

# Pyriithiamine 내성 형질전환시스템의 유용성 검토

pPTR I (TaKaRa Code 3621) 및 pPTR II (TaKaRa Code 3622)는, *A. oryzae* 유래 pyriithiamine(PT) 내성유전자 *ptrA*<sup>1)</sup>를 선택 마커로 하는 *A. oryzae* 등 *Aspergillus*속 진균을 숙주로 하는 사상균·대장균 형질전환용 shuttle vector이다. Thiamin analog PT 함유배지에서 형질전환체를 선택할 수 있다. PT에 감수성(표1)인 균주로 protoplast 조제가 비교적 용이한 사상균 *A. kawachii*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma reesei*에서 형질전환체를 얻었으며<sup>2)</sup>, 이 시스템의 범용성에 대해 간단히 소개한다.

표 1 각 사상균의 PT에 대한 MIC

Strains	PT conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	0	0.05	0.1	0.5	1	10
<i>A. oryzae</i> RIB128	+	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i> IAM2561	+	±	-	-	-	-
<i>A. kawachii</i> IFO4308	+	±	-	-	-	-
<i>A. shirousamii</i> RIB2502	+	-	-	-	-	-
<i>A. sojae</i> RIB1045	+	±	-	-	-	-
<i>A. tamarii</i> IAM 2561	+	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> IFO 30537	+	-	-	-	-	-
<i>A. parasiticus</i> IAM13888	+	-	-	-	-	-
<i>A. nidulans</i> A89	+	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i> IFO 30537	+	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> TIMM 2726	+	-	-	-	-	-
<i>Monascus anka</i> RIB5202	+	±	-	-	-	-
<i>Trichoderma reesei</i> IFO31326	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i> IFO7784	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium solani</i> IFO9425	+	+	+	+	+	+

+: 생육; ±: 균사부분의 신장 있음; -: 생육하지 않음  
 최소배지에서 배양한 각 균주에서 분생자를 회수하여, 그것을 PT(0~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )점가 최소재배에 접종하였다. 30°C에서 7일간 배양한 후, 각 균주의 생육을 관찰하였다.

## ■ 실험1 : pPTR I 및 II에 의한 형질전환효율

### 【방법】

pPTR I (염색체 조합형)과 II (자율복제형)을 protoplast-PEG법<sup>3)</sup>으로 *A. kawachii*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma reesei*에 도입하였다. 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PT를 함유한 Czapeck-Dox(CD) 최소재배를 선택배지로 사용하였다(*T. reesei*만 top agar에 0.02% casamino acid를 첨가). 30°C에서 7~10일간 배양한 후, 선택배지 상에 생성된 colony를 관찰했다.

### 【결과】

각 균주의 형질전환 효율을 표 2에 나타내었다.

표 2 각 균주의 형질전환 효율(colony수/ $\mu\text{g}$  plasmid DNA)

균주	plasmid	
	pPTR I	pPTR II
<i>A. nidulans</i> A89	76	1878
<i>A. oryzae</i> RIB128	6.6	344
<i>A. kawachii</i> IFO4308	0.8	65
<i>A. terreus</i> IFO30537	0.8	100
<i>A. fumigatus</i> TIMM2726	0.6	42
<i>Trichoderma reesei</i> IFO31326	8	490

## ■ 실험2 : pPTR II vector를 사용한 GUS ( $\beta$ -glucuronidase) report 유전자의 도입 및 발현

### 【방법】

*A. oryzae glaA* promoter-*E. coli uidA*(GUS유전자를 코딩)-*A. oryzae amyB* terminator에서 형성되는 chimera 유전자<sup>4)</sup>를 pPTR II에 삽입한 pPTR II-GUS를 제작하여(A)*A. kawachii*, (B)*A. fumigatus*에 형질전환하였다. 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PT, 0.8 M NaCl을 포함한 CD 최소재배를 선택배지로 사용하였다. 생성된 형질전환체 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PT, 1% dextrin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  X-gluc, 0.3% Triton X를 포함한 CD 최소배지(발현배지)에서, 5~15일간 배양한 후, GUS 단백질 발현에 의해 청색 발색 유무를 관찰하였다.

### 【결과】

*A. kawachii*, *A. fumigatus*에서 형질전환체를 얻어 발현배지에서 GUS 단백질 발현에 의한 청색 발색을 확인하였다(그림1).

