

RNAi법 기초지식 - 원리와 메커니즘 2

RNA의 생물학적 역할 (1): 분열효모에서 heterochromatin 제어

진핵세포의 chromatin은 크게 전사가 활발한 chromatin과 전사가 억제되어 있는 heterochromatin으로 나눌 수 있다. Heterochromatin은 반복 서열, transposon, 바이러스 유래 서열로 형성되어 있다. 이 영역에서 유전자는 거의 찾아볼 수 없으며, DNA는 히스톤에 단단히 감겨 있는 고차구조를 가지고 있다. Heterochromatin은 상동성이 있는 서열간의 이동을 막아 게놈의 정확성, 안정성에 기여하고 있는 것으로 생각되고 있다¹⁾.

히스톤은 모든 진핵생물의 chromatin에서 볼 수 있는 염기성 단백질이다. 염기성 아미노산인 아르기닌 (R)과 리신 (K)이 풍부하며, 이 두 가지 아미노산을 합하면 전체 아미노산 잔기의 25%에 달한다. 모든 진핵세포에서 5가지 주요 형태의 히스톤인 H1, H2A, H2B, H3, H4를 볼 수 있는데, 특히 H3과 H4는 아미노산 서열 수준에서 고도로 보존되어 있다. 히스톤의 아미노산 잔기의 side chain은 효소의 수식을 받아 메틸화, ADP-리보실화, 인산화, 아세틸화된다. 이러한 히스톤의 아미노산 잔기 수식으로 인해 chromatin이 특징지어지며, DNA 정보는 chromatin의 고차구조에 의해 재편성된다. H3은 K4, K9, K27, K36에서 메틸화가 일어난다. 이 중 K9 (H3-K9)의 메틸화는 heterochromatin의 형성과 유전자 silencing을 일으킨다고 알려져 있다. 분열효모 (*Schizosaccharomyces pombe*)에서 heterochromatin 제어에는 heterochromatin 결합 단백질 SWI6, 히스톤 메틸기 전이효소 (Histone methyl transferase: HMT) CLR4가 관여하고 있다. SWI6은 CHROMO domain (Chromatin organization modifier domain)을 통해 H3-K9 메틸화를 특이적으로 인식한다. 그 후 CLR이 결합되어 H3-K9 메틸화가 주위 영역으로 퍼지다가 경계영역에서 멈추는 것으로 알려져 있다²⁾.

예를들면 지금까지 식물의 dsRNA 서열특이적인 DNA 메틸화³⁾, 선충에서 transposon의 안정화 또는 Polycomb-group 단백질과 RNAi 경로 관련⁴⁾, mouse에서의 H3-K9 메틸화와 그에 따른 RNA의 존재⁵⁾ 등에 따라 RNAi 경로가 여러가지 형태로 heterochromatin 상태에 관여하고 있음이 시사되었다. 아래의 두 보고에 의해 분열효모의 H3-K9 메틸화는 아마도 작은 RNA를 통해 이루어지며, RNAi 경로는 heterochromatin 형성에 필요하다는 것이 명확해졌다 (그림 1)⁶⁻⁷⁾.

Grewal 등과 Martienssen 등에 의해 분열효모에서 다른 생물의 RNAi 경로에 중요한 역할을 하는 Dicer (*dcr1*), Argonaute (*ago1*), RdRp (*rdp1*)를 결실시킨 3가지 변이주 *dcr⁻*, *arg⁻*, *rdp⁻*를 만들었다. *dcr⁻*, *arg⁻*, *rdp⁻*에서

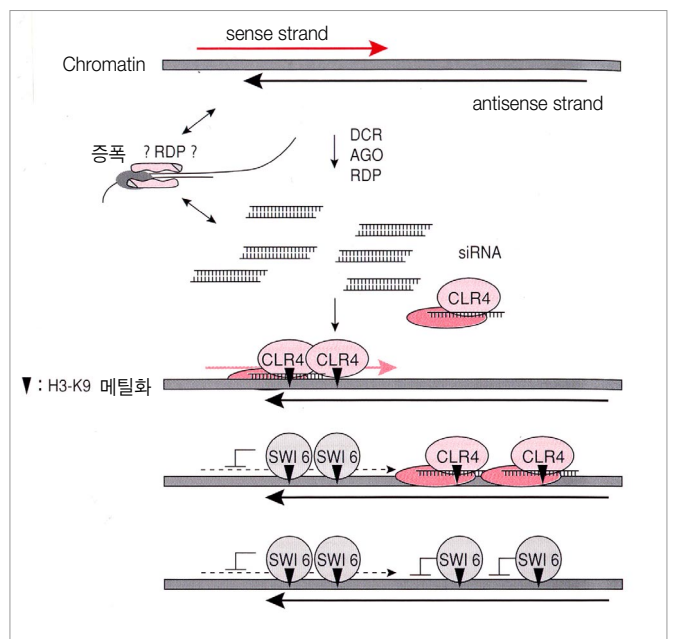


그림 1 분열효모에서 RNAi 경로에 의한 heterochromatin 제어의 모식도

Sense strand, antisense strand가 전사되어 생성된 dsRNA에서 DCR, AGO, RDP의 siRNA가 제작되었다. siRNA의 서열 특이적으로 히스톤 메틸기 전이효소 CLR-4가 유도되어, 히스톤 H3의 리신 K9가 메틸화 된다. H3-K9 메틸화를 특이적으로 인식하여 SWI6이 결합하고, SWI6이 결합하는 것에 따라서 heterochromatin 상태가 형성된다. SWI6, CLR4를 사이에 두고 더욱더 주위에 heterochromatin이 형성된다.

는 H3-K9 메틸화의 억제가 낮았으며, centromere 외측 영역의 heterochromatin에 있는 marker 유전자의 발현억제가 해제되었다. 그곳에서 centromere 외측 영역의 cen3 반복 서열 유래 RNA가 조사되었다. cen3 유래 RNA는 야생형에서는 거의 검출되지 않았으나 *swi6⁻*에서는 1.4 kb의 sense strand만 미량으로, *dcr⁻*, *arg⁻*, *rdp⁻*주에서는 sense strand와 2.4 kb의 antisense strand가 다량으로, *swi6⁻ arg⁻* 이중변이주에서는 두 strand 모두 매우 다량으로 축적되었다. 핵 Run-on assay 결과로부터 야생형 sense strand는 *swi6* 및 RNAi 경로에 의해 전사 단계에서, antisense strand는 RNAi에 의해 전사 후 단계에서 억제되는 것으로 나타났다. Centromere 반복서열 유래의 짧은 RNA 존재는 이미 보고된 바 있으며, miRNA와 같은 hairpin 구조가 아닌 siRNA처럼 dsRNA 유래임을 시

사했다⁸⁾.

Grewal 등에 의해 RNAi 경로와 heterochromatin의 형성, 유지와의 관계가 명확해졌다⁶⁾. 분열효모 접합형은 silent mating locus (*mat2/3*)이라고 불리는 *mat2*, *mat3* 유전자, 그 사이의 K영역을 포함한 20 kb의 heterochromatin 영역에 의해 결정된다. K영역 안의 cenH 반복 서열은 heterochromatin 형성에 중요하며⁹⁾, cenH 서열로부터 주변의 heterochromatin이 형성됨을 보여줬다⁶⁾. cenH 서열을 marker 유전자가 발현된 euchromatin 영역에 도입하면 야생형에서는 marker 유전자는 silencing 되었으나, RNAi 변이주에서는 silencing, H3-K9 메틸화를 볼 수 없었다. 한편 야생형 *mat2/3* heterochromatin 상태는 RNAi 변이주와 불여도 영향을 받지 않았다. 약제를 이용하여 강제적으로 heterochromatin 상태를 해제하면 야생형에서는 다시 heterochromatin이 형성되었으나, RNAi 변이주에서는 거의 형성되지 않았다. 이것은 RNAi 경로는 heterochromatin의 시작에 필요하며, 유지에는 관여하지 않음을 시사한다⁶⁾¹⁰⁾.

