



주목의 신상품

## Gradient PCR Machine

# TaKaRa PCR Thermal Cycler GP

TaKaRa Code TP500

TaKaRa에서는 TaKaRa Thermal Cycler 시리즈에 Gradient 기능을 가진 신제품을 출시하였다. 지금까지 Thermal cycler로 PCR을 할 경우 하나의 목적 DNA를 증폭하는 반응조건을 최적화하기 위하여 수회의 실험을 거쳐야 했다. 이번에 개발한 Thermal cycler는 온도조건을 설정하는 각 단계에서 시료 block의 좌우에 최대 20°C의 온도 구배를 설정할 수 있는 gradient 기능을 추가하였다. 이 기능의 추가로 한번의 실험으로 반응조건을 최적화 할 수 있다.

### ■ 특징

- 1) 0.2 ml PCR tube를 사용하여 oil free로 증폭이 가능하다.
- 2) 96 well microplate용 외에 384 well microplate용 heat block을 선택할 수 있다.
- 3) 폭넓은 칼라 액정화면으로 PCR 온도과정을 그래픽으로 표시한다.
- 4) Heat bonnet는 button으로 개폐를 조작하며, tube의 종류에 따라 최적 가압 상태를 설정한다. 또 이 동작은 외부 신호로 제어할 수 있어 전처리용 로봇과 조합하여 사용할 수 있다.
- 5) 프로그램 종료시 error 발생상황과 gradient 기능으로 설정한 각 well의 온도를 표시한다.
- 6) CF(compact flash memory) card를 사용하여 다수의 파일을 보존할 수 있다.
- 7) Touch down PCR 설정도 간편하게 할 수 있다.

### ■ TaKaRa PCR Thermal Cycler GP를 사용한 PCR

λ DNA를 주형으로 3단계 또는 2단계 PCR로 8 kbp 단편을 증폭하였다.

#### 【반응액 조성】

• TaKaRa Ex Taq™ (5 U/μl)	0.25 μl
• 10× Ex Taq Buffer (Mg <sup>2+</sup> Plus)	5 μl
• dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
• Primer 1 (20 μM)	0.5 μl
• Primer 2 (20 μM)	0.5 μl
• λ DNA (0.5 ng/μl)	1 μl
• 멸균증류수	38.75 μl
Total volume	50 μl

#### 【Cycle 조건】

##### • 3 Step PCR의 조건에

98°C 10초  
45 → 65°C 30초  
(좌우의 gradient)  
72°C 5분

30 cycles

##### • 2 Step PCR의 조건에

98°C 10초  
52 → 72°C 5분  
(좌우의 gradient)

30 cycles

#### 【결과】

##### • 3 Step PCR의 결과

Annealing 온도가 높을수록 저분자의 비특이적 증폭이 감소하였다(그림 1).

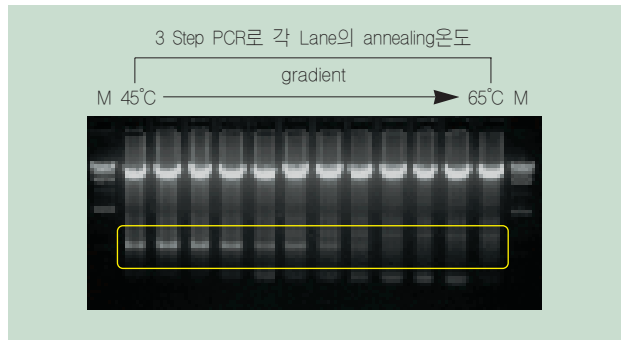


그림 1 3 Step PCR의 결과. M : λ-Hind III digest(marker)

##### • 2 Step PCR의 결과

Annealing/신장 온도가 높을수록 저분자의 비특이적 증폭이 감소하고 목적 증폭산물의 양이 증가하였다(그림 2).

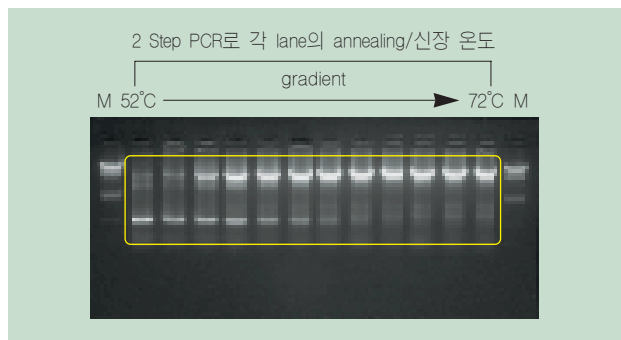


그림 2 2 Step PCR의 결과. M : λ-Hind III digest(marker)

# TaKaRa PCR System

## Thermal Cycler

TaKaRa  
PCR Thermal Cycler

**MP** TP3000

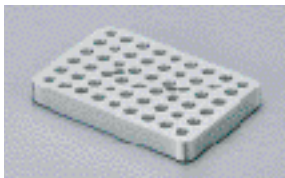


TaKaRa  
PCR Thermal Cycler

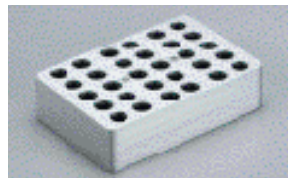
**PERSONAL** TP240



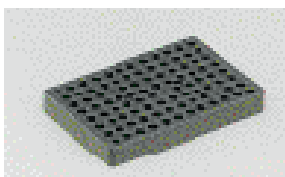
TP3000용 **부속품**  
Sample block



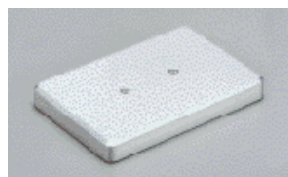
Sample Block for  
0.5 ml 54-well



Sample Block for  
1.5 ml 30-well



Sample Block for  
PCR Tube Plate



Sample Block for Slide  
Glass(in situ PCR)

TaKaRa  
PCR Thermal Cycler

**SP** TP400





# Undercarboxylated Osteocalcin 특이 항체 GluOC 4-5

Anti-Human Undercarboxylated Osteocalcin(GluOC4-5)

TaKaRa Code M171 0.1 mg

Osteocalcin(OC)은 bone Gla protein(BGP)라고도 하며  $\gamma$ -carboxyl glutamate(Gla) 잔기를 2 또는 3개를 함유하는 아미노산 49 잔기, 분자량 약 5,900의 비타민 K 의존성 칼슘 결합 단백질이다. 뼈의 유기질 성분의 90%는 collagen이고 나머지 10%가 osteocalcin, osteonectin,  $\alpha$ -HS glycoprotein, cyanoprotein, fetuin 등의 비 collagen성 단백질로 구성된다. Osteocalcin은 골아세포에서 합성된 후에 세포내에서 비타민 K 의존성 carboxylase에 의해 Gla화한다. 이 Gla화한 osteocalcin만이 뼈의 hydroxyapatite와 결합하고 뼈 기질내에 축적되어 골형성에 관여하는데, Gla 잔기가 없거나 탈탄산화한 osteocalcin(Glu-OC)은 뼈 기질과의 친화성이 낮아 혈중에 방출되어 뼈 흡수의 지표가 된다.

