

# Cell Culture 하면서, 동시에 Light detection까지 가능한 System ATTO Kronos Luminometer

## 유전자의 transcription 및 translation과정

어느 날 A 씨는 갑자기 몸이 안 좋아져 쓰러졌다. A 씨는 병에 걸린 것은 아닌가 하고 병원에 가기로 하였다. 의사의 진단 결과, A 씨는 병을 치료하기 위해 입원한 후 느긋하게 쉬며 영양이 있는 음식을 먹고 약을 복용하게 되었다.

며칠이 지나자 휴식과 영양보급으로 체력을 회복하고, 투약에 의해 병이 치료되어 건강해졌다. 이때 체내에서는 건강해지기 위한 메커니즘이 작용하며, 휴식이나 영양보급, 투약 등은 이 메커니즘이 작용하기 위한 계기가 되었다.

병의 원인이 무엇인지를 조사해 본 결과, 단백질 A의 생성량이 감소하였기 때문에 몸의 상태가 나빠진 것을 알 수 있었다. 그리고 이 단백질 A의 생성량은 다른 단백질 B에 의해 조절되고 있는 것을 알 수 있었다. 이 병은 단백질 B 유전자의 활동이 약해져서 발생하는 것이었다.

A 씨가 복용한 약은 단백질 B 유전자 활동을 활발하게 하는 효과가 있는 것이었다. 또한 이 약은 1일 1회, 아침 8시에 복용하면 최대의 효과를 발휘하여 투약량도 줄일 수 있기 때문에 부작용이 줄어들 것이라고 한다.

A 씨의 건강을 회복하게 만든 이 약은 단백질 생합성에 초점을 맞추어 개발된 것으로, 약 효과의 정도나 변화를 연구한 결과, 효과적인 투약 타이밍과 양을 발견할 수 있었던 것이다.

## 미세한 단백질 생합성량의 분석

목적으로 하는 단백질이 언제, 어느 정도 만들어지고 있는가를 아는 것은 치료에 효과적인 투약 시기와 양을 알아내는데 중요하다.

이 타이밍과 양을 추정하는 방법으로 mRNA를 대상으로 RT-PCR, northern blotting과 *in-situ* hybridization이 이용되고 있다. 목적으로 하는 단백질 항체가 있으면 Western Blotting의 활용도 가능하다.

이런 방법을 이용하여 일정 시간마다 cell에서 mRNA와 단백질을 추출할 수 있으면 전사량과 단백질량의 경시적인 변화를 알 수 있다. 그러나 이런 방법으로 시료를 채취하는데는 많은 노력과 시간이 필요하다.

## 간편한 Promoter 전사 활성 측정 방법

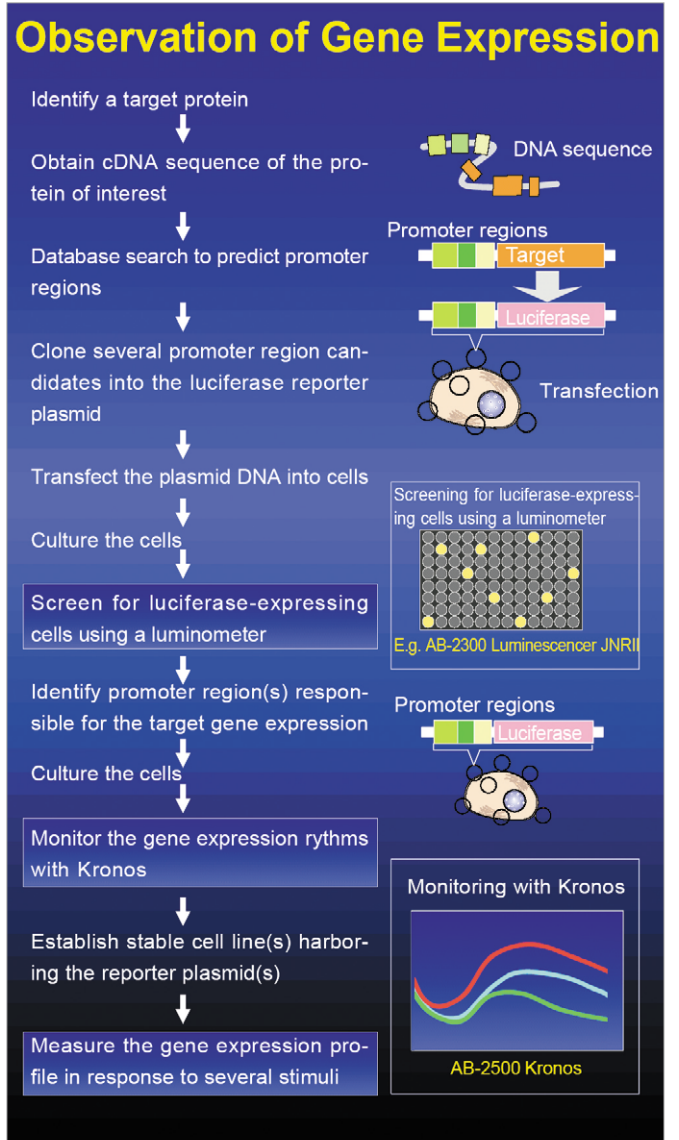
보다 간편하게 전사 활성을 해석할 수 있는 방법으로, bioluminescent protein을 이용한 reporter gene 실험이 주목을 끌고 있다. Reporter gene assay법을 활용하려면, database 등을 참고로 하여 유전자의 promoter 영역을 선정한 후 이 promoter 서열의 하류에 reporter gene을 연결시킨 vector를 조제하고, 이 vector에 세포를 도입한다. 도입에 성공한 세포는 luminometer를 사용하여 스크리닝 할 수 있다.