RNAi의 생물학적 역할 (2): *Tetrahymena thermophila*에서의 DNA 결실제어

분열효모에서 RNAi 경로와 heterochromatin 형성 관여가 보고된 것과 거의 동시에 섬모충류 *tetrahymena thermophila*에서 RNAi 경로와 대규모 DNA 서열 결실과의 관계가 보고 되었다¹¹⁾¹²⁾.

*Tetrahymena*는 단세포 원생동물이며 진핵생물의 모델로서 오래 전부터 분자생물학적 연구에 이용되어 왔다. *Tetrahymena*는 형태적으로나 기계적으로 서로 다른 2종류의 대핵과 소핵을 동일 세포 내에 지닌다. 소핵은 생물 세포핵에 해당되며, 완전한 게놈 정보를 지니지만 RNA의 전사활성은 전세포 주기를 통해 매우 낮다. 한편 대핵은 체세포핵에 해당되며, 유성 생식시에 소핵으로부터 형성되며, 일부 게놈 정보는 결실되어 있지만 개체 표현형이 대부분 대핵에 존재하는 유전자에 의해 지배되고 있다.

기아에 의해 두세포가 접합되며, 유성 생식이 시작된다 (그림 2A-a). 소핵은 2회의 감수분열을 거쳐 4개가 되며, 그 중 3개는 분해된다 (그림 2A-b~d). 나머지 1개는 유사분열을 하며, 동일한 2개의 배우자 전핵을 만든

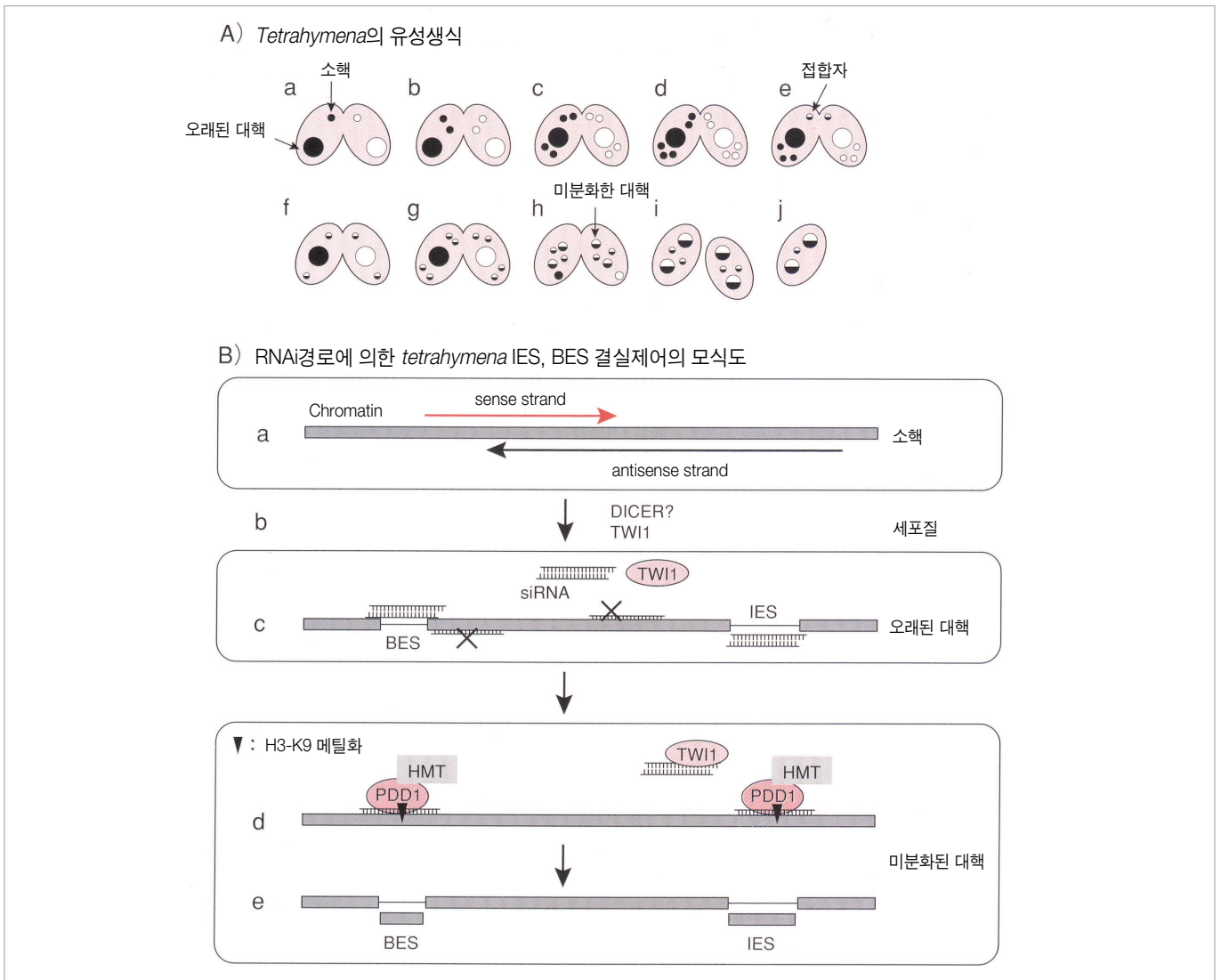


그림 2 *Tetrahymena*에 있어서 RNAi 경로에 의한 DNA 결실제어의 모식도

A) *Tetrahymena*의 유성생식. a. 두세포의 접합. b. 첫번째 소핵의 감수분열. c. 두번째 소핵의 감수분열. d. 배우자 전핵 형성. e. 접합자 형성. f. 첫번째 접합자 유사분열. g. 두번째 접합자 유사분열. h. 미분화 한 대핵 형성. i. 두세포 분리. j. 한개의 소핵 소실. B) RNAi 경로에 의한 IES, BES 결실 제어의 모식도. a. 소핵에서 sense, antisense strand 전사. b. TWI1을 매개로 siRNA가 생성. c. siRNA가 BES, IES의 서열을 scan하여 BES, IES에 해당하지 않는 siRNA는 분해. d. siRNA의 서열 특이적으로 PDD1를 매개로 histone 메틸기 전이 효소 HMT가 유도되고, H3-K9 메틸화가 일어남. e. H3-K9 메틸화가 일어난 서열이 BES, IES로 잘림.

