

Yeast Two-Hybrid 시스템의 결정판 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System

[1] Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System

- 4개의 reporter와 3개의 promoter로 false positive가 감소
- 융합단백질의 결합을 통해 Aureobasidin A(강력한 항생제)에 저항성을 나타냄
- 항생제, 영양소, blue/white 선별을 통해 간단하면서도 강력하게 스크리닝 가능

클론텍의 Matchmaker System은 새로운 단백질-단백질 결합(protein-protein interactions; PPIs)을 연구하는 매우 진보된 기술이다. 최근 더욱 더 강력해진 Matchmaker Gold Yeast

Two-Hybrid System이 발매되었다. 이는 2개의 nutritional reporter와 blue/white color 선별에 추가로 고감도의 Aureobasidin A (AbA)¹⁾ 항생제 마커를 더해 쉽고도 강력하게 yeast two-hybrid (Y2H) screening이 가능한 4-reporter system이다 (그림 1).

Aureobasidin A는 효과적으로 효모를 박멸하지만, GAL4-hybrid protein간의 결합이 일어나면 AUR1-C 유전자가 발현되어 효모가 AbA에 내성을 가진다. Positive clone을 선별하기 위해 2단계에서는 3개의 각기다른 GAL4-reporter promoter에 의해 조절되는 4개의 reporter를

채용하여 확인한 결과, False positive를 효과적으로 배제하여 positive clone을 더 많이 선별할 수 있었다. 이와 같이 screening의 질을 높여 간단해진 Mate & Plate library screening 방법으로 시간을 절약하면서도 효과적으로 PPIs 실험을 진행할 수 있다.

■ Two-hybrid system의 기초

Y2H system은 DNA-binding domain (DNA-BD)과 RNA Pol II-recruiting transcription activation domain (AD)^{2,3)}로 구성된 전핵생물의 transcription factor의 모듈을 이용한다. Matchmaker system에서 이미 알고있는 단백질은 GAL4 transcription factor의 DNA-BD와 융합하여 “bait” 단백질로 사용한다. Bait와 결합시킬 “prey” 단백질은 GAL4의 AD와 융합하여 종종 library형태로 사용하기도 한다(그림 1). Bait와 prey 융합 단백질이 서로 상호 결합할 때, GAL4 기능이 살아나고 이들 단백질이 reporter 유전자의 전사를 활성화시킨다. Matchmaker Gold에서는 4개의 reporter의 발현유무에 따라 단백질간 결합이 이루어진 효모주를 선별할 수 있다(그림 2). Library를 스크리닝할 때는 library와 결합된 prey 단백질 서열을 포함하는 플라스미드를 이용해 실험하며 선별된 효모주에서 플라스미드를 분리하여 추가적인 분석과 염기서열 결정 등의 실험을 진행한다.

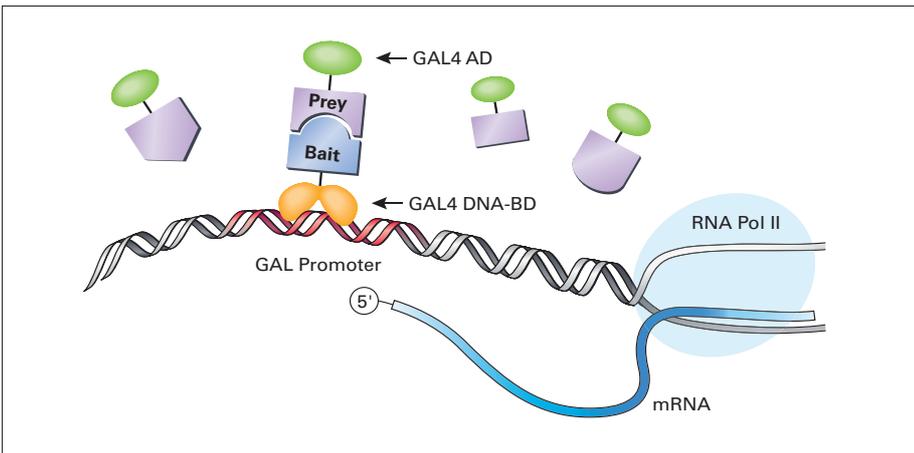


그림 1. Yeast two-hybrid system design. Library-derived, transcription-activating prey fusion proteins that interact with the DNA-binding bait fusion protein activate the expression of reporter genes.