이와 같이 bioluminescent protein을 reporter 유전자로서 도입할 수 있는

cell은 배양하면서 전사활성을 real time으로 측정할 수 있다는 장점이 있다. 발광 측정은 세포에 대해 기질(substrate) 이외의 자극이 없어 장시간 측정이 가능하다.

## Luciferase assay

Reporter gene assay에서는 firefly Luciferase 유전자가 폭넓게 이용되고, Luciferase assay법으로도 불리고 있다. Luciferase assay에서는 대상 유전

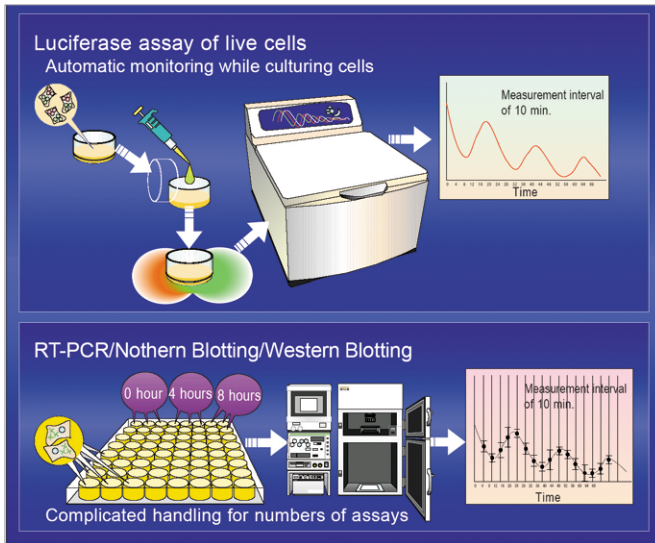


자로부터의 단백질 합성 대신 Luciferase가 합성된다. 실제로 mRNA와 Luciferase량의 변동이 일치한다는 예가 보고 되어 있다. 발광 기질의 Luciferase를 배지에 첨가만 해 두면 세포 내의 Luciferase 농도에 의존한 발광이 관찰되기 때문에 비교적 측정이 간단하다. 세포 내에서는 Luciferase의 수명이 짧거나 축적되지 않는 것도 real time 측정이 가능하다.

**Timing 과 Luciferase Assay**

동일한 시료인데 시간에 따라 Luciferase assay 발광량이 차이가 나는 경우가 있다. 유전자 발현은 전사 요인 등의 자극에 의해 촉진 또는 억제되거나 일정한 주기성을 발생하기도 한다. 그러나 기존의 Luciferase assay는 세포를 파괴하고 측정하기 때문에, 어느 시점에서 유전자 발현이 나타나는가에 주안점을 두었다. Luminometer도 장시간 측정하기는 힘들고, 어디까지나 일정한 발현 상태가 지속될 것으로 예상하고 결과를 평가하였다.

ATTO는 최근 장시간 promoter 전사활성을 측정할 수 있는 luminometer AB-2500 KRONOS를 개발하였다. 이 장치는 세포를 배양하면서 장기간에 걸쳐 일정 시간마다 발광량을 측정하고 유전자 발현을 연속적으로 측정할 수 있다.

