 또는 세포에서 고순도의 total RNA를 추출할 수 있다.
- 시약을 조절할 필요가 없으며, 조작이 간단하여 다수 시료를 동시에 처리할 수 있다.
- 색을 띠고 있어 원심분리 후 층의 구별이 쉽다.
- 약 1시간에 모든 실험을 완료할 수 있다.
- 사용하는 시약의 양만 조절하면 어떤 량의 재료도 처리할 수 있다.

■ 실험예 : 본 제품을 이용하여 각종 조직에서 분리한 RNA의 Northern blot

EASYPrep RNA를 이용하여 mouse의 각종 조직(간장, 흉선, 심장, 뇌, 폐, 정소, 난소, 신장)에서 total RNA를 분리하였다.

각 5 µg의 RNA를 변성 agarose gel 전기영동을 하고 membrane filter에 blotting한 후 mouse β-actin, mouse cyclophilin에 상보적인 ³²P-표식 RNA probe를 이용하여 hybridization하였다. Filter를 세정한 후 autoradiography하였다(감광은 2시간, 그림 2).

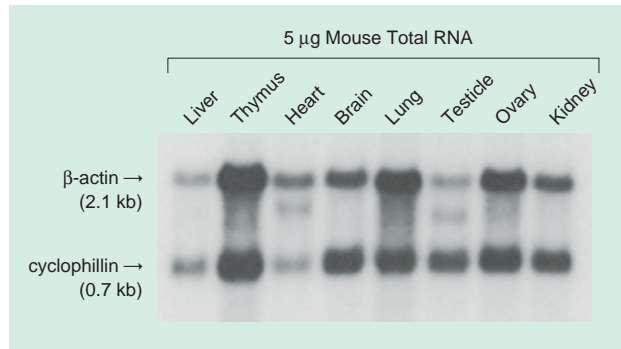


그림 2 EASYPrep RNA를 이용하여 분리한 RNA의 Northern blot

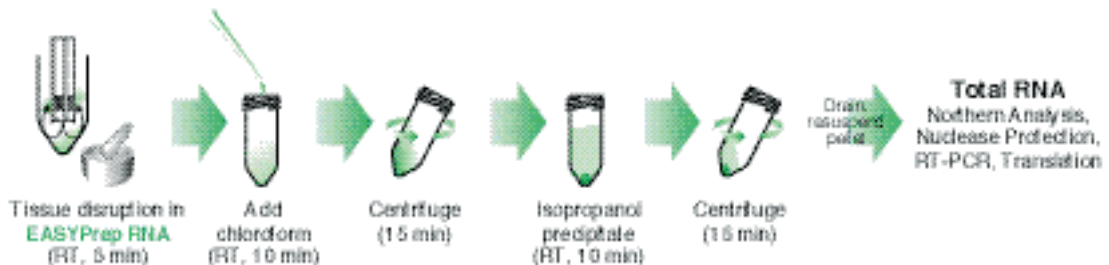


그림 1 EASYPrep RNA를 이용한 total RNA의 분리조작

RNA 추출 · 회수용 Kit

RNA Isolation System(phenol-free)

TaKaRa Code 9096 1 Kit

RNA Isolation System은 phenol을 이용하지 않고 소량의 시료에서 total RNA를 추출 · 회수하기 위한 kit이다. 여러 종류의 조직이나 세포(동물조직, 식물조직, 배양세포, 세균, 효모, virus 입자, 효소반응물 등)에서 신속하고 효율적으로 total RNA를 조제할 수 있다.

■ Kit의 내용(25 mg 조직 기준 50회분)

· Lysis/binding solution	60 ml
· Water for 64% ethanol (사용직전에 99.5% ethanol을 38.4 ml 첨가)	21.6 ml
· Wash solution 1	40 ml
· Wash solution 2/3 concentrate (사용직전에 99.5% ethanol을 64 ml 첨가)	16 ml
· Filter cartridge	50개
· 회수용출용 RNase-free tube	100개
· Elution solution	9 ml
· LiCl precipitation solution	4 ml
· Gel loading solution*	6 ml

* 본 제품은 Formamide와 Formaldehyde가 들어있으므로 충분히 주의하여 사용한다(상세한 것은 시약에 첨부된 MSDS를 참조한다).