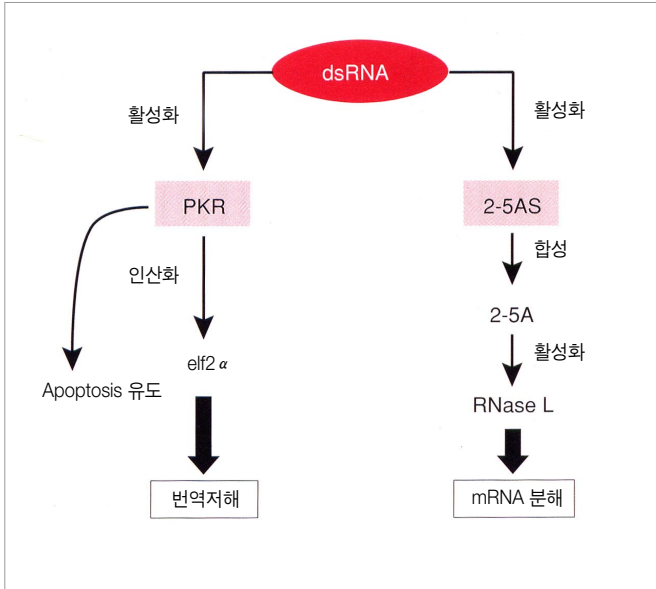


그림 3 포유동물세포의 dsRNA에 대한 반응 초기 배, 난모세포를 제거한 포유동물 체세포는 30 염기 이상의 긴 dsRNA의 도입에 의해 interferon 반응이 일어나는 것으로 알려져 있는 2개의 경로가 활성화 된다. PKR의 활성화는 번역인자를 인산화하여 번역을 저해하고, 또 2-5AS에 의해 RNaseL이 mRNA를 비특이적으로 분해한다. 이 시스템에 따라 포유동물세포에서 RNAi 효과가 특이적으로 관찰되지 않았다고 생각되었지만 siRNA를 이용함으로써 dsRNA에 대한 세포독성을 회피할 수 있었다.

다 (그림 2A-d). 배우자 전핵은 각기 다른 두 종류의 세포 간에 수정함으로써 2개의 접합자를 만든다. 접합자는 2회의 유사분열을 거쳐 동일한 4개의 핵을 형성 (그림 2A-f,g)하며, 거기에서 2개의 대핵, 2개의 소핵이 분화형성 된다 (그림 2A-h,j). 오래된 대핵은 apoptosis (세포 소멸)에 의해 분해된다 (그림 2A-i).

새로운 대핵 형성과정에서 2종류의 DNA 결실이 일어난다. 하나는 소핵 또는 접합자 유래의 대략 15%의 게놈 서열 (Internal eliminated sequences: IES)을 잃게 된다. IES는 대략 6,000개 정도라고 하며, 크기는 0.5 kb에서 20 kb 사이이다. 또 하나는 염색체의 50 bp 이하 정도의 서열이 잘려나가 (Breakage eliminated sequences: BES), 신규로 telomere가 부가되는 것이다. IES 결실과 ligation에 의한 재편성, EBS 결실과 telomere 서열 부가에 의해 접합자의 5개의 염색체로부터 200~300개의 대핵 염색체가 형성된다¹³. IES, BES는 정확히 같은 장소에서 보이기 때문에, 그 인식기구에는 서열특이적인 정보가 관여하고 있는 것으로 생각되었다. 지금까지 IES, BES 결실에는 CHROMO domain을 지닌 PDD1 (Pro-programmed DNA Degradation), PDD3 단백질이 필요하다고 알고 있었다¹³⁻¹⁶.

Gorovsky는 RNAi 경로와 IES, BES의 결실 관련을 조사하기 위해 PPD 단백질인 TWI1을 cloning하여 그 활동을 추적했다. *twi1* mRNA는 보통 증식 중인 세포에서는 검출되지 않으며, 유성생식시의 최초의 감수분열 직후에만 검출되었다 (그림 2A-b, 2B-b~d). *twi1* knock-out 세포는 유성생식을 완료하지 못하고 IES, BES 모두 결실되지 않았다. *twi1* knock-out 세포에 HA-tag를 붙인 TWI1 (HA-TWI1)을 도입하면 IES, BES가 결실되어, 야생형과 마찬가지로 유성생식을 완료하였다. HA-TWI1은 유성생식 동안, 처음에는 세포질, 다음으로 친대핵, 그 다음으로 미분화한 대핵으로 이동한 후 소실되었다 (그림 2B-b~d). *twi1* 또는 *pdd1* 발현과 병행하여

5' 인산기와 3' 수산기를 지닌 작은 26~31 염기의 RNA 축적이 관찰되었다 (그림 2B-c, d). 이 RNA는 *twi1* knock-out 세포에서는 검출되지 않았다¹¹.

IES 유래의 sense, antisense RNA의 존재는 보고된 바 있으므로¹⁷, 이 작은 RNA는 RNAi 경로에 의해 축적된 것으로 생각된다. 이 작은 RNA에 해당하는 서열은 대핵 DNA에는 거의 존재하지 않아, 소핵 DNA 즉 IES 또는 BES에 유래하는 것으로 나타났다¹¹.

Allice 등은 PDD1과 H3-K9 메틸화의 관계에 대해 조사하였다. PDD1은 적어도 2개의 CHROMO domain을, PDD3은 1개의 CHROMO domain을 지니며, 각각 *in vitro*에서 H3-K9와 특이적으로 결합하였다. *pdd1* 발현과 H3-K9 메틸화는 함께 일어나고 있으며, 모두 유성생식 접합시에만 관찰되었다. H3-K9 메틸화, *pdd1*은 소핵, 오래된 대핵에는 존재하지 않으며 미분화한 대핵에서 존재하였다 (그림 2B-d). 또한 DNA hybridization에 의해 H3-K9 메틸화, PDD1은 IES 서열과 관계가 있음이 밝혀졌다. H3-K9 메틸화는 *pdd1* knock-out 세포에서는 거의 보이지 않았다¹².

이 두 가지 보고에서 TWI1과 작은 RNA는 IES, BES의 서열정보를 오래된 대핵에서 새로운 대핵으로 전달하고 있으며, 아마도 *pdd1*을 통해 그 RNA의 서열정보에 기초한 H3-K9 메틸화에 의해 새로운 대핵의 IES, BES 결실이 일어나는 것을 보여준다 (그림 6B).

분열효모, tetrahymena는 게놈을 위협하는 서열을 siRNA를 통한 서열특이적인 H3-K9 메틸화하여 marking하고, 각각 heterochromatin화, DNA 결실이라는 형태로 전사를 불활성화하는 것으로 생각된다¹⁸.

RNAi의 포유동물 세포에 적용

Fire의 보고 후, 다수의 RNAi 연구는 수백 bp의 dsRNA를 도입하여 이루어졌다. RNAi는 간단한 유전자를 knock-out법으로 다양한 생물에 응용되어 왔으나, 포유동물계에서는 좀처럼 잘 이루어지지 않았다. RNAi가 포유동물 세포에서 효과가 없었던 이유 중 하나로 30 bp 이상의 dsRNA 도입에 의해 인터페론 반응으로 알려져 있는 2개의 경로가 활성화되는 것을 생각할 수 있다 (그림 3)^{19,20}. 인터페론 반응은 면역반응의 수시간에서 수일 전에 작용하는 방어기구로서, 바이러스 침입이나 전사, 번역 개시 등 바이러스 증식의 거의 모든 단계에 관여하고 있다. 인터페론은 dsRNA의 존적 단백질 kinase (dsRNA dependent-protein kinase: PKR) 2' -5'-oligo adenylate 합성효소 (2-5AS)를 유도한다. PKR은 보통 불활성형이지만 dsRNA와 결합해 활성화되며, 번역인자 eIF2a를 인산화한다. 이로서 eIF2a는 다른 번역인자와 불활성형 복합체를 만들며 번역을 저해한다. 또한 PKR 과잉발현으로 인해 apoptosis도 유도된다. 한편 2-5AS는 dsRNA에 의해 활성화되며 짧은 2-5A를 합성하지만, 이것이 2-5A 의존적 RNase L을 활성화한다. RNase L은 비특이적으로 모든 ssRNA를 절단한다. 즉, dsRNA 도입에 의한 PKR과 2-5AS의 활성화는 세포내 모든 유전자 발현을 저하시켜, 포유동물 세포에서 RNAi에 의한 특이적 유전자 knock-down은 잘 관찰되지 않는다²¹.

