

RNA Fluorescence Labeling Core Kit(M-MLV Version)

TaKaRa Code TX810 10회

본 제품은 RNA를 주형으로하는 역전사반응에 형광색소를 넣는 labeling kit로 특히 DNA chip(DNA microarray)용으로 개발되었다.

본 제품을 사용하면 소량의 형광색소로도 고효율로 형광표식 cDNA probe를 조제할 수 있어, 신뢰성 높은 데이터를 얻을 수 있다.

본 고에서는 본 제품(M-MLV Version)을 사용한 실험예와 데이터의 유의성을 살펴 보고자한다.

■ 실험예 : 본 kit로 mRNA의 Cy3TM, Cy5TM 표식과 이를 probe로 사용한 DNA chip 실험 데이터의 유의성

【방법】

배양세포 HL60에서 total RNA를 추출하고 *OligotexTM-dT30(Super)*mRNA Purification Kit을 사용하여 mRNA를 조제하였다. mRNA 각 1 μ g을 RNA Fluorescence Labeling Core Kit(M-MLV Version)을 사용하여 Cy3TM, Cy5TM로 각각 형광표식하여 probe 용액으로 하였다. 이 두 개를 혼합하여 Human CHIP 1K Set I Ver. 1.0(TaKaRa Code X1071)상에서 65°C에서 하룻밤 hybridization하였다. 세정 후 Affymetrix[®]428TM Array Scanner로 scanning하여, 해석용 software ImaGeneTM으로 데이터를 해석하였다.

【결과 및 고찰】

Hybridization 화상을 그림 1에, ImaGeneTM의 해석결과(Scatter Plot)를 그림 2에 나타내었다. Cy3TM과 Cy5TM간의 signal 강도 보정은 global normalization으로 하였다. 또 spot signal의 Mean(평균치)이 각 spot 주변의 background signal의 Mean+2×SD(표준편차)보다 큰 값을 갖는 경우만 유효 signal로 normalization하였다.

본 kit로 조제한 형광표식 cDNA를 probe로 DNA chip 실험으로 signal 강도가 강한 hybridization 화상을 얻을 수 있었다(그림 1). 본 kit를 사용하면 소량의 mRNA로 소량의 형광색소를 사용하여 효율적으로 표식 할 수 있다.

그림 2의 Scatter Plot은 Cy3TM과 Cy5TM 시료의 signal 비가 1:1(적색선), 2:1 혹은 1:2(녹색선)의 경우 이론치를 나타낸다. 본 실험에서는 같은 시료를 각각 Cy3TM과 Cy5TM으로 표식하고 있으므로 1:1 위치 상에 분포할 것이며 측정결과도 동일하다. 이 실험의 경우 Cy5TM/Cy3TM signal 비의 평균치와 표준비 차에서 유효 spot의 95%는 1.77:1과 1:1.77 내측 영역에, 또 유효 spot의 99%는 2.11:1과 1:2.1 내측 영역에 분포한다고 추정된다. 본 실험에서 두 종류의 시료에 유래하는 형광 signal의 비가 2:1 혹은 1:2 범위 외에 있으면 약 99% 신뢰도로 유의한 발현차이가 있음을 알 수 있다.



그림 1 Hybridization 화상
녹색: Cy3TM signal ; 적색: Cy5TM signal

【결론】

DNA chip으로 발현비율의 검출한계를 넓혀 신뢰성 있는 데이터를 얻기 위해서 Cy3TM과 Cy5TM의 효율의 차가 작은 post label 법이 사용되기도 하나 그 방법은 cDNA를 합성한 후 표식반응 조작이 번거로운 단점이 있다. 본 kit는 역전사 반응시에 형광색소를 넣는 direct label법으로 조작이 간단하며 신뢰성 높은 데이터를 얻을 수 있었다.