■ 본 kit를 이용한 total RNA 추출 · 회수 조작(그림 1)

RNA Isolation System은 고농도의 caotrophic염(예를 들면 guanidine thiocyanate(GITC)) 존재 하에서 RNA가 glass조직에 흡착하는 성질을 이용하고 있다. 먼저 guanidine thiocyanate(GITC)를 함유한 lysis/binding solution을 넣어 조직(세포)을 파쇄하고 동시에 세포에 존재하는 RNase를 불활성화한다.

이 lysate를 ethanol로 희석하고 filter cartridge에 넣어 원심분리하여 흡인 여과한다. RNA는 filter cartridge 내의 glass filter에 흡착하고 단백질, DNA 및 다른 불순물은 제거된다. Filter를 3회 세정한 다음, 소량의 elution solution을 이용하여 filter에 흡착한 RNA를 용출한다.

조직(세포)파쇄 후의 공정은 약 20분에 완료되며 phenol/chloroform 추출이나 protease 처리, alcohol 침전 과정이 필요없어 다수의 시료를 동시에 처리하는데 적합하다.

■ 분리된 RNA 품질

본 시스템으로 분리한 RNA는 Northern blotting, RT-PCR, *in vitro* translation 등에 사용할 수 있다. 분리된 RNA는 genome DNA를 거의 포함하지 않는다(그림 2). 단, RT-PCR에 이용하는 경우 genome DNA가 혼입될 수 있으므로 LiCl 침전(Kit 내의 LiCl precipitation solution 이용) 또는 DNase I 처리로 혼입 DNA를 제거한다.

■ 특징

- 다양한 종류의 조직, 세포의 추출에 이용할 수 있다.
- 세포 파쇄 후 20분에 추출을 완료할 수 있다.
- Phenol/chloroform추출이나 alcohol 침전, protease 처리 과정이 필요 없다.
- 소량의 시료를 다수 처리하는데 적합하다.



그림 1 RNA Isolation System (phenol-free)을 이용한 total RNA의 분리조작

■ 시료 처리량

RNA Isolation System filter를 1개 사용할 경우 표준 권장 재료 양은 표 1과 같다.

표 1

재료	권장량
동식물 조직	1~75 mg
포유류 배양세포	1×10 ² ~1×10 ⁷ 개의 세포 또는 60 cm ² plate : confluent하게 배양
그렘 음성세포	2×10 ⁶ 개의 세포 또는 A ₆₀₀ =약 2~3의 배양액 1.5~3 ml
그렘 양성세포	10 ⁶ ~10 ⁸ 개의 세포 또는 A ₆₀₀ =약 1~2의 배양액 1.5~3 ml
효모	1×10 ⁶ 개의 세포 또는 A ₆₀₀ =약 1~2의 배양액 1.5~3 ml
Virus 입자	약 200 μg의 RNA를 포함하는 양
효소 반응액	약 5~300 μg의 RNA

■ 실험예

(1) 본 Kit를 이용하여 분리한 total RNA의 전기영동

Mouse, rat, alfalfa의 조직, 효모 및 대장균에서 본 kit을 이용하여 total RNA를 조제하였다. 각 1.5 μg의 total RNA를 gel loading buffer에서 65°C, 15분 가열 후, 1% agarose gel에 formaldehyde/MOPS buffer로 전기영동한 후 EtBr로 염색하였다. 결과는 그림 2와 같다.