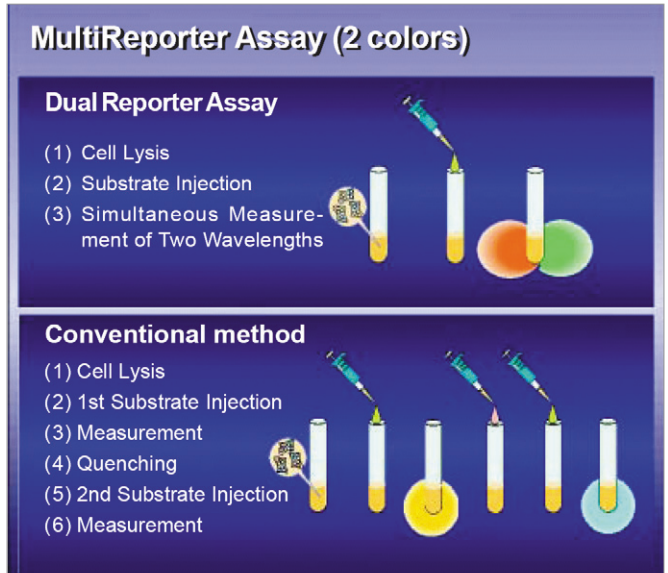


**Dual Luciferase assay**

일반적인 Luciferase assay에서는 세포의 수와 상태에 따라 발광량이 달라지게 된다. 보다 정확하게 측정하기 위하여 이런 영향을 보정하기 위한 내부 표준물이 필요하다. 현재, 목적 유전자의 측정을 위한 firefly Luciferase gene과 control로서 전사활성이 일정한 유전자의 promoter에 sea pansy Luciferase gene을 연결한 vector가 이용되고 있다. 이 vector를 이용할 경우에는 firefly Luciferase에서의 발광량을 측정한 후에 sea pansy Luciferase의 발광량을 측정한다. 다음에 sea pansy Luciferase의 발광량을 1로 하였을 때의 firefly Luciferase의 상대 발광량을 구한 후, 이것을 보정치로 하고 있다. 이 방법은 두 종류의 Luciferase를 이용하기 때문에 dual Luciferase assay라고 한다. 그러나 이런 Luciferase는 발광의 최적 조건이 다르기 때문에 동시에 측정할 수 없고, sea pansy Luciferase 기질의 막 투과성이 나쁘고 살아있는 상태로 배양세포를 발광 계측하기에는 적합하지 않다.

최근, 기질이 동일해도 다른 색으로 발광하는 Luciferase 유전자의 연구가 진행되고 있다. 이 발광 시스템이 확립하면 기존의 문제점을 해결할 수

있을 것으로 판단된다. ATTO사는 이 점에 주목하여 KRONOS에 filter 자동교체 기구를 설치함과 동시에, 발광색의 정점 파장이 근접해 있어 분리가 어려운 발광도 간단히 분리 측정하는 방법을 개발하였다. 최대 3색까지 발광을 분리 측정할 수 있으므로 3종류의 유전자 발현을 동시에 모니터링할 수 있고, 한 종류를 내부 표준으로 하고 두 종류의 promoter 활성을 연속 모니터링 할 수도 있다.



**Biological clock의 분자 생물학적 연구에 KRONOS**

아침에 일어나서 낮에는 활발히 활동을 하고 밤에는 잠을 잔다. 이러한 당연한 생활리듬도 사람을 비롯하여 지구상의 생물 체내에는 생명활동의 리듬을 만들어내는 biological clock이며 생물이 오랜 기간에 걸쳐 획득한 생존을 위한 적응기능이라고 할 수 있다.

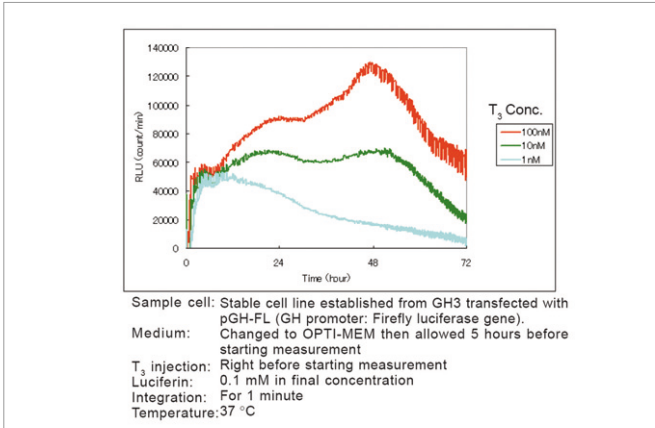
이 리듬을 circadian 리듬이라고 한다. 사람은 약 24 시간 주기로 반복되며, 이 제어에 clock gene이 깊이 관여하고 있다. Clock gene은 포유류에서 시상하부의 시교 또는 상핵(Suprachiasmatic nucleus : SCN)에 많이 존재하며 Per, Clock, Bmal, Cry 등이 clock gene로서 동정되고 있다.

