

# Life Science & Biotechnology

제 7호  
(제 3권 2호)

1998년 6월 10일

편집인 이재현

발행인 이재현

발행처 보한바이오테크놀로지(주)

강남구 도곡 2동 451-3

MF 상황의 끝이 보이지 않는 이른 더운 날씨 속에서 7호를 발간합니다.

많은 어려움 속에서 연구에 매진하는 여러분들에게 미력이나마 활력소가 되었으면 합니다.

이번에는 다양하고 유익한 신제품들이 많이 쏟아져 나왔습니다.

신기술에 관한 정보를 많이 얻을 수 있는 좋은 기회라 생각합니다.

올 여름은 무척 길고 덥더군요.

우리는 여러분을 응원하고 있습니다.  
하이팅!!

그리고 월드컵도 16강에 들었으면 좋겠는데.....

## TaKaRa

 **보한바이오테크놀로지(주)**  
TAKARA-KOREA BIOMEDICAL INC.

Technical Support Line

Tel.02-577-2002 Fax.02-577-3691

E-mail bohanbio@soback.komet.nm.kr

URL www.biochem.or.kr/bohanbio.htm

<전문대리점>

(주)녹십자양행 L/S 사업팀

Tel.02-3471-7437 Fax.02-581-0136

E-mail : gmate@chollian.net

gmate@hitel.co.kr

(주)코아바이오시스템

Tel. 02-841-7530 Fax.02-841-7531

0331-284-8592(수원)

042-622-2726(대전)

E-mail : corebio@naunuri.naucom.co.kr

## 찾아보기

### 특집 1

PCR 특집 시리즈 7

2차 구조를 쉽게 형성하는 RNA의 PCR 2

### 특집 2

Gene Targeting을 Recombinant ES Cell 제작

4

### 특집 3

배양세포의 전체 N-glycan의 구조해석

8

### 연재기획

PCR 기초강좌 6

PCR을 이용한 DNA, RNA 해석기술의 원리

12

### Technical Tips

1. 형광편광도 측정시스템 Full-Range BEACON 2000

20

2. TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set을 이용한

22

*Mycoplasma bovis*의 검출

단백질 연구용 시약 소개 (3)

23

### 주목상품

1. Solid Phase cDNA Synthesis Kit

26

2. cDNA PCR Library Kit

28

3. PerfectShot Ex Taq(Loading dye mix)

30

4. DNA-OFF, RNase-OFF

31

5. Dr. GenTLE(효모, 그램 양성균용)

32

6. Positive Selection Vector pGATA

33

7. SCDase(Sphingolipid Ceramide N-deacylase)

34

8. Precoat-type E-cadherin EIA Kit

36

9. CFLP Scanning System

38

TaKaRa Custom Service 5

- 단백질 및 peptide의 분자량 측정 -

11

### 실험강좌

면역 조직 화학적 염색법의 기초 (1) - 조직절편 -

40

Novagen사 제품 소개

42

Bender Med System - Apoptosis 연구용 제품 -

45

신제품 안내

47

작은 안내 큰 소식

19

# 2차 구조를 쉽게 형성하는 RNA의 PCR

## BcaBEST™ RNA PCR Kit Ver. 1.1

TaKaRa Code	RR023A	50회	350,000원
TaKaRa Code	RR023B	100회	615,000원

### Version up으로 복잡한 2차구조의 RT-PCR이 용이합니다.

BcaBEST™ RNA PCR Kit는 복잡한 2차 구조를 갖는 mRNA도 높은 효율로 cDNA로 변환할 수 있는 내열성 DNA 합성효소인 BcaBEST DNA Polymerase(역전사반응 최적온도가 65°C)와 증폭효율이 향상하도록 개선한 Bca-optimized Taq™을 채용한 RT-PCR kit이다. 본 고에서는 금번 반응조건 등을 변경하여 복잡한 2차 구조를 갖는 주형을 증폭할 수 있도록 개량한 제품 기존의 제품과 당사의 다른 RT-PCR kit와 비교한 결과를 소개하고, 또한 본 키트를 사용하여 보다 복잡한 2차구조를 갖는 주형을 증폭할 때의 반응조건을 소개한다.

#### ▶ Version up으로 달라진 내용

##### [역전사반응조건]

변경전 : 65°C	1분	변경후 : 65°C	1분
30°C	1분	30°C	5분
↓	15분	↓	15분
65°C	15~30분	65°C	15~30분
80°C	2분	98°C	5분
5°C	5분	5°C	5분

##### [2배 Bca 1st buffer의 용량]

변경전 : 500 μl                      변경후: 1.25 ml × 2개

##### [Control RNA, Control Primer]

변경전 : HL60 유래 total RNA(1 μg/μl)  
TFR 영역 964 bp를 증폭할 수 있는 primer쌍  
변경후 : pBR322 유래 tetracyclin 내성유전자를 갖는 1.4 kb의 단편을 SP6 promotor 영역의 하류에 삽입한 plasmid pSTet3를 주형으로 SP6 RNA polymerase에 의해 *in vitro*에서 역전사하여 합성한 RNA(2 × 10<sup>5</sup> copies/μl).  
Tetracyclin 내성유전자 영역 462 bp를 증폭하는 primer쌍



#### 실험에 1 : 각 kit의 비교

##### [방법]

각 키트의 사용설명서에 따라 반응액을 조제하여 각각의 최적조건에서 반응을 실시하였다.

증폭단편 : human *mcl* 유전자 460 bp(GC 함량 67%)

주형 : HeLa 세포유래 total RNA 1 μg/RT 반응액 20 μl

역전사반응 primer : Oligo dT Primer

RT 반응조건 :

- BcaBEST™ RNA PCR Kit Ver. 1.1의 경우
 

65°C	1분
30°C	5분
↓	15분
65°C	15분
98°C	5분
5°C	5분

- TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1 및 TaKaRa RNA™ LA PCR Kit(AMV) Ver. 1.1의 경우

30°C 5분, 50°C 30분, 98°C 5분, 5°C 5분

PCR 반응조건 :

94°C 1분  
94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분 30 cycles  
72°C 5분

##### [결과]

*mcl* 유전자(460 bp)의 목적영역을 BcaBEST™ RNA PCR Kit Ver. 1.1과 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit(AMV) Ver. 1.1이 동등하게 증폭하였다(그림 1).

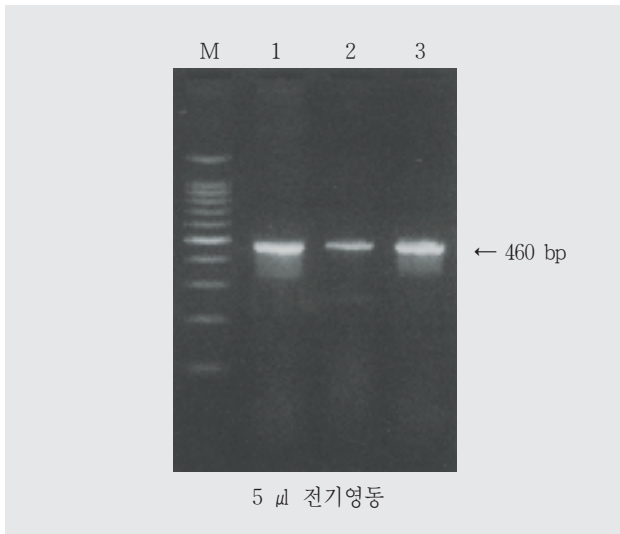


그림 1 키트별 *mcl* 유전자 증폭의 비교

Lane  
 M : 100 bp DNA Ladder  
 1 : *BcaBEST*<sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1  
 2 : TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1  
 3 : TaKaRa RNA LA PCR<sup>TM</sup> Kit(AMV) Ver. 1.1  
 3% agarose gel



**실험예 2**

**보다 복잡한 2차구조를 갖는 주형의 증폭**

**[방법]**

각 키트의 사용설명서에 따라 반응액을 조제하여 각각의 최적조건에서 반응을 실시하였다.

목적영역 : IGFR II 유전자 516 bp(GC 함량 63.5%)

시료 : 사람 골격근 유래의 total RNA 5 µg/RT액 20 µl

RT 반응액의 조제 :

2× <i>Bca</i> 1st buffer	10 µl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	4 µl
dNTP mixture	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
<i>BcaBEST</i> <sup>TM</sup> Polymerase	1 µl
Oligo dT Primer	1 µl
Template RNA	1 µl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	1.5 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

RT 반응조건(반응액 20 µl) :

<i>BcaBEST</i> <sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1의 경우		TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 2.1 및 TaKaRa RNA LA PCR Kit Ver. 1.1의 경우	
65°C	1분	30°C	5분
30°C	5분	50°C	30분
↓	15분	98°C	5분
65°C	15분	5°C	5분
98°C	5분		
5°C	5분		

*BcaBEST*<sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1의 PCR 반응액의 조제 :

**A법(통상의 방법)**

25 mM MgSO <sub>4</sub>	6 µl
5× <i>Bca</i> 2nd Buffer	16 µl
<i>Bca</i> -Optimized <i>Taq</i> <sup>TM</sup>	0.5 µl
상류 primer	1 µl
하류 primer	1 µl
멸균수	55.5 µl
<b>계</b>	<b>80 µl</b>

**B법**

25 mM MgSO <sub>4</sub>	6 µl
2× <i>Bca</i> 1st Buffer	40 µl
<i>Bca</i> -Optimized <i>Taq</i> <sup>TM</sup>	0.5 µl
상류 primer	1 µl
하류 primer	1 µl
멸균수	31.5 µl
<b>계</b>	<b>80 µl</b>

위의 반응액(80 µl)을 RT 반응 종료액(20 µl)에 각각 첨가하여 아래의 조건으로 PCR을 실시하였다.

PCR 반응 조건 :

94°C	1분	} 40 cycles
94°C	30초	
60°C	30초	
72°C	1분	
72°C	5분	

**[결과]**

TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1 및 TaKaRa RNA LA PCR<sup>TM</sup> Kit(AMV) Ver. 1.1에서는 증폭산물을 얻을 수 없었다. 한편 *BcaBEST*<sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1의 경우, A법(통상의 방법)으로는 증폭할 수 없었으나 새로운 B법으로는 증폭되었다(그림 2).