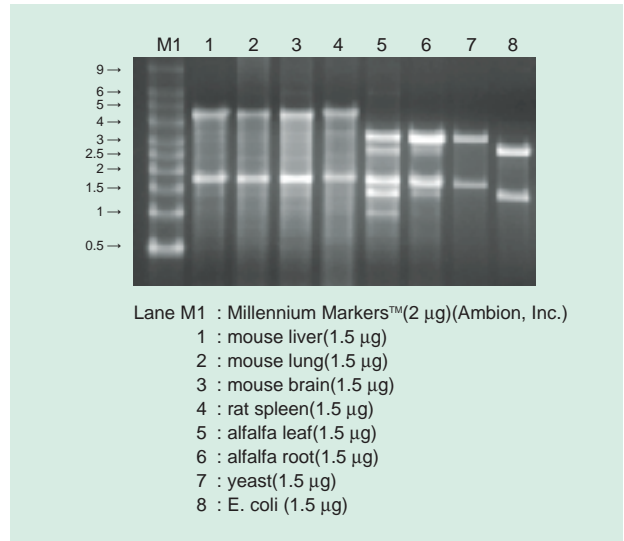


그림 2

(2) 본 kit으로 분리한 RNA의 RT-PCR

본 kit을 이용하여 mouse 간장에서 RNA를 추출하여 그 10 μg을 주형으로 RT-PCR을 실시하였다. 결과는 그림 3과 같다.

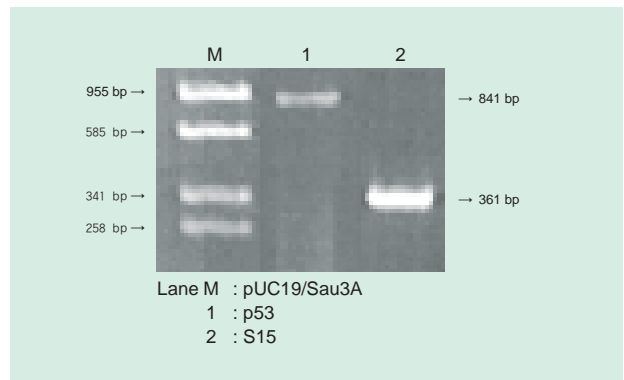


그림 3

■ Takara RT-PCR System 비교

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

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

RNA의 안정적인 보존을 위하여!

RNAlater™

TaKaRa Code AB001 100 ml

Ambion사의 제품입니다.

RNAlater™은 비동결 세포내의 RNA를 *in situ*에서 안정하게 보존하기 위한 조직 보존용 시약이다. 조직의 시료를 채취하여 곧바로 RNAlater™에 넣으면 RNA의 질과 양에 손상 없이 보존할 수 있다. RNAlater™을 사용할 경우 급하게 조직을 처리할 필요가 없으며, 다음 처리를 위하여 조직을 액체 질소에 동결 보존할 필요가 없다.

■ 특징

- ① 조직중의 RNA를 -80℃~37℃ 범위로 보존할 수 있다. 37℃에서 하루, 25℃에서 일주일, 4℃에서 한달간 보존할 수 있다. -20℃나 -80℃에서는 조직의 장기 보존이 가능하다.
- ② 다양한 조직 보존에 효과적이다.
RNAlater™은 여러 척추동물 유래의 뇌, 심장, 신장, 비장, 간장, 정소, 골격근, 지방조직, 폐, 흉선 조직과 백혈구 조직 배양세포의 보존에 효과적이다(그림 1, 2 참조).
또한 대장균이나 초파리, 여러 종류의 식물(담배 잎, 감자줄기, *Arabidopsis thaliana*, Alphaalpha 등)에도 효과적이다.
- ③ RNAlater™로 보존한 조직은 대부분의 RNA분리법을 이용하여 분리할 수 있다. TaKaRa에서는 RNA분리용시약-EASYPrep RNA(TaKaRa Code 9095), RNA Isolation System(phenol-free)(TaKaRa Code 9096), RNase 제거용 시약-RNase Remover(TaKaRa Code 9038), RNA 조제용 water-RNA Preparation Water(TaKaRa Code 9011)등 다양한 RNA 추출용 제품을 공급하고 있다.