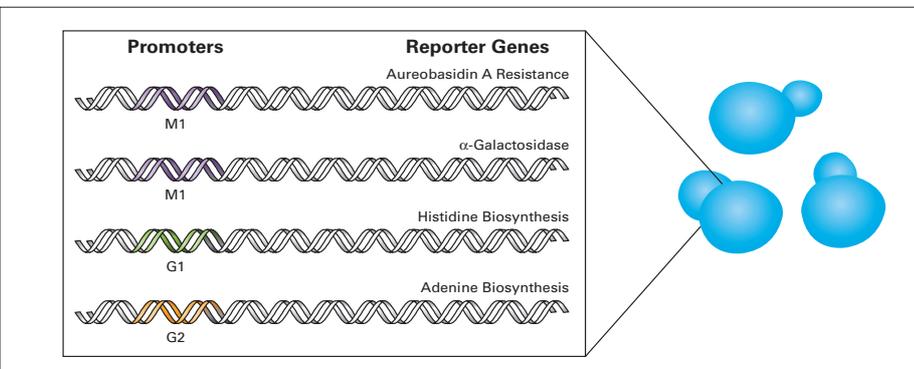


그림 2. Four reporters give Matchmaker Gold its high stringency. Interacting bait and prey fusion proteins drive the expression of four different reporters from three different GAL4-responsive promoters (M1, G1, and G2), which are stably integrated in the genome of the reporter strain, Y2HGold. Aureobasidin A (AbA) resistance and the two auxotrophic reporters for histidine and adenine biosynthesis confer growth selection in the presence of AbA and on histidine- and adenine-deficient media, while the α -galactosidase reporter produces blue colonies in the presence of X- α -Gal.

■ Background를 없애기 위한 Aureobasidin A의 사용

Matchmaker Gold System은 *S. cerevisiae*에 강력한 독성을 가지는 AbA의 저항성 유전자인 AUR1-C 유전자를 새로운 reporter로 사용하는 유일한 제품이다. 항균작용을 하는 depsipeptide에 안정적으로 내성을 가짐으로서 nutritional selection 단독으로 사용할 때 필요로 했던 최적화 과정없이 직접 Y2H library를 스크리닝 할 수 있다. HIS3를 기반으로한 selection시 1차 스크리닝에서 매우 많은 수의 background 클론이 존재했던 반면, AbA는 AUR1-C reporter를 발현하지 않는 클론을 효과적으로 제거할 수 있다. 그 결과 AbA를 이용하여 낮은 강도의 초기 스크리닝에서도 background의 간섭없이 높은 확률로 positive clone을 확보할 수 있었다.

continued...

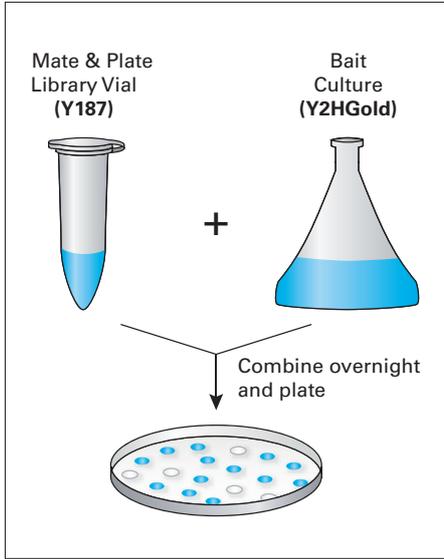


그림 3. The Mate & Plate Protocol. To screen a Matchmaker Mate & Plate Library, an aliquot of the library in the Y187 strain (*MAT α*) is simply mixed with a bait-expressing culture of the Y2HGold strain (*MAT α*). The mated strains are cultured overnight and plated on selective agar medium (e.g. -Leu/-Trp + AbA + X-alpha-Gal).