KRONOS를 이용하면 cell line이나 tissue에서 clock gene promoter의 전사활성의 변동을 쉽게 측정할 수 있다.

**약물 동태 연구**

생물은 약 24시간 주기인 circadian 리듬을 가지고 있다. 병 치료의 한 방법인 약의 효용방법도 circadian 리듬과 관련이 있다. 그래서 ATTO AB-2500 KRONOS를 이용하여 어떤 자극에 대해 유전자의 발현량과 response phase를 연속적으로 모니터링하는 것이 가능한지 검토하였다.

아래 그림은 갑상선호르몬(T3) 자극에 의한 성장호르몬(GH)의 유전자 전사활성 변화를 모니터링한 것이다. GH promoter의 하류에 firefly Luciferase 유전자를 연결한 서열을 포함하는 plasmid vector를 도입한 cell line를 이용하여 T3 자극 후의 전사활성을 KRONOS로 측정하였다. GH 생성을 촉진하는 T3를 첨가할 결과, 농도 의존적으로 발광이 증대하여 GH 생성에도 리듬이 있는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 어떤 타 이밍에서 어느 정도의 양을 공급하면 좋은지 판단하는 지표 중 하나가 된다. 이와 같이 투약 시간과 양을 바꿈으로써 부작용을 줄이거나 효과를 올리는 것을 목표로 하는 chronotherapy가 주목을 끌고 있다.



참고문헌

Tanahashi, Y. et. al. Continuous Measurement of Targeted Promoter Activity by a Secreted Bioluminescence Reporter, *Vargula hilgendorfii* Luciferase ; *Analytical Biochemistry* **289**, 260-266(2001)

AB-2500 KRONOS

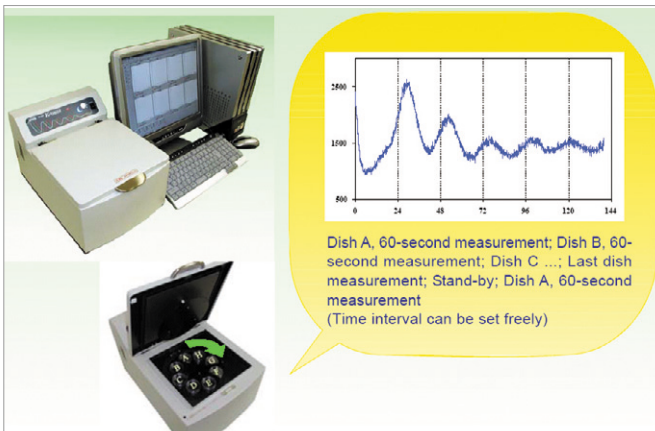
세포를 배양하면서 측정

KRONOS는 장치 내를 20 °C~45 °C 의 범위에서 온도를 제어할 수 있어 별도의 배양은 필요하지 않다. 목적으로 하는 세포 조건으로 온도를 설정한 후 35 mm petri dish 내에서 세포를 배양하면서 측정을 할 수 있다.



