

아토피성 피부염 관련제품

Pseudomonas aeruginosa Ceramidase Primer Set

TaKaRa Code 6631 50회용

아토피성 피부염 환자의 피부표면(각질층)에는 각질층 세포의 세포사이를 메운 ceramide가 감소되어 있는 것으로 보고되었으며, 그 감소가 체외로부터 체내에의 항원의 침입과 체외로의 과잉 수분손실을 일으키고 더 나아가서는 본 증상의 발병과 증상 악화에 관여할 가능성이 있다. 당사는 큐슈대학 농학부 ITO MAKOTO 조교수 및 큐슈대학의 학부 스山修平 박사(현재:국립병원 큐슈의료센터)와의 공동연구로 ceramide 감소의 하나의 원인이 될 수 있는 ceramidase(ceramide를 sphingosine과 지방산으로 분해하는 효소)의 생산균을 환자피부에서 분리하여 녹농균을 동정하였다. 또 그 녹농균 ceramidase 유전자를 clone화함과 동시에 생화학적인 분석을 시행하였다.^{1,2)} 또한 아토피성 피부염 환자는 ceramidase 생산균의 감염이 통계학적으로 유사하다는 것을 알아냈다.³⁾

최근 TaKaRa에서는 Nested PCR법에 의해 간편하면서도 단시간의 조작으로 아토피성 피부염 환자 유래의 시료에서 이 녹농균 ceramidase 유전자를 검출하기⁴⁾ 위한 primer set, *P. aeruginosa* Ceramidase Primer Set를 신발매하였다. 본 set는 별매의 TaKaRa Ex Taq™ (dNTP Mixture, 10X Ex Taq Buffer 첨부)(TaKaRa Code RR001A/B/C)와의 사용으로 최고의 효율을 얻을 수 있도록 설계되어 있다. 여기서는 본 제품에 대해서 소개하겠다.

■ 세트 내용 (50 회분)

PA F1 Primer (20 pmol/μl)	25μl
PA R1 Primer (20 pmol/μl)	25μl
PA F2 Primer (20 pmol/μl)	25μl
PA R2 Primer (20 pmol/μl)	25μl
Control Template (1 ng/μl)	25μl

■ 원리

녹농균(*P. aeruginosa* AN-17)의 ceramidase 유전자(GenBank AB028646)에 결합하는 2쌍의 primer를 사용하여 nested PCR을 실행한다. 우선 두개의 primer F1과 R1을 사용하여 1st PCR을 행한 후, 이 내부 서열에 결합하는 primer F2와 R2를 사용하여 2nd PCR을 한다. 다음으로 증폭산물을 agarose 전기영동으로 분석한다. 각 primer의 서열과 위치는 다음과 같다. 1st PCR로는 523 bp의 DNA 단편이, 2nd PCR로는 463bp의 DNA 단편이 각각 증폭된다.

primer	서열	위치
PA F1 Primer	GGCTTCTCCACTACGCGATG	1007~1027
PA R1 Primer	CGAATTGGCGCAGACCGATCT	1509~1529
PA F2 Primer	TGCTCGGCTTCCAGGAAAAGA	1041~1061
PA R2 Primer	GTGTTGTGCGAACTCGTTGTCG	1483~1503

■ 실험에 1 : 검출한계의 검토

녹농균 ceramidase 유전자를 cloning한 plasmid의 단계 희석액을 시료로서 사용하여 검출한계를 검토하였다.

(1) 1st PCR 반응

【반응액의 조제】

10×Ex Taq Buffer	5 μl
dNTP Mixture	4 μl
PA F1 Primer	0.5 μl
PA R1 Primer	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq™	0.25 μl
Plasmid 용액	2 μl
멸균 증류수	37.75 μl
Total volume	50 μl

【PCR 조건】

94℃	1분	} 40 cycles
94℃	30초	
63℃	30초	
72℃	30초	
72℃	7분	

(2) 2nd PCR 반응

【반응액의 조제】

10×Ex Taq Buffer	5 μl
dNTP Mixture	4 μl
PA F2 Primer	0.5 μl
PA R2 Primer	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq™	0.25 μl
1st PCR 산물	2 μl
멸균 증류수	37.75 μl
Total volume	50 μl

【PCR 조건】

94℃	1분	} 40 cycles
94℃	30초	
57℃	30초	
72℃	30초	
72℃	7분	

(3) 증폭산물의 전기영동에 의한 해석

1st 및 2nd PCR 반응산물을 각 2.5 μl 취하여 agarose gel 전기영동하고 증폭단편의 유무와 사이즈를 조사하였다.