■ 4개의 reporter로 정확하게 positive clone을 선별

AUR1-C, *HIS3*, *ADE2*와 *MEL1* (α -galactosidase), 이렇게 총 4개의 reporter유전자를 사용하는 Matchmaker Gold는 3개의 다른 GAL4-binding promoter에 의해 발현이 조절된다. 이들 유전자는 Y2HGold reporter strain의 게놈내에 안정적으로 삽입되어 있다(그림 2). 4개 유전자의 전략적인 조합으로 하나의 GAL4 promoter에 결합하지만 나머지 3개의 promoter에는 결합하지 않는 false positive를 걸러내는데 탁월하다.

■ Mate & Plate library & screening

Matchmaker Gold의 또 다른 이점은 기존의 번거로운 library-scale yeast transformation 방법 대신에 bait와 prey 융합 단백질을 각각 발현시키는 두개의 단수성(haploid) 효모주를 이용한 "Mate & Plate"라는 새로운 전략을 사용한다는 것이다(그림 3). Y2HGold는 *MAT α* 주로 4개의 reporter 유전자가 게놈내에 삽입되어 있고, bait

단백질을 발현하는 pGBKT7 플라스미드를 형질 전환한다 Library "prey" 주인 Y187은 *MAT α* 주로 Y2HGold의 mating 파트너로 적합하다. 클론텍에서는 Y187에 형질전환시킨 다양한 Mate and Plate Library를 판매하고 있다. 또한 스스로 library를 제작할 수 있는 Make Your Own "Mate & Plate" Library System (TaKaRa Code 630490)을 사용하거나, 먼저 선발된 prey 융합 단백질을 플라스미드에 넣어 형질전환시킬 수도 있다. Y2HGold와 Y187의 조합으로 매우 쉽게 mating이 가능하며, 배수체 효모내에서 bait와 prey 단백질을 같이 발현시킬 수 있다.

■ 높은확율로 확실한 positive clone을 선별

AbA 저항성에 의한 뛰어난 colony 선별로 1차 선별에서는 AbA-저항성 파란색 클론만이 선별된다. Positive로 추정되는 클론의 2/3는 4개의 reporter유전자를 전부 사용하는 high stringency screening에서 확인할 수 있다. 결과적으로 low stringency screening으로 콜로니를 선별한 다음 high stringency로 확인할 것을 추천한다. 이러한 방법으로 보다 많은 진짜 positive와 낮은 false positive를 구별해낼 수 있다(그림 4).

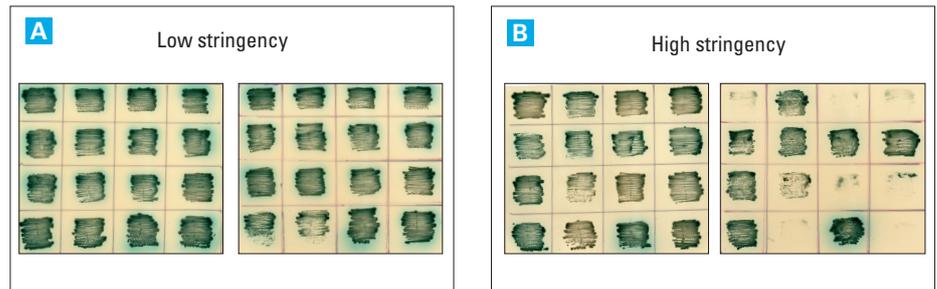


그림 4. Secondary Matchmaker Gold screening confirms high numbers of positive clones. A Y2HGold bait containing the POU domain from the mouse Oct4 transcription factor (BD-POU_{Oct4}) was used to screen the Mate & Plate Universal Mouse (Normalized) Library for Oct4-binding proteins. 32 colonies from a low stringency primary screen (DDO + AbA, 60 ng/ml + X-alpha-Gal) were selected and replated/patched onto fresh low stringency medium (Panel A) and onto high stringency medium (QDO + AbA, 60 ng/ml + X-alpha-Gal) (Panel B) to confirm the expression of all four Matchmaker Gold reporters. Of the 32 originally selected colonies, 25 were confirmed positive for the 4 reporters. DDO = Double dropout medium: SD/-Leu/-Trp. QDO = Quadruple dropout medium: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp.