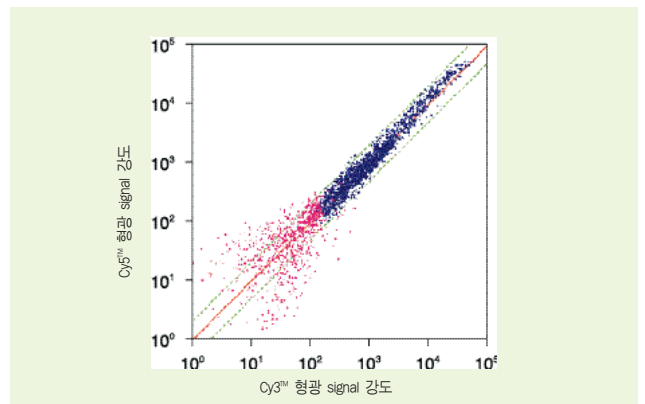


그림 2 Scatter Plot
X축은 Cy3TM signal, Y축은 Cy5TM signal을 나타낸다. 그래프 중 적색은 Cy3TM과 Cy5TM의 signal비가 1:1 인 경우의 이론치를 나타내고, 녹색은 2:1 혹은 1:2 인 경우의 이론치를 나타낸다. Cy3TM, Cy5TM의 유효 signal spot은 청색으로 Cy3TM, Cy5TM 중 하나 혹은 양쪽이 무효 signal인 spot은 적색으로 plot되어 있다.

TaKaRa Miniprep DNA Purification Kit

TaKaRa Code 9085 50회용

본 kit는 alkaline SDS법과 다공성 실리카겔 막 column을 조합한 plasmid DNA 조제용 제품이다.

1~10 ml의 대장균 배양액에서 최대 20 µg plasmid DNA를 조제할 수 있다.

20 kbp 까지의 plasmid 조제에 적합하며, 정제한 plasmid는 DNA sequencing 등 일반적인 실험에 그대로 사용할 수 있다.

또 kit에 포함되어 있는 alkaline protease를 사용하면 기존의 실리카겔 정제때 문제로 작용하던

endA nuclease의 오염을 쉽게 해결 할 수 있어 endA⁺ 대장균주 에서도 고순도의 plasmid를 조제 할 수 있다.

■ 내용(50회용)

Cell Suspension Buffer	20 ml
Cell Lysis Buffer	20 ml
Neutralization Solution	30 ml
Wash Buffer*	20 ml
Alkaline Protease Solution	550 µl
Nuclease-free H ₂ O	13 ml
Miniprep Spin Column	50개
Collection Tube(2 ml)	50개

* Kit를 사용하기 전에 ethanol 35 ml를 첨가하여 최종 volume을 55 ml로 한다.

■ 특징

1) 처리시간

다공성 실리카겔 막 column을 사용하며 column에 plasmid의 흡착이 동시에 일어난다. Alkaline SDS 처리로 얻어지는 대장균 lysate의 원심 분리 후 얻어진 상청(plasmid 포함)을 column에 통과시킨 후 바로 원심 분리할 수 있다. Column 세정 조작과 plasmid의 분리 조작 또한 원심분리로 신속하게 실시 할 수 있어, 약 30분 만에 plasmid를 조제 할 수 있다(그림 1 참조).

