

Human · Cytochrome P450의 주요 10분자종의 발현을 단순하며 · 정확하게 정량 가능!!

Cycleave Human P450 정량 Probe/Primer Set

TaKaRa Code CY401 20회용

- Human · Cytochrome P450의 주요 10분자종의 housekeeping 유전자 2종 (RNA양 보정용)의 발현량을 Real Time RT-PCR로 정량하기 위한 probe와 primer 세트이다.
- Cycleave RT-PCR Core Kit (TaKaRa Code CY502)와 조합하여 사용한다.
- Smart Cycler® II System 등의 RealTime PCR 기기가 필요하다.

Cytochrome P450은 superfamily로 분류되는 효소군으로, 같은 subfamily에 속하는 분자종에는 상동성이 매우 높다. Cycling probe법 (그림 1, LifeScience & Biotechnology 27호 참조)을 채택함으로써, 상동성이 높은 Cytochrome P450 분자종도 정확한 정량이 가능하다.

본 고에서는 본 제품의 내용과 본 제품을 이용하여 특히 높은 상동성을 지닌 human CYP2C subfamily (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19) 발현을 해석한 예를 소개한다.

제품 내용

Cycleave Human P450 정량 Probe/Primer Set (20회분)

PCR Primer Mix	10 μ l \times 12종류
Cycling probe (FAM 표식)	20 μ l \times 12종류
RNA transcript ^{*1} (10 ⁶ copy/ μ l)	15 μ l \times 12종류
Dilution Buffer (for RNA transcript)	1 ml

*1 : 검량선 작성용 표준 RNA

【정량 가능한 분자종】

Human CYP1A1 Human CYP2C9 (Human β actin)²
 Human CYP1A2 Human CYP2C19 (Human GAPDH)²
 Human CYP2A6 Human CYP2D6
 Human CYP2B6 Human CYP2E1
 Human CYP2C8 Human CYP3A4

*2 : RNA양 보정용 housekeeping 유전자

실험 예

(1) Cycling probe의 특이성

본 제품에는 검량선 작성용 standard로서 각 분자종 유전자와 같은 서열을 지닌 인공합성 RNA (RNA transcript)가 첨부되어 있다. 이들 RNA transcript를 주형으로 이용하여 목적하는 분자종이 정확한 probe · primer set에서만 검출되는가를 조사하였다 (그림 2).

그림 2에서 알 수 있듯이, 각 probe · primer set은 해당하는 분자종의 주형만 검출하며, 다른 분자종 주형에는 전혀 반응하지 않음을 알 수 있다.

(2) CYP2C subfamily의 발현 해석

판매되고 있는 다양한 장기 유래의 total RNA 6종에 대해 CYP2C subfamily 발현을 해석하였다. 먼저 첨부 RNA transcript의 단계 희석액을 이용하여 주형 정량을 위한 검량선을 작성하였다 (그림 3).

다음으로 6종류의 total RNA에 대해 CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, β -actin, GAPDH를 검출하였다.