표 1. Mouse Oct4-Binding Proteins Identified in Matchmaker Gold Library Screening¹

Protein	Function
E21/Ubc9	Small ubiquitin-related modifier (SUMO) enzyme involved in sumoylation of Oct4; regulates Oct4 stability
PIAS1	An E3 ligase protein inhibitor of activated STAT1; a potent inhibitor of Oct4-mediated transcriptional activation
PSMB5	Proteasome beta5 subunit; may mediate the interaction of Oct4 with proteasomes, which regulate cellular processes through protein degradation.

¹ Mate & Plate Library – Universal Mouse (Normalized).

Yeast Two-Hybrid 시스템의 결정판 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System

continued...

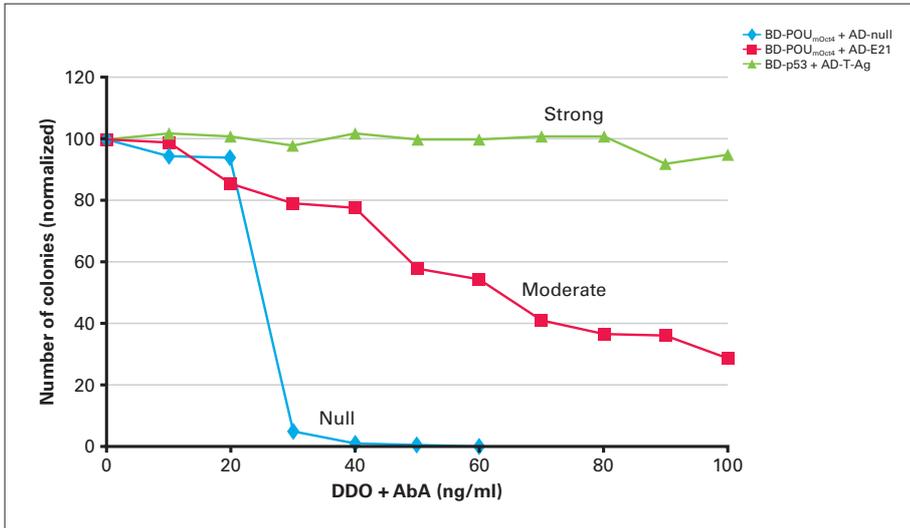


그림 5. Titration of Aureobasidin A for three different Matchmaker protein pairs. Y2HGold yeast clones co-expressing one of three bait/prey fusion protein pairs: a negative control (BD-POU_{mOct4} + AD-null); a pair of putative interactors (BD-POU_{mOct4} + AD-E21); or a positive control (BD-p53 + AD-T-Ag), were grown on DDO agar (SD/-Trp/-Leu) in the presence of increasing concentrations of AbA. The relative ability of each strain to grow in the presence of AbA reflects the strength of the interactions between the bait and prey proteins. Libraries are usually screened in the presence of AbA at 60 ng/ml, which demonstrates definitive selection for interacting hybrids. POU_{mOct4} = POU domain from the mouse transcription factor, Oct4.

■ Aureobasidin A 내성에 의한 특이성 높은 선별

AbA 저항성이 높은 선별특성을 확인하기 위해 각기 다른 bait/prey 단백질쌍을 발현하는 3개의 배수체 Y2HGold주의 AbA를 측정하였다(그림 5). 상호결합하지 않는 단백질쌍 (BD-POU_{mOct4} bait와 변형하지 않은 GAL4 AD 단백질; AD-null)을 발현하는 negative control주는 AbA의 농도가 40 ng/ml 이상일 때 전혀 자라지 못하였다. 반면 BD-POU_{mOct4} bait와 상호결합할 것으로 추정되는 prey 단백질 (AD-E21)과 결합했을 때 70~100 ng/ml의 AbA 농도에서도 잘 자

랐다. 이러한 결과로 단백질간 상호결합 할 때 *AURI-C*의 발현이 충분히 활성화되어 AbA 배지에서 콜로니가 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. Positive control에서는 강력하게 결합하는 단백질쌍 (DNA-BD-p53과 AD-SV40 large T antigen)으로 100 ng/ml의 AbA (테스트 중 가장 높은 농도) 존재하에서도 콜로니의 생장에 영향이 없었고 이는 매우 높은 수준으로 *AURI-C*가 발현됨을 나타낸다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System	each	630489
Make Your Own "Mate & Plate" Library System	5 rxns	63049