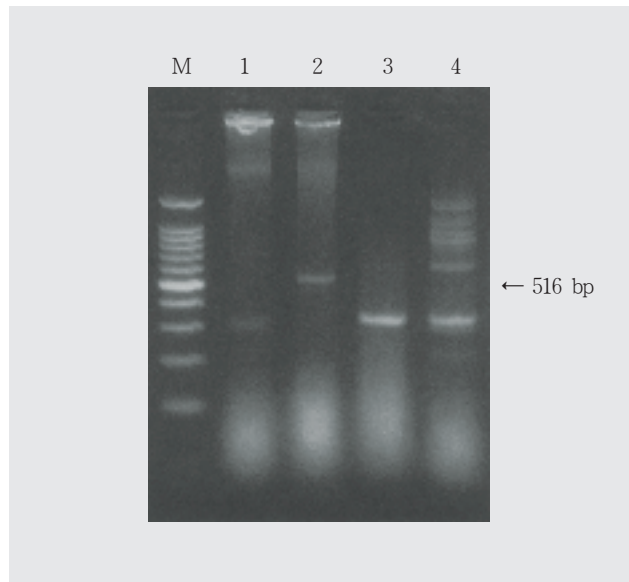


그림 2 키트별 IGFR II 유전자의 증폭 비교

Lane  
 M : 100 bp DNA Ladder  
 1 : *BcaBEST*<sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1 A법  
 2 : *BcaBEST*<sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1 B법  
 3 : TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1  
 4 : TaKaRa RNA LA PCR<sup>TM</sup> Kit (AMV) Ver. 1.1  
 3% agarose gel

이와 같이 B법에서는 PCR에서도 2× *Bca* 1st buffer를 사용하므로서 증폭산물을 얻을 수 있었다.

# Gene Targeting용 Recombinant ES Cell 제작

유전자 구조 해석에서 획득한 정보로부터 그 기능을 규명하는 방법으로서 그 유전자의 변이를 갖는 변이체를 제작하는 기술 (Gene Targeting, Gene Disruption)은 genome project의 진전과 더불어 그 중요성이 더욱 커졌다. 금번 TaKaRa에서는 미국 Lexicon Genetics사의 gene targeting용 recombinant ES cell system을 공급하게 되어, 원리와 제품에 관하여 간단히 소개하고자 한다.

## ▶ Gene targeting의 원리

ES 세포(embryonic stem cell)는 생식세포계에의 분화능을 포함하여 다분화능력을 유지한 채로 계대할 수 있는 배양세포주이다. 목적 배열을 삽입한 targeting vector(knock out vector)를 구축하여 ES cell에 도입한 후 homologous recombination(상동재조합)이 일어난 ES 세포를 positive-negative selection 법으로 선별하므로써 목적 유전자에 변이가 도입된 재조합 ES 세포를 얻을 수 있다. 이 재조합 ES 세포를 mouse 배반포(마우스 초기배)에 주입하여 chimera mouse를 만들고 다시 이를 교배하여 chimera mouse의 자손(F1 또는 F2) 중에서 목적 유전자가 파괴된 mouse를 얻을 수 있다(그림 1).

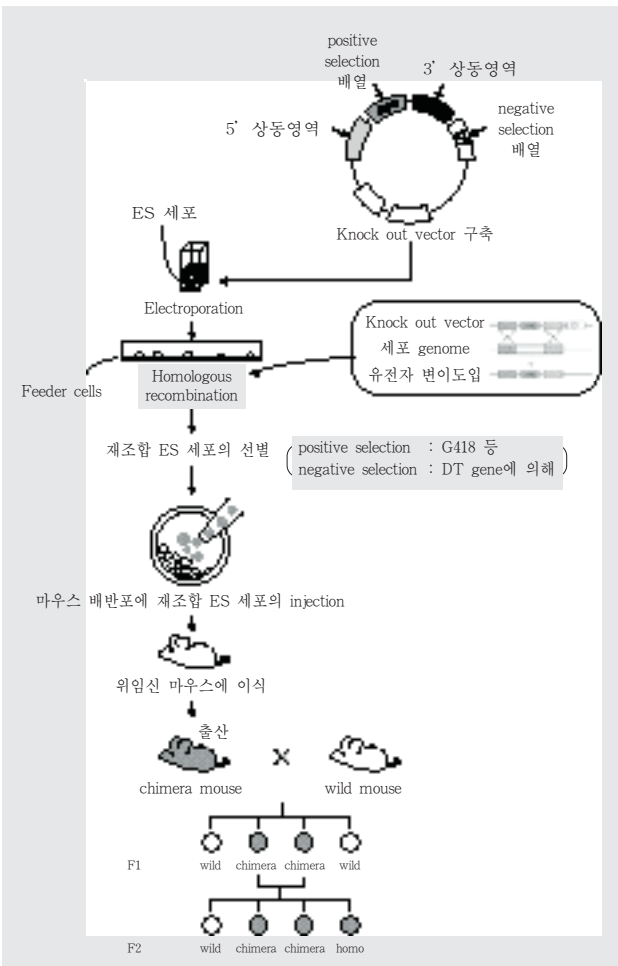


그림 1 Gene targeting의 원리

## ▶ 제품소개

본 시스템은 상동재조합으로 목적유전자에 변이(positive selection 배열)를 도입하여 재조합 ES 세포를 제작하기 위한 시스템이다. 본 시스템에서는 우선 pKO Scrambler Series™의 벡터에 목적 배열과 pKO Selection plasmid에서 잘라낸 selection 배열을 삽입하여 targeting vector를 제작한다. 다음으로 The Mouse Kit™에 component로 들어있는 ES 세포에 targeting vector를 electroporation에 의해 도입하여 재조합 ES 세포를 제작하여 선별한다. 이 시스템에 사용되는 제품에 관하여는 다음에 설명한다.

### (1) pKO Scrambler Series™(그림 2)

#### pKO Scrambler 901 - pKO Scrambler 924

Knock out vector를 제작하는데 기본이 되는 벡터로서, positive selection 배열(neomycin, puromycin, *hprt* 등)을 삽입하는 부위(Asc I site), negative selection 배열(Diphtheria Toxin A Chain)을 삽입하는 부위(*Rsr* II site), 벡터를 직선형으로 만드는 데 필요한 제한효소 인식배열(*Sal* I site & *Not* I site) 그리고 상동재조합을 일으키고자 하는 target 배열을 삽입하는 cloning site(Scrambler A, Scrambler B)로 구성되어 있으며, cloning site가 다른 24종류의 벡터가 준비되어 있다(그림 3).

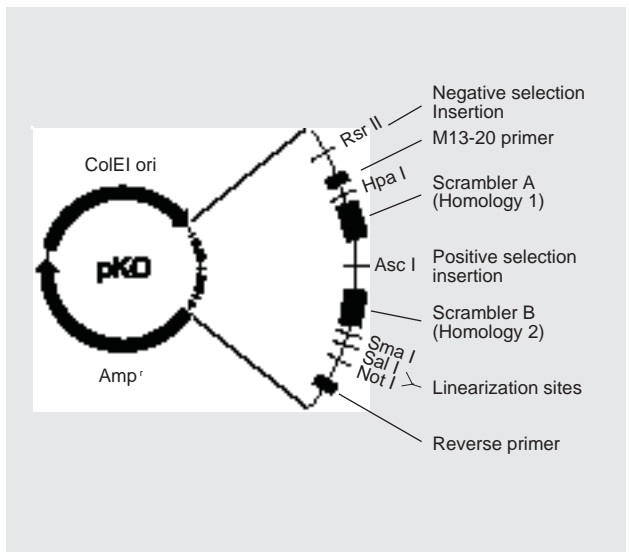


그림 2 pKO Scrambler Series™의 기본구조

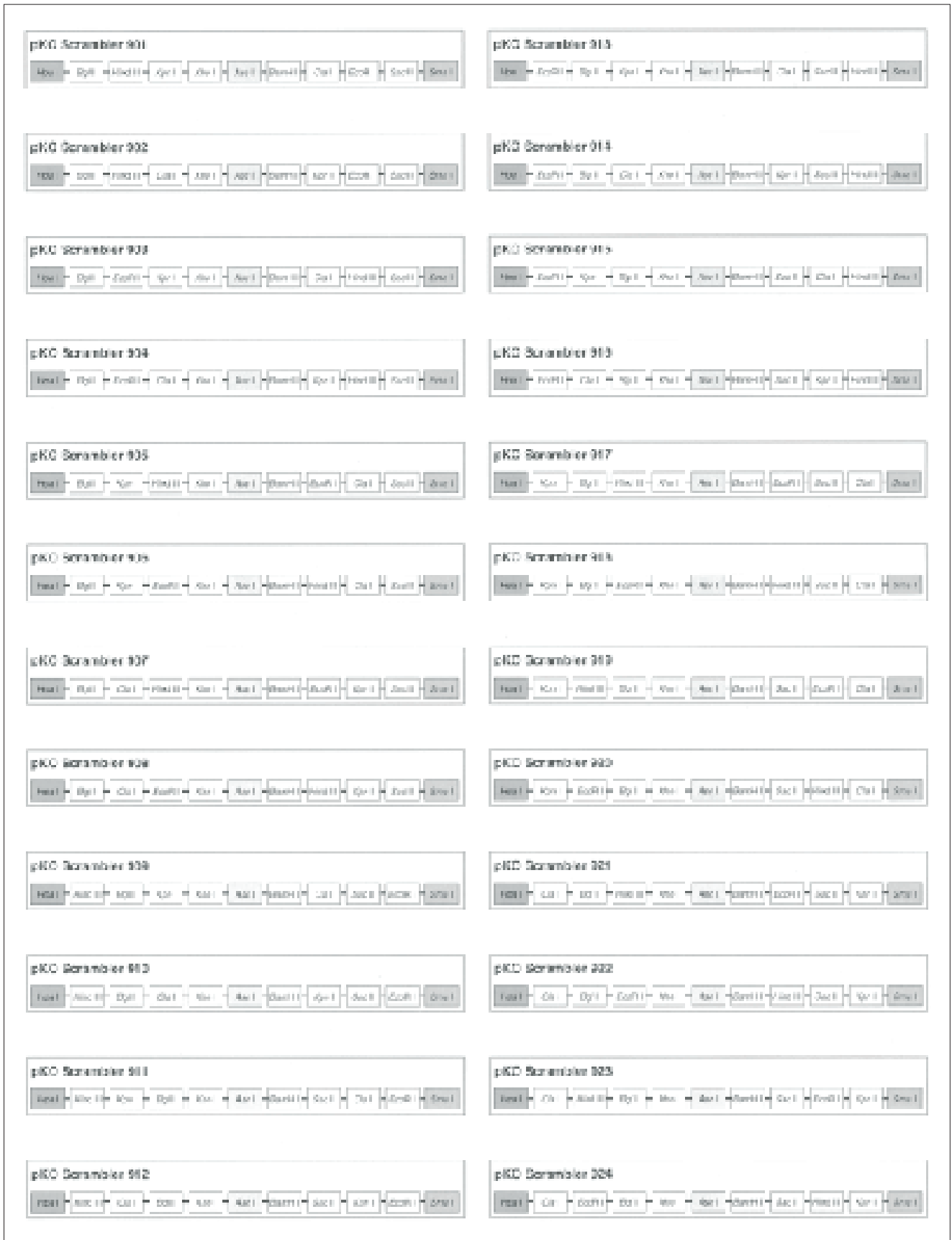


그림 3 pKO Scrambler Series™의 cloning site

**(2) pKO Selection Plasmids(그림 4)**

**pKO SelectNeo, pKO SelectPuro,  
pKO SelectHPRT, pKO SelectDT**

각기 다른 selection용 배열을 갖는 plasmid이다. 재조합 ES 세포를 선별하기 위하여 이들 plasmid에서 positive 또는 negative selection 배열을 잘라내어 pKO Scrambler Series™에 삽입한다.