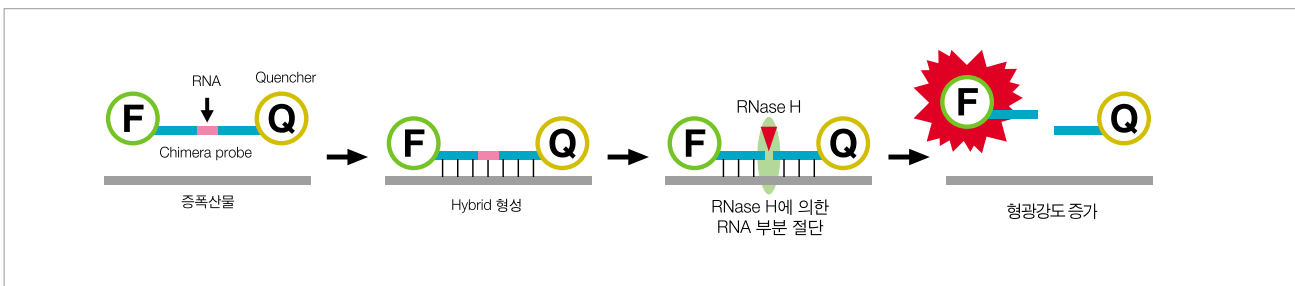


그림 1 Cycling probe법의 원리

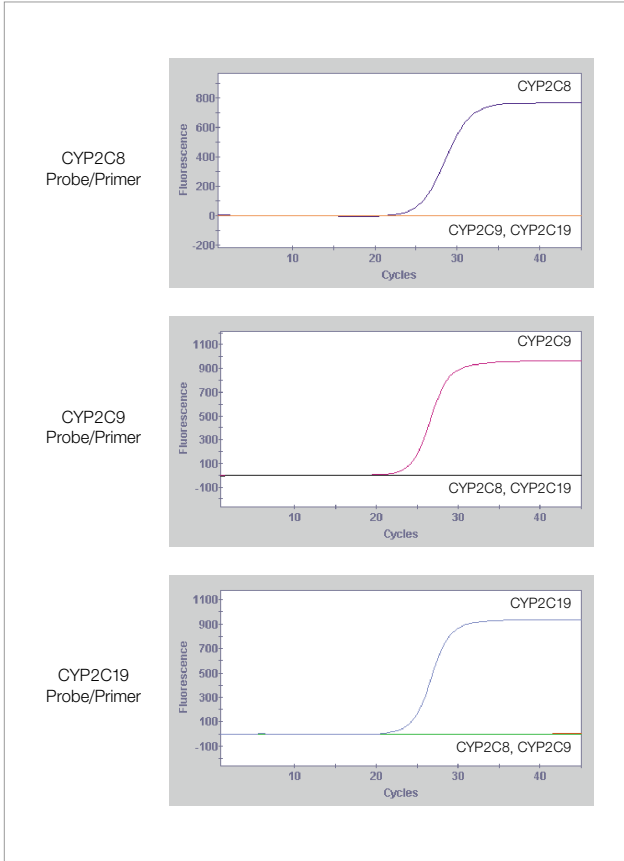


그림 2 Cycling probe를 이용한 특이적 검출
본 제품에 첨부되어 있는 CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19의 probe · primer 세트를 이용해 Real Time RT-PCR을 수행하였다. 이 때 주형으로 CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19의 RNA transcript 각 1 µl을 이용하였다. Real Time PCR 장치는 Smart Cycler® II System을 이용하였다.

Real Time RT-PCR로 얻은 결과 (그림 4)를 검량선에 적용하여 각 유전자의 발현량을 산출하여, housekeeping 유전자 (β -actin, GAPDH) 발현량에 따라 RNA양을 보정해 CYP2C 분자종의 상대적 발현량을 산출하였다 (그림 5). A사 제품을 이용하여 동일한 발현해석을 하고, 결과를 비교하였다 (그림 5).

그림5의 결과에서 CYP2C subfamily는 여러 장기 중 간장에서의 발현이 많은데, 특히 CYP2C9는 그 같은 경향이 강한데 비해 CYP2C8이나 CYP2C19는 그 밖의 다양한 장기에서도 비교적 많이 발현됨을 알 수 있다. 이런 결과는 기존의 CYP2C subfamily 발현 양식에 관한 지견과 일치한다. 또한 A사 제품에 의한 발현해석에서도 같은 결과를 알 수 있었다. 그러나 A사 제품을 이용한 검출에서는 일부 장기에서 데이터를 얻지 못했다. 이는 본 제품에 비해 검출 감도가 낮고, 발현량이 적은 mRNA를 검출하지 못한 것으로 추측된다.

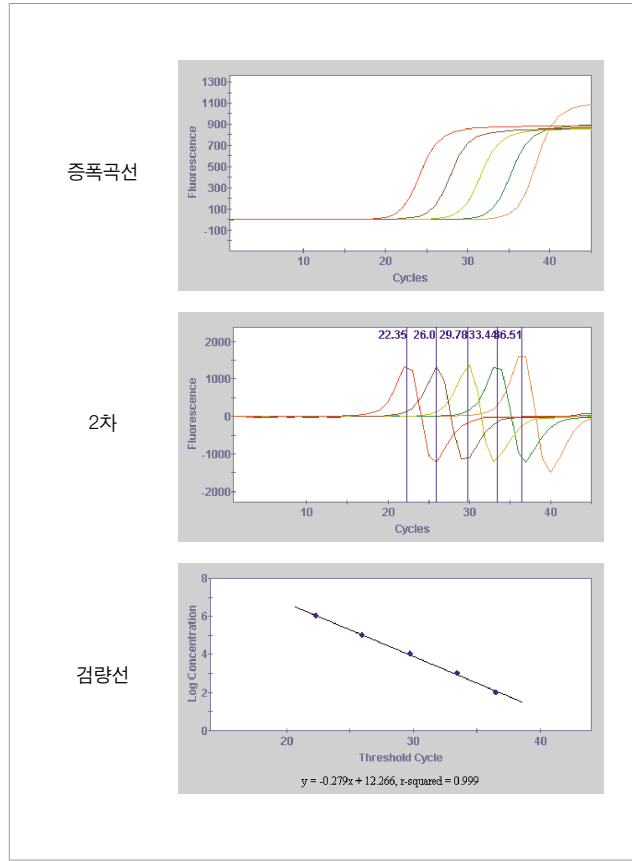


그림 3 검량선 작성
검량선용 표준에는 제품에 첨부되어 있는 RNA transcript를 dilution buffer로 10배 단계 희석해 5단계 농도로 한 것을 이용하였다.