【결과】

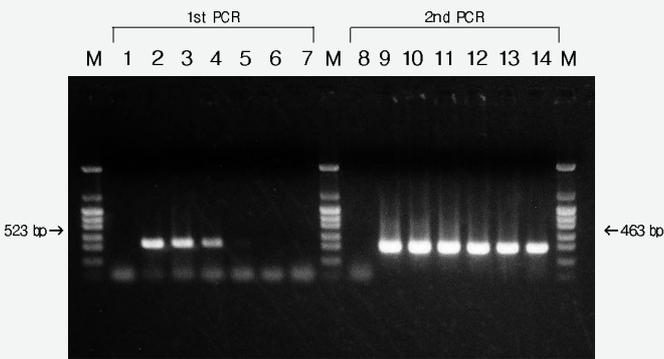


그림 1 Ceramidase 유전자를 cloning한 plasmid의 검출한계

Lane M : pHY Marker ; 1, 8 : H₂O첨가 ; 2, 9 : 2×10⁵ copies ;
 3, 10 : 2×10⁴ copies ; 4, 11 : 2×10³ copies ; 5, 12 : 2×10² copies ;
 6, 13 : 2×10⁴ copies ; 7, 14 : 2 copies
 *전기영동에는 1% Agarose L 03 gel을 사용하였다.

■ 실험예 2 : 피부표면에서의 녹농균 ceramidase의 검출

(1) 시료의 조제

아토피성 피부염 환자 27명, 그 이외의 피부염 환자 15명, 건강한 사람 66명 (건강한 사람은 병원에 가지도 않고 전혀 자각증상이 없는 자를 가르킴)의 피부표면을 각각 면봉으로 수회 닦은 후, 소량의 멸균증류수에 담구어 균체를 회수하였다. 균일성, 회수율을 높이기 위해서 면봉에 흡인되어 있는 용액도 원심에 의하여 회수하였다. 균체 회수액을 95℃에서 5분간 가열한 후 원심하여 상층을 PCR 반응에 사용하였다.

(2) PCR 반응 및 증폭산물의 전기영동에 의한 해석

실험예 1의 방법에 준하여 Nested PCR을 하였다. 다만 1st PCR로의 시료량은 5 μl로 하였다. 반응종료 후 반응산물을 각 2.5 μl 취하여 agarose gel 전기영동을 하였다.

(3) 대조실험

Control template(10,000배 희석한 것 중 2 μl를 사용)를 같은 반응조건에

【관련제품】

제품명	TaKaRa Code	용량
TaKaRa Ex Taq™	RR001A/B/C	250 U/1,000 U/3,000 U
TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version	RR001A/B	250 U/1,000 U

* dNTP Mixture, 10×Ex Taq Buffer 첨부

서 증폭하고, 1st PCR에서 684 bp, 2nd PCR에서 642 bp의 DNA 단편이 증폭된다는 사실을 확인하였다.

【결과】

아토피성 피부염 환자로부터 채취한 시료의 PCR 분석의 결과의 예를 그림 2에 나타내었다.

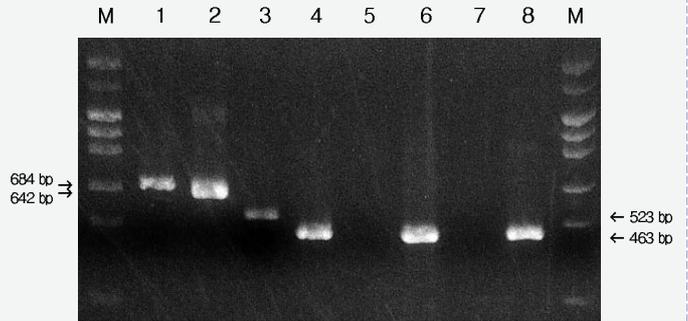


그림 2 아토피성 피부염 환자 유래 시료의 PCR 분석

Lane M : pHY Marker
 1 : Control Template DNA(1st PCR)
 2 : Control Template DNA(2nd PCR)
 3 : *P. aeruginosa* 배양균체 추출액(1st PCR)
 4 : *P. aeruginosa* 배양균체 추출액(2nd PCR)
 5 : 아토피성 피부염환자 1(1st PCR)
 6 : 아토피성 피부염환자 1(2nd PCR)
 7 : 아토피성 피부염환자 2(1st PCR)
 8 : 아토피성 피부염환자 2(2nd PCR)
 *전기영동에는 3% Nusieve 3:1 Agarose gel(BMA사)을 사용하였다.

각 시료에서 녹농균 ceramidase 유전자의 검출율은 아래와 같다.

시료	검출율
아토피성 피부염 환자	27명중 20명
건강한 사람	66명중 12명
그 이외의 피부염 환자	15명중 3명

아토피성 피부염의 환자에서 녹농균 ceramidase 유전자가 고빈도로 검출되고, 이 방법에 의한 감수성(검출된 자의 수/아토피성 피부염 모든 환자수)은 74.1%, 특이성(검출되지 않은 자의 수/건강한 사람수)은 81.8%였다. 또 아토피성 피부염 이외의 피부염 환자에게 있어서 검출율은 건강한 사람의 경우와 거의 같았다.

【참고문헌】

- Okino, N., Tani, M., Imayama, S. and Ito, M. (1998) *J. Bio. Chem.* **273**, 14368-14373.
- Okino, N., Ichinose, S., Omori, A., Imayama, S., Nakamura, T. and Ito, M. (1999) *J. Bio. Chem.* **274**, 36616-36622.
- Ohnishi, Y., Okino, N., Ito, M. and Imayama, S. (1999) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 101-104.
- Imamura, Ito, Sano, Imayama, Kato, 제 74회 일본생화학기록. **73**, 848