■ 영양배지 선별보다 우수한 선별법

Y2H 선별을 위해 영양요구성의 reporter만을 사용하는 것은 종종 최적화 과정을 필요로 하며 특히 *HIS3*-의존적인 선별의 경우 여러 단계의 선별 과정이 필요하다. *HIS3*에 의한 선별은 강도가 약해 이로 인한 누락을 막으려면, background colony의 증식을 억제하는 3-AT (a competitive inhibitor of the His3 protein)를 배양배지에 반드시 포함시켜야 한다. 하지만 AbA와 Matchmaker Gold의 2가지 nutritional marker를 사용함으로써 3-AT를 사용하지 않고도 충분히 positive clone을 선별해 낼 수 있다.

클론텍에서는 Matchmaker Gold 시스템과 조직 특이적이면서도 보편적으로 적용할 수 있는 Mate & Plate Library와 함께 여러 Y2H screening 기술을 선보이고 있다. Make Your Own "Mate & Plate" Library System을 사용한다면 자신만의 library 제작도 가능하다. 클론텍의 진보된 Y2H 시스템으로 짧은 시간에 효율적인 library screening을 실현할 수 있다.

■ 제품구성

Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System

- pGBKT7 DNA-BD Cloning Vector
- pGADT7 AD Cloning Vector
- pGBKT7-53 Control Vector
- pGBKT7-Lam Control Vector
- pGADT7-T Control Vector
- Y2HGold Yeast Strain
- Y187 Yeast Strain
- YPDA Broth
- YPDA with Agar
- SD/-Trp with Agar
- SD/-Leu with Agar
- Yeastmaker Yeast Transformation System 2

continued...

[2] Mate & Plate Yeast Two-Hybrid cDNA Libraries

- Library 수준의 플라스미드 정제, 형질전환 불 필요!
- human, mouse 등 다양한 cDNA 중 선택가능
- SMART 기술을 이용해 자신만의 pretransformed library를 간단하면서 효과적으로 제작
- Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 과의 완벽한 조합

최신 버전인 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System을 포함한 클론텍의 Matchmaker System은 yeast에서 cDNA library를 스크리닝 하고 새로운 DNA결합 단백질, 단백질간 결합 (protein-protein interaction ; PPIs)을 찾아내는 최적화된 기술이다. Yeast two-hybrid (Y2H) screening을 위한 기존의 GAL4-AD fusion protein library는 cDNA 합성, yeast용 발현 vector로의 cDNA library 클로닝, E. coli 에서의 library 증폭, 플라스미드 정제, yeast에 library를 형질전환 등 library screening 전에 거쳐야할 실험단계가 매우 많다⁴⁾.

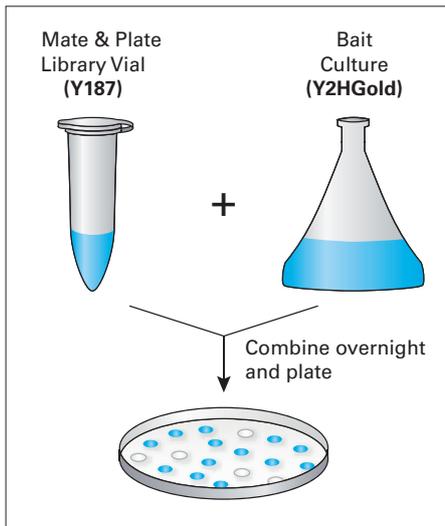


그림 6. The Mate & Plate Protocol. To screen a Mate & Plate Library, an aliquot of the library in the MAT α Y187 strain is simply mixed with a bait-expressing, MAT α reporter strain culture (Y2HGold or AH109). The two strains are co-cultured overnight and then plated on selective agar medium.