- Positive selection 배열을 갖는 plasmid (Asc I site로 절단 가능)
  - pKO SelectNeo : neomycin 내성유전자
  - pKO SelectPuro : puromycin 내성유전자
  - pKO selectHPRT : *hprt* 유전자
- Negative selection용 배열을 갖는 plasmid (*Rsr II* site로 절단 가능)
  - pKO SelectDT : Diphtheria Toxin A chain 유전자

**(3) The Mouse Kit™**

pKO Scrambler Series™과 pKO Selection Plasmid를 이용해 제작한 targeting vector를 사용하여 재조합 ES 세포를 제작하는 키트이다. 높은 효율로 생식세포로 분화하는 ES 세포주 AB2.2와 최적화한 시약을 중심으로 아래와 같은 component로 구성되어 있다.

- AB2.2-Prime ES Cells™  
mouse strain 129/SvEv 유래, *hprt* 유전자 결손,  $3 \times 10^7$  cells×1 vial
- ESQ Feeder Cells™  
STO cell line 유래 mouse 섬유아세포, LIF(Leukemia Inhibitory Factor)는 불필요, neomycin · puromycin 내성,  $5 \times 10^7$  cells×3 vial
- The ESQ Reagent System™  
: 세포 배양용 각종 시약 세트

- ESQ™ FBS(500 ml) : AB2.2-Prime ES Cells™과 ESQ Feeder Cells™을 최적으로 유지하도록 엄선한 FBS(Fetal Bovine Serum)
- ESQ™ DMEM(450 ml) : D-glucose, L-glutamine, 중탄산나트륨 함유, 피루빈산나트륨 비함유
- ESQ™ PBS(500 ml) : Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 비함유
- ESQ™ Gelatin(500 ml) : 0.1%(w/v) gelatin
- ESQ™ Trypsin(125 ml) : 0.25% trypsin, 0.04% EDTA-2Na
- ESQ™ GPS 100×(30 ml) : 200 mM L-glutamine, 5,000 U/ml penicillin G, 5,000 µg/ml streptomycin
- ESQ™ BME 100×(30 ml) : 10 mM β-mercaptoethanol in PBS

**(4) AB2.2-Prime ES Cells™ Genomic Library(근일발매)**

**(5) 기타**

The Mouse Kit™의 각 component와 아래의 시약을 별도 판매한다.

- Selection용 시약 : 100× G418(10 ml)  
100× HAT(10 ml)  
100× HT(10 ml)  
100× Puromycin(1 ml)
- AB2.2-Prime ES Cells™( $2.5 \times 10^6$  cells×2 vials) : The Mouse Kit™의 ES 세포와는 농도와 갯수가 다르다.

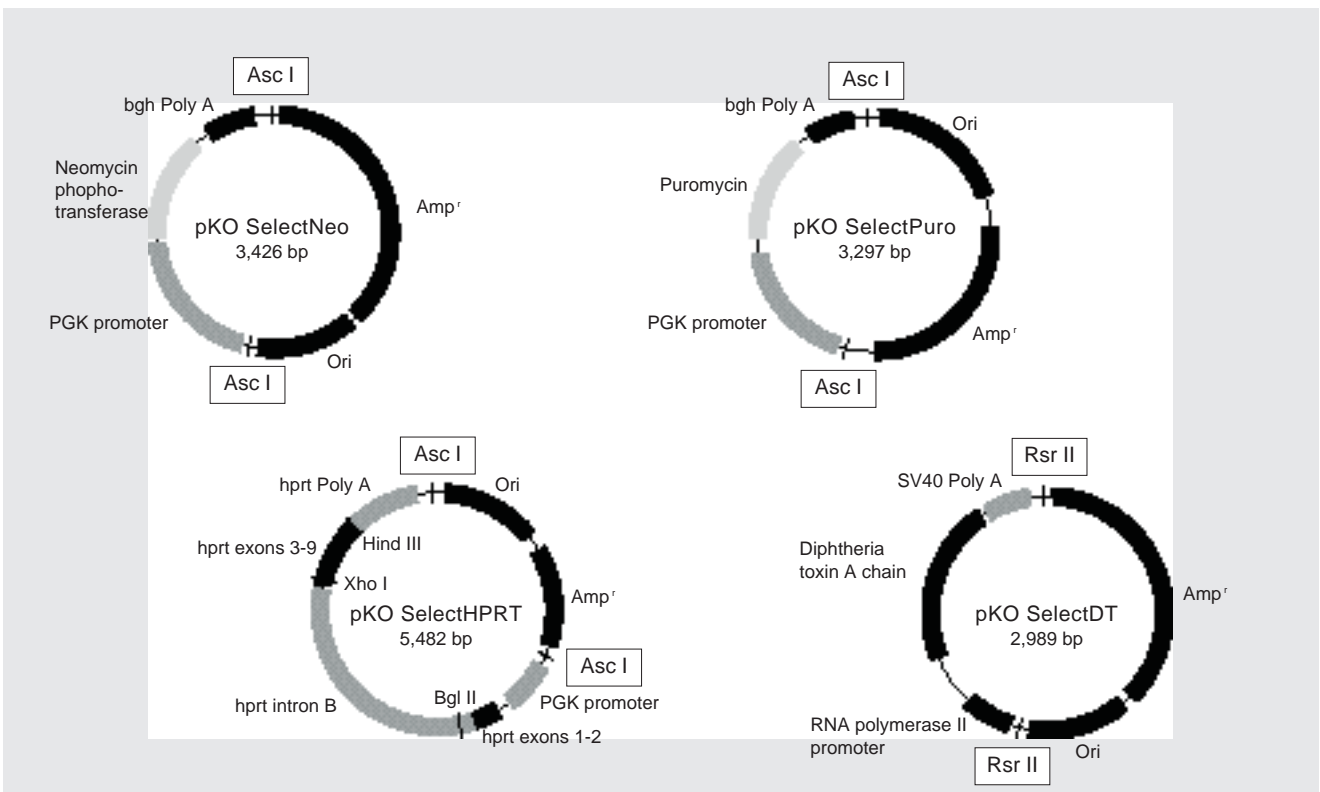


그림 4 각 pKO selection plasmid의 구조

## 재조합 ES 세포 제작 시스템 제품 리스트

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
pKO Scrambler Series™			
pKO Scrambler 901	LXV901	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 902	LXV902	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 903	LXV903	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 904	LXV904	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 905	LXV905	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 906	LXV906	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 907	LXV907	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 908	LXV908	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 909	LXV909	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 910	LXV910	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 911	LXV911	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 912	LXV912	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 913	LXV913	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 914	LXV914	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 915	LXV915	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 916	LXV916	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 917	LXV917	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 918	LXV918	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 919	LXV919	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 920	LXV920	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 921	LXV921	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 922	LXV922	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 923	LXV923	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Scrambler 924	LXV924	20 µg/20 µl	525,000원
pKO Selection Plasmids			
pKO SelectNeo	LXV800	20 µg/20 µl	625,000원
pKO SelectPuro	LXV810	20 µg/20 µl	625,000원
pKO SelectHPRT	LXV820	20 µg/20 µl	625,000원
pKO SelectDT	LXV840	20 µg/20 µl	625,000원
The mouse Kit™	LXK100	1 Kit	5,700,000원
Murine 129SvEv Genomic Library	근일 발매		
The ESQ Reagent System™			
AB2.2-Prime ES Cells™	LXC100	2 Vials( $2.5 \times 10^6$ cells/vial)	3,425,000원
AB2.2-Prime ES Cells™	LXC110	1 Vial( $3 \times 10^7$ cells/vial)	3,425,000원
ESQ Feeder Cells™	LXC200	3 Vials( $5 \times 10^7$ cells/vial)	1,375,000원
ESQ™ FBS(Fetal Bovine Serum)	LXB100	500 ml	875,000원
ESQ™ DMEM	LXM205	450 ml	75,000원
ESQ™ PBS	LXM215	500 ml	100,000원
ESQ™ Gelatin	LXM210	500 ml	150,000원
ESQ™ Trypsin	LXM220	125 ml	100,000원
ESQ™ GPS 100×	LXM250	30 ml	100,000원
ESQ™ BME 100×	LXM260	30 ml	75,000원
Reagents for Selection			
ESQ™ G418 100×	LXM270	10 ml	275,000원
ESQ™ HAT 100×	LXM280	10 ml	50,000원
ESQ™ HT 100×	LXM290	10 ml	25,000원
ESQ™ Puromycin 1000×	LXM300	1 ml	50,000원

주) 본 제품은 전부 연구용을 목적으로 하고 있습니다. 따라서 동물에의 의료, 임상진단 그리고 식품, 화장품, 가정용품 등으로 사용하지 않도록 하여 주십시오.



# 배양세포의 전 N-glycan의 구조 해석

최근 많은 당전이효소 특히 N-glycan 합성 유전자군이 분리되어 이들 유전자의 배양세포 내 또는 생체 내에서의 유전공학적 발현제어에 의한 당쇄변환 그리고 그에 따른 세포의 기능변화 또는 생산된 당단백질의 기능변화 등에 관한 연구가 아주 많이 이루어지고 있다. 그렇지만 세포 또는 조직전체의 N-glycan의 구조를 해석한 보고는 lectin염색에 의한 간접적인 방법이 대부분으로 N-glycan의 미세한 구조를 직접 해석한 예는 극히 소수에 불과하다. 그 이유는 세포의 경우 정제된 당단백질과 달리 지질, 핵산 등의 협잡물이 많고 전처리가 번잡하며 또한 표식 후에도 협잡물의 영향이 남아 분석에 지장을 초래하기 때문이다. 본 고에서는 이 협잡물을 어떻게 하면 제거할 수 있을가에 초점을 맞추어 배양세포의 N-glycan의 구조해석법에 대하여 소개한다.