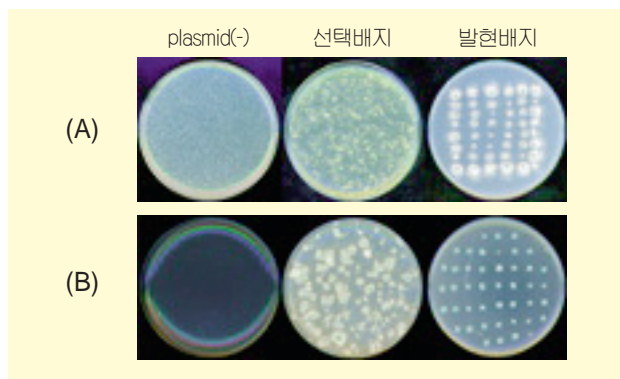


그림 1 형질 전환체의 선택과 GUS 단백질의 발현

(A) *A. kawachii*; (B) *A. fumigatus*

## 【참고문헌】

- 1) Kubodera, T. et al. (2000) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64** (7), 1416-1421.
- 2) Kubodera, T. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (submitted)
- 3) *Life Science & Biotechnology* (2000) **16**, 34-35
- 4) Hata, Y. et al. (1992) *Curr. Genet.*, **22** (2), 85-91.

# 형광편광도측정법을 이용한 Glucocorticoid Receptor 결합실험

**FLUPOLO™**

**Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit**

TaKaRa Code TE 100 1대

TaKaRa Code V2816 100 assays

PanVera사 제품입니다.

TaKaRa에서는 생물간 상호작용을 광범위하게 측정하기에 가장 적합한 형광편광도 측정 mult plate reader (*FLUPOLO™*)을 판매중이다. Plate 상에서 형광편광도를 측정할 수 있어 다수의 시료를 동시에 측정할 수 있는 장점이 있다.

또 형광편광도 측정법(*FLUPOLO™*나 Full-Range BEACON® 2000을 사용)으로 각종 receptor에 결합하는 물질을 assay하는 kit도 판매하고 있다. 즉 FP Screen-for-Competitors Kit, ER- $\alpha$  및 ER- $\beta$ 는 환경호르몬 물질의 screening 등에(Life Science & Biotechnology 17호, 32; Life Science & Biotechnology 18호, 55), Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit는 새로운 Glucocorticoid Receptor(GR) 결합물질의 screening이나 steroid 생화학연구등에(Life Science & Biotechnology 18호, 55), Progesterone Receptor Competitor Assay Kit은 신규 Progesterone Receptor 결합 물질의 screening 등에 사용할 수 있다.

본 고에서는 Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit 와 (*FLUPOLO™*)을 이용하여 GR에 대한 dexamethasone 및 17 $\beta$ -estradiol의 친화성(EC50)을 측정하였다.

## ■ 실험에 : GR에 대한 dexamethasone (DEX) 와 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)의 친화성 측정

Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit를 사용하여 GR에 높은 친화성을 가지는 DEX와 친화성이 낮은 E<sub>2</sub>를 테스트시료로 GR에 대한 친화성(EC<sub>50</sub>)을 측정하였다.

Fluorescent glucocorticoid(Fluormone GS1)와 GR의 결합에 대한 테스트 화합물의 경쟁해작용을 *FLUPOLO™*을 사용하여 형광편광도의 변화로 측정하였다(Life Science & Biotechnology 16호, 42, 측정원리 그림 참조). DEX : 10, 1  $\mu$ mol, 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0.1 nmol; E<sub>2</sub> : 100, 50, 10, 5, 2.5, 1  $\mu$ mol, 500, 100, 10 nmol의 각 용액 1  $\mu$ 를 49  $\mu$ 의 GR Screening Buffer( $\times 1$ )에 첨가하여 vortex mixer로 혼합한다. 각각에 4 nM의 fluormone GS1을 25  $\mu$ , 16 nM의 GR을 25  $\mu$  첨가하여 원심분리한다. 이때 vortex mixer로 너무 강하게 혼합하지 않도록 주의한다(혼합은 spin down 정도로 충분함). 차광한 실온(25 $^{\circ}$ C 정도)에서 1시간 방치하여 결합 반응을 한다.

표준 방법으로 *FLUPOLO™*을 set up 하였다. *FLUPOLO™*은 TakaraFluor2(자가형광의 유무에 관계없이 적용 가능)와 *XFLUOR4*(시료가 자가형광을 가지지 않는 경우에 적용)의 두 개 프로그램을 이용할 수 있지만, 본 실험에서 측정된 시료(DEX 및 E<sub>2</sub>)는 자가형광을 가지지 않아 양쪽 다 측정이 가능하나 본 고에서는 *XFLUOR4*을 이용하였다.