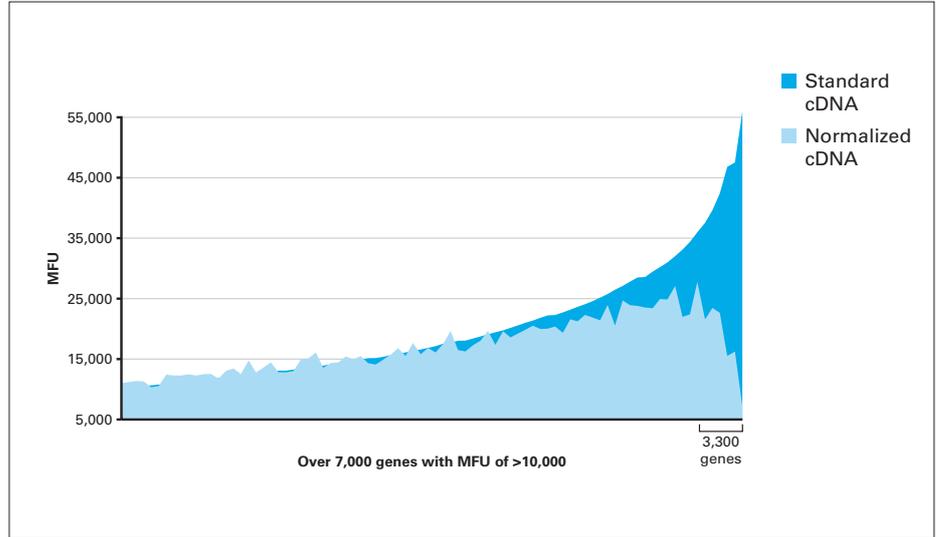


그림 7. Normalization reduces the abundance of cDNAs derived from highly expressed genes. Universal cDNA, synthesized using RNA from mixed human tissues, was analyzed before and after normalization on a NimbleGen Homo sapiens microarray (Cat. No. A4542-00-01). Data are shown for the 7,000+ genes which exhibited greater than 10,000 Mean Fluorescence Units (MFU). The signal intensities for approximately 3,300 of the most highly represented genes were significantly reduced following normalization, reflecting a preferential reduction of these abundant cDNAs.

■ Mate & Plate Library의 간편성

클론텍에서는 library construction, transformation이 완료된 다양한 pretransformed cDNA library를 판매하고 있다. Mate & Plate Library는 GAL4-AD prey fusion protein의 cDNA library로 Y2H 시스템의 스크리닝에 바로 적용할 수 있다. 이러한 library는 MAT α 배수체 효모주인 Y187에 형질전환되어 있고, 배수체 MAT α reporter 주인 AH109나 Y2HGold 주와 mating할 수 있다.

“Mate & Plate” 실험이란, bait-expressing reporter strain 과 Mate & Plate library를 혼합해 배양한 것을(그림 6), 두 효모주를 함께 배양하여 bait와 각각의 library prey 단백질을 동시에 발현시킨 후, clone pool을 선택배지에 도말하여 reporter 유전자를 발현하는 각각의 클론을 선택함으로써 단백질 결합유무를 판단할 수 있다.

■ 낮은 False Positives 를 위한 Normalized Library

클론텍에서는 보다 간단하게 단백질간의 결합을 밝혀낼 수 있는 normalized Mate & Plate Library도 판매한다. Duplex-specific nuclease (DSN) normalization은 전체 cDNA에서 특히 많은 수의 cDNA를 선택적으로 제거하고, 적은 abundant 서열을 증가시켜준다(그림 7)^{4,5)}.

이러한 작업을 통해 잠재적은 false positive의 주된 원인을 없애고, positive interaction을 선별해야 하는 각각의 클론수를 줄여, 초기의 low stringency screening에서 나타날 수 있는 false positive의 빈도를 낮춰준다.

Matchmaker Gold 시스템에서 제시하는 강력한 스크리닝 방법과 함께 normalized Mate & Plate library를 사용함으로써, 초기의 스크리닝에서도 positive 클론을 찾아내고, false positive로 인한 background 콜로니가 거의 발생하지 않게 된다.

Yeast Two-Hybrid 시스템의 결정판 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System

continued...