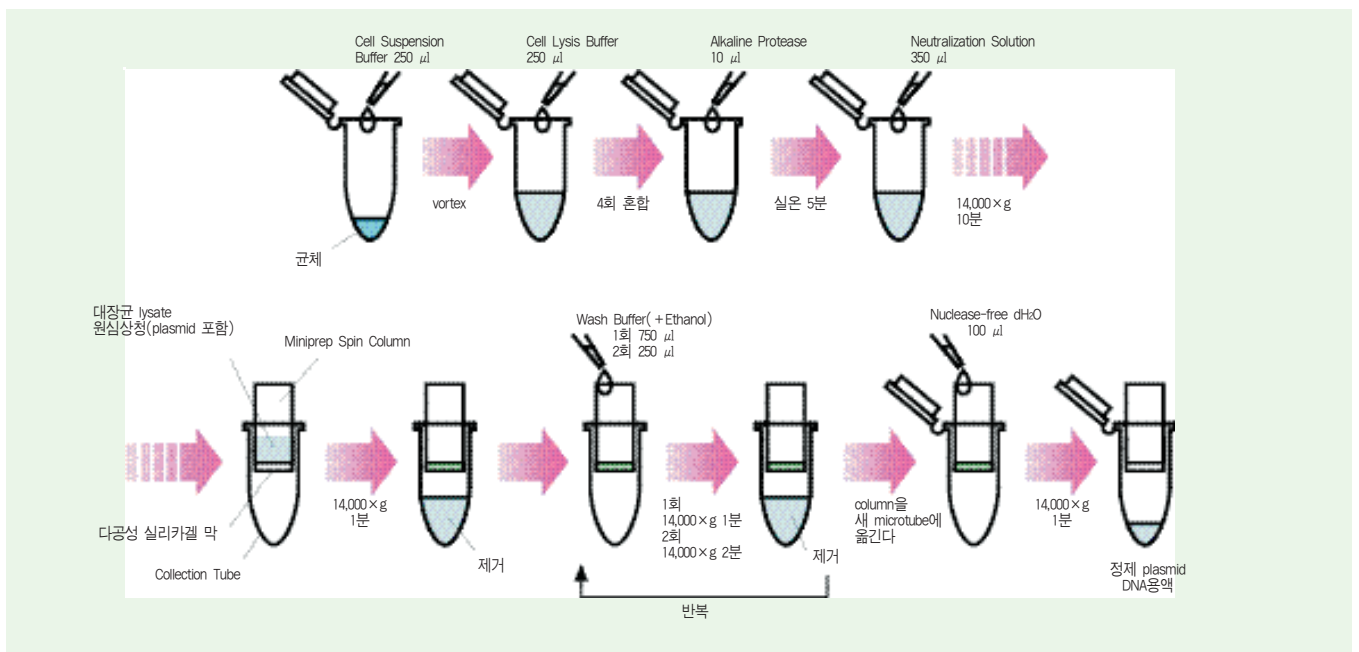


그림 1 조작법

2) Alkaline protease 처리

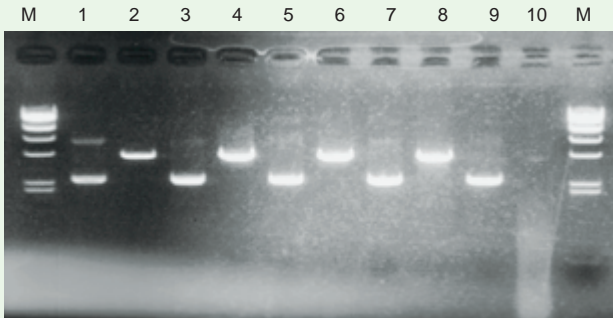
기존의 실리카겔 정제로는 내재성 *endA* nuclease를 완전히 제거할 수 없어, HB101 등 *endA*⁺ 대장균주에서 plasmid를 조제하는 경우, 마지막에 phenol 처리 등을 해야한다. 본 kit는 Cell Lysis Buffer(알칼리액)로 세포용해처리 후 alkaline protease 처리를 추가하여 *endA* nuclease를 제거하므로 *endA*⁺ 대장균주에서 조제한 plasmid의 내재성 *endA* nuclease의 혼입을 방지할 수 있다(그림 2 참조).

또 DH5 α , JM109 등 *endA*⁻주에서 plasmid를 조제할 경우는 alkaline protease를 처리할 필요가 없다. Alkaline protease의 적정 pH는 9이상 이므로, 중화 조작 후에는 활성을 나타내지 않으므로 별도로 효소를 실활시킬 필요가 없다.