지금까지 undercarboxylated OC는 혈 중에서 유출하여 골 기질에 머무르지 않아 면역조직염색으로 검출하지 않았으나 최근 undercarboxylated OC에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 골아 세포가 생산하는 carboxylated 전 단계의 OC를 밝혔다.

이때 TaKaRa에서는 Undercarboxylated Osteocalcin EIA Kit(Precoated)(TaKaRa Code MK118)에 항체 plate의 성분으로 사용하는 undercarboxylated OC(비 Gla화 OC) 특이항체 GluOC4-5를 단품으로 발매하였다.

## ■ GluOC4-5 항체를 생산하는 hybridoma의 기원

Human OC의 14~30 위치의 아미노산 서열에 해당하는 합성 peptide DPLEPRREVCELNPDCD(두 개의 cysteine 잔기간에 disulfide 결합을 형성)를 KLH(carrier 단백질로 사용)에 결합시켜 BALB/c mouse에 항원으로 면역하였다. 세포 융합 후, 면역 peptide 및 bovine Glue형 OC(Gla형 OC를 가열하여 탈 탄산으로 생성)에는 반응하지만 Gla형 OC에는 반응하지 않는 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 screening하여 세포 주를 확립하였다.

## ■ GlueOC4-5항체의 특이성

Osteocalcin(OC)는 보통 골아 세포에서 생기고, 그 17, 21, 24 위치의 glutamate(Glu, E)가 비타민 K 의존성  $\gamma$ -carboxylase에 의해 Gla화 되어 골 기질에 머문다고 알려져 있다. GluOC4-5 항체는 골아 세포에 의해 생성되지만, 여러가지 이유로 calboxyl화 되지 못한 OC와, calboxyl화 되어 일단 골 기질에 머물렀지만 효소 등에 의해 탈 탄산 되어 혈중에 용출된 OC에 대해 특이적으로 반응한다. 이 GluOC4-5 항체가 인식하는 epitope는 아래에 나타낸 5종류의 합성 peptide를 사용한 상세실험으로, 주로 human Glu형 OC의 21위치 Glu(E)이며, 넓게는 24위치의 Glu에 까지 이르는 영역으로 결정되었다.

면역원*	아미노산 서열
	17 21 24
EEE	DPLEPRREVCELNPDCD
EXE	DPLEPRRXVCELNPDCD
EEX	DPLEPRREVCXLNPDCD
EXX	DPLEPRRXVCXLNPDCD
XXX	DPLXPRRXVCXLNPDCD

\* : 각 peptide에서 두 개의 cysteine(C)잔기 사이는 disulfide 결합을 하고 있다.

많은 동물 종의 OC 아미노산 서열 비교를 통하여 GluOC4-5 항체가 인간 이외의 다른 동물과도 폭넓게 교차 반응 할 것으로 예상되며, 실질적으로 EIA kit에 의한 검토결과와 면역염색결과에서 인간, 소, 토끼, 염소, 양, 돼지, 쥐, 모르모트 등에서 유래하는 OC와 교차 반응한다는 것을 확인하였다.

## ■ 실험에

오사카 대학 대학원 치학 연구과 턱구강병인병태 제어학 강좌의 Toyozwa 및 Kobayashi 박사가 실시한 각종 항 OC 항체를 사용한 쥐 경골의 면역조직염색결과를 아래에 소개하겠다. 본 실험에 사용한 항 OC 항체는 OC4-30, OCG3, GluOC4-5로, 앞의 두 개는 판매중이다.

- OC4-30 항체 (TaKaRa Code M041) : 17위치  $\gamma$ -carboxylated OC에만 반응한다.
- OCG 3 항체 (TaKaRa Code M043) : Gla, Glu 두가지 형의 OC에 반응한다. 인식하는 epitope는 21~31위치의 아미노산 잔기.
- GluOC4-5 항체 (TaKaRa Code M171) : Uncarboxylated OC 및 21위치, 24위치 Gla의  $\gamma$ -carboxyl기의 탈 탄산화 OC에 반응한다.

## 【방법】

### • 조직절편의 조제

- 재 료 : 쥐의 경골
- 조작순서\* : 1) PLP고정  
2) 10% EDTA로 탈회 4°C, 1주간  
3) Acetone 4°C, 하룻밤  
4) Acetone 실온 30분, 4회  
5) Methyl benzoic acid 실온 30분, 2회  
6) Xylene 실온 30분, 2회  
7) 파라핀 60°C 30분, 4회

- 8) 파라핀 포매
- 9) 박절

\*: step 3~9)은 AMeX 변형법(신선 동결절편에 준 한 항원성의 유지가 가능해진다.

• 면역조직 염색

- 1차 항체 : OC4-30            10,000배 희석(0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- OCG3                5,000배 희석(0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- GluOC4-5            10,000배 희석(0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

추출방법 : sABC system(DAKO사)

- 조작순서 : 1) 탈 파라핀
- 2) 비특이적 단백질의 blocking
- 3) 1차 항체 4°C, 하룻밤
- 4) Biotin 표식 2차 항체 실온 30분
- 5) 내인성 peroxidase의 blocking

- 6) Strept ABCComplex 실온 30분
- 7) DAB 반응
- 8) 대비염색(methyl green)
- 9) 탈수·투철·봉입

【결과】

실험한 3종의 항 OC monoclonal 항체는 rat 유래의 OC와 교차 반응을 하고 rat 조직에서도 사용할 수 있음을 확인하였다. Gla형 OC를 인식하는 OC4-30항체는 일부 골아 세포나 골세포와 반응하였지만 주로 골 기질에 강하게 반응하였다(그림 1의 A-D). Gla형, Glu형 OC를 인식하는 OCG3 항체는 골 기질과 함께 골아세포와 골세포에 반응하였다(그림 1의 E-H). 또 Gla화되기 전단계 OC의 21위치, 24위치의 Glu(E)잔기를 인식하는 GluOC4-5 항체는 골 기질에 반응하지 않고 특정 시기(생후 15~17일)의 골아 세포에 강하게 반응하였다.