■ Balanced Gene Representation

DSN normalization 결과, 유전자의 representation의 균형이 증가했다는 것을 확인하기 위해 47,633개의 인간유전자를 포함하는 NimbleGen microarray상에서 normalization 전과 후를 비교하였다(그림 7). 분석 결과, 높은 수준으로 발현되는 유전자의 cDNA는 현저하게 제거된 반면, 낮은 abundant cDNA는 크게 영향을 받지 않았다. 따라서, 낮은 카피수를 가지는 서열의 representation은 전체 cDNA pool에서 증가하였다. 그림 8은 매우 높은 발현수준을 유지하는 housekeeping 유전자(β -actin, GAPDH)가 normalization을 통해 효과적으로 감소되었음을 나타내는 예이다.

■ 보편적인 유전자를 모두 포함하는 Library

클론텍의 일반적인 library는 거의 모든 조직에서 발현되는 유전자를 완전히 충족하며 보편적으로 사용할 수 있다. Normalized library는 다양한 범위의 유전자를 발현하는 모든 인간조직 또는 쥐의 조직에서 분리한 RNA에 SMART 기술을 적용하여 cDNA를 합성하고 증폭하여 library를 제작하기 전에 cDNA를 normalize한다⁶⁾. 낮은 카피수의 cDNA를 증폭시킨 클론텍의 normalized library를 이용하여 목적 단백질에 결합하는 단백질을 효과적으로 선별할 수 있다.

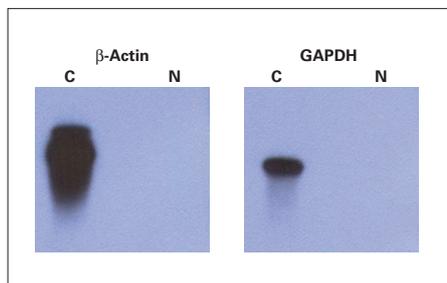


그림 8. DSN-Normalization removes highly abundant cDNAs. Normalized (Lanes N) and non-normalized (Lanes C) human HeLa S3 cDNAs were compared using virtual Northern blot analysis and 32P-labeled probes. The levels of these two highly abundant cDNAs were sharply reduced following normalization.

■ 효과적인 Two-Hybrid Screening

진보된 normalized library의 Y2H screening 효과를 확인하기 위해 Mate & Plate Library-HeLa S3 (Normalized)를 이용해 murine p53-bait와 결합실험을 진행하였다. 279,000개의 클론으로부터 p53-결합단백질이 포함됐을 것으로 추정되는 62개의 클론이 선별되었다⁴⁾. 일반적인 library에서는 1~2백만개의 클론을 스크리닝할 것을 추천하는 것과는 대조적이다. 추가 실험을 통해 선별된 8개의 콜로니 중 4개는 p53과 결합하는 것으로 알려진 3개의 단백질(PCNA, PRMT3, PTEN)을 포함하였다. 따라서 normalized library에서는 적은 수의 클론선별과정을 통해서도 충분한 결과를 도출할 수 있었다.

■ 직접 제작 하는 나만의 "Mate & Plate" Library

Library를 직접 제작해야 하는 경우, 클론텍의 Make Your Own "Mate & Plate" Library System을 추천한다. SMART 기술을 적용시킨 이 시스템을 이용하면 효모내에서 높은 효율로 homologous recombination이 일어나 효과적으로 cDNA를 합성하고 pGADT7-Rec AD Cloning Vector에 클로닝할 수 있다. Library는 construction 후 Y187효모주로 한번에 형질전환할 수 있고, 이렇게 만들어진 library는 쉽게 Mate & Plate protocol에 적용할 수 있다. Mate & Plate Library는 클론텍의 Matchmaker Gold 시스템과 함께 단백질간의 새로운 상호결합을 연구하기 위한 진보된 실험법을 제공한다. 이러한 기술을 통해 적은 시간과 노력으로 큰 결과를 가져올 수 있게 되었다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
Mate & Plate Library - Universal Human (Normalized)	2 x 1 ml	630481
	5 x 1 ml	630480
Mate & Plate Library - Universal Mouse (Normalized)	2 x 1 ml	630482
	5 x 1 ml	630483
Mate & Plate Library - HeLa S3 (Normalized)	5 x 1 ml	630479
Mate & Plate Library - Human Bone Marrow	5 x 1 ml	630477
Mate & Plate Library - Human Fetal Brain	5 x 1 ml	630469
Mate & Plate Library - Human Heart	5 x 1 ml	630471
Mate & Plate Library - Human Liver	5 x 1 ml	630468
Mate & Plate Library - Human Skeletal Muscle	5 x 1 ml	630473
Mate & Plate Library - Human Testis	5 x 1 ml	630470
Mate & Plate Library - Human Ovary	5 x 1 ml	630474
Mate & Plate Library - Mouse Embryo 11-day	5 x 1 ml	630478
Mate & Plate Library - Mouse Embryo 17-day	5 x 1 ml	630476

continued...