3) 간편성과 순도

정제한 plasmid는 염이 포함되지 않은 수용액으로 직접 제한효소처리, DNA sequencing 등 실험에 사용 할 수 있어 별도의 ethanol 침전 등의 조작이 필요 없다*. 또 모든 조작은 원심분리로 이루어지므로 별도의 기기가 필요 없다. 당사에서는 본 kit로 추출한 plasmid를 사용하여 DNA sequencing, 제한효소처리, transformation 등에 사용하여, 좋은 결과를 확인하였다(그림3 참조).

* Plasmid는 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 전후의 농도에서 용출되므로 높은 농도가 필요한 경우 ethanol 침전 등의 조작으로 농축해야한다.



Lane	Plasmid DNA	Alkaline protease처리	Hind III 처리
1	pBR322(대조)		-
2			+
3	숙주대장균 DH5 α 에서 조제한 pBR322		-
4		+	+
5		-	-
6		-	+
7	숙주대장균 HB101에서 조제한 pBR322		-
8		+	+
9		-	-
10		-	+
M	Marker(λ -Hind III digest)		

(+): 처리; (-): 미처리. Plasmid DNA의 비특이적인 분해가 인정된 것은 lane10의 경우(HB101, alkaline protease처리 없이 Hind III 처리)뿐 이었다.

그림 2 숙주 대장균 DH5 α (*endA*⁺), HB101(*endA*⁺)에서 조제한 plasmid pBR322의 Hind III 처리

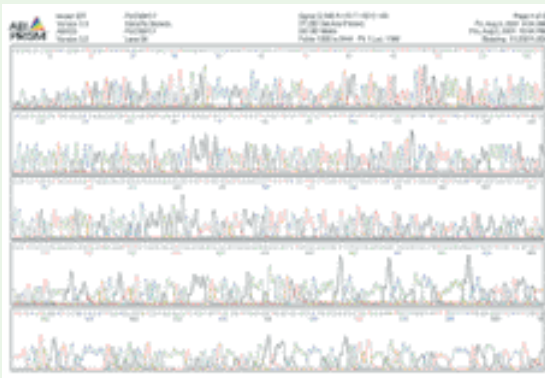


그림 3 본 kit를 사용하여 조제한 plasmid pUC18의 DNA sequencing 결과
본 kit로 정제한 0.3 μg pUC18을 주형으로 ABI PRISM377 sequencer로 해석하였다. 실험방법은 ABI의 표준 protocol에 준한다.

Inclusion body refolding 조건 검토용 kit

Refolding CA Kit

TaKaRa Code 7350 25회

재조합 유전자를 대장균 등 미생물에서 발현시킨 경우 활성을 가진 가용성 단백질만 생성되는 것이 아니라, 세포 내 불용화한 inclusion body가 생성되는 경우가 있다. 이 경우 단백질 활성 회복을 위하여 요소나 guanidine과 같은 변성제로 inclusion body를 unfolding한 후, 투석 또는 희석하여 변성제를 제거하고 refolding(재생)시키는 방법이 일반적으로 이용되고 있다.

이 방법으로 refolding하는 것은 시간과 노력이 많이 소요 되고 refolding 효율이 낮은 경우가 많다. 최근 refolding 조작을 2단계로 나누어 각 단계에 적합한 2종류의 화합물을 사용하여 refolding 효율을 높이는 방법이 보고되고 있다¹⁻³⁾.

TaKaRa에서는 계면활성제와 고중합도 cyclodextrin(이하 CA)를 사용하여 inclusion body refolding 조건 검토용 Refolding CA Kit를 발매하였다. 본 고의 실험 내용은 독립행정법인 식품종합연구소의 Hayashi, Machida의 실험 결과이다.