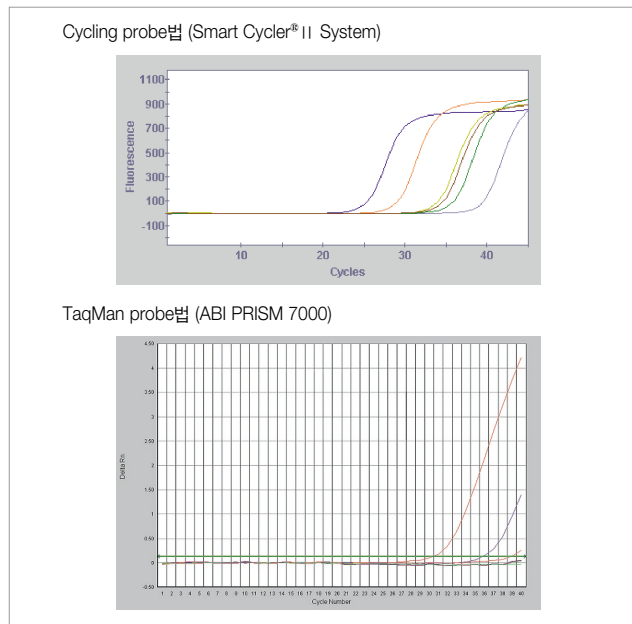


그림 4 증폭산물의 Real Time 검출의 일례: 본 제품과 A사 제품을 이용한 CYP2C19 발현해석 비교
각 반응에는 total RNA 100 ng을 주형으로 이용하였다.

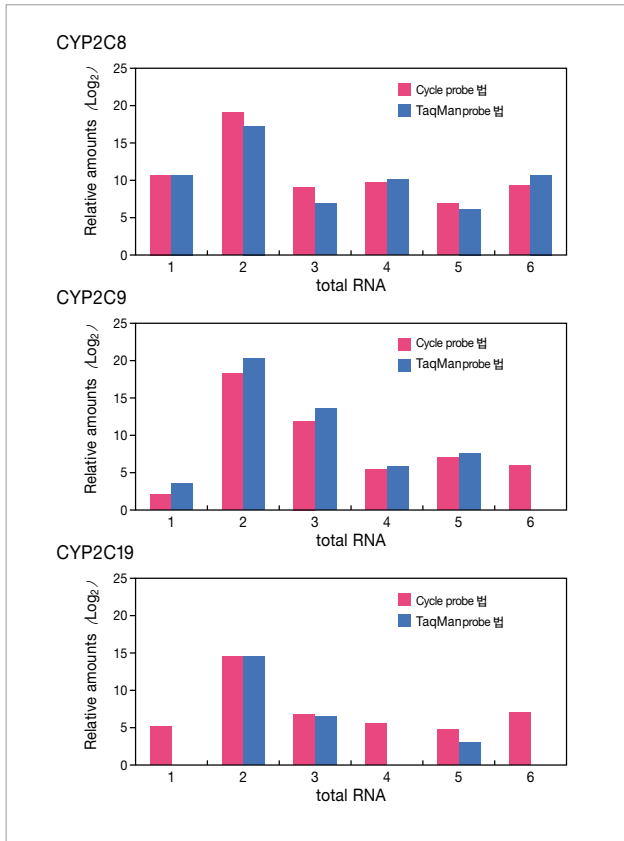


그림4 증폭산물의 Real Time 검출의 일례: 본 제품과 A사 제품을 이용한 CYP2C19 발현해석 비교
 각 반응에는 total RNA 100 ng을 주형으로 이용하였다.

관련 제품

- Cycleave RT-PCR Core Kit
 TaKaRa Code CY502 50회
- Cycleave Rat P450 정량 Probe/Primer Set
 TaKaRa Code CY402 각 20회
- Smart Cycler® II System
 TaKaRa Code SC200N/SC210N

Housekeeping 유전자 검출용 Real Time RT-PCR primer (& probe)

기존의 제품군 (Life Science & Biotechnology 31호 참조)에 신제품이 추가되었다. Real Time RT-PCR Core Kit를 이용하여 Real Time RT-PCR 수행할 때, housekeeping 유전자를 검출하기 위해 사용하는 primer set 외에 cycling probe법을 이용한 검출용 primer와 probe set도 있다. 제품 리스트는 당사 온라인 카탈로그 (www.takara.co.kr)를 참고한다. 출시된 제품 모두 반응성 test를 완료하였으므로 PCR에 즉시 사용할 수 있다.

Real Time PCR 해석 서비스

Primer 및 probe 설계, 합성에서 반응조건 최적화에 이르기까지 Real Time PCR 실험을 종합적으로 지원하고 있다. 또한 실제 시료 측정 및 정량해석도 실시하므로, Real Time PCR 장치를 보유하고 있지 않은 연구자 분들도 사용이 가능하다. 자세한 서비스 내용은 당사 홈페이지를 참고한다.

Real Time PCR 실험 가이드

Real Time PCR 실험을 성공시키기 위한 가이드는 당사 Life Science & Biotechnology 30호 (실험강좌)에 게재되어 있다. Primer 설계에서 PCR 반응조건 설정방법까지, Real Time PCR 실험에 필요한 항목이 자세히 설명되어 있으므로 참고한다.