## ▶ 배양세포로부터 pyridyl amino화 당쇄의 조제

Mouse Melanoma 세포(약  $5 \times 10^7$  cells, 10 cm 샬레 약 20개 분)를 chloroform-methanol로 탈지하였다(그림 1). 탈지 후의 단백질의 회수량은 3.5 mg(회수율 91%) 이었다. 다음으로 일반적인 방법에 의하여 hydrazine 분해(100°C, 10시간), 재 N-acetyl화, 탈염을 통하여 유리의 N-glycan을 함유하는 잔사를 얻었다. 잔사를 증류수에 용해하여 5개의 GlycoTAG® 전용튜브에 분주한 후 GlycoTAG®의 당쇄 표식 프로그램으로 pyridyl amino(PA)화하였다. PA화 후 시료의 1/500량을 PALPAK® Type S(TaKaRa Code CA8300)를 사용하여 순상 HPLC로 분석하였다. Injection 이후 45분까지 용출되는 peak(점선 밑줄)는 환원말단 분석에서 PA-GlcNAc을 형성하지 않았기 때문에 협잡물의 peak이라고 판단된다. 45분 이

후의 peak(실선 밑줄 : PA glucose oligomer로는 5 mer 이상에 상당)는 PA-GlcNAc를 환원말단에 갖고 있어 이들 peak에 PA화 N-glycan이 용출되는 것을 알았다. 이후의 당쇄분석을 위해 동일조건으로 PA화 N-glycan 분획을 분취하고자 하였으나 분취 scale에서는 협잡 peak의 tailing이 심하여 만족한 결과를 얻을 수 없었다. 따라서 PA화 후의 시료를 우선 Sephadex™ G-15 column(25 ml)에 걸어 10 mM 중탄산수용액으로 용출하였다. 각 분획(1 ml)의 일부를 PALPAK® Type S를 사용하여 순상 HPLC로 분석하고, N-glycan을 함유하는 분획을 모았다(15~20 ml). 이를 다시 순상 HPLC에 걸어 협잡 peak를 완전히 제거하여(그림 3), PA화 당쇄를 조제하였다.

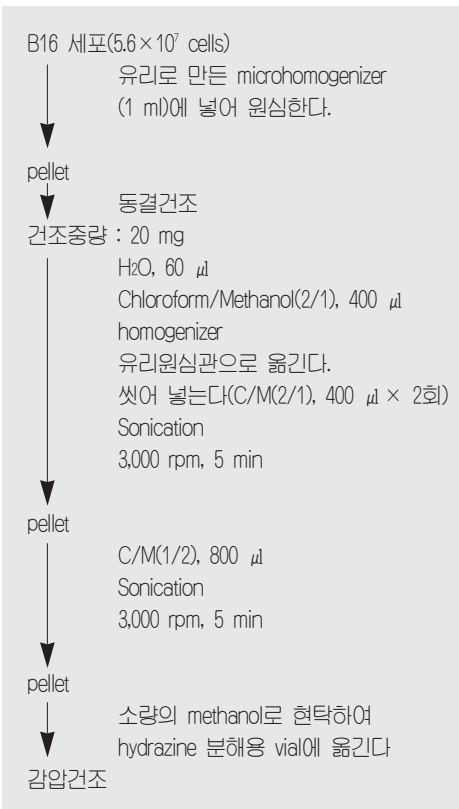


그림 1 배양세포의 전처리

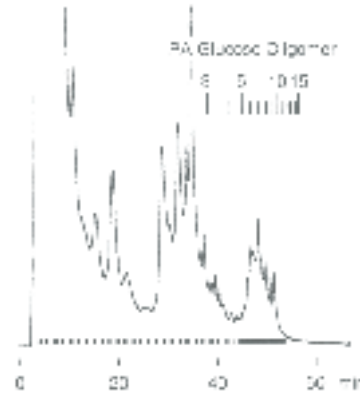


그림 2 PA화 직후의 순상 HPLC pattern

〈HPLC 조건〉

Column : PALPAK® Type S

Solvent A : CH<sub>3</sub>CN/500 mM AcOH-triethylamine(pH7.3)/H<sub>2</sub>O, 9/1(v/v)

Solvent B : CH<sub>3</sub>CN/500 mM AcOH-triethylamine(pH7.3)/H<sub>2</sub>O, 5/1/4(v/v/v)

Elution : 0% Solvent B for 20 min, and 0%~100% Solvent B in 30 min

Flow Rate : 1 ml/min

Column Temp. : 40°C

Detection : Fluorescence(Ex. : 310 nm, Em. : 380 nm)

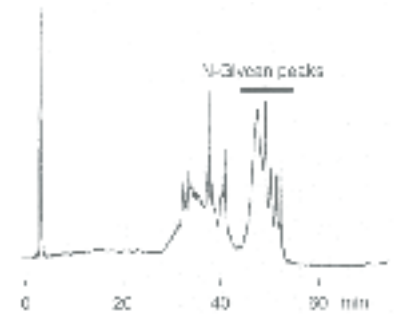


그림 3 gel 여과 직후의 순상 HPLC pattern  
HPLC 조건은 그림 2와 같다.



▶ PA화 당쇄의 HPLC 분석

조제한 PA화 당쇄분획을 anion exchange HPLC로 분석하였다. 중성당쇄(65%)외에 1-4개의 산성당쇄(35%)를 확인하였다(그림 4). 다음에 PA화 당쇄 분획을 0.1 N 염산으로 80 °C, 1시간 처리하여 sialic acid를 제거한 후 PALPAK® Type R(TaKaRa Code CA8000)을 사용하여 역상 HPLC로 분석하였다(그림 5). High mannose형 N-glycan의 용출위치에서도 peak가 관찰되었다. Complex형 N-glycan 이라고 생각되는 peak는 이전에 보고된 B16세포 막단백질의 complex

형 N-glycan<sup>1)</sup>(그림 6)의 용출 부위와 일치하였으므로 이들 peak(b~f)를 분취하여 순상 HPLC로 분석하였다. 또 high mannose형 N-glycan의 분취 (a)도 같이 모아 분취하여 순상 HPLC로 분석하였다. 순상분석의 결과, a는 mannose 6-9 개의 high mannose형 당쇄의 혼합물(그림 7a)로, b는 Tri\*가 15%이고 나머지는 미동정의 peak(그림 7b)이며, c는 Bi, Tri\*F, Tetra가 3:1:3(그림 7c), 그리고 d는 Tri, TetraF가 1:3, e, f는 각각 BiF, TriF로 동정되었다.

중성당쇄

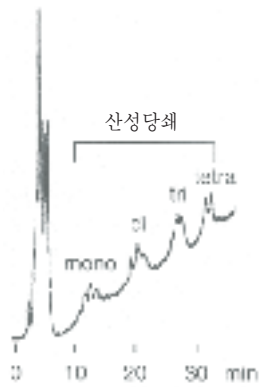


그림 4 Anion exchange HPLC 분석

<HPLC 조건>

- Column : Asahipak NH2P-50
- Solvent A : CH<sub>3</sub>CN/500 mM AcOH-triethylamine(pH7.3) /H<sub>2</sub>O, 55/8/37(v/v/v)
- Solvent B : CH<sub>3</sub>CN/500 mM AcOH-triethylamine(pH7.3) 30/70(v/v)
- Gradient : 0~100% Solvent B in 50 min
- Flow Rate : 1 ml/min
- Column Temp. : 40°C
- Detection : Fluorescence(Ex. : 320 nm, Em. : 400 nm)

그림 5 탈 sialo 당쇄의 역상 HPLC 분석

<HPLC 조건>

- Column : PALPAK® Type R
- Solvent A : 100 mM AcOH-triethylamine(pH4)
- Solvent B : 0.5% 1-Butanol in Solvent A
- Gradient : 5~35% Solvent B in 60 min
- Flow Rate : 1 ml/min
- Column Temp. : 40°C
- Detection : Fluorescence(Ex. : 320 nm, Em. : 400 nm)

High mannose형 당쇄

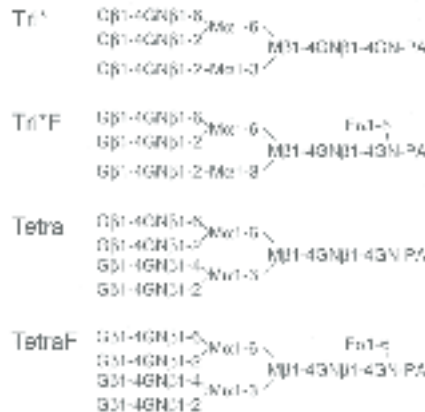
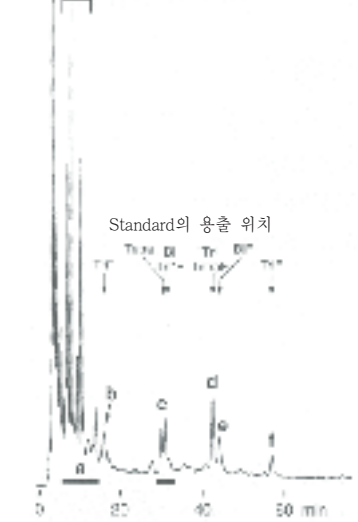


그림 6 B16세포 유래의 complex형 N-glycan

- M : mannose
- G : galactose
- GN : N-acetylglucosamine
- F : fucose
- PA : Pyridyl amino기

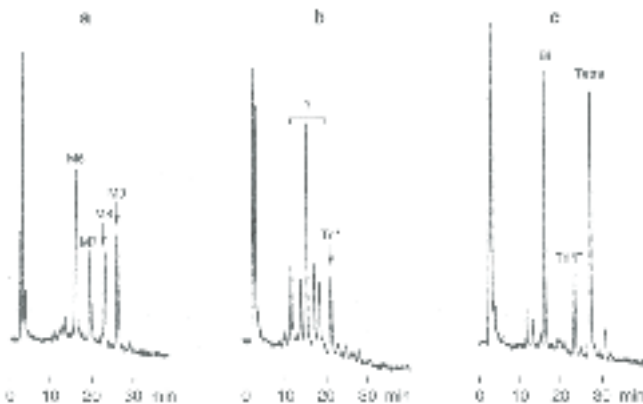


그림 7 역상 fraction의 순상 HPLC 분석

<HPLC 조건>

- Column : PALPAK® Type S
- Solvent A : CH<sub>3</sub>CN/500 mM AcOH-triethylamine(pH7.3) /H<sub>2</sub>O, 75/10/15(v/v/v)
- Solvent B : CH<sub>3</sub>CN/500 mM AcOH-triethylamine(pH7.3) /H<sub>2</sub>O, 50/10/40(v/v/v)
- Elution : 30~80% Solvent B in 50 min
- Flow Rate : 1 ml/min
- Column Temp. : 40°C
- Detection : Fluorescence(Ex. : 310 nm, Em. : 380 nm)

주) a의 injection양은 b, c의 10분의 1

▶ **맺음말**

배양세포나 조직과 같은 crude한 시료의 당쇄 분석에서는 분석을 방해하는 험잡물을 간편하면서도 효율적으로 제거하는 것이 무엇보다도 중요한 과제이다. 금번 배양세포중의 N-glycan의 PA화에 의한 구조 분석을 소개하였으나 포인트는 (1) hydrazine 분해 전에 탈지하는 것 (2) PA화 후에 Sephadex G-15로 gel filtration 하는 두가지이다. 이들 조작으로 험잡물을 효과적으로 제거할 수 있어 구조해석이 용이하게 되었다. 또 HPLC 컬럼에의 부담을 줄이게 되므로 수명을 늘릴 수 있다. PA화는 아주 높은 감도의 labeling 방법이므로 배양세포의 경우 10<sup>7</sup>개만을 가지고도 어느 정도의 당쇄해석은 가능하리라 생각한다.