Kit의 내용

8 M Guanidine hydrochloride	1 ml × 2
4 M Dithiothreitol(DTT)	50 μ l
1% Tween 40	1 ml × 2
1% Tween 60	1 ml × 2
1% CTAB	1 ml × 2
1% SB3-14	1 ml × 2
200 mM DL-cystein	0.75 ml × 2
3% cyclodextrin(CA)	1.6 ml × 7

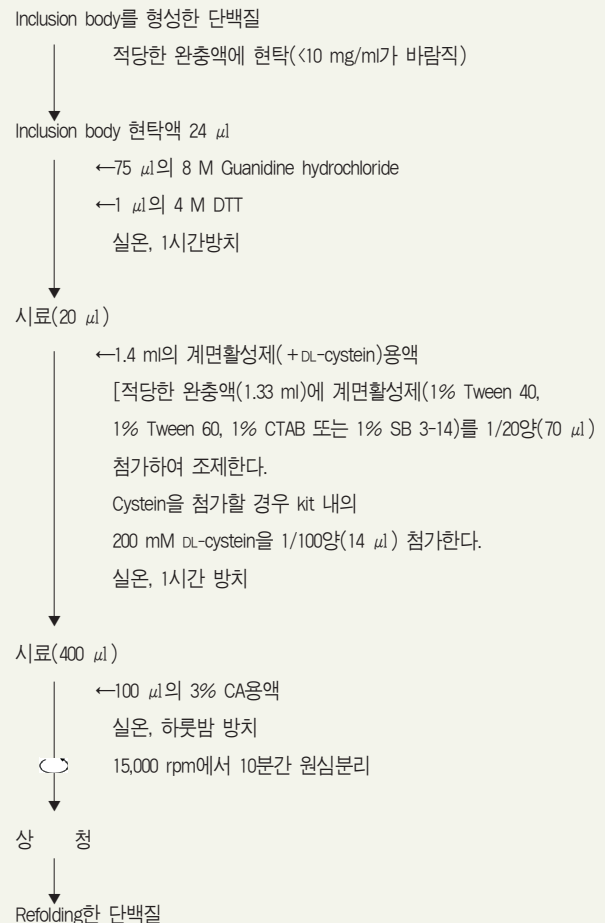
특징

본 kit는 inclusion body를 형성한 재조합 단백질의 refolding 조건을 4 종류의 계면활성제와 CA를 조합한 조건검토용으로, refolding 능력을 높이는 물질로 CA를 사용하고 있다. CA는 cyclodextrin(중합도 6~8의 환상 α -1, 4-glucan)에서도 우수한 refolding 능력을 나타낸다고 보고되고 있다³⁾. 본 제품은 25시료의 refolding 조건을 검토할 수 있다. 또 계면활성제 및 CA는 50회의 동결 용해 반복에도 안정하다(단, CA용액에 미생물과 아밀라아제가 혼입되면 환형이 깨져 refolding 능력이 저하되므로 주의한다). 또한 모든 조작이 1.5 ml의 microtube 안에서 이루어지므로 신속, 간편하다.

원리³⁾

계면활성제를 단백질 변성용액 내에 첨가하여 변성제의 농도를 희석하고, 단백질 분자간의 응집을 방지한다. 계속 CA를 첨가하고 그 refolding 능력으로 단백질-계면활성제 복합체에서 계면활성제를 제거하여 단백질 활성을 가진 고차구조로 refolding시킨다.

조작법



■ 실험예 1: 효소 refolding 실험

(1) Citrate Synthase일 경우

【Unfolding과 refolding】

2.4 mg/ml의 Citrate Synthase의 황산 암모늄 현탁액을 24 μ l 취하여 위 조작법에 따라 변성제를 가하여 unfolding하고 실온에서 1시간 방치하였다. 20 μ l에 1.4 ml의 비 이온성 계면활성제용액(최종 농도 0.05%의 Tween 40 혹은 Tween 60을 포함하는 158 mM Tris-HCl, pH7.6)을 첨가하여 실온에서 1시간 방치하였다. 그 후 다양한 농도의 CA를 첨가하여 실온에서 16시간(하룻밤) 방치하여 refolding한 후, 원심분리하여 상청을 모아 효소활성을 측정하였다.