측정용 plate는 COSTOR3694 EIA/RIA PLATE, Solid Black 96 Well(Corning Inc.)를 사용하였다. Blank는 75  $\mu$ l의 GR Screening Buffer( $\times 1$ )와 25  $\mu$ l의 16 nM GR을 혼합하여 사용하였다. 1 시간 방치한 반응액을 96 well plate에 옮기고 Ex. 485 nm, Em. 535 nm, Number of Flashes 20, Gain(Manual)149, G-Factor 0.893958(1 nM FITC/0.01 N NaOH)의 조건에서 측정하여 GlaphPad PRISM™소프트웨어(TaKaRa Code GP100)를 사용하여 해석하였다(그림 1).

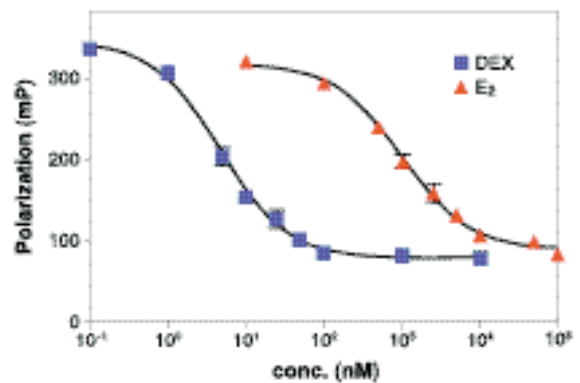


그림 1 GR에 대한 DEX 와 E<sub>2</sub>의 친화성 측정

## ■ 결과

그림 1의 결과에서 DEX 및 E<sub>2</sub>의 EC<sub>50</sub>값은 DEX : 4.66 nM, E<sub>2</sub> : 998.4 nM로 과거의 문헌에 보고된 값과 유사했다.<sup>2)</sup>

## 【참고문헌】

- 1) Mulatero, P. et al.(1997) *Hypertension*, **30**, 1274-1278.
- 2) Hogger, P. and Rohdewald, P.(1997) *Steroids*, **59**, 597-602.

# 항 Catenin antibody를 이용한 면역조직염색

Catenin은 세포 접착 분자인 cadherin의 세포질영역에 결합하고 있어 cadherin-β-catenin-α-catenin 복합체를 형성한다. Catenin은 cadherin 기능에 필수적이고, cadherin과 복합체를 형성하여, cadherin을 도와주는 단백질로 동물의 형태형성이나 조직 구축, 유지에 관여하고 또 세포 골격체의 상호작용에 중요한 역할을 한다.

최근 catenin은 다음과 같은 분야에서 활발히 연구되고 있다. ① 높은 전이성·침투성을 가진 암세포에서 α-catenin이 높은 빈도로 결실되거나 감소한다. ② 핵 내에서 β-catenin은 Lef/TCF(lymphoid enhancer binding factor, Lef; T-cell-specific factor, TCF) family로 불리는 DNA 결합 단백질과 복합체를 형성하여 목적 유전자의 전사활성을 조절한다. ③ Receptor type의 tyrosine phosphatase가 β-catenin과 결합하고 있다. ④ β-catenin은 암억제유전자 APC(adenomatous polyposis coli)의 산물과 결합해 그 발현이 정상적인 APC산물에 의해 조절되고 있다. ⑤ β-catenin은 importin β와 유사하며 핵막을 통과할 수 있는 분자로, 세포외 signal의 하나인 Wnt signal 전달계에 관여하여 핵내에서 기능한다.

## ■ Catenin

α-catenin은 906 아미노산(분자량 102 kDa)으로 이루어져 있으며, 분자의 N 말단, 중앙부, C 말단에서 vinculin과 30% 전후의 상동성을 가지고 있다. α-catenin은 cadherin-β-catenin 복합체와 actin 세포골격을 연결하는 기능을 갖고 있어 cadherin은 강한 세포간 접착분자로 작용한다. α-catenin은 성체의 중추신경계 이외 세포간 접착성을 가진 거의 모든 세포에 분포하고 있다. 또한 α-catenin 유전자는 인간염색체에서는 5q23에 위치하고 있으며 16개 이상의 exon으로 구성되어 있다.