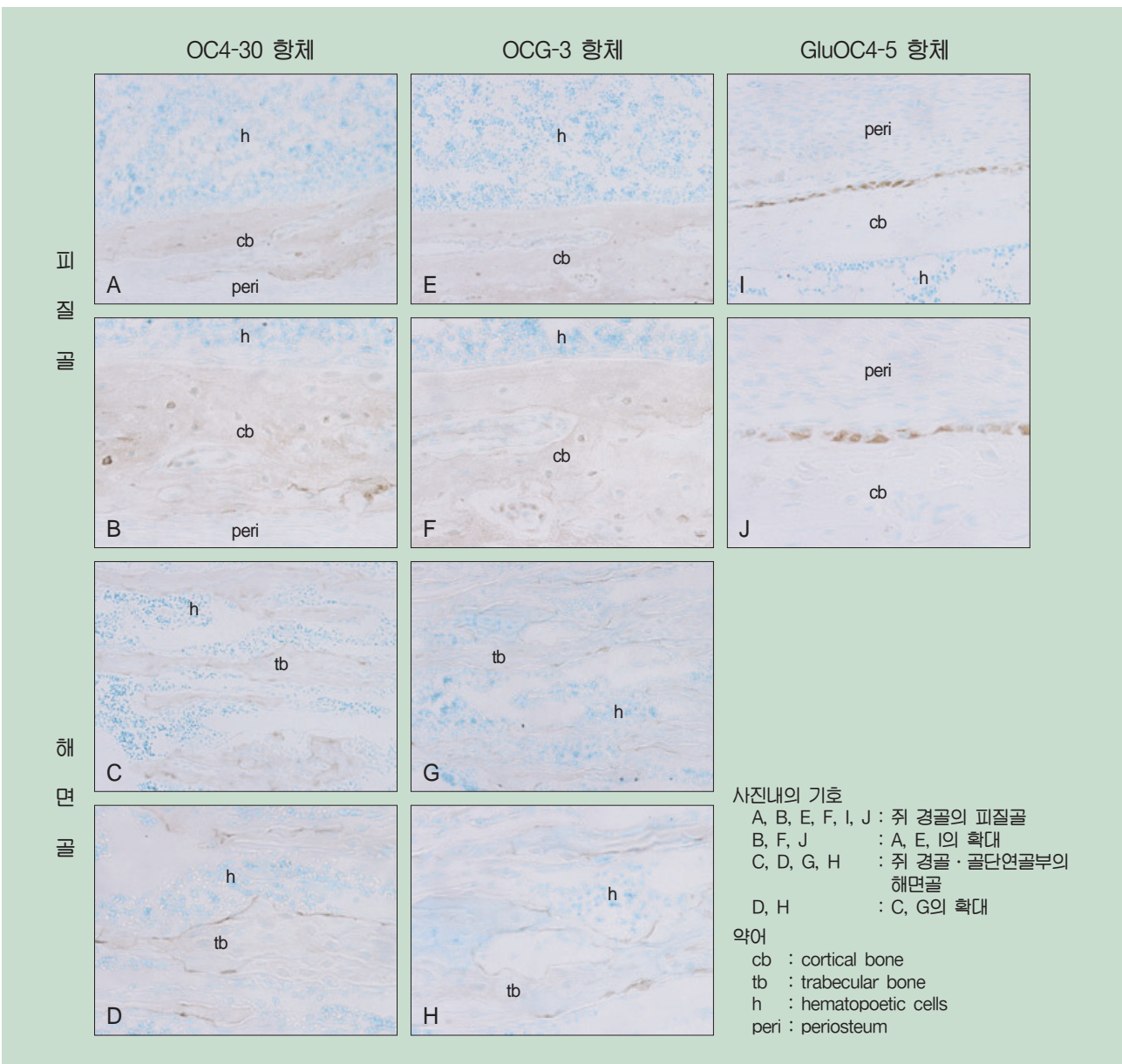


그림 1 피질골과 해면골의 면역 조직염색



## 주석산 내성산성 phosphatase 및 알칼리성 phosphatase 2중 염색 kit

# TRACP & ALP double-stain Kit

TaKaRa Code MK300

본 제품은 골아세포의 마커 효소인 알칼리성 phosphatase와 파골세포(Osteoclast)의 마커 효소인 주석산 내성산성 phosphatase의 발색 기질에 첨가하여 파골세포의 다핵화를 관찰하는 핵 염색 시약을 set로 한 골 관련 세포염색 kit이다. 골 대사는 골아세포의 골 형성과 파골세포의 골 흡수라는 상호 밸런스로 이루어지며 두 개의 마커 효소를 동시에 검출하여 골 관련 세포의 분화와 골 조직의 분포를 알 수 있다. 혈액과 세포 시료 내의 산성 및 알칼리성 phosphatase의 효소활성을 시험관 내에서 측정하는 kit는 다수 판매되고 있지만 본 kit는 세포 내의 산성 및 알칼리성 phosphatase의 활성을 동시에 측정하여 비교할 수 있는 특징이 있다. 기질이 미리 혼합되어 있어 시약조제가 매우 간단하다.

골 대사는 골 형성과 골 흡수의 상호조화로 성립되므로, 두 개의 마커효소로 동시 평가하는 것이 유용하다.

### ■ Kit의 내용

- |                                |            |
|--------------------------------|------------|
| 1. 세포 고정액 (Fixation solution)  |            |
| 60% 아세톤함유 구연산 완충액 pH5.4        | 30 ml      |
| 2. 0.5 M 주석산 나트륨 완충액 pH5.2     | 4 ml       |
| 3. 산성 phosphatase premix 기질    |            |
| (Substrate for ACP) NABP/FRVLB | 10 ml 용×3개 |
| 4. 알칼리성 phosphatase premix 기질  |            |
| (Substrate for ALP) BCIP/NBT   | 10 ml 용×3정 |
| 5. 핵 염색 시약 methyl green        | 10 ml      |

### ■ 골관련세포와 phosphatase에 대해서

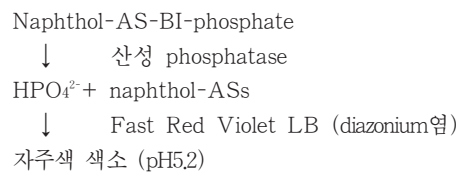
Phosphatase는 지방족·방향족 인산에스테르 작용하여 이를 가수분해하여 인산을 유리시키는 효소이다. 적정 pH가 알칼리성인 알칼리성 phosphatase와 산성인 산성 phosphatase의 두 종류가 있다.

산성 phosphatase는 전립선과 간장, 신장, 비장, 적혈구, 혈소판, 파골세포 등 생체의 여러 세포와 조직에 존재하고 있다<sup>2)</sup>. 1959년 Burstone<sup>3)</sup>은 파골세포에는 강한 산성 phosphatase, 골아세포(Osteoblast)에는 알칼리성 phosphatase 활성을 보고하였다. 골세포에 관련된 phosphatase 활성에 대한 다양한 연구 결과 파골세포의 산성 phosphatase 활성은 주석산이 존재할 경우 활성을 유지(주석산 내성산성 phosphatase, TRACP)하는 것을 알았다. 현재는 TRACP활성이 파골세포의 조건이 되고 있다. 파골세포 외에 TRACP활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 또 주석산 존재 하에서 활성을 잃는 타입은 주석산 감수성산성 phosphatase(TSACP)로 불리고 있다. 알칼리성 phosphatase는 생체 막에 결합하여 존재하는 당 단백질로 소장형, 태반형, 태반유사형, 장기비특이형 등 네 종류로 분류되어 있다. 장기비특이형으로 빼어 특이적인 isozyme은 골형 알칼리성 phosphatase라고 하며, 골아세포막에 결합하여 존재하고, 석회화 부위의 결합 형성을 방해하는 pyrophosphate을 분해하기도 하고, 유기인산 에스테르를 분해하고 무기인산 농도를 높여 골 형성을 촉진시키기도 한다. 따라서 골형 알칼리성 phosphatase는 골대사 cycle의 골형성 마커로 사용된다.