【효소활성 측정】

반응액의 조성 :

- 158 mM Tris-HCl(pH7.6)
- 0.023 mM Acetyl-CoA
- 0.5 mM Oxaloacetate
- 0.12 mM Dithiobis

이 반응액에 refolding시킨 Citrate Synthase를 첨가하여 412 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 변성처리를 하지 않고 완충액으로 효소를 같은 배율로 희석한 경우 효소활성을 100%로 하여 변성과 refolding 상대 활성을 측정하였다.

【결과】

계면활성제로서 Tween 40 및 Tween 60을 사용하고 CA를 0.6%의 최종농도(본 kit의 protocol에서 추천하고 있는 농도)로 사용한 경우, Citrate Synthase의 상대 활성은 86%, 100% 였다(그림 1).

CA 최종농도(%)	상대활성(%)	
	Tween 40	Tween 60
0	0	0
0.2	33.1	34.7
0.4	66.2	80.0
0.6	86.2	100
0.8	88.5	100
1	100	98.0

본 kit의 protocol에서 추천하는 CA 최종 농도는 0.6%이다(□의 경우에 해당).

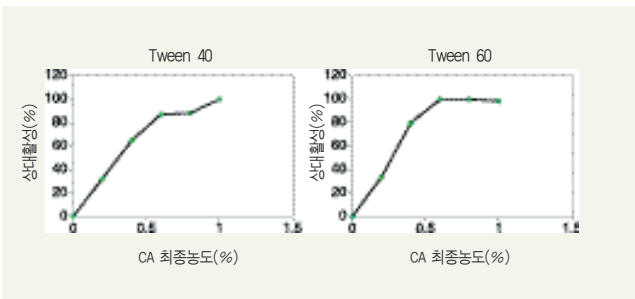


그림 1 Citrate Synthase의 refolding 실험

(2) Lysozyme의 경우

【Unfolding과 refolding】

15 mg/ml의 lysozyme 물 현탁액을 24 μ l 취하여 (1)의 경우와 같이 변성제로 처리하였다. 그 중 20 μ l를 취하여 1.4 ml의 양이온성 계면활성제용액(최종농도 0.05%의 CTAB와 2 mM cystein을 포함하는 Tris-acetate, pH7.6)을 첨가하여 실온에서 1시간 방치하였다. 그 후 다

양한 농도의 CA를 첨가하여 실온에서 16시간(하룻밤) 방치하여 refolding한 후, 원심분리하여 상청을 모으고 효소활성을 측정하였다.

【효소활성의 측정】

반응액의 조성 :

- 0.16 mg/ml *Micrococcus lysodeikticus* 건조균체/
50 mM 인산 나트륨 완충액(pH6.2)

이 반응액에 refolding시킨 lysozyme을 첨가하여 450 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 변성처리를 하지 않고 완충액에서 효소를 같은 배율로 희석한 경우 효소활성을 100%로 하여 변성과 refolding 상대 활성을 측정하였다.

【결과】

계면활성제로 CTAB를 사용하여 CA를 0.6%의 최종농도(본 kit의 protocol에서 추천하고 있는 농도)로 사용한 경우 lysozyme의 상대 활성은 88%였다(그림 2).

CTAB를 사용한 경우

CA 최종농도(%)	상대활성(%)
0	0
0.1	33.3
0.3	56.7
0.6	88.3
0.9	90.8
1.2	87.1

본 kit의 protocol에서 추천하는 CA 최종농도는 0.6%이다(□의 경우에 해당).