그렇다면 RNAi의 포유동물 세포에 대한 응용이 어떻게 가능했을까? 포유동물 세포에서의 RNAi 적용 예는 극히 한정적으로 mouse의 난모세포와 초기 배에서 보고가 있었을 뿐이었다^{22,23}. 많은 연구자들이 이 문제에 도전해 왔으나 그 실마리를 찾지 못했다. 그런데 2001년 5월에 발표된 Tuschl의 논문에 의해 마침내 그 해답이 밝혀졌다 (LifeScience & Biotechnology 29호 참고). 해답은 의외로 21 mer라고 하는 RNA의 길이

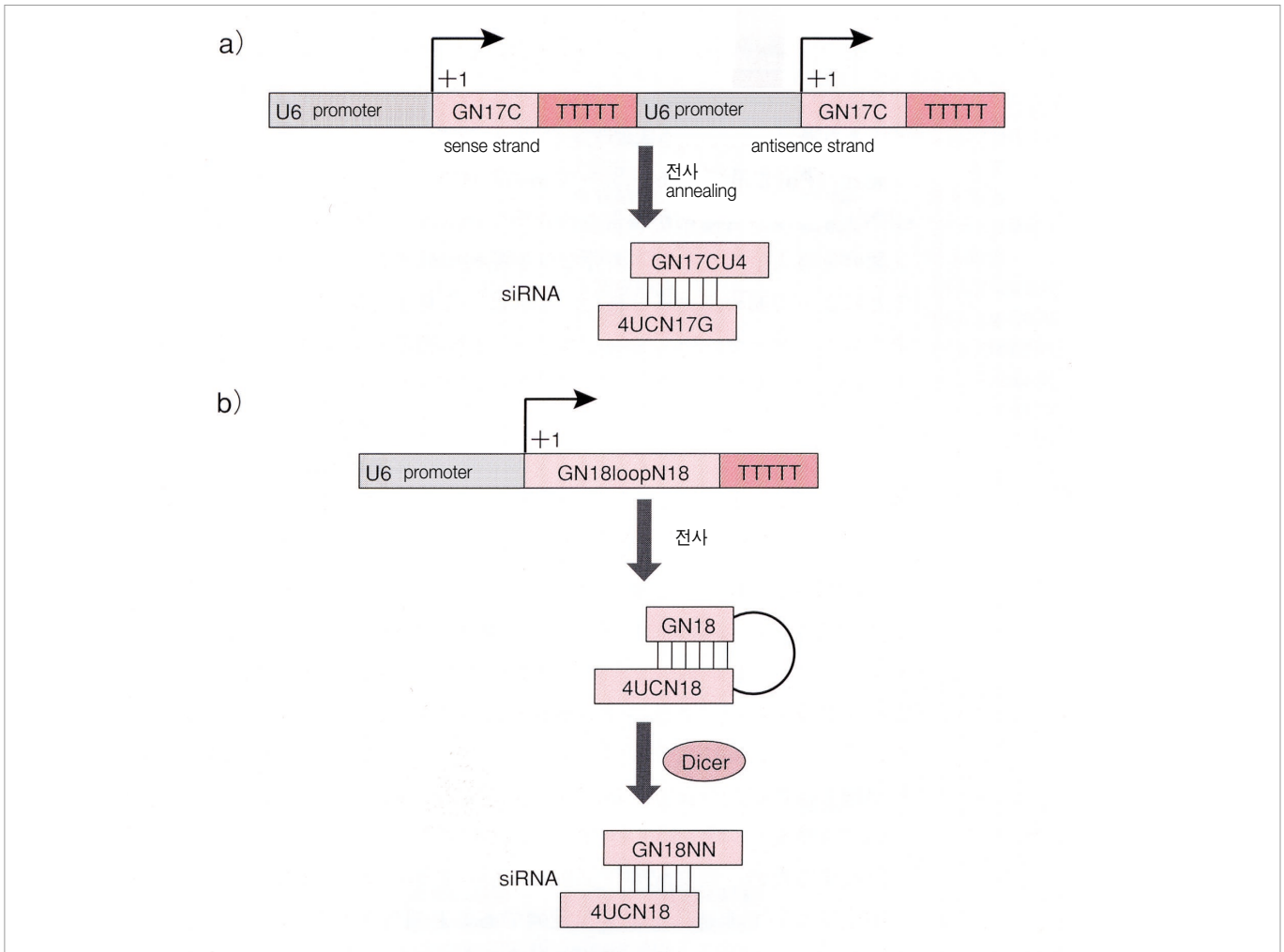


그림 4 U6-siRNA 벡터의 모식도

a) Tandem형 siRNA 벡터. 약 250 bp의 U6 promoter에 의해 전사개시염기 G, terminator TTTT 사이의 서열이 전사된다. 23염기의 sense 및 antisense RNA는 세포내에서 annealing되고, siRNA로서 기능을 한다. b) Hairpin형 siRNA 벡터. 전구체 RNA에서 hairpin형 RNA가 전사되고, Dicer에 의해 processing 되어 siRNA가 만들어진다.

와 3' 측에 2염기가 돌출되어 있는 dsRNA의 말단 형태였다. 그때까지의 상식으로는 짧을수록 효과가 나쁘다는 보고로 인해 대부분의 연구자들은 이 사실을 발견하지 못했다. Tuschl 등은 3' overhang이 있는 21 bp의 화학합성된 siRNAs를 그대로 injection함으로써 dsRNA에 의한 세포독성을 피해 HeLa 세포, NIH/3T3세포, COS-7세포, 293세포 등의 포유동물 세포에서 RNAi가 서열 특이적으로 일어날 수 있음을 보여 주었다.

포유동물 세포에서 RNAi에 의한 억제효과는 target 서열에 매우 의존한다고 알려져 왔다²⁴⁾. 그럼에도 불구하고 몇몇 임의로 디자인된 siRNA를 도입하자 기존의 다른 방법에 비해 높은 유전자 억제효과를 얻은 경우가 많다. 그 이유로는 아래의 두 가지를 생각할 수 있다. 하나는 보통 짧은 RNA는 세포 내에 대량으로 존재하는 RNase에 의해 빠르게 분해되지만, RISC에 들어간 siRNA는 매우 안정적이라는 점이다. 또 하나는 하나의 RISC가 한번 뿐 아니라 몇 번이라도 target mRNA를 절단할 수 있다는 점이다⁶⁵⁾. 또한, 포유동물 세포에서는 RdRp에 의한 증폭이 작용하지 않을 수도 있기 때문에 target mRNA의 upstream 또는 downstream 서열의 siRNA가 생성되지 않을 것으로 생각되어, 높은 특이성을 유지할 수 있다²⁵⁾. 그 때문에 RNAi는 포유동물 세포의 유전자 발현을 억제하기 위한 표준 tool로 여겨지고 있다.