[3] Convenient Premixed Yeast Two-Hybrid Media Sets

- Ready-to-go: ddH₂O 첨가 후 고압멸균만 하면 배지가 완성!
- Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 전용 배지 셋트
- Aureobasidin A과 X-alpha-Gal을 포함하여 편리성이 증가된 "Plus" 형태 제공

이제 Yeast Media Set 2와 Yeast Media Set 2 Plus를 이용하여 yeast two-hybrid screening을 편리하게 진행할 수 있다. 각각 8종류의 액체, 고체배지를 만들 수 있는 모든 성분을 포함하고 있으며(표 2) 클론텍의 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System⁷⁾과 함께 사용한다. 각 배지 혼합물은 10개의 호일파우치에 나누어 포장되어 있다(그림 9). 또한 Yeast Media Set 2 Plus는 효모 항생제 선택마커인 Aureobasidin A를 포함하여 4개의 reporter 유전자를 모두 사용한 스크리닝에 적용할 수 있으며, GAL4-based two-hybrid interaction을 확인하기 위한 X-alpha-Gal도 포함되어 있다.



그림 9. Specialized yeast media mixes are available in convenient, ready-to-go pouches.

■ Ready-to-Go Media Pouches

Yeast Media Set를 이용하면 500ml의 ddH₂O에 파우치 하나를 녹이고 고압멸균하여 식히는 것으로 배지를 완성할 수 있다. 또한 일반적인 멸균수를 사용한다면 별도로 pH를 조정하지 않아도 된다. Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System과 함께 Yeast Media Set 2, Yeast Media Set 2 Plus를 사용한다면 yeast two-hybrid 스크리닝 효율을 극대화 할 수 있을 것이다.

■ 제품구성

Yeast Media Set 2 (0.5 L pouches)

- YPDA Broth (2 each)
- YPDA with Agar
- SD/-Leu Broth
- SD/-Leu with Agar
- SD/-Trp Broth
- SD/-Trp with Agar
- SD/-Leu/-Trp (DDO; 10 each)
- SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (QDO)

■ 관련제품

Yeast Media Set 2 Plus

- Yeast Media Set 2
- Aureobasidin A (1 mg)
- X-alpha-Gal (250 mg)

■ 참고문헌

1. Takesako, K. *et al.* (1991) *J. Antibiot.* 44 (9):919-924.
2. Fields, S & Song, O. (1989) *Nature* 340 (6230):245-246.
3. Chien, C. T. *et al.* (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88(21):9578-9582
4. Pretransformed Normalized Matchmaker™ Library (January 2007) *Clontechiques* XXII (1):21-23.
5. Pretransformed Normalized Matchmaker™ Libraries (January 2008) *Clontechiques* XXIII (1):14-16.
6. High-Performance Reference RNA and cDNA (July 2008) *Clontechiques* XXIII (2):18-20.
7. Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System. (January 2009) *Clontechiques* XXIV (1):1-3.

제품명	용량	TaKaRa Code
Yeast Media Set 2	each	630494
Yeast Media Set 2 Plus	Each	630495
YPDA Broth	10 pouches	630306
YPDA with Agar	10 pouches	630307
SD/-Leu Broth	10 pouches	630310
SD/-Leu with Agar	10 pouches	630311
SD/-Trp Broth	10 pouches	630308
SD/-Trp with Agar	10 pouches	630309
SD/-Leu/-Trp Broth	10 pouches	630316
SD/-Leu/-Trp with Agar	10 pouches	630317
SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp Broth	10 pouches	630322
SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar	10 pouches	630323
Aureobasidin A	1 mg	630466
X-alpha-Gal	100 mg	630462
	250 mg	630463

* License Notice: [12], [15], [17]