■ 실험예

1) RNAlater™로 보존한 조직 RNA의 안정성

Mouse 간장, 비장 및 신장을 RNAlater™에 넣어 37℃에서 하루, 실온에서 일주일, 4℃에서 한달 간 보존 후 RNA의 분해 정도를 알아보기 위하여 각 조직에서 RNA를 추출하고 변성 agarose 겔로 전기 영동하여 northern blotting하였다. 그 결과는 그림 1과 같다.

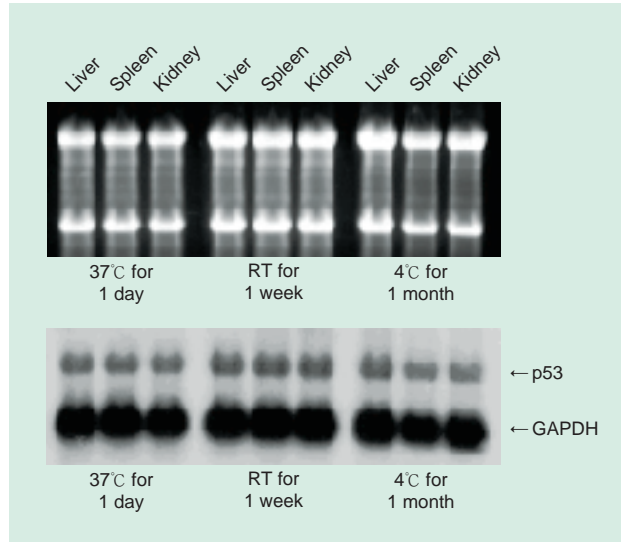


그림 1 RNAlater™로 보존한 조직에서 추출한 RNA
(a) EtBr로 염색한 변성 agarose gel
(b) Northern blotting

2) RNAlater™로 보존한 조직의 mRNA profile

Mouse의 간장, 비장 및 신장을 RNAlater™에 넣어 4℃에서 일주일 또는 4주간 보존한 후, 각 조직에서 추출한 RNA를 각종 방사성 antisense probe를 이용하여 RNase protection assay를 실시한 후 mRNA의 profile를 조사하였다. 결과는 그림 2와 같다.