한편 β-catenin은 781 아미노산(분자량 90 kDa전후)으로 이루어져 있으며 세포질인자인 procoglobin과 63%의 상동성을 가지며, 분자 중앙의 약 560 아미노산 영역에는, armadillo(ARM)repeat로 불리는, 42 아미노산으로 형성된 반복 unit(소수성 아미노산이 많고, 각 unit간 상동성은 낮다)가 13개 나열되어 있다. 이 영역은 cadherin의 세포질 영역과의 결합에 관여하며, N말단 영역은 α-catenin과의 결합에 관여한다. β-catenin은 cadherin과 α-catenin과의 결합을 증가하여 cadherin의 접착성을 억제하는 역할을 하고 있어 형태형성에 관여하는 signal 전달분자로 불리며 β-catenin유전자는 사람염색체 3q21에 위치하고 있다.

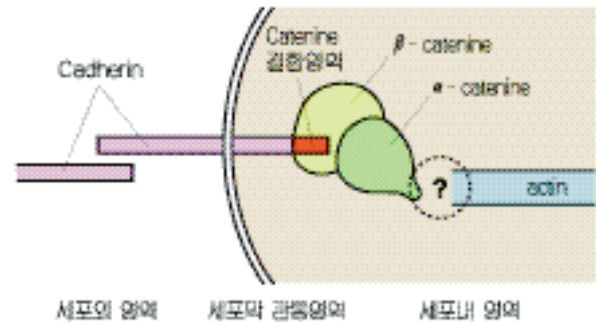


그림 1

## ■ 실험예

1차 항체 : Monoclonal 항 α-catenin 항체/항 β-catenin 항체  
200배 희석(10 μg/ml)  
Polyclonal 항 α-catenin 항체/항 β-catenin 항체  
400배 희석(5 μg/ml)

조직절단 : 시판(DAKO)하는 파라핀포매 절편(인간조직)

검출방법 : ENVISION plus(DAKO)

조작순서 : 1) 탈 파라핀

2) 부활처리

Microwave(전자레인지)처리, 10 mM citrate buffer(pH6.0)로 5분×6회 처리

3) 내인성 peroxidase blocking

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15분

4) 비특이적 결합 blocking

blockase(원액) 30분

5) 일차 항체반응 실온 30분

6) ENVISION plus 실온 30분

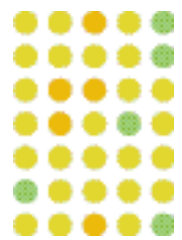
7) DAB발색 반응

8) 핵염색(hematoxylin)

9) 탈수·투철·봉입

## 【참고문헌】

- 1) Nollet, F. et al. (1996) *GENOMICS*, **32**, 413-424.
- 2) Herrenknecht, K. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9156-9160.
- 3) 세포공학 별책 접착분자 handbook(수운사)
- 4) Bio Science 용어 라이브러리 세포접착 (양토사)
- 5) 현대화학 중간 29 세포접착분자 (동경화학동인)