보다 안정적인 유전자 발현 억제를 위해 - siRNA 발현 벡터의 개발

포유동물 세포에서의 RNAi의 문제는 siRNA의 합성이 매우 고가라는 점과 억제효과가 겨우 1주 정도라는 점이였다. 최근 세포내 DNA에서 siRNA를 생성하는 방법이 거의 같은 시기에 8개 그룹에서 보고되었다(그림 4)²⁶⁾⁻³²⁾.

siRNA를 세포 내에서 전사시키기 위해 가장 적합하다고 생각된 것은 RNA polymerase III (Pol III)에 의해 전사되는 Pol III계 promoter였다. PolIII계 promoter는 tRNA나 snRNA (small nuclear RNA) 등의 비교적 짧은 서열을 전사하는데 작용하고 있으며, Pol II계 promoter와 달리 전사 산물에 여분의 서열이 부가되지 않는다. 그 중에서도 U6 snRNA promoter²⁶⁾⁻³⁰⁾, 히스톤 H1 promoter³¹⁾ Pol III계 promoter로서는 예외적으로 조절서열이 전사 시작 서열의 upstream에 존재하여 promoter 다음에 어떠한 서열에도 삽입할 수 있어, siRNA 발현 벡터 promoter로서 이용되었다. 전사 시작 염기는 U6에서는 G, H1에서는 A가 바람직하다고 생각되었으나, H1은 다른 염기에서도 효과를 보였다³¹⁾. Pol III계 promoter는 T가 4개 이상 늘어선 서열을 전사 종결 서열로서 인식하므로, 기본적으로는 T 또는 A가 4개 이상 늘어선 서열을 target으로 할 수 없다. U6

표 1 Virus 질환, 암, 유전자질환의 원인유전자에 해당하는 RNAi 적용 예

Virus, 병명	유전자	세포종	세포종 유래	siRNA 형태	표현형	문헌
HIV-1	rev-EGFP	293T	신장세포	vector	virus 증식억제	26
	CCR5	CD4+T	T세포	letinvirus	침입저해	38
	Tsg101	293T	신장세포	siRNA	출아저해	48
	tat, RT, NF- κ B p65	Jurkat	백혈병 T림프종세포	siRNA	virus 증식억제	49
	CD4	Magi-CCR5	자궁암세포	siRNA	침입저해	50
	p24	HeLa-CD4	자궁암세포		virus 증식억제	50
	GFP	H9	T세포		virus 증식억제	50
	p24	ACH2	T세포		virus 증식억제	50
	tat, rev	293T	신장세포	siRNA	virus 증식억제	51
	tat, rev	Jurkat	백혈병 T림프종세포		virus 증식억제	51
	gag, pol	HOS.T4.CXCR4	골육종세포		virus 증식억제	52
	LTR TAR, nef, vif	Magi-CD4	자궁암세포	siRNA	virus 증식억제	53
	C형 간염 virus	NS5B-Fluc	mouse 간염	mouse 간장	vector	virus 증식억제
NS3, NS5B		Huh-7	간장암세포	siRNA	virus 증식억제	55
NS5B		Huh-7	간장암세포	EBNA	virus 증식억제	56
5' UTR		Huh-7,5	간장암세포	siRNA	virus 증식억제	57
poliovirus	capsid, polymerase	HeLa S3	자궁암세포	siRNA	virus 증식억제	58
	Fluc	MEF	mouse 태아섬유아세포		virus 증식억제	58
Rous육종 virus	fusion protein	A549	폐암세포	siRNA	virus 증식억제	59
	gag, pol	가금류배	가금류배	siRNA	virus 증식억제	52
Papillomavirus	E6, E7	CasKi, SiHa	자궁경부암세포	siRNA	apoptosis	60
	E6	CasKi, SiHa	자궁경부암세포	siRNA	p53 level 상승	61
Influenza virus	capsid, RNA transcriptase	MDCK	견상피세포	siRNA	virus 증식억제	62
암일반	p53	MEF	mouse 태아섬유아세포	vector	arrest 저해	27
	p53	MCF-7	유방암세포	vector	G1 arrest 저해	31
	p53	조혈간세포	E μ Myc mouse 태아간장조혈간세포	retrovirus	Myc유도림프종 촉진	44
	p53	MDAH087	Li-Fraumeni 증후군 피부섬유아세포	siRNA	점변이 p53 특이적 억제	61
췌장암	K-RAS V12	CAPAN-1	췌장암세포	retrovirus	종양형성능력상실	63
대장암	K-ras	SW480	대장암세포	vector	세포증식억제	32
전립선암	ezh2	RWPE	전립선암세포	siRNA	G2/M arrest	64
만성글수성백혈병	bcr/abl	K562	적아구백혈병세포	siRNA	bcr/abl 특이적 억제	65
	bcr/abl	CML-CD34+	CML 조혈세포	siRNA	bcr/abl 특이적 억제	66
polyglutamine병	GFP-polyglutamine	PC12	Rat 부신수질세포	adenovirus	inclusion body 형성 억제	33

promoter는 tetracycline에 의해 전사를 유도할 수 있어 치사유전자, 시기 특이적 유전자 등도 해석 가능하다고 생각된다³³⁾. 가장 효과가 높은 siRNA 발현 벡터 설계방법에 대해서는 아직 많은 부분 조사되어 있지 않다. 우리의 데이터에서는 tandem형 (그림 8A)보다 hairpin형 (그림 8B)이 저농도에서 높은 효과를 보이고 있다. 실제 실험에서는 siRNA 벡터를 5개 정도 만들어 transient assay로 그 효과를 확인한 후 지속적으로 유지할 수 있는 형태를 만드는 것이 좋을 것으로 생각된다.

최근 Pol II계 promoter인 CMV promoter에 의해서도 효과가 있는 siRNA 발현 시스템이 보고되었다³⁴⁾. 그것은 CMV 전사 시작 서열 바로 다음에 hairpin 서열의 도입과 여분의 부가서열을 최소한의 terminator로 이용하여 성공하였다. 이것은 지금까지 개발되어 온 다양한 Pol II계 promoter를 siRNA 발현 벡터로서 이용할 수 있다는 가능성을 나타내며, 가까운 장래 예를 들면 기관, 조직에 시기특이적인 siRNA 벡터 설계가 가능하게 될 것이다.

siRNA 발현 벡터에 의해 일시적이 아닌 지속적으로 유전자 발현을 억제 한 세포주, 동물체를 얻을 수 있으며, 또한 adenovirus, retrovirus, lentivirus 벡터에 넣어 종래 형질 전환 효율이 매우 낮았던 초대 배양세포에 대해 유전자 knock-down이 가능할 것으로 기대된다. 이미 논문으로서 보고되어, siRNA 발현 cassette를 adenovirus³⁴⁾, retrovirus^{35),36)}, lentivirus

벡터³⁷⁾⁻⁴¹⁾에 넣은 안정발현주에 의해 뇌세포, 간세포를 포함한 다양한 세포종에서 RNAi 적용이 가능한 것으로 나타났다. 이 밖에 siRNA 발현 벡터로 transgenic mouse³⁹⁾⁻⁴⁴⁾를 만든 예도 여러 건 보고되어 있다.

siRNA 발현 벡터는 성질상 sense 서열과 antisense 서열이 매우 가깝게 위치하기 때문에 palindrome을 형성한다 (그림 8). Palindrome은 포유동물 세포에서 매우 불안정한 배열이라고 보고되어 있다⁴⁵⁾. 이러한 완전한 palindrome은 target 서열을 인식하지 않는 sense 서열의 C를 T로 치환함으로써 RNA에 의한 억제효과를 떨어뜨리지 않고 회피할 수 있다⁴¹⁾⁻⁴⁷⁾. 장기간 지속할 수 있는 형태의 siRNA를 유지할 수 있는가의 여부와 유전자 발현이 억제된 후대 개체를 얻을 수 있는가에 대한 앞으로의 연구가 기다려진다.