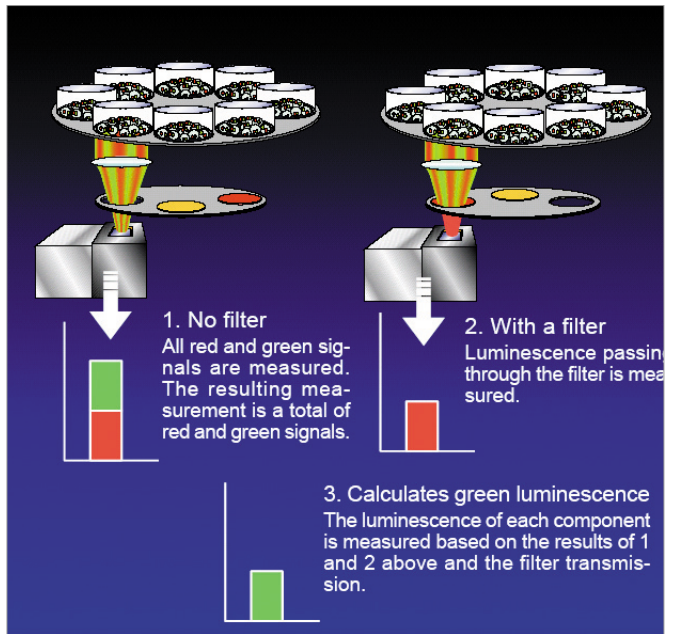
한눈에 알 수 있는 display

컴퓨터를 이용하여 조작할 수 있으며, 화면은 8개의 측정내용이 한 화면으로 표시되어 한눈에 측정상황을 확인할 수 있다. 중요한 data는 일정한 시간마다 자동적으로 저장된다.



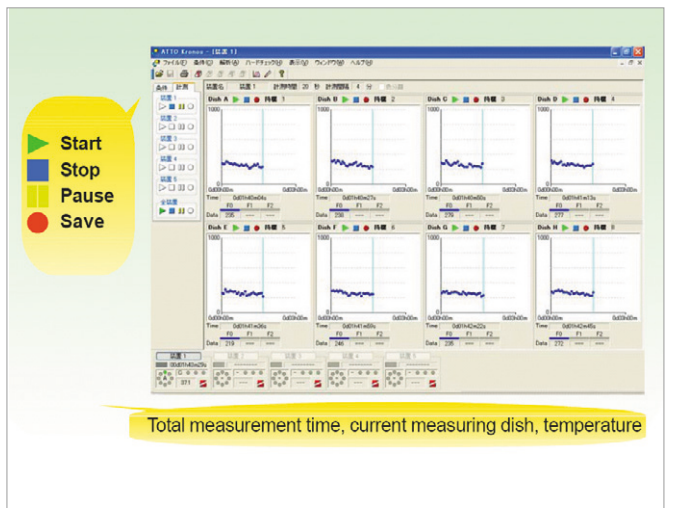
Filter에 의한 발광 성분의 분리 분석

KRONOS는 filter 교체 측정기능을 채택하여 여러 색의 발광성분을 분리할 수 있게 되어 있다. 우선 filter를 사용하지 않을 때의 총 발광량을 측정하고, 이어서 특정한 filter를 투과하는 발광량을 측정한다. 이 결과와 미리 측정해 둔 발광 성분마다의 filter 투과율로 각 발광성분의 발광량을 구할 수 있다. (측정법과 장치를 특허 출원중)



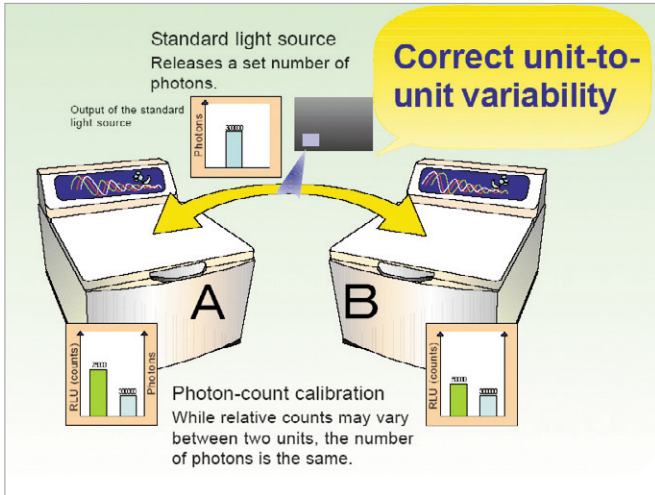
Long-term assay

KRONOS는 일정한 시간마다 시료의 발광량을 측정하고, 수일~수십일간 연속 측정이 가능하여 long-term luciferase assay에 유용하다.



**Photon calibration**

KRONOS는 표준 light source를 이용하고, photomultiplier를 photon counts로 전환하여 비교값을 측정한다. 이와 같은 photon-count calibration으로 각 장치의 보정이 가능하다.



**PC 1 대로 5대의 Kronos 제어 가능**

PC 1 대로 AB-2500 KRONOS를 5 대까지 제어할 수 있으며, 최대 40 시료의 측정이 가능하다. 또한 장치마다 다른 조건으로 설정하여 측정할 수 있다. USB 포트를 지닌 OS Windows2000, XP의 PC로 동작한다.