### ■ 염색원리<sup>4)</sup>

(1) 주석산 내성 및 감수성 산성 phosphatase 활성 염색의 원리<sup>1, 2)</sup>

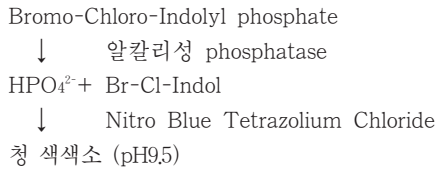
Microplate의 well이나 slide glass상에 고정한 세포를 시료로 사용한다. 두 개의 동일 유래의 시료를 준비하고 한쪽은 주석산을 첨가한 premix 기질액(NABP/FRVLB)을, 다른 쪽에는 주석산을 첨가하지 않은 premix 기질액을 첨가하여 반응한다. 전자의 경우 주석산 내성 산성 phosphatase(TRACP)활성이 검출되고 후자의 경우 주석산 내성과 감수성 전체 산성 phosphatase(TSACP)활성이 검출된다. 주석산 감수성 산성 phosphatase(TSACP)활성은 양자를 비교해 보면 알 수 있다. 각각의 경우 검출 대상의 효소가 존재하면 premix 기질액 내에 포함되는 성분에 의해 아래와 같은 반응이 일어나고 적자색의 색소를 생성한다.



파골세포와 혈액중의 hairy cell은 TRACP 활성을 가지고 있으므로 주석산을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 모두 적자색 색소가 형성된다.

**(2) 알칼리성 phosphatase 활성 염색의 원리**

Premix 기질액(BCIP/NBT)을 시료에 첨가하여 반응한다. 알칼리성 phosphatase가 존재하면 premix 기질액 내에 포함된 성분으로 아래와 같은 반응이 일어나며 청자색 색소가 생성된다.



골 관련 세포로 알칼리성 phosphatase 활성을 가지는 골아세포가 청자색으로 염색된다.

**■ 조작방법**

Kit에는 산성 및 알칼리성 phosphatase의 premix 기질이 10 ml 용 ×3개(정) 포함되어 있다. 이 3개로 24 well 배양 plate 약 5개의 염색이 가능하다. 또 2중으로 염색하는 경우 반드시 산성 phosphatase 활성을 먼저 검출한 후 알칼리성 phosphatase 기질로 바꾸어 염색을 해야 한다. 반대로 할 경우 산성 phosphatase의 일부가 실패하므로 주의한다.

**【세포 고정】**

- (A) 24 well plate로 배양한 세포  
(골수세포를 고정하는 경우를 예로 하면 아래와 같다)
  - ① 24 well plate 에 세포를 배양한다.
  - ② 배양상청을 제거하고, 멸균 PBS로 1회 세정한다.
  - ③ 세포고정액(Fixation solution)\*을 각 well에 250 μl씩 첨가하여 실온에서 5분간 방치하고 세포를 well에 고정한다.
  - ④ 멸균수를 각 well에 약 2 ml 첨가하여 well을 세정하고 상청을 제거한다. 이 단계에서는 건조하거나 -20°C 이하에서 1주간 정도 보관할 수 있다.

\* : 점부한 고정액(30 ml)으로 24 well plate 5개의 고정이 가능하다.

- (B) 96 well plate에서 배양한 세포  
24 well plate의 경우와 기본적으로 조작은 동일하며 1 well당 시약의 양을 바꿔준다. 세포 고정액\*의 양은 1 well당 50 μl, 세정에 사용하는 멸균수의 양은 250 μl가 적당하다.

\* : 점부한 고정액(30 ml)으로 96 well plate 5를 고정할 수 있다.

**【활성염색】**

산성 phosphatase 기질액 또는 알칼리성 phosphatase 기질액(멸균수에 녹여 조제)을 고정한 세포에 첨가한다. 주석산 내성산성 phosphatase 활성을 검출할 경우 산성 phosphatase 기질액 10 ml에 첨부한 0.5 M 주석산 나트륨 완충액을 1 ml 첨가한다. 첨가하는 기질액의 양은 24 well plate의 경우는 250 μl/well, 96 well plate의 경우 50 μl/well가 적당하다.

Slide glass의 경우는 적당량을 고정한 세포에 첨가한 후 건조되지 않도록 parafilm으로 덮는다.

발색시간은 세포중에 존재하는 산성 phosphatase 활성량에 의해 좌우되지만 보통 37°C에서 15분~45분 정도 염색한다.

활성 이중 염색을 실시할 경우 산성 phosphatase의 염색을 종료한 후, 반응액을 제거하고 멸균수로 세정한 다음 알칼리성 phosphatase 기질을 첨가하여 다시 염색한다.

발색시간은 세포중의 알칼리성 phosphatase 활성량에 의해 좌우되며 보통 37°C에서 15분~45분 정도 염색한다.

반응액을 제거하고 멸균수로 3회 세정하여 반응을 멈춘다. 핵염색을 하지 않을 경우, 건조를 방지하기 위하여 glycerol 용액 등을 첨가하여 관찰한다.

주의 : 활성 이중 염색 후에 methyl green으로 염색하면 식별하기 어려울 수 있으므로, methyl green을 사용하기 전에 반드시 검경한 후 사용해 주십시오.

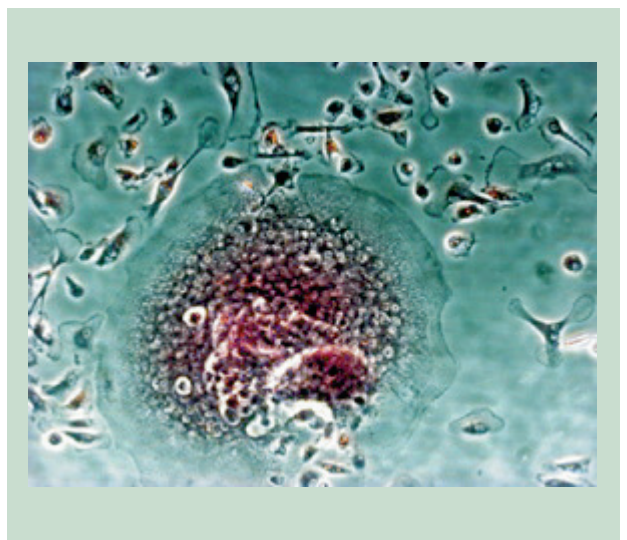
**【핵염색】**

핵염색을 할 경우 활성 염색 종료후 methyl green을 세포가 덮일 정도로 첨가하여 실온에서 5분간 염색하고 멸균수로 세정한다. 건조를 막기 위해 glycerol 용액 등을 첨가한 다음 검경한다.

**■ 실험예**

**【실시에 1】**

생후 16주 JW 토끼(수컷)에서 채취한 골수세포를 M-CSF 및 활성화형 비타민 D3의 존재하에서 배양하고 6일째에 주석산 내성산성 phosphatase 활성 염색을 하였다(그림 1).



**그림 1** 토끼 배양 골수세포의 주석산내성 산성 phosphatase 활성 염색

**【실시예 2】**

생후 24일 SD rat(암컷)에서 채취한 골수세포를 M-CSF 및 활성형 비타민 D3 존재하에서 배양하여 10일째에 알칼리성 phosphatase 활성 염색을 하였다(그림 2).

**【실시예 3】**

인간 골수유래 단핵세포(Human Bone Marrow Mononuclear Cells, TaKaRa Code PT020)를 각종 첨가인자 존재하에서 배양하고 분화세포가 된 시기(배양 9일째)에 주석산 내성산성 phosphatase 및 알칼리성 phosphatase를 활성염색 하였다(그림 3).