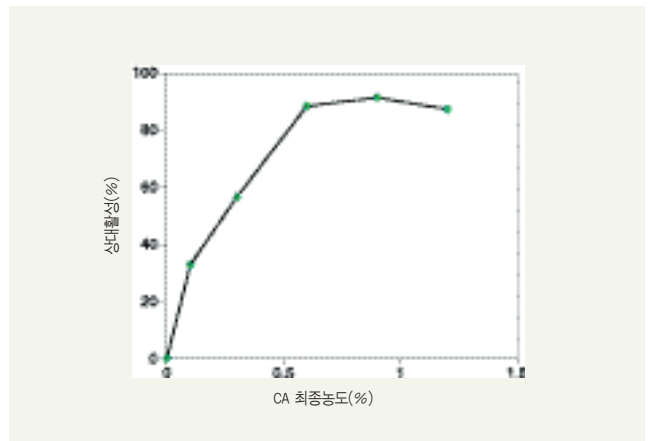


그림 2 Lysozyme의 refolding 실험

■ 실험예 2 : Refolding 시간의 검토

【방법】

Citrate Synthase를 Tween 60 및 CA 또는 β -cyclodextrin(β -CD; 중합도 7의 환상 α -1,4-glucan)을 사용하여 refolding에 필요한 시간을 조사하였다.

【결과】

본 kit의 protocol로 refolding 시간을 하룻밤으로 측정하고 있으나 β -CD는 1시간에 40%정도 refolding되고, CA는 100% refolding되어 있는 것을 알 수 있었다(그림 3). 조건에 따라 다르지만 본 kit로는 단시간에 refolding가 일어나는 것을 보여준다.

시간(분)	(-)	CA(최종 농도 0.6%)	β -CD(최종 농도 0.6%)
0	0	0	0
1	0	0	0
5	0	15.6	0
15	0	47.8	7.8
30	0	78.6	28.3
60	0	100	38.6
90	0	100	46.2
120	0	100	54.8

● 참고문헌

- 1) Daugherty, D. L., Rozema, D., hansen, P. E. and Gellman, S. H.(1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33961-33971
- 2) Sundari, C. S., Raman, B. and Balasubramanian, D.(1999) *FEBS lett.* **443**, 215-219
- 3) Machida, S., Ogawa, S., Xiaohua, S., Takaha, T., Fujii, K. and Hayashi, K.(2000) *FEBS lett.* **486**, 131-135

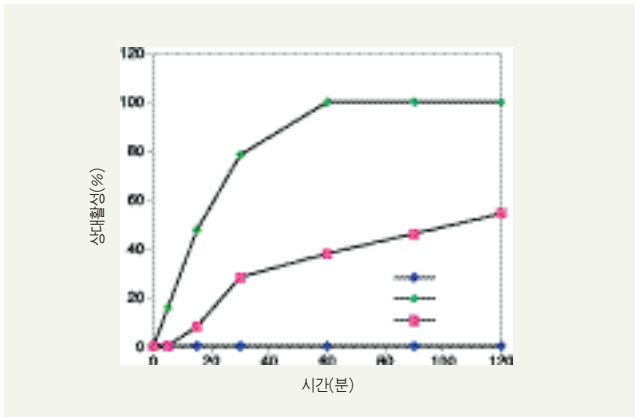


그림 3 Refolding 시간 검토

Takara 합성 DNA 1000원/base 국내 수식합성 개시

■ High Quality PCR Grade(HQ-PCR)

역상 cartridge column 사용
순도 : 90% 이상

■ Sequencing Grade(HQ-SEQ)

이온교환 HPLC 또는 PAGE로 정제
순도 : 99% 이상

■ 수식합성

5' -FITC화, 5' -Biotin화, 5' -XRITC화, S-Oligo,
5' -인산화, 5' -아민화, DIG Labeling, 이노신,
Mixture, 3' -수식화, 내부수식, 수식염기 등

Grade	Size	가격
HQ-PCR grade 50 nmol(2 OD 보증)	1~20 mer 21~35 mer	20,000원 1,000원/base
HQ-PCR grade 200 nmol(8 OD 보증) (36 mer 이상은 5 OD)	1~20 mer 21~35 mer 36 mer 이상	30,000원 1,500원/base 2,000원/base
HQ-SEQ. grade 200 nmol 1 OD 보증 (30 mer 이상은 0.5 OD)		정제료 30,000원 추가

* 수량에 관계없이 1회 주문시 Set Up 비용 10,000원이 추가됩니다.