의료분야에 응용

RNAi에 의한 유전자 silencing의 서열특이성과 높은 발현억제효과로 인해 특히 AIDS, 암, 유전질환 등 현재로서는 치료가 어려운 질환에 대한 유전자 치료에 기대가 모아지고 있다. 표 1은 RNAi를 적용한 보고이다 (문헌 26, 27, 31, 32, 34, 38, 44, 48-66).

HIV-1, C형 간염 바이러스를 비롯한 RNA 바이러스에 대해 siRNA 또는 siRNA 벡터를 이용한 보고가 있다. 어느 예에서도 바이러스 증식에 대해

수일에서 수시간에 걸쳐 높은 억제효과를 보였다. RNA 바이러스에 대한 RNAi의 target 서열로는 대부분의 경우 바이러스 자체 서열이 선택되었지만, TSG101⁴⁸⁾, NF- κ B p65 subunit⁴⁹⁾ 등의 바이러스 증식에 필요한 내재 인자에 대해서도 큰 효과를 얻고 있다. 또한 CD4, CCR5 receptor 등의 바이러스가 세포에 침입하기 위한 내재 receptor도 유효한 target으로서 기대되고 있다^{38),50)}.

RNA 바이러스 자체를 target으로 한 경우에 가장 우려되는 것은 RNA 바이러스 서열의 고빈도 변이이다. 바이러스에 의한 만성질환에서는 다양한 변이를 지닌 바이러스 집단이 형성되어 있어, siRNA에 의한 효과를 충분히 얻을 수 없을 것으로 생각된다. Poliovirus의 게놈을 target으로 할 경우, siRNA의 target이 되지 않는 변이가 생성된 바이러스 집단이 선택적으로 증식한 예가 보고되고 있다⁵¹⁾. 이러한 변이에 대해 효과를 유지하기 위해서는 보존된 서열을 target으로 하는 방법과 복수의 siRNA 또는 다른 방법도 사용하는 것이 유효하다고 생각된다.

배양세포에 추가로 mouse 개체에 대한 RNAi 적용 예가 보고되었다. 꼬리 정맥에 압력을 가하며 핵산을 도입시키는 방법으로 간장, 신장, 비장, 폐, 췌장에서 동시에 도입한 luciferase 활성을 특이적으로 90% 이상 억제했다⁴⁷⁾. 같은 방법으로 간세포의 C형 간염 바이러스의 5B polymerase 부분에 삽입한 luciferase 활성이 특이적으로 억제되었다⁵²⁾. 이러한 방법은 바이러스를 이용하지 않는다는 점에서 매우 유용하며, 앞으로 이러한 방법을 이용한 RNAi 의료 개발이 기대된다.

암 치료를 목적으로 한 RNAi 응용연구도 성과를 거두고 있다. 암의 원인 유전자는 변이되면 암유전자가 되는 *ras*, *myc* 등의 원암유전자와, 암유전자를 억제하는 기능을 하는 *p53* 등의 암억제유전자의 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 대부분의 경우 최소 이 2종류의 유전자 양쪽에 변이가 생겨 종양이 형성된다고 한다. 이러한 암의 원인유전자를 target으로 한 RNAi 적용으로서 *p53*⁴¹⁾, *K-ras*^{23),63)}의 point mutation에 대해 변이유전자만 억제한다고 보고되어 있다.

또한 RNAi는 암의 원인유전자가 융합유전자인 경우에도 효과를 발휘했다. *bcr/abl* 융합유전자는 조혈세포 암인 만성 골수성 백혈병의 원인유전자이지만 *bcr*, *abl* 유전자 자체는 생체 내에서 모두 필요한 유전자들이다. 따라서 *bcr*, *abl* 유전자의 발현을 억제하지 않도록 융합유전자 경계부분을 target으로 하여 각각의 유전자의 대략 10염기씩을 이용하는 형태로 siRNA가 설계되었다^{64),65)}. 그 결과 *bcr*, *abl* 자체의 발현에 영향을 미치지 않고 융합유전자만 억제 가능한 것으로 나타났다. 이것은 융합유전자가 원인유전자인 질환, 예를 들면 급성백혈병 등에 대해서도 RNAi를 응용할 수 있음을 시사한다⁶⁶⁾.

최근의 RNAi 암연구에 대한 응용으로서의 Chinanaiyan 그룹의 보고가 흥미롭다⁶⁴⁾. 암세포는 처음에는 한정된 생체 내에서 이동하지 않지만, 암이 진행되면 침윤·전이되게 된다. 한정된 범위의 암세포는 외과적인 방법이나 방사선요법으로 제거할 수 있지만, 전이된 암세포는 완전히 치료하는 것이 매우 어렵다. Chinanaiyan 그룹은 전이성과 국한성 전립선암 세포를 microarray로 비교함으로써 전이성 전립선암 세포에 특이적으로 높은 발현을 보이는 55 유전자와 발현이 낮은 480 유전자를 결정하였다. 그 중 전이성 세포에 가장 특이적으로 발현이 높았던 것이 Polycomb-group 단백질인 *ezh2*였다. Polycomb-group 단백질은 다양한 유전자의 발현을 억제하는 인자로서 알려져 있다. 흥미롭게도 *ezh2*는 종양 악성도에 관련하여 발현 패턴을 지니는 것으로 관찰되었다. *ezh2*처럼 암의 진행도와 발현이 연계된 유전자는 임상적으로 매우 중요한 지표로 이용될 것으로 기

대된다. siRNA로 *ezh2* 기능을 파괴하면 암세포 증식이 억제되며, 세포주기가 G2/M기에서 멈췄다 (G2/M arrest). 대규모 발현해석에 의해 밝혀진 *ezh2*는 RNAi에 의한 발현억제에 의해 그 기능이 밝혀졌다. 앞으로 이러한 전략은 여러 질환의 원인유전자에 적용될 것으로 생각된다.

현재 RNA 바이러스의 증식억제, 질환의 원인유전자 발현억제·기능해석 등의 분야에서 점차 RNAi 적용 성공사례가 보고되고 있다. 그러나 실제로 유전자 치료에 응용하기 위해서는 siRNA의 Delivery 방법, 효과의 지속성, 안전성 등 검토되어야 할 문제도 많다. 그러한 문제해결을 포함해 RNAi의 의료분야에 대한 응용은 앞으로 급속히 진전될 것이다.

선충에서의 게놈 scale의 RNAi

유전자 기능을 결정하는 방법으로서 화학적 변이유도제, UV, transposon 등으로 유전자에 무작위적으로 변이를 도입해, 그 표현형을 screening하여 파괴된 유전자 자리를 결정하는 방법이 전통적으로 이용되어 왔다. 이처럼 표현형을 나타내는 변이주로부터 유전자를 결정하는 방법을 forward genetics라고 하며, 수많은 유전자 기능 결정에 기여하였다. 그러나 DNA를 파괴함으로써 기능을 잃게 된 개체가 발생하는 이런 방식으로 multicopy 유전자나 기능을 다른 유전자 산물이 보완하지는 못한다. 한편, RNAi는 mRNA가 target이며 mRNA 수준 이상의 상동 부분을 지닌 유전자 기능을 선택적으로 파괴할 수 있다. target 서열을 특정하여 그 기능을 잃게 된 개체를 얻는 방법은 reverse genetics라고 불린다. 게놈 프로젝트가 진전됨에 따라 선충, 초파리, 환형동물, 사람 등의 고등생물의 전체 염기서열을 이용할 수 있게 된 지금, RNAi는 reverse genetics를 위한 최고의 tool로 여겨지고 있다⁶⁹⁾.