[참고문헌]

- 1) Yamashita, K. et al. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10834.
- 2) Shimizu, H. et al. (1993) *J. Biochem.* **114**, 334.
- 3) S. I. Takazaki(1991) 당쇄I·당단백질(상), 신생화학실험 강좌3, 일본생화학회편(동경화학동인) p95
- 4) Kawano, T. et al. (1991) *Glycobiology* **1**, 375.

▶ **관련제품**

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
GlycoTAG <sup>®</sup>	GT100	1대	114,000,000원
PALPAK <sup>®</sup> Type R	CA8000	1개	1,108,800원
PALPAK <sup>®</sup> Type S	CA8300	1개	1,108,800원

# 환율 폭등에도 인상하지 않았 습니다 !!

합성 DNA, 가격만으로 판단하십니까?  
품질과 양을 함께 꼼꼼히 비교하십시오.

## 정평의 TaKaRa 합성 DNA

### HQ-PCR Grade

역상 cartridge column을 사용하여, 정제, 탈염한 것으로 순도는 90% 이상  
PCR용 primer 또는 probe용으로서 사용하는 데 적당합니다.

### HQ-SEQ Grade

이온교환 HPLC에 의해 정제·검정한 초고순도품으로 순도는 99% 이상.  
특히 정제를 필요로 하는 DNA 염기배열 결정용 primer로 적당합니다.  
41 mer 이상은 역상 HPLC에 의해 정제, 검정합니다.

**가 격**

(200 nmol Scale 합성) - 합성료, 정제료, 송료를 전부 포함한 가격임

HQ-PCR Grade	가 격
~17 mer	44,000원
18~25 mer	50,000원
26~40 mer	57,000원

HQ-SEQ Grade	가 격
~17 mer	85,000원
18~25 mer	93,000원
26~40 mer	100,000원
41~이상	별도상담

수식합성 DNA	가 격
1 건당*	199,800원

- 10 OD 보증
- 통상 납기 1주일

- HPLC Grade, 1 OD 보증
- 통상 납기 1주일

- HPLC 정제
  - SEQ Grade, 40 mer까지
  - 통상 납기 2주일
- \* FITC, Biotin, XRITC, S-Oligo, DIG, INOSINE, 인산화 등

## - 단백질 및 peptide의 분자량 측정 -

질량 분석장치에 의한 단백질·peptide의 분자량을 측정합니다. Ion spray 질량 분석방법으로 150 kD의 단백질의 분자량도 정확하게 측정할 수 있습니다(오차 0.01% 이하).

측정에는 PE Sciex사의 고성능 3련 질량 분석장치 API III™을 사용합니다. 측정 결과는 질량분석 DATA를 첨부하여 송부합니다.

소요기간 약 15일

### ▶ 분석을 의뢰하실 때에는 다음의 점에 유의하여 주시기 바랍니다.

(1) 측정 분자량 한계                      150 kD 까지

#### (2) 시료의 순도

90% 정도의 순도로 충분하나 염이나 안정제의 혼입은 방해가 되므로 완전히 제거하여 주시기 바랍니다.

일반적으로 휘발성 용매(Trifluoroacetic acid/Acetonitrile, 2-Propyl alcohol)를 사용한 역상 HPLC로의 정제를 권장합니다. 역상 HPLC로 회수가 곤란한 경우에는 투석(외액에는 0.1~1% formic acid를 사용한다) 또는 겔 여과(formic acid 또는 TFA계에서의 HPLC Gel Chromatography)도 관계 없습니다.

(3) 필요한 시료량                          500 pmol 이상

#### (4) 형상

동결 건조품이 최적입니다만 재용해가 곤란한 시료의 경우는 용액으로도 가능합니다. 농축 건조는 시료의 회수가 좋지 않으므로 피하여 주십시오.

#### (5) 시료의 용해성

측정은 통상 0.1~10% formic acid 20~50%(최종농도)의 acetonitrile를 첨가하여 실시합니다. 이 조건에서 시료의 용해성이 좋지 않은 경우 또는 특정의 용매가 있는 경우는 그 내용을 알려주시기 바랍니다.

LC/MS법에 의한 다성분의 분자량 측정과 MS/MS 분석법에 의한 peptide, 단백질의 구조해석에 관해서는 별도로 상담하여 드립니다.

# PCR을 이용한 DNA, RNA 해석 기술의 원리

PCR의 원리는 2가닥의 DNA를 주형으로 하여 특정영역을 사이에 두는 두개의 primer가닥을 DNA polymerase에 의해 신장을 반복 하므로서 primer 사이의 DNA 단편을 증폭하는 것은 주지의 사실이다. 이 PCR을 기반으로 여러가지 DNA, RNA의 해석 기술이 고안되어 있다. 각각 중요한 아이디어가 들어 있으므로 이러한 기술중 최근에 비교적 자주 사용되는 몇몇의 방법에 대하여 그 원리를 간단히 정리하여 소개하고자 한다.

## 서론

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)이 처음으로 소개된 것은 1986년이다. Cold Spring Harbor연구소에서 개최된 Symposium on Quantitative Biology "The Molecular Biology of Homo Sapiens"에 참석한 Kary Mullis가 PCR의 개발을 보고한 것이다.<sup>1)</sup> 이 발표는 분자생물학, 의학 등의 폭넓은 분야에서 DNA를 클로닝할 필요없이 아주 소량의 DNA만 있으면 표적유전자의 상태를 알 수 있게 해 주는 혁명적인 것이라 할 수 있다.

1953년 Watson과 Crick에 의해 DNA 나선 구조의 해명으로 시작된 DNA 분자생물학의 세계는 20년 후 제한효소의 발견과 그에 따른 DNA cloning법, 염기배열 결정법의 개발로 혁명적인 변혁을 맞게 되고, 그리고 10년 후 PCR의 탄생은 새로운 혁명을 맞게 된다. 이 PCR 기술의 개발로 Mullis는 1993년도 일본 국제상을 수상하게 되고, 이듬해 노벨 의학생리학상으로 빛나게 된다.

두 가닥의 DNA를 주형으로 하여 특정영역을 사이에 두고 짧은 primer DNA를 각 상보가닥에 hybridize 하여 기질이 되는 4종류의 deoxy nucleotide triphosphate(dNTP)의 존재 하에서 DNA polymerase를 작용시키면 이 primer의 3' 말단에 주형의 염기배열에 따라서 nucleotide가 첨가되어 가닥이 신장한다. PCR의 원리는 이 반응으로 형성된 새로운 두가닥 DNA를 가열하여 상보가닥으로부터 분리하고 과잉으로 존재하는 primer를 해당 위치에 결합시켜 DNA polymerase로 새로운 DNA 가닥을 합성하는 것이다. 이 반응을 반복하므로서 목적 영역을 함유하는 DNA 단편을 대량으로 얻을 수 있다. 이 원리로 DNA 단편의 수를 늘릴 수 있다는 것은 1976년 tRNA 유전자를 대상으로 처음으로 기능을 갖는 유전자의 인공합성에 성공한 H. G. Khorana가 위스콘신대학에서 MIT로 옮겼을 즈음인 1971년에 발표한 논문 가운데 이미 서술되었다.<sup>2)</sup> 그러나 그 당시 배경이 되는 과학적 지식, 기술의 진보가 충분하지 않았던 것도 영향을 미쳤는지 모르나 실용화까지 진행되지 않아 PCR이 되지는 못하였다. 그로부터 10년, Mullis에 의해 PCR이 화려하게 탄생한 것이다. 반응으로부터 얻은 두가닥 DNA를 가열하여 상보가닥을 분리하는 과정에서 DNA polymerase가 실활하기 때문에 반

응을 반복할 때마다 새로운 효소를 첨가하여야 하는 불편함은 내열성 DNA polymerase를 사용하는 등의 연구가 계속되고 기계화되어 지금은 각 연구실마다 한 두대씩 보유하는 시대가 되었다.

과학기술 특히 분자생물학, 생화학분야의 기술에 있어서는 단순한 원리, 간단한 조작일수록 유용성이 많은 경향이 있다. 즉 초심자가 논문에 따라서 실험을 진행하여도 반드시 제대로 된 결과를 얻을 수 있는 기술이다. PCR은 그 전형적인 예이다. PCR의 원리는 위에서 설명한 바와 같으나 이 PCR을 기반으로 하여 DNA, RNA 해석기술이 고안되었고 이는 약어로 불려지고 있으므로 그 원리를 알지 못하는 경우가 많다. 각각의 기술은 기발한 아이디어로 개발되어 있어 그 원리들을 간단히 정리하여 본다.

단 Alu PCR, inverse PCR, asymmetric PCR, multiplex PCR, RT-PCR, PCR에 의한 변이도입, 또 Allele 특이적 PCR, GC clamp PCR, PCR-SSCP 등 DNA 염기배열의 변화를 검출하는 기술은 이미 널리 알려져 있으므로 생략한다.

## 1. PCR

내열성 DNA polymerase가 PCR의 주역이므로 대표적인 효소의 기본적인 성질을 정리하였다(자세한 내용은 본지 3호(제 2권 1호)를 참조). PCR에 통상 사용하는 내열성 DNA polymerase는 *Thermus aquaticus*에서 정제한 Taq DNA polymerase이다. 이것은 2.5 kbp의 유전자가 코드하는 832개의 아미노산으로 구성되어 있으며 5' → 3' exonuclease 활성을 갖고 있으나 3' → 5' exonuclease 활성은 갖고 있지 않다. *AmliTaq*, *Takara Taq*은 클론화한 Taq DNA polymerase를 대장균에서 발현하여 정제한 효소이다<sup>3)</sup>. 내열성 DNA polymerase 중 중요한 것들을 표 1에 정리하였다. Stoffel fragment는 효소로서의 안정성이 Taq의 2배이므로 PCR의 변성과정에서 보다 높은 온도로 사용할 수 있으므로 GC rich 영역, 복잡한 2차구조를 갖는 영역의 증폭에 유리하다. *Vent* DNA polymerase는 *Thermococcus litoralis* 유래로서, 높은 열안정성을 가지며, 긴 단편을 합성할 수 있다. 3' → 5' exonuclease 활성으로 말미암아 primer의 3' 말단에

잘못 삽입된 염기를 제거할 수 있어 mismatch가 적은 DNA를 합성할 수 있다. 그러나 이같은 특성으로 인하여 allele 특이적 PCR에는 사용할 수 없다. Stoffel fragment, Vent DNA polymerase는 열안정성이 뛰어나 고온에서의 반응이 가능하므로 주형 DNA의 복잡한 고차구조의 형성을 저해하여 DNA sequencing 반응용 효소로서 유리하다. Pfu DNA polymerase는 *Pyrococcus furiosus*에서 분리한 효소로 3' → 5' exonuclease 활성을 갖고 있으므로 DNA 단편의 증폭에 있어서 잘못된 염기를 삽입하는 비율이 Taq DNA polymerase에 비하여 12분의 1 정도이다. PCR로 얻는 DNA 단편은 사용하는 효소의 염기삽입 충실도에 의존하여 잘못된 염기를 함유하는 분자가 존재한다. 따라서 그 염기배열의 결정은 클론화한 분자를 재료로 하는 경우 잘못된 염기를 읽는 경우가 생긴다. 따라서 반응산물을 혼합물의 상태로 직접 해석 재료로 사용하든지, 클론화한 경우에는 복수의 클론에서 동일한 결과인지를 확인한다. 또는 복수의 클론을 혼합하여 해석재료로 사용할 필요가 있다.