면역조직염색의 결과

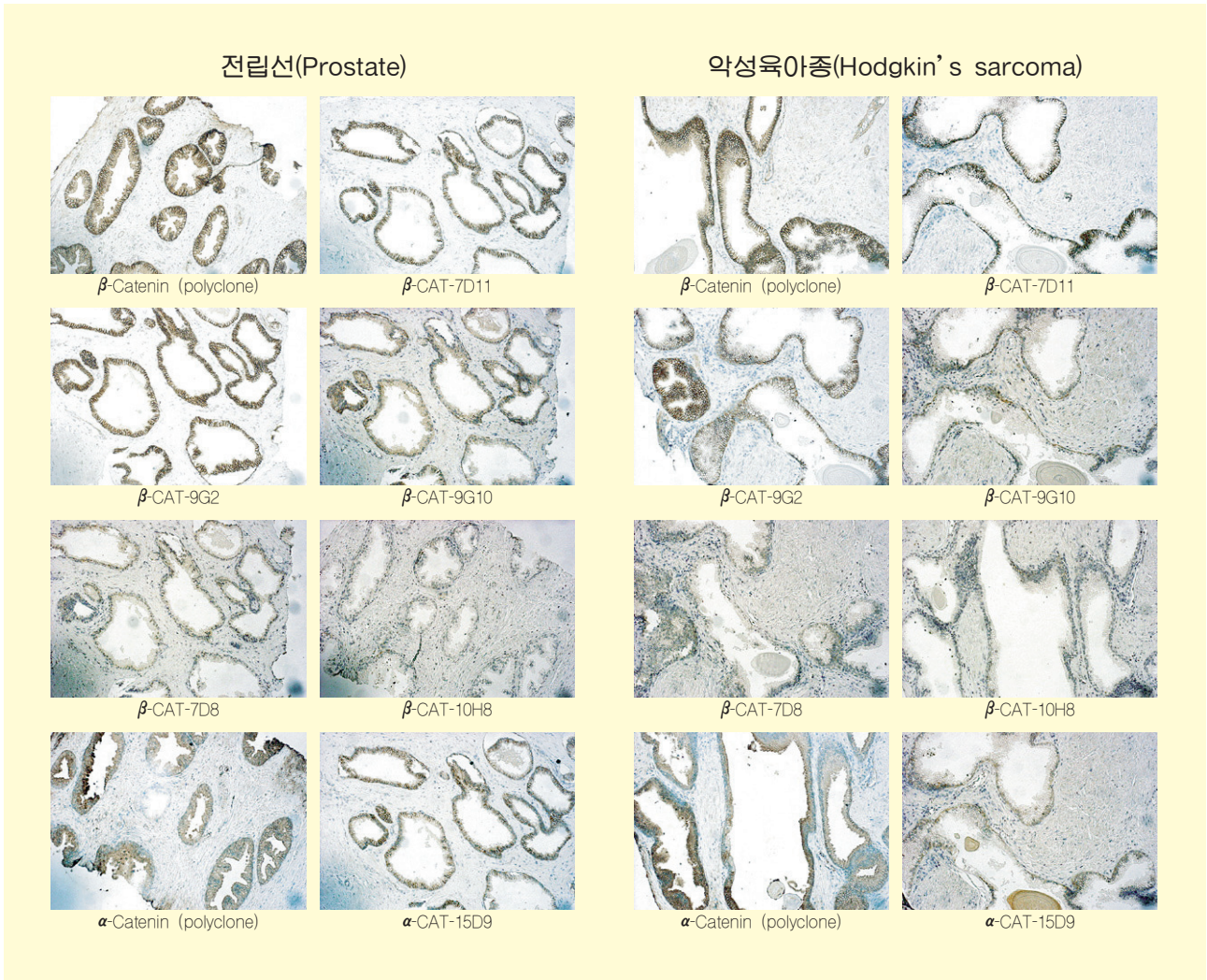


표 2 각종 beta-catenin monoclonal 항체의 epitope 특이성

Clon	특이성	1-781 a.a. 전체	120-781 a.a. N 말단 영역 결실	1-683 a.a. C 말단 영역 결실	120-683 a.a. 중양부(Core)	70-156 a.a. Exon 3	769-781 a.a. C말단 영역
beta-CAT-7D11	N 말단 영역/Exon 2를 인식한다.	+	-	+	-	-	-
beta-CAT-9G2	Exon 3(70-156 a.a.)/alpha-catenin 결합부위를 인식한다.	+	-	+	-	+	-
beta-CAT-9G10	Core 영역을 인식한다.	+	+	+	+	-	-
beta-CAT-7D8	C 말단 영역/Exon 14를 인식한다.	+	+	-	-	-	-
beta-CAT-10H8	C 말단 영역(769-781)을 인식한다.	+	+	-	-	-	+

【제품리스트】

제품명	Clon번호	특이성	TaKaRa Code	Subclass	포장량
Anti alpha-Catenin	alpha-CAT-15D9	사람, 쥐, 토끼항원에 반응한다.	M150	IgG <sub>1</sub> $\kappa$ 쇄	0.1 mg
Anti beta-Catenin	beta-CAT-7D11	사람, 쥐, 토끼, 개 항원에 반응한다.	M151	IgG <sub>2a</sub> $\kappa$ 쇄	0.1 mg
	beta-CAT-9G2	사람, 쥐, 토끼, 개 항원에 반응한다.	M152	IgG <sub>1</sub> $\kappa$ 쇄	0.1 mg
	beta-CAT-9G10	사람, 쥐, 토끼, 개 항원에 반응한다.	M153	IgG <sub>2b</sub> $\kappa$ 쇄	0.1 mg
	beta-CAT-7D8	사람, 쥐, 토끼, 개 항원에 반응한다.	M154	IgG <sub>1</sub> $\kappa$ 쇄	0.1 mg
	beta-CAT-10H8	사람, 쥐, 토끼, 개 항원에 반응한다.	M155	IgG <sub>2a</sub> $\kappa$ 쇄	0.1 mg
Polyclonal Anti-Human alpha-catenin		사람, 쥐, 돼지 항원에 반응한다.	M133		0.4 mg
Polyclonal Anti-Human beta-catenin		사람 항원에 반응한다.	M136		0.4 mg