* 대량합성, 특수합성, 임상용 GMP grade 합성의 경우는 별도로 문의하여 주시기 바랍니다.

Takara가 만들면 다릅니다!

human Mesenchymal Stem Cells (인간간엽계모세포)시리즈 전용분화배지 kit

BioWhittaker사 제품입니다.

간엽계모세포(MSC)는 골수중에 극히 소량으로

존재하는 미분화 세포로 증식능력과

골세포 · 연골세포 · 근육세포 · 스트로마세포 ·

근육세포 · 지방세포로의 분화능력을

가지고 있다(그림 1 참조).

TaKaRa에서는 기존의 Poietics™ 시리즈로

Osiris Therapeutic사의 기술로 제조된

정상사람 MSC 및 전용배지를

판매하고 있다(Life Science & Biotechnology

15호, 42페이지 참조).

기존에 판매하는 제품에

인간 MSC 전용분화배지를 신발매하였다.

세포분화(골형성, 연골형성, 지방세포 형성 등)

연구 등 다양한 연구에 이용할 수 있다.

본 제품은 연구용이므로 임상용이나

진단용으로 사용할 수 없다.

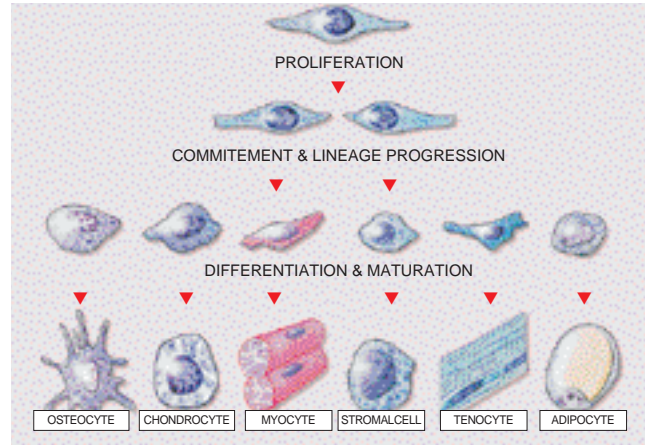


그림 1 인간간엽계모세포(hMSC)의 증식과 분화

● hMSC Differentiation BulletKit®, Osteogenic (골아세포분화용)

TaKaRa Code B3002(PT-3002)

내용 :

Differentiation Basal Medium, Osteogenic 185 ml

hMSC Osteogenic SingleQuots® 1 set

● hMSC Differentiation BulletKit®, Chondrogenic (연골세포분화용)

TaKaRa Code B3003(PT-3003)

내용 :

Differentiation Basal Medium, Chondrogenic 185 ml

TGF-β3 SingleQuots® Kit 1 set

hMSC Chondrogenic SingleQuots® Kit 1 set

● hMSC Differentiation BulletKit®, Adipogenic (지방세포분화용)

TaKaRa Code B3004(PT-3004)

내용 :

Adipogenic Maintenance Medium 175 ml

Adipogenic Induction Medium 175 ml

hMSC Adipogenic SingleQuots® Kit 1 1 set

hMSC Adipogenic SingleQuots® Kit 2 1 set

【관련제품】

제품명	TaKaRa Code	포장량
hMSC, human Mesenchymal Stem Cells(동결건조품)	PT034(PT-2501)	7.5 × 10 ⁶ /vial
전용배지 kit hMSC BulletKit®(B3238 + B4105)	B3001(PT-3001)	1 Set
기본배지 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium(MSCBM)	B3238(PT-3238)	440 ml
첨가인자 set MSCGM SingleQuots®	B4105(PT-4105)	60 ml
Trypsin/EDTA Solution	B3232(CC-3232)	100 ml

()는 BioWhittaker사 제품 코드입니다.