## 2. Long PCR(long and accurate PCR)

내열성 DNA polymerase로 증폭되는 DNA영역은 그 종류에 따라 다양하나 일반적으로 5 kbp를 넘지 않고 실제로는 1~2 kbp의 DNA를 얻기도 어려운 경우도 있다. 그 원인으로는 내열성 DNA polymerase에 의한 primer 가닥의 신장중에 일어나는 3' 말단의 A잔기의 부가로 생기는 mismatch의 형성, PCR 과정중 고온처리 과정에서 일어나는 DNA상의 purine염기의 유리(depurination), 3' → 5' exonuclease 활성을 갖는 효소의 경우 primer 3' 말단의 제거 등에 의한 DNA 가닥의 신장의 정지 등을 들 수 있다.

PCR로 10~20 kbp의 DNA 단편을 증폭할 수 있으면 cDNA 염기배열로부터 genome DNA의 intron 염기배열을 알 수가 있어, 상동 재조합에 사용하는 DNA 단편을 간단히 얻을 수 있는 등 다양하게 응용할 수 있다.

이와 같은 요구에 부응하는 하나의 방법으로서 그림 1에 나타낸 바와 같이 3' → 5' exonuclease 활성을 갖는 효소를 이용하는 것이다. Mismatch 염기를 primer 말단으로부터 제거하므로써 계속해서 PCR에 의해 primer의 신장이 일어난다. 3' → 5' exonuclease 활성을 갖지 않는 일반 Taq에 5' → 3' exonuclease 활성을 부여하고, 3' → 5' exonuclease 활성을 갖는 Pfu polymerase를 미량 공존 시키므로써 긴 증폭단편을 얻을 수 있다<sup>4,5)</sup>(이 PCR기술에 관한 자세한 내용은 본지 1호(제 1권 1호) 8 페이지 참조).

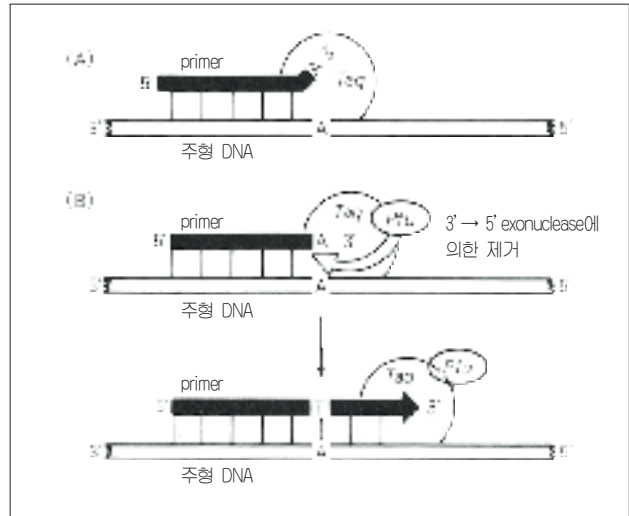


그림 1 long PCR

(A) Taq DNA polymerase에 의한 PCR, (B) Taq DNA polymerase에 3' → 5' exonuclease를 갖는 polymerase를 공존시키는 long PCR

## 3. hot start PCR

PCR을 시작할 때 온도가 T<sub>m</sub>값 이하로 떨어지면 primer dimer 형성이나 비특이적 start가 일어나게 된다. Hot start는 이 같은 난점을 극복하기 위한 것이다. 그 원리는 첫번째 변성온도에 이르기까지 예를 들면 DNA polymerase 등 공통 반응성분의 하나를 반응계로부터 첨가하지 않는 것이다. 이 원리를 실제로 사용하는 경우로서 아래의 3가지 방법을 들 수 있다. ① mineral oil을 증층하는 반응계로 반응하는 tube 수가 많지 않은 경우, 최초의 변성온도에 이른 다음에 각 tube에 공통반응 구성성분을 첨가한다. ② wax beads를 반응액 위에 놓고 가열 용해 후 고형화하여 층을 만든다. 그 위에 첨가하지 않았던 공통 반응 구성성분을 첨가한다. 첫번째 변성온도로 가열할 때 wax가 용해하여 고온시에 전 구성성분이 만날 수 있도록 한다. ③ 반응 구성성분을 처음부터 혼합하나 항 Taq DNA polymerase 항체를 반응액에 첨가하여 놓는다. 변성온도에 달하는 과정에서 이 항체가 polymerase로부터 유리하여 실활하게 되므로써 고온에서 전 구성성분이 갖추어 지게 된다.

## 4. rapid amplification of cDNA ends(RACE)

cDNA의 일부만의 염기배열을 알고 있는 경우 그 5' 그리고 3'-말단부분을 단리하는 PCR이다<sup>6)</sup>. Anchored primer<sup>7)</sup> one-sided PCR<sup>8)</sup>도 같은 목적이나 원리로 하는 방법이다. RACE의 원리는 그림 2와 같다. cDNA의 3' 말단의 증폭에는 우선 3종류의 제한효소 인식배열을 갖는 35 nucleotide

표 1 내열성 DNA polymerase

DNA polymerase	분자량 (K)	최적온도 (°C)	신장속도 nucleotide/sec	안정성(반감기, min)			exonuclease 활성		mismatch 빈도 (1 bp/kbp)	증폭DNA 길이 (kbp)
				97.5°C	95.0°C	92.5°C	5' → 3'	3' → 5'		
Taq	94	75~80	150	10	40	130	+	-	5~15	<5~6
Stoffel	61		>50	20	90	?	-	-		<0.3
Vent	?		>80	130	360	?	-	+	20	10~13
Pfu	92	72~78	60	>180	>120	?	?	+	140	<1.5~2
rTh			150				+	-		<5~6



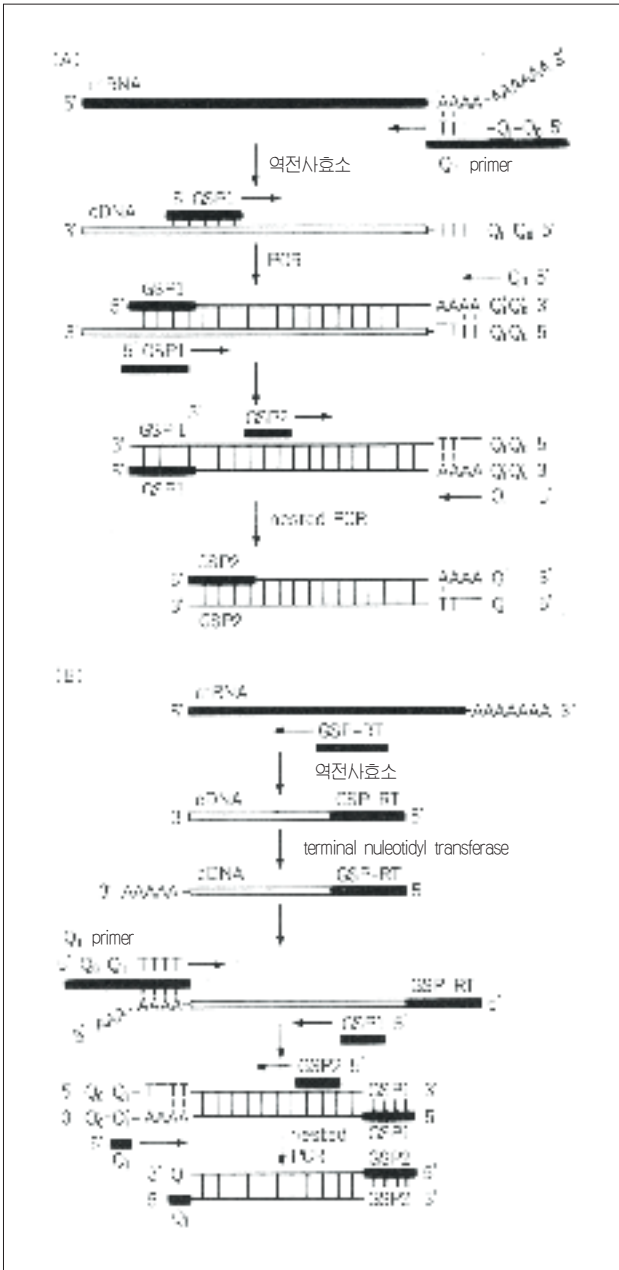


그림 2 RACE법에 의한 cDNA 양말단의 증폭

(A) cDNA 3' 말단의 증폭

(B) cDNA 5' 말단의 증폭 Q<sub>T</sub> primer는 18 nucleotide의 Q<sub>0</sub>, 18 nucleotide의 Q<sub>T</sub>(Q<sub>0</sub>의 3' 말단과 Q<sub>1</sub>의 5' 말단의 nucleotide는 공통)로 구성된 35 nucleotide의 Q<sub>0</sub>-Q<sub>1</sub> 배열의 3' 말단에 17개의 T가 연결된 oligonucleotide. 이 35 nucleotide 배열중에 *Hind* III, *Pst* I, *Xho* I의 인식배열이 들어 있다. GSP1, GSP2는 cDNA의 염기배열의 기지영역에 대응하는 유전자 특이적 primer. GSP1, GSP2는 cDNA의 기지의 염기배열 영역에 대응하는 유전자 특이적 primer. GST-RT는 역전사 반응용의 유전자 특이적 primer

(18 nucleotide의 Q<sub>0</sub>, 18 nucleotide의 Q<sub>2</sub>로 구성되어 Q<sub>0</sub>의 3' 말단과 Q<sub>1</sub>의 5' 말단이 같은 염기배열을 공유한다)에 계속하여 T가 17개 연결된 Q<sub>T</sub> primer를 사용하여 mRNA를 주형으로 역전사반응하여 한가닥 cDNA를 합성한다. 이 cDNA를 주형으로 Q<sub>T</sub> primer의 5' 말단에 위치하는 Q<sub>0</sub>배열을 primer로 하여 미리 알고 있었던 mRNA 5' 말단에 보다 가까운 영역에 대응하는 유전자 특이적 primer-1(GSP1)의 사이에 PCR을 실시한다. 계속해서 이 PCR산물을 주형으로 GSP1보다 안쪽의 GSP2 primer와 Q<sub>1</sub> primer를 사용하여 nested PCR을 실시하므로써 기지영역에서 poly(A) 까지의

3' 말단측의 cDNA를 얻을 수 있다(그림 2A). 5' 말단영역의 cDNA에 관해서는 mRNA를 주형으로 역전사용 유전자 특이적 primer(GST-RT)를 사용하여 한가닥 cDNA를 제작하고 계속해서 그 3' 말단에 terminal deoxynucleotidyl transferase로 A잔기를 부가한다. 이 poly(A) 부분에 GT primer를 annealing시켜 GSP1 primer 사이로 PCR을 실시한다. Q<sub>T</sub> primer와 보다 안쪽의 유전자 특이적 GSP2 primer를 사용하여 nested PCR로 cDNA의 5' 말단 영역을 얻을 수 있다(그림 2B).