**【참고문헌】**

- 1) Burstone, M. S. *et al.* (1958) *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**, 601-615
- 2) Burstone, M. S. *et al.* (1958) *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**, 523-539
- 3) Burstone, M. S. (1959) *J. Histochem. Cytochem.*, **7**, 39-41
- 4) Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A LABORATORY MANUAL*, 406-407

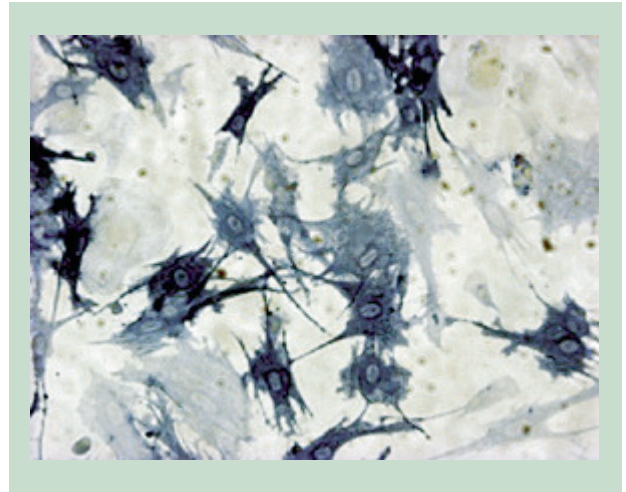


그림 2 Rat 배양 골수세포의 알칼리성 phosphatase 활성염색

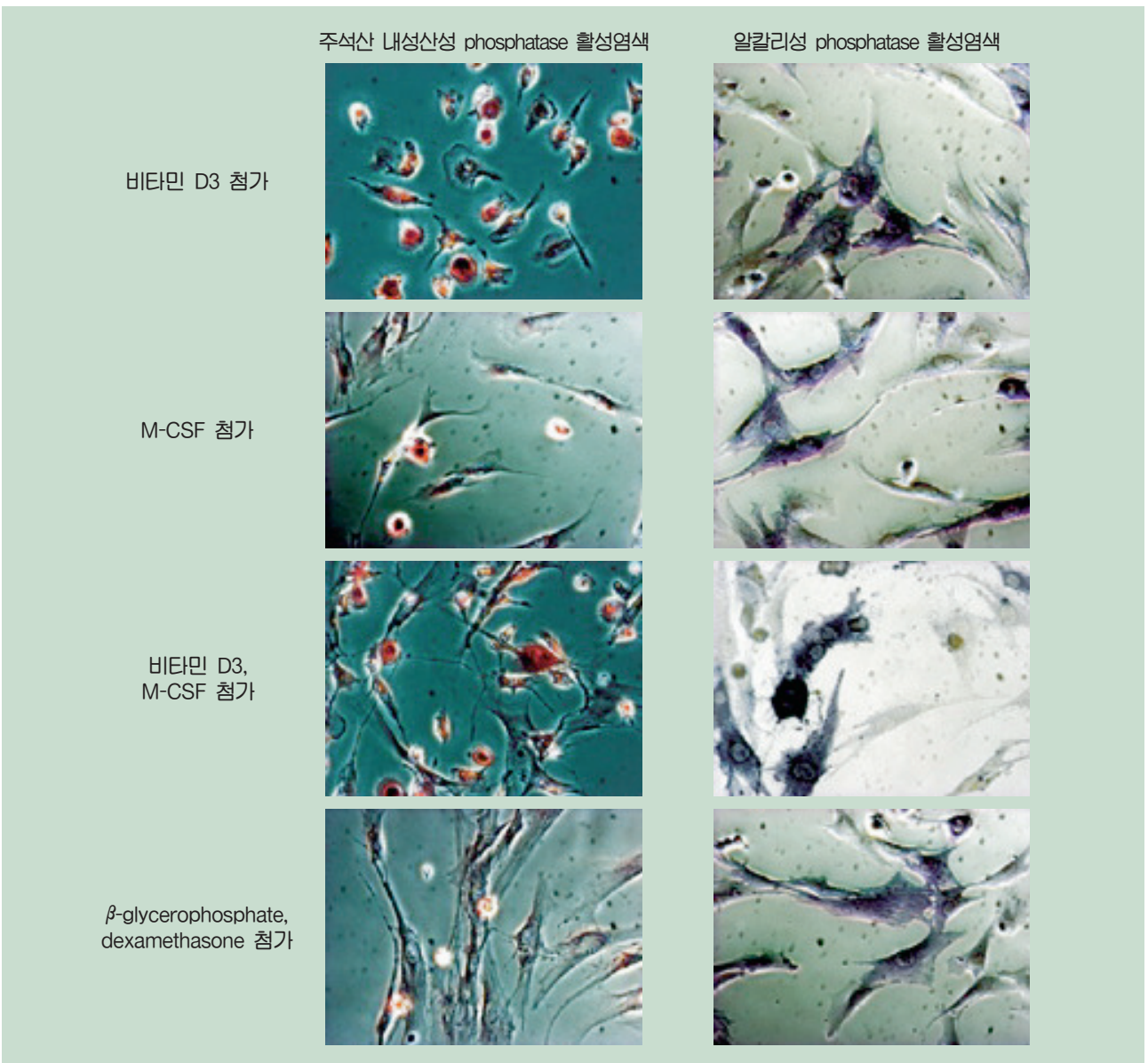


그림 3 Human 배양 골수세포의 주석산 내성산성 phosphatase 및 알칼리성 phosphatase 활성염색



# CTL 유도실험용 종양관련 항원 peptide

HER2.8(9)	TaKaRa Code SP204	0.5 mg
HER2.63(9)	TaKaRa Code SP205	0.5 mg
MAGE2.156(9)	TaKaRa Code SP206	0.5 mg
FluNP.38(10)	TaKaRa Code SP207	1 mg

TaKaRa에서는 4종류의 CTL 유도실험용 HLA-A24 결합성 항원 peptide(HER2.8(9), HER2.63(9), MAGE2.156(9), FluNP.38(10))을 신발매하였다. HLA-A24 결합성 항원 peptide는 기존의 3종(MAGE1.143(9), MAGE3.195(9), CEA652(9))과 더불어 총 7가지이다. 이들 4종의 새로운 항원 peptide는 모두 학회 및 논문에 보고된 peptide로, 기존 제품과 같이 고도의 품질관리(순도, endotoxin 실험)를 하여 CTL유도 해석실험에 적합하다. CTL유도의 실험 및 논문에 보고된 MAGE3유래 HLA-A24 결합성 항원 peptide의 임상 효과에 대해서 소개한다.

## ■ 서론

최근 골수이식이나 유전자 치료 등 자기세포나 동종 세포를 이용하는 치료법이 주목받고 있다. 암의 면역요법도 세포를 이용한 치료법의 하나로 기대되고 있다. 암의 면역요법은 T 세포가 인식하는 MHC 결합성 항원 peptide의 동정이 중요한 과제이다.

1991년에 melanoma 항원이 발견된 후 T세포 특히 killer T세포(CTL)에 인식되는 종양관련 항원 단백질과 바이러스 단백질에서 유래한 항원 peptide가 많이 동정되고 있다. 60% 이상의 일본인에게 발현되는 HLA-A24 결합 항원 peptide(MAGE1~MAGE3, CEA, HER2/neu, Tyrosinase, SART 등)의 동정도 활발히 진행되고 있다. HLA-A24 결합성 항원 peptide를 이용한 항원 특이적 CTL 유도실험 및 CTL 해석실험에 대한 관심이 높아짐과 동시에 임상적으로 응용이 검토되고 있다.