선충에 dsRNA를 도입하는 방법으로서 microinjection으로 직접 도입해 왔는데, 이 방법은 개체마다 조작하여야 한다. 최근 dsRNA가 들어간 용액에 담그는 방법⁷⁰⁾, dsRNA가 전사되어 있는 박테리아를 먹이로 먹이는 방법⁷¹⁾도 유효한 것으로 밝혀졌다. 이처럼 간편한 형질 전환방법이 개발됨에 따라 선충에 대한 RNAi 적용은 더욱 넓어져 대량의 개체를 처리할 수 있게 되었다.

선충은 6개의 염색체를 지니며, 유전자수는 약 19,000개로 어렵잡고 있다⁷²⁾. 그 중 2개의 염색체상의 거의 모든 유전자에 대해 선충의 cDNA를 기본으로 한 dsRNA를 만들어, RNAi를 이용한 표현형이 시도되었다.

염색체I의 유전자 약 90%에 해당하는 2,416 유전자 중 378 유전자가 RNAi에 의한 표현형을 나타냈다⁷³⁾. 지금까지 알려져 왔던 표현형이 70에서 갑자기 5배로 많아지게 된다. 대량으로 결정된 유전자 기능은 다른 생물의 유전자 기능을 추정하기 위해서도 매우 유효하며, 예를 들면, 사람의 질병과 관련된 유전자 homologue가 발견되고 있다. 또한 종래 보고되어 온 초기배에서의 치사유전자 중 90%가 특정되어, RNAi에 의한 screening 시스템이 매우 유효함을 나타냈다. 이 밖에 147의 초기배에서의 치사유전자의 RNAi 표현형을 시간의 흐름에 따라 녹화해 발생의 어느 단계에서 필요한지를 상세하게 해석했다⁷⁴⁾. 염색체III 상의 유전자 90%에 해당하는 2,232 유전자 중, 133 유전자가 RNAi에 의한 표현형을 나타냈다. 그 중 11 유전자 기능만 종래의 연구에서 실험적으로 결정되었으며, 104 유전자는 아직 선충에서 그 기능은 결정되지 않았지만 다른 생물에 보존되어 있는 것이며, 나머지 18 유전자는 알 수 없었다⁷⁵⁾. 그 후, 일본 그룹에서도 게놈 scale로 RNAi를 이용해 생식계열에 관계하는 유전자를 결정하고 있음이 보고되고 있다^{76),77)}.

최근 게놈 scale의 RNAi에 의해 결정된 표현형과 microarray, 대규모 효

모 · two-hybrid 시스템에 의해 결정된 transcriptom, 단백질 상호작용 비교검토가 이루어졌다⁷⁶⁾⁷⁷⁾. 상세한 RNAi 표현형에 의한 분류는 각각의 해석으로 얻어진 데이터의 타당성을 높이고, 미동정 생물경로의 규명에 큰 위력을 발휘했다. 주의점은 RNAi를 일으키는 방법 등의 실험 시스템 차이에 따라 같은 유전자에 대해 서로 다른 표현형으로 분류될 가능성이 있다는 것이다. 또한 재현성 문제도 지적되고 있다. 그럼에도 불구하고 RNAi를 이용한 게놈 scale의 유전자 기능 결정은 매우 강력하며 매력적인 방법이다. 앞으로 수년간 중요한 모델 생물에 대해 RNAi가 적용 가능한 표현형의 동정 · 분류와 그에 따른 포스트게놈 해석은 급속히 진전될 것으로 생각된다.

결론

현재 대략 30,000개의 사람의 전체 유전자를 개별적으로 knock-down하는 siRNA 벡터 library 구축이 진행 중이다. siRNA library를 이용한 screening 시스템에 의해 암이나 AIDS 등의 질환과 관련된 유전자 또는 세포분화, signal 전달경로 등 다양한 생물현상과 관련된 유전자의 종합적인 동정 · 분류가 가능해질 것으로 기대된다. 독자적인 방법으로 변이를 줌으로써 siRNA 벡터의 안정성은 급격히 향상되고 있으며⁴²⁾⁴⁷⁾, 이미 효율적으로 대량 벡터를 만드는 시스템을 확립하였다. 또한 RNAi에 의한 유전자 억제효과의 target 서열 의존성에 대해서는 독자적으로 적당한 site를 선택하는 알고리즘을 개발함으로써 대응하고 있다.

응용면은 물론이며, RNAi 개념은 많은 생물현상 해명에 빛이 되고 있다. RNAi는 종 (species)을 초월해 보존되어 있으므로, 각각의 종에서 이루어진 연구가 상호 보완하며 매우 빠른 속도로 연구가 진전을 보이고 있다. RNAi에 관련된 유전자의 homologue는 보존되어 있는 것도 많지만, 다른 곳에서는 전혀 찾아볼 수 없는 것도 있다. 각각의 종에서 그 유전자의 대부분은 생물학적으로도 중요한 역할을 하고 있어, 하나의 유전자는 상상 이상으로 여러 가지 기능을 하고 있음을 알려지고 있다. 그 기능은 각각의 생물에서, 또는 독자의 진화를 거듭하며 각기 다른 네트워크로 구축되어 있다. 또한 siRNA와 관련되어 발견된 miRNA는 적어도 1,000종류 정도가 될 것으로 생각된다. 그 대부분은 전사인자를 제어하는 것으로 생각되며, 그 작은 siRNA, miRNA에 의해 다양한 생물현상이 제어되고 있음을 시사한다.

RNAi 발견으로 인해 기초에서 응용까지 다양한 유용한 부산물이 만들어지고 있다. 그 파급효과는 지금까지 살펴본 것처럼 새로운 유전자 발현억제기구의 해명, 의료분야에 대한 응용, 바이러스 내성 작물을 위한 품종 개량, 포스트게놈 시대에서의 유전자 기능해석 등에 영향을 주어 모든 국면에서 무시할 수 없게 되었다. RNAi를 효과적으로 이용하기 위해 개개의 목적에 적합한 screening 시스템 개발이 중요해질 것이다.

참고 문헌

- 1) Grewal, S. I., & Elgin, S. C. : *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**: 178-187, 2002
- 2) Lachner, M., & Jenuwein, T. : *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**: 286-298, 2002
- 3) Matte, M. F. *et al.* : *EMBO J.*, **19**: 5194-5201, 2000
- 4) Dudley, N. R. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 4191-4196, 2002
- 5) Maison, C. *et al.* : *Nat. Genet.*, **30**: 329-334, 2002