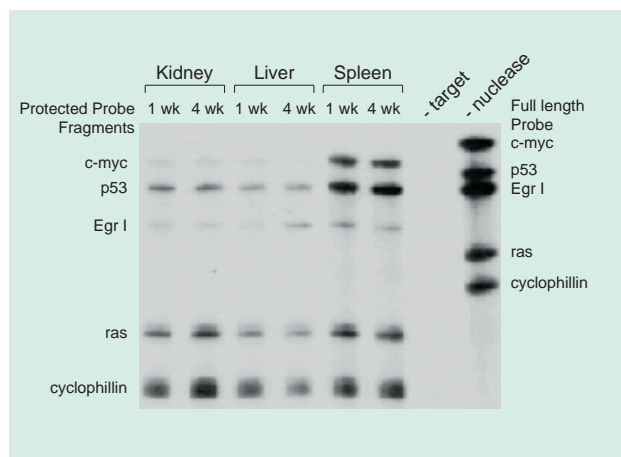


그림 2 RNAlater™로 4℃ 보존한 조직의 mRNA profile

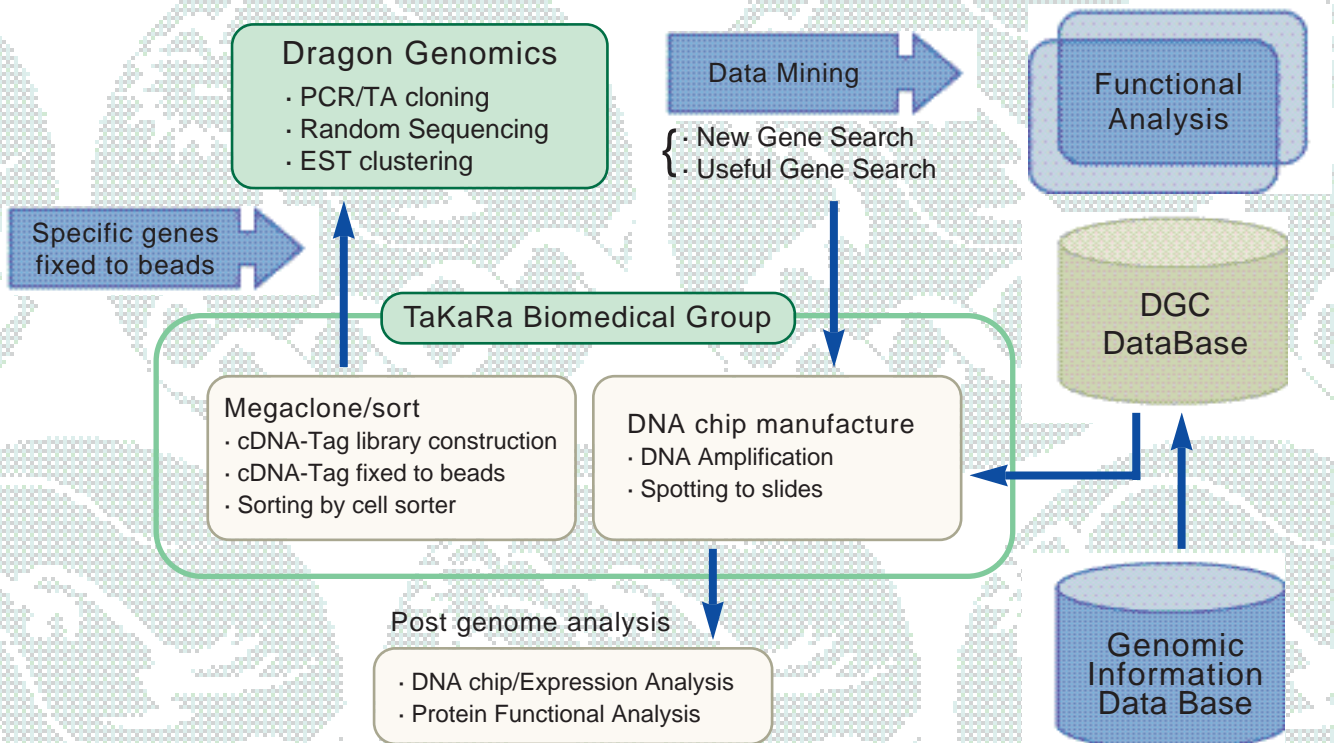
Genome Projects Speed가 생명 !! 초저가, 초스피드 실현

3 Mb 미생물 Genome Project를 3개월 이내에 완벽하게 완료하여 드립니다.

Genome Project에서 Functional Genomics까지

대형 유전자 해석 프로젝트 서비스

Cooperation with TaKaRa Biomedical Group



Dragon Genomics 해석 능력		
기종	MegaBACE	96/384 type
대수		30/15
처리 능력	반응/일	103,680
시료수	/월	3,110,400
	/년	37,324,800
데이터량	Mega염기/월	1,866.2
	Mega염기/년	22,394.4
마우스(5,400 Mb)환산	마리/년	4.1
사람(6,600 Mb)환산	명/년	3.4

주요 서비스 내용
Sequencing Targets
· Multiple, full-length cDNA
· Whole Genome
· Large Shotgun(BAC)
· Medium Shotgun(Cosmid)
· Small & Directed Projects
Editing/Assembly/Annotation
Bioinformatics Service
Functional Genomics

문의 : 다카라코리아바이오메디칼(주) 기술지원팀
Tel. 02-577-2002 e-mail support@takara.co.kr