새로운 CTL 유도용 HLA-A24 결합성 항원 peptide는 ① 유방암, 폐암, 위암 등에서 과잉 발현된다고 밝혀진 HER2/neu 유래 항원 peptide 2종류(HER2.8(9), HER2.63(9)) ② 종양거절 항원으로 처음 발견된 MAGE family로 종양조직에서 높은 발현빈도를 나타내는 MAGE2(MAGE2.156(9))(MAGE1, MAGE3는 이미 발매) ③ 지금까지 CTL epitope 동정용 peptide set에 positive control peptide로 첨부된 influenza virus nucleoprotein 유래 HLA-A24 결합성 peptide(FluNP.38(10))이다.

## ■ MAGE3 유래 HLA-A24 결합성 항원 peptide의 임상응용보고

주된 항원제시세포로 주목받고 있는 수상세포(DC)를 MAGE3 유래 항원 peptide로 pulse처리하고, 이 DC를 HLA-A24를 발현하고 있는 방광암 환자에게 투여한 결과가 최근 보고 되었다<sup>1)</sup>. MAGE3 유래 HLA-A24 결합성 항원 peptide(IMPKAGLLI)\*는 F. Tanaka<sup>2)</sup> 등에 의해 MAGE3 특이적 CTL 유도가 가능한 peptide로 동정되어 이를 이용한 임상연구를 발표하였다.

Nishiyama<sup>1)</sup> 등은 HLA-A24를 발현하는 방광암 환자(4례)의 자기 DC에 이 MAGE3 유래항원 peptide를 결합시켜 이를 환자에게 투여한 후 효과를 비교하였다. 우선 환자의 말초혈 단핵구(PBMC)에서 monocyte를 분리한 후 GM-CSF 및 IL-4 존재 하에서 7일간 배양하여 자기 DC를 유도하였다. 다음에 이 DC를 MAGE3 유래항원 peptide와 함께 배양한 후  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$  개/회를 환자에게 피하 투여하고, 2주 간격으로 투여하여 6회에서 최대 18회까지 투여하였다. 그 결과 4명 중 3명에서 분명한 림프구 이동이 축소되고(또는) 간전이 축소를 확인하였다(표 1). 4명 모두 심각한 부작용은 확인되지 않았다. 또 항원 peptide 결합 DC로 환자 PBMC에 peptide 특이적 CTL유도가 *in vitro* 실험에서 확인되었다. 이 결과로 MAGE3 유래 HLA-A24 결합성 항원 peptide를 사용한 면역요법은 HLA-A24를 발현하는 암환자에 임상효과가 확인되었다.

## ■ 항원 peptide를 사용한 CTL 유도 예

지금까지 다양한 CTL 유도법이 보고되고 있다. Life Science & Biotechnology에서도 ① Recall에 의해 PBMC에서 CTL을 유도하는 방법(Life Science & Biotechnology 9호, 40) ② SAC-I(*Staphylococcus aureus* Cowan-I) 존재 하에서 배양한 PBMC를 항원제시세포(APC)로 사용하는 방법(Life Science & Biotechnology 8호, 10) ③ GM-CSF 및 IL-4 존재 하에서 PBMC에서 유도한 DC를 APC로서 사용하는 방법(Life Science & Biotechnology 9호, 41) ④ PBMC를 Keyhole limpet hemocyanin(KLH) 및 IL-7 존재 하에서 배양하여 CTL을 유도하는 방법(Life Science & Biotechnology 9호, 40)을 소개하였다. 새로운 4종류의 항원 peptide(MAGE2.156(9)<sup>3)</sup>, HER2.8(9)<sup>4)</sup>, HER2.63(9)<sup>3)</sup>, FluNP.38(10))은 위 4가지 방법으로 종양관련 항원양성의 종양 세포주를 상해하는 peptide 특이적 CTL 유도작용을 확인하였으며 이는 여러 학회에서 보고한 바 있다.



표 1 암환자(HLA-A24<sup>+</sup>, MAGE3<sup>+</sup>)에 DC 백신 투여효과

Patient	Site of tumors	No. of DC vaccinations	Clinical response
A	Right inguinal LN <sup>a)</sup> Para-aorta LN Right external iliac LN	6	Complete response <sup>b)</sup>
B	Iliac LN Para-aorta LN Liver Brain <sup>c)</sup>	18	Partial response of para-aorta LN and Complete response of liver metastasis overall progression
C	Bilateral inguinal LN Perineum	6	Partial response
D	Local recurrence Pleural dissemination	6	Progressive disease

a) LN, lymph node; b) Determined by autopsy; c) Solitary brain metastasis developed 6 months after the DC vaccination and was surgically removed. [참고문헌 10에서 발췌]

본 고에서는 각각의 항원 peptide를 사용하여 다양한 방법으로 CTL을 유도한 후 CTL 특이적 세포 상해성을 조사한 결과를 소개한다.

MAGE2.156(9) : 그림 1은 KLH 및 IL-7로 유도한 CTL 특이적 세포 상해성 실험 결과이다.

HER2.8(9) : 그림 2는 DC를 APC로 유도한 CTL 특이적 세포 상해성 실험 결과이다.