- 6) Hall, I. M. *et al.* : *Science*, **297**: 2232-2237, 2002
- 7) Volpe, T. A. *et al.* : *Science*, **297**: 1833-1837, 2002
- 8) Reinhert, B. J., & Bartel, D. P. : *Science*, **297**: 1831, 2002
- 9) Allshire, R. : *Science*, **297**: 1818-1819, 2002
- 10) Jenuwein, T. : *Science*, **297**: 2215-2218, 2002
- 11) Mochizuki, K. *et al.* : *Cell*, **110**: 689-699, 2002
- 12) Taverna, S. *et al.* : *Cell*, **110**: 701-711, 2002
- 13) Turkewitz, A. P. *et al.* : *Trends Genet.*, **18**: 35-40, 2002
- 14) Madireddi, M. T. *et al.* : *Cell*, **87**: 75-84, 1996
- 15) Nikiforov, M. A. *et al.* : *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 4128-4134, 2000
- 16) Smothers, J. F. *et al.* : *Development*, **124**: 4537-4545, 1997
- 17) Chalker, D. L., & Yao, M. C. : *Genes Dev.*, **15**: 1287-1298, 2002
- 18) Demburg, A. F., & Karpen, G. H. : *Cell*, **111**: 159-162, 2002
- 19) Stark, G. R. *et al.* : *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 227, 1998
- 20) Gil, J., & Esteban, M. : *Apoptosis*, **5**: 107-114, 2000
- 21) Ui-Tei, K. *et al.* : *FEBS Lett.*, **479**: 79-82, 2000
- 22) Svoboda, P. *et al.* : *Development*, **127**: 4147-4156, 2000
- 23) Wianny, F., & Zernicka-Goetz, M. : *Nat. Cell Biol.*, **2**: 70-75, 1999
- 24) Hohjoh, H. : *FEBS Lett.*, **521**: 195-199, 2002
- 25) Kisielow, M. *et al.* : *Biochem. J.*, **363**: 1-5, 2002
- 26) Lee, N. S. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **20**: 500-505, 2002
- 27) Paddison, P. J. *et al.* : *Genes Dev.*, **16**: 948-985, 2002
- 28) Paul, C. P. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **20**: 505-508, 2002
- 29) Sui, G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5515-5520, 2002
- 30) Yu, J. Y. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6047-6052, 2002
- 31) Brummelkamp, T. R. *et al.* : *Science*, **296**: 550-553, 2000
- 32) Kawasaki, H. and Taira, K. : *Nucleic Acids Res.*, **31**: 700-707, 2003
- 33) Ohkawa, J., and Taira, K. *Hum. Gene Ther.*, **11**: 557-585, 2002
- 34) Xia, H. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **20**: 1006-1010, 2002
- 35) Devroe, E., & Silver, P. A. *BMC Biotechnol.*, **2**: 15, 2002
- 36) Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 14943-14945, 2002
- 37) Abbas-Terki, T. *et al.* : *Hum. Gene Ther.*, **13**: 2197-2201, 2002
- 38) Qin, X. F. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 183-188, 2003
- 39) Rubinson, D. A. *et al.* : *Nat. Genet.*, PMID: 12590264, 2003
- 40) Tiscornia, G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1844-1848, 2003
- 41) Miyagishi, M. *et al.* : submitted, 2003
- 42) Hasuwa, H. *et al.* : *FEBS Lett.*, **532**: 227-230, 2002
- 43) Carmell, M. A. *et al.* : *Nat. Struct. Biol.*, **10**: 91-92, 2003
- 44) Hemann, M. T. *et al.* : *Nat. Genet.*, PMID: 12567186, 2003
- 45) Kawasaki, H. *et al.* : *EMBO Rep.*, in press, 2003
- 46) Tanaka, H. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 8772-8777, 2002
- 47) 多比良和誠, 宮岸 眞: 特願, 2001-363385, 2001
- 48) Garrus, J. E. *et al.* : *Cell*, **107**: 55-65, 2002
- 49) Surabhi, R. M., & Gaynor, R. B., *J. Virol.*, **76**: 12963-12973, 2002
- 50) Novina, C. D. *et al.* : *Nat. Med.*, **8**: 681-686, 2002
- 51) Coburn, G. A., & Cullen, B. R., *J. Virol.*, **76**: 9225-9231, 2002
- 52) Hu, W. *et al.* : *Curr. Biol.*, **12**: 1301-1311, 2002

- 53) Jacque, J. M. *et al.* : *Nature*, **418**: 435-438, 2002
 54) McCaffrey, A. P. *et al.* : *Nature*, **418**: 38-39, 2002
 55) Kapadia, S. B. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 2014-2018, 2003
 56) Wilson, J. A. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, PMID: 12594341, 2003
 57) Randall, G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 235-240, 2003
 58) Gitlin, L. *et al.* : *Nature*, **418**: 430-434, 2002
 59) Bitko, V., and Barik, S. : *BMC Microbiol.*, **1**: 34, 2001
 60) Jiang, M., and Milner, J., *Oncogene*, **21**: 6041-6048, 2002
 61) Martinez, L. A. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 14849-14854, 2002
 62) Ge, Q. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, PMID: 12594334, 2003
 63) Brummelkamp, T. *et al.* : *Cancer Cell*, **2**: 243-247, 2002
 64) Varambally, S. *et al.* : *Nature*, **419**: 624-629, 2002
 65) Wilda, M. *et al.* : *Oncogene*, **21**: 5716-5724, 2002
 66) Scherr, M. *et al.* : *Blood*, **101**: 1566-1569, 2003
 67) Lewis, D. L. *et al.* : *Nat. Genet.*, **32**: 107-108, 2002
 68) Ohshima, K. *et al.* : submitted, 2003
 69) Sternberg, P. W. : *Cell*, **105**, 173-176, 2001
 70) Tabara, H. *et al.* : *Science*, **282**: 430-431, 1998
 71) Kamath, R. S. *et al.* : *Genome Biol.*, **2**: 1-10, 2000
 72) The *C. elegans* Sequencing Consortium. : *Science*, **282**: 2012-2018, 1998
 73) Fraser, A. G. *et al.* : *Nature*, **408**: 325-330, 2000
 74) Zipperlen, P. *et al.* : *EMBO J.*, **20**: 3984-3992, 2001
 75) Gonczy, P. *et al.* : *Nature*, **408**: 331-336, 2000
 76) Maeda, I. *et al.* : *Curr. Biol.*, **11**: 171-176, 2001
 77) Hanazawa, M. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 8686-8691, 2001
 78) Walhout, A. J. *et al.* : *Curr. Biol.*, **12**: 1952-1958, 2002
 79) Piano, F. *et al.* : *Curr. Biol.*, **12**: 1959-1964, 2002
 80) 明石英雄, 宮岸 眞, 多比良和誠 : *Antisense*, **5** (2): 59-74, 2001
 81) 明石英雄, 宮岸 眞, 多比良和誠 : *Antisense*, **6** (2): 69-88, 2002
 82) 明石英雄, 宮岸 眞, 多比良和誠 : *Pharm. Tech, Japan*, **18** (2): 149-158, 2002
 83) Cole, E. S. *et al.* : *Dev. Biol.*, **189**: 215-232, 1997

믿을 수 있는 Takara 합성 DNA

- 1. 고품질** - 귀하의 소중한 실험을 위해 TaKaRa 합성 DNA는 정품의 시약 및 컬럼만을 사용합니다.
- 2. 신속** - 전국 어디서나 빠르고 정확한 택배서비스로 납품하여 드립니다.
- 3. 다양한 서비스** - 50 nmol, 200 nmol, 대량합성, 수식합성 등 고객이 원하는 대로 합성합니다.
- 4. 편리한 주문** - 지역별 전문대리점, e-mail 또는 인터넷을 이용하여 온라인으로 주문할 수 있습니다.
- 5. 믿을 수 있는 기술지원 서비스** - 언제 어디서나 무엇이든 전문가가 상의하여 드립니다.

50 nmol(2 OD 보증)
PCR Grade

1~250 mer → 1,000원/base
 251~2,000 mer → 800원/base
 2,001 mer 이상 → 600원/base

200 nmol(8 OD 보증)
PCR Grade

1~250 mer → 1,400원/base
 251~2,000 mer → 1,300원/base
 2,001 mer 이상 → 1,200원/base

정제료(최종 1 OD 보증), SEQ Grade → 30,000원