그림 2에 나타낸 RACE에서는 5' 말단 영역은 얻은 DNA의 단편이 반드시 mRNA의 5' 말단까지 포함되어 있다고는 말할 수 없다. 이와 같은 문제를 해결하는 방법으로서 그림 3에 나타낸 신 RACE법이 고안되었다<sup>9)</sup>. 이 방법의 요점은 cDNA를 제작하는데 있어서 cap을 갖고 있는 전장의 mRNA를 선택하는 것과 mRNA의 5' 말단에 직접 염기배열을 알고 있는 RNA를 anchor로서 첨가하는 것이다. 우선 mRNA의 5' 말단을 탈인산화한다. 전장의 mRNA는 5' 말단에 cap구조를 갖고 있으므로 탈인산화 반응의 영향을 받지 않으나, cap 구조를 갖고 있지 않은 5' 말단이 결손된 분자는 그 5' 말단의 인산기가 제거된다. 계속해서 cap구조를 제거하는 반응을 실시하면 전장의 mRNA는 5' 말단에 인산기를 갖는 형태가 된다. 이 5' 말단에 이미 알고 있는 짧은 RNA를 T4 RNA ligase로 결합한다. anchor를 첨가한 mRNA를 주형으로 GST-RT primer를 사용한 역전사효소 반응으로 한가닥 cDNA를 제작한 다음 첨가한 anchor RNA의 염기배

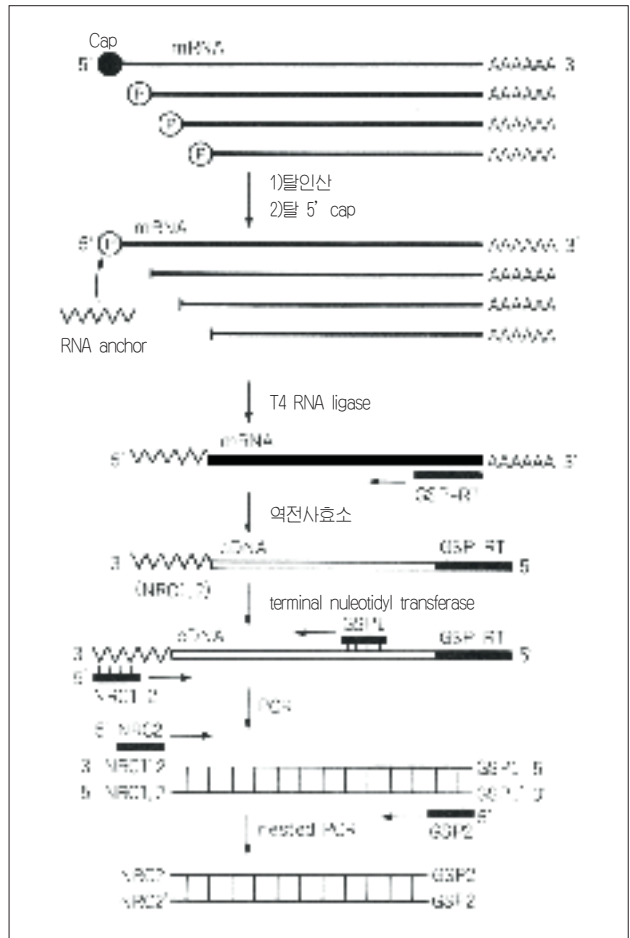


그림 3 신 RACE

NRC1, 2는 mRNA의 5' 말단에 결합한 RNA 부분에 특이적인 primer. GSP1, 2는 유전자 특이적 primer

열에 대응하는 NRC1 primer과 GSP1 primer를 사용하여 PCR을 실시한다. 얻어진 DNA 단편을 주형으로 NCR2와 GSP2 primer에 의해 nested PCR을 실시하므로써 전장 mRNA의 5' 말단 영역을 갖는 cDNA를 얻을 수 있다.

### 5. nested PCR

nested PCR, seminested PCR의 원리는 그림 4와 같다. 목적하는 영역의 처음의 PCR산물을 주형으로 처음에 사용한 primer의 위치보다 양쪽 모두 안쪽으로 primer의 위치를 설정하여 PCR을 실시하는 것이 nested PCR이고, 어느쪽이든 한쪽의 primer만을 안쪽의 것으로 사용하는 것이 seminested PCR이다. 이 같은 조작으로 목적이외의 영역으로부터 유래하는 산물을 제거할 수 있다.

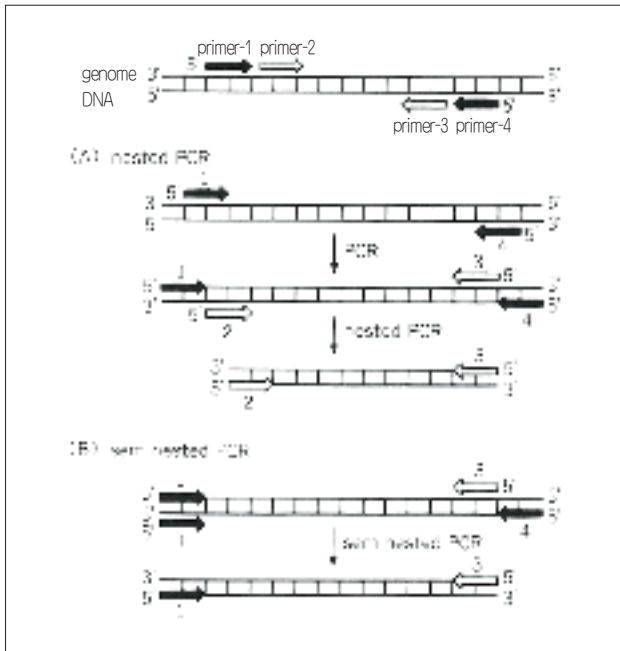


그림 4 nested PCR, seminested PCR

### 6. arbitrarily primed-PCR(AP-PCR)

AP-PCR은 한개의 primer를 사용하는 PCR로 그 원리는 그림 5와 같다. 처음 수회의 사이클은 조건이 약한 상태(예를 들면 anealing 온도 50°C 등)로 실시하여 primer와 template DNA strand간에 mismatch를 갖는 hybrid를 형성하여 primer를 신장시킨다. 계속해서 통상의 anealing 온도조건으로 PCR을 실시하므로써 약한 조건에서 생성된 DNA 단편을 증폭한다. 이 같은 PCR로 평균 약 30개의 다양한 염색체 유래의 단편이 증폭된다<sup>10)</sup>. 통상의 PCR을 25 cycles 정도에서 정지하면 준정량적으로 최초의 약한조건에서 생성한 산물의 양을 반영한 DNA 단편을 얻을 수 있다.

Polyacrylamide gel 전기영동으로 분획하여 얻은 finger print를 비교하므로써 염색체 영역의 copy수의 증감 등을 검색할 수 있다. 또 signal의 유무로 DNA상의 염기배열의 다형을 검출할 수 있다. AP-PCR의 산물을 한가닥으로 변성한 후 비변성 polyacrylamide gel로 분리하는 SSCP 해석을 실시하여 DNA 단편 내의 염기변화도 검출할 수 있어 DNA 염기배열상의 많은 정보를 얻을 수 있다<sup>11)</sup>.

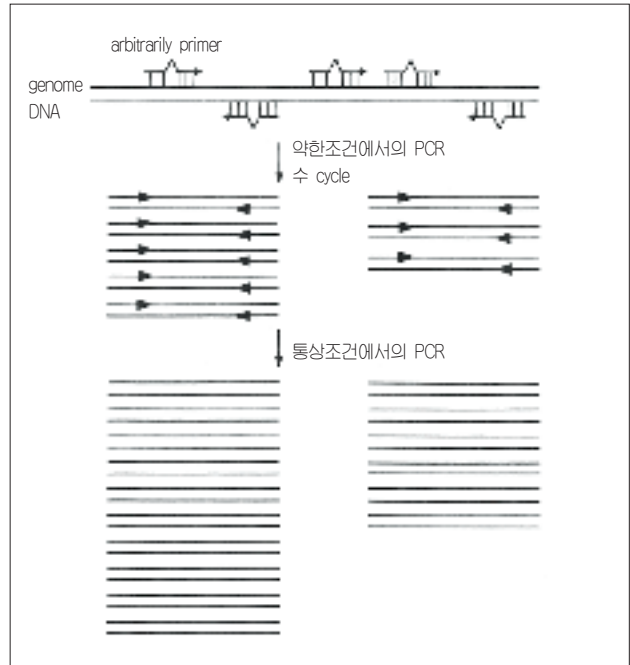


그림 5 AP-PCR

### 7. differential display RT-PCR(DDRT-PCR)

세포간, 조직간에서 다르게 발현하고 있는 유전자를 mRNA의 존재유무로 동정하는 방법으로서 1992년에 개발된 PCR을 기반으로 하는 기술이다. 이는 differential display RT-PCR(DDRT-PCR)<sup>12)</sup> 또는 RNA arbitrarily primed PCR(RAP-PCR)<sup>13)</sup>이라 불려지고 있다.

DDRT-PCR의 원리를 그림 6(A)에 나타내었다. 요점은 degenerate anchor primer(T)<sub>10</sub> MN을 사용하여 한가닥 cDNA를 제작하고 같은 anchor primer와 임의의 염기배열을 갖는 decamer(X)<sub>10</sub>을 primer로 하는 PCR에 의해 cDNA의 일부영역을 증폭하는 것이다. mRNA의 poly(A)에 annealing하는 oligo dT를 갖는 anchor primer를 사용하나 그 3' 말단에 degenerate sequence M과 N을 추가한다. M은 A, G, C 중의 어느 염기, N은 A, G, T, C 중의 어느 염기를 나타낸다. 따라서 12종류의 primer를 사용하는 것이 되나 degenerate primer로 모든 poly(A)를 갖는 mRNA로부터 역전사반응으로 한가닥 cDNA를 만들게 된다. 이 cDNA를 주형으로 각 degenerate primer를 하류의 primer로 하여, 상류의 primer로는 arbitrarily로 hybrid를 형성하여 primer로서 역할을 하는 임의의 염기배열을 갖는 10 nucleotide의 oligomer(X)<sub>10</sub>을 사용하여 PCR을 실시한다. 이 arbitrarily primer로서 모든 염기배열을 사용할 수 있는 것은 아니고 기본적으로는 자기끼리 서로 hybrid를 형성하는 배열이 없으며 GC배열의 수가 5개인 것을 사용한다. 아무튼 24종류의 arbitrarily primer를 사용하여 가능한한 모든 cDNA를 증폭할 수 있도록 한다. 12종류의 degenerate primer의 각각에 대하여 24종류의 arbitrarily primer를 사용한 PCR을 2종류의 mRNA에 대하여 실시하므로 12×24×2=576 반응을 실시하는 것이 된다. 96 well의 plate 6장을 사용하므로써 모든 반응을 실시할 수 있다.