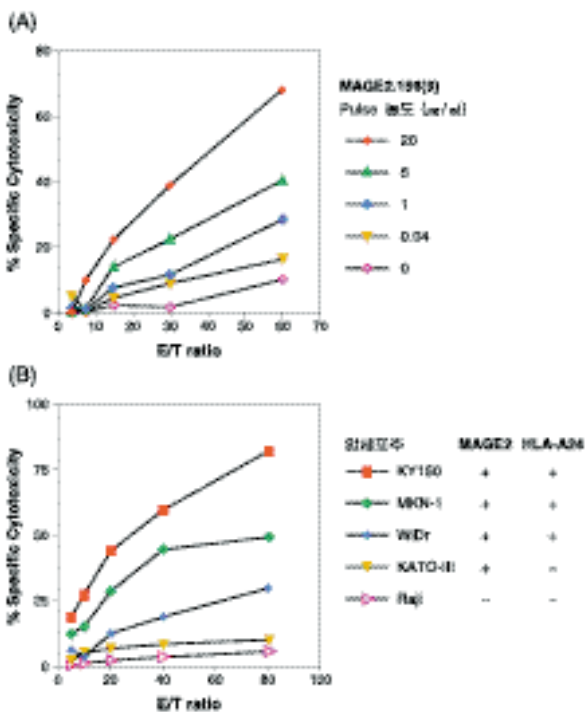


그림 1 MAGE2.156(9)으로 유도한 CTL 세포 상해성<sup>3)</sup>

(A) Peptide pulse · 목적세포에 대한 세포 상해성  
(B) 암세포주에 대한 세포 상해성

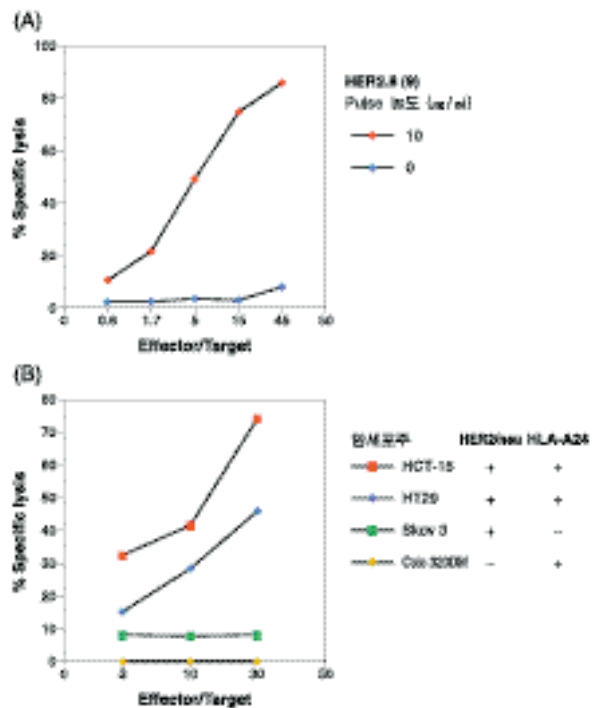


그림 2 HER2.8(9)로 유도한 CTL 세포 상해성<sup>4)</sup>

(A) Peptide pulse · 목적세포에 대한 세포 상해성  
(B) 암세포주에 대한 세포 상해성

FluNP.38(10) : Recall법으로 유도한 CTL 세포 상해성 실험 결과는 (Life Science & Biotechnology 9호, 41)를 참조해 주십시오.

HER2.63(9) : HLA-A24와 동일한 MHC 결합 motive를 가지며 mouse에서 CTL을 유도한 peptide로 사람의 HER2/neu 암기노산 서열에서 동정된 항원 peptide로 높은 HLA-A24 결합능력을 가지고 있다.

이들은 모두 학회 및 논문으로 보고 되었으며 CTL의 유도 해석실험에 적합한 고품질(순도 95%이상(HPLC법), endotoxin 실험완료)의 peptide이다.

■ 결론

TaKaRa에서는 CTL 유도실험용 HLA-A24 결합성 항원 peptide 외에도 신규 HLA-A24 항원 peptide를 동정하기 위한 "CTL epitope 동정용 peptide set" MAGE3(HLA-A24), CEA(HLA-A24), HER2/neu(HLA-A24)도 공급하고 있다. 또 이외의 서열의 peptide가 필요한 경우는 합성수탁(문의: 기술지원팀 02-577-2002, support@takara.co.kr)을 이용할 수 있다. CTL 유도에 사용하는 배지와 혈청, 세포배양용 시약류, 배양세포도 취급하고 있다.

\*: MAGE3 유래 HLA-A24 결합성 항원 peptide(IMPKAGLLI)는 CTL 유도실험용 종양관련 항원 peptide MAGE3.195(9)와 동일한 아미노산 서열이다.

【참고문헌】

- 1) Nishiyama, T. et al. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**, 23.
- 2) Tanaka, F. et al. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4465.
- 3) Tahara, K. et al.(1999) *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2236.
- 4) Tanaka, H. et al.(2001) *British J. Cancer*, **84**, 94.
- 5) Okugawa, T. et al.(2000) *Eur. J. Immunol.*, **30**, 338.

【관련제품】

제품명	TaKaRa Code	포장량
<b>CTL유도실험용 종양관련 항원 peptide</b>		
MAGE1.135 (9) (HLA-A24)	SP201	0.5 mg
MAGE3.195 (9) (HLA-A24)	SP202	0.5 mg
CEA.652 (9) (HLA-A24)	SP203	0.5 mg
HER2.8 (9) (HLA-A24)	SP204	0.5 mg
HER2.63 (9) (HLA-A24)	SP205	0.5 mg
MAGE2.156 (9) (HLA-A24)	SP206	0.5 mg
FluNP.38 (10) (HLA-A24)	SP207	1.0 mg
<b>CTL epitope 동정용 peptide set</b>		
종양항원 MAGE3 (HLA-A24)	SP101	9종 (각 1 mg)
종양항원 CEA (HLA-A24)	SP102	10종 (각 1 mg)
종양항원 HER2/neu (HLA-A24)	SP103	10종 (각 1 mg)

Bio21 인터넷 쇼핑몰

인터넷으로 제품구매도 하고 사은품도 듬뿍!  
쓰면 쓸수록 유용한 Bio21 마일리지

마일리지 포인트별 사은품

- 20,000 - 헤어드라이기, 미니전화기 등
- 50,000 - 커피메이커, 미니 청소기, 플라로이드 카메라 등
- 100,000 - 포터블 카세트 플레이어, 상품권
- 200,000 - 자동카메라, 청소기, 워크맨, 휴대용 CD-Player, 식기건조기, 전자레인지, MP3 Player, 20만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
- 300,000 - 오디오, TV, 소형냉장고, Sony VTR, 자동응답전화기(900Mz), 30만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
- 500,000 - (2001년 7월 새롭게 추가된 사은품)  
DVD Player, Laser Printer, 디지털 카메라, TV, 팩시밀리, 50만원 상당의 TaKaRa 제품교환권

- 인터넷 쇼핑몰은 Bio21회원 전용 쇼핑몰입니다.
- 지금 바로 가입 하시면 다양한 정보를 받으실 수 있습니다.

마일리지 1000점

# RNA의 취급방법

분자생물학 실험에서 RNA는 DNA chip으로 유전자 발현해석, RT-PCR, cDNA library 제작, northern blotting 등 많은 분야에 광범위하게 사용된다. 그러나 RNA는 매우 불안정하고 실험자의 땀이나 타액에 포함되어 있는 RNase나 다른 시약으로부터 RNase가 혼입하여 쉽게 분해되는 문제가 있어 RNA를 취급할때 세심한 주의가 필요하다.

본 고에서는 RNA 취급시 주의사항 및 DNA chip 분석 등에 이용하는 RNA 시료의 제조방법에 대하여 소개한다.

## ■ RNA 취급시 준비 및 주의점

1. RNA의 조제나 분석에 사용하는 시약은 다른 시약과는 별도로 보존해야 한다.
2. 작업 중에는 불필요한 이야기는 피하고, 마스크와 청결한 일회용 플라스틱 장갑을 착용하며 RNA 전용 실험대를 사용하는 등 세심한 배려가 필요하다.
3. RNA의 조제나 분석에 사용하는 시약 용액은 모두 0.1% DEPC 처리수를 사용하여 조제하고, autoclave 후 사용한다. Autoclave 할 수 없는 시약이 함유된 경우에는 미리 멸균조작을 한 기구와 물을 사용하여 용액을 조제하고 여과 멸균(filtering)하여 사용해야 한다.

\* : 0.1% DEPC 처리수의 조제방법  
Diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 증류수에 0.1%(v/v) 첨가하여 stirrer로 교반하면서 실온에서 하룻밤(또는 37°C에서 12시간)방치한 후, 120°C에서 30분간 autoclave하여 DEPC를 완전히 제거한다.

주의 : DEPC는 RNase 저해제 단백질의 화학수식제로서 사용되는 시약이지만 발암성이 있으므로 취급시 주의한다.

4. 시판되는 일회용 멸균 플라스틱 기구는 보통 RNase free로 실험에 그대로 사용해도 무방하나, 일반적인 microcentrifuge tube와 micro pipet용 tip은 autoclave한 후에 사용해야 한다. 유리기구, spatula 등을 사용할 경우 180°C에서 최소 1시간 이상 건열 멸균한다. 건열멸균할 수 없는 것은 0.1% DEPC 용액 중에 담가 실온에서 하룻밤 (또는 37°C에서 12시간) 정도 지난 후, autoclave하여 사용한다.

## ■ RNA 시료의 조제방법

많은 실험에서 고순도 RNA 시료를 요구한다. 특히 DNA chip 해석에 사용하는 경우에는 다당이나 단백질 등 불순물이 존재하면 표식반응이 저해되거나 hybridization시 비특이적인 signal이 생겨 background가 높아질 가능성이 있다. 또 genome DNA의 혼입을 방지해야 한다.

조직과 세포에서 RNA는 시료채취 후 바로 추출해야 하며 불가능한 경우는 사용시까지 -80°C 혹은 액체질소에 시료를 보존해야 한다.

조직보존용 시약 RNAlater™(TaKaRa Code AB001)은 세포내의 RNA를 안정하게 보존하기 위한 시약이다. 조직을 채취한 후 이 용액에 보존하면 RNA의 질과 양의 손실 없이 안정적으로 RNA를 보존할 수 있다. 서둘러 시료를 처리하거나 동결 보존할 필요가 없어 매우 편리하다.

### (1) Total RNA의 조제

염화세슘 밀도 기울기 원심법이나 Guanidine thiocyanate phenol chloroform법(AGPC법) 또는 시판되는 RNA 분리 정제용 시약을 사용한다.

EASYPrep RNA(TaKaRa Code 9095)는 동물과 식물 혹은 배양세포에서 고순도 Total RNA를 추출하는 시약으로 변성제와 RNase 저해제가 독자적인 비율로 혼합되어 있어 다당, 지방산, 단백질, RNase가 많은 조직에서도 고효율로 RNA를 추출할 수 있다(그림 1 참조).

### (2) Poly(A)<sup>+</sup> RNA의 정제

Poly(A)<sup>+</sup> RNA는 Oligo(dT) Cellulose 등을 사용하여 Total RNA로부터 분리하는 방법이 일반적이다. Oligotex™-dT30(Super)은 라텍스입자에 Oligo(dT) 30의 5' 말단을 공유 결합하여 고정된 시약으로, Poly(A)<sup>+</sup> RNA와 고효율로 결합하여 원심분리 조작으로 입자를 회수하여 신속하게 고순도의 Poly(A)<sup>+</sup> RNA를 회수할 수 있다.

## ■ RNA의 순도와 농도 측정

대부분의 경우 실험결과는 사용하는 RNA의 순도에 의해 크게 좌우하므로 사용 전에 반드시 RNA의 순도검정을 해야한다.

## (1) 전기영동에 의한 Total RNA의 순도검정

Total RNA 1~2  $\mu\text{g}$ 를 열변성(65°C, 10분)하여 1% agarose gel(TBE buffer)에 전기 영동한다. 분해가 되지 않은 total RNA는 2개의 ribosomal RNA(진핵세포 : 28S와 18S, 원핵세포 : 23S와 16S)의 선명 band가 약 2:1의 비율로 보이며 ribosomal RNA의 band가 퍼져있는 경우에는 RNase의 혼입으로 RNA가 분해되었을 가능성이 크다. 또 28S(또는 23S) band보다 분자량이 큰 band가 있는 경우는 genome DNA의 혼입을 생각할 수 있으므로 DNase I(RNase-free)(TaKaRa Code 2215A/B)을 처리하여 genome DNA를 제거해야 한다.

## (2) 흡광도에 의한 Total RNA 및 Poly(A)<sup>+</sup> RNA의 순도검정과 정량

Total RNA(혹은 Poly(A)<sup>+</sup> RNA)의 순도와 농도 계산을 위해 260 nm 및 280 nm의 흡광도를 측정한다.

$A_{260}/A_{280}$ 의 비가 1.8~2.1이면 단백질의 혼입이 적고 고순도의 RNA 시료이며  $A_{260}/A_{280}$ 의 비가 1.7 이하인 경우는 DNA chip 실험에 사용할 수 없다.

RNA 농도는  $A_{260}=1$  을 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 계산한다.

예) RNA 시료 양 : 100  $\mu\text{l}$

50배 희석한 시료(10  $\mu\text{l}$  RNA 시료 + 490  $\mu\text{l}$  TE Buffer)의 흡광도 :  $A_{260}=0.65$ 일 경우

$$\begin{aligned} \text{RNA 농도} &= 40 \mu\text{g}/\text{ml} \times A_{260} \times \text{희석율} \\ &= 40 \times 0.65 \times 50 \\ &= 1300 \mu\text{g}/\text{ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Total RNA 양} &= \text{농도} \times \text{시료량}(\text{ml}) \\ &= 1300 \times 0.1 \\ &= 130 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Total RNA나 mRNA의 검정은 핵산 전기영동과 해석을 전자등 검출장치를 이용하면 보다 정확하게 산출할 수 있다.

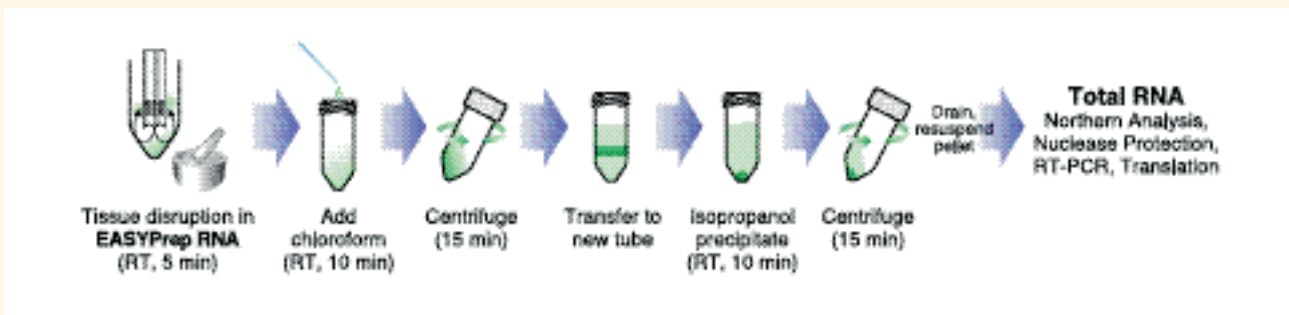


그림 1 EASYPrep RNA를 사용한 Total RNA의 분리조작

## TaKaRa RNA 관련 신제품

### ■ RNase Remover (TaKaRa Code 9038 250 ml)

RNase Remover는 glass기구를 건열살균이나, DEPC를 사용하지 않고 RNase를 제거할 수 있는 시약이다.

- 특징 - Glass기구 및 플라스틱 표면, 피펫, Gel 전기영동기구 등 RNase 제거에 유용하다.
- Spray타입으로 사용할 수 있다.
- 고농도 RNase의 제거에 유용하다.



### ■ RNA Preparation Water (TaKaRa Code 9011 1 L)

- DEPC 처리를 하지 않은 RNase-free water이다.
- RNA시료의 용해와 RNA 정제용 시약의 조제 등에 그대로 사용할 수 있다.