그림 6에 나타낸 바와 같이 다른 발현을 나타내는 mRNA를 arbitrarily primed PCR 산물을 polyacrylamide gel 전기영동으로 비교하므로써 검출할 수 있다. 대응하는 밴드위치에



들어있는 DNA 단편을 gel에서 용출하여 PCR로 증폭하므로써 해당하는 염기배열의 결정이나 이를 probe로 하여 northern blot 해석이나 cDNA library의 검색이 가능하다.

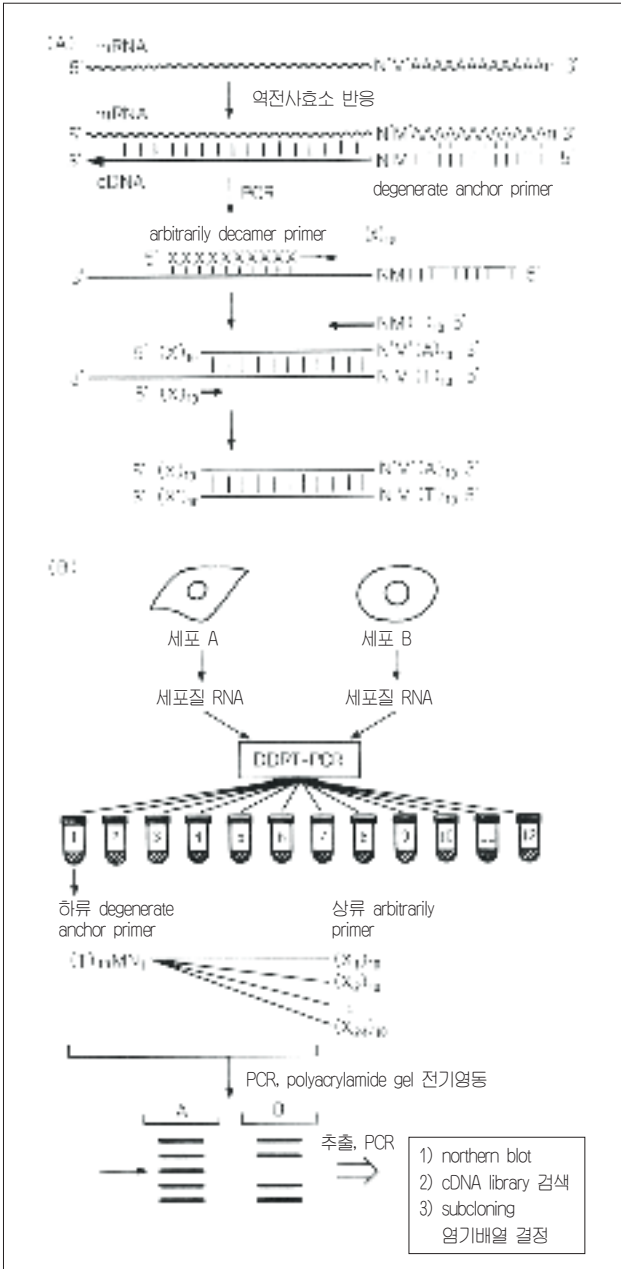


그림 6 DDRT-PCR

(A) DDRT-PCR의 원리. degenerate anchor primer(T<sub>10</sub>)은 T잔기 10개의 3' 말단에 2염기 M, N를 첨가한 oligonucleotide로 M은 A, G, C 중 어느 하나, N은 A, G, T, C 중 어느 한 염기를 함유한다. 따라서 12개의 primer를 사용한다. arbitrarily decamer primer(X<sub>10</sub>)은 임의의 염기배열을 갖는 10 nucleotide의 oligomer를 사용한다. (B) DDRT-PCR에 의한 해석

### 8. panhandle PCR

이미 알고 있는 염기배열 영역과 접해 있는 미지영역을 PCR을 사용하여 분리하는 방법이 panhandle PCR이며<sup>10)</sup> 그 원리는 그림 7에 나타내었다. genome DNA를 제한효소로 절단하여 얻어진 DNA 단편의 돌출하는 5' 말단의 인산기를 alkaline phosphatase로 제거한다. 기지 염기배열 영역의 약 30염기의 배열을 갖는 oligonucleotide를 합성하고 그 5' 말단을 인산화하여 T4 DNA ligase로 탈인산화한 DNA 단편의 3' 말단에 연결한다. 반응액을 희석하여 DNA 단편의 농도를

낮추어 Taq DNA polymerase와 4종류의 dNTP를 첨가하여 가열변성으로 상보가닥으로 분리하고 다시 annealing한다. 저농도이므로 분자 내의 annealing이 일어나 미지영역의 3' 말단에 결합한 기지 염기배열의 oligonucleotide가 그 염기배열 유래의 부분과 hybrid 결합하므로써 stem loop 구조가 형성된다. 첨가한 Taq DNA polymerase의 반응으로 stem 부분의 3' 말단에 기지 염기배열을 주형으로 한 염기배열이 첨가된다. 계속하여 oligonucleotide에 사용한 염기배열을 사이에 둔 primer 1과 2를 사용하여 PCR을 실시하면 미지영역을 사이에 두고 그 양단에 기지 염기 배열을 갖는 DNA 단편이 얻어진다. 이 주형의 보다 안쪽으로 설정한 primer 3과 4를 사용하여 nested PCR을 실시하므로써 목적으로 하는 미지영역을 얻는다.

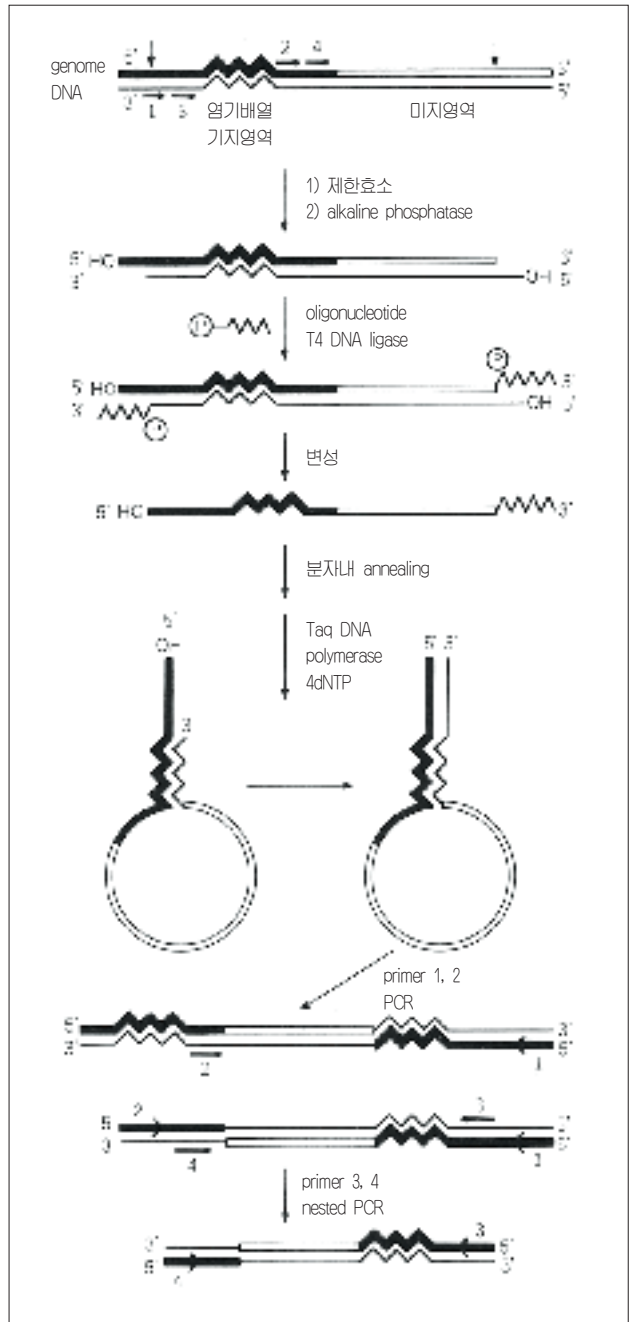


그림 7 panhandle PCR

genome DNA상의 이미 기지 염기배열을 짧은선으로 미지영역을 짧은 현선으로 나타내고 상보가닥을 가는선으로 나타냈다. 짧은 화살표는 primer의 위치를 나타낸다. 파상으로 나타낸 부분은 기지의 염기배열의 oligonucleotide에 대응하는 영역을 나타낸다.

## 9. single-nucleotide primer extension assay (SNuPE)

다형의 염기배열을 갖는 유전자의 발현을 RT-PCR을 기본으로 비교하는 편리한 방법으로<sup>15)</sup> 그 원리는 그림 8의 P<sub>gk-1a</sub> 유전자의 발현으로 나타내었다. RT-PCR로 얻은 cDNA를 주형으로 SNuPE용 primer와 다형에 의존하여 삽입되는 표식 nucleotide의 기질 한종류를 첨가하여 Taq DNA polymerase 존재하에서 1 cycle의 PCR을 실시한다. 1염기만이 첨가된 primer를 염기배열 결정용 gel에 전기영동하여 분리 정량한다.

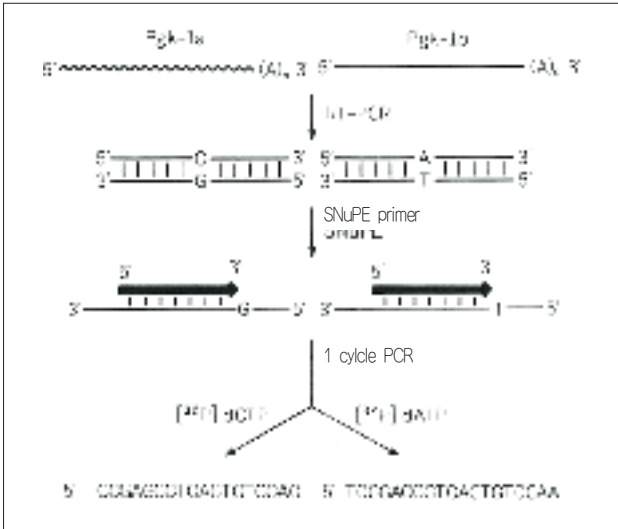


그림 8 SNuPE

## 10. ligase chain reaction(LCR)

염기배열의 다형을 이용하여 allele를 구별하는 등에 유용한 방법으로서 내열성 ligase를 사용하는 것이 특징이며 몇가지의 변법이 있다. 기본적인 원리는 oligonucleotide 사이를 ligase로 결합할 수 있는가, 없는가로 1염기 치환을 구별하는 것이다. 그림 9(A)에 ligase chain reaction(LCR)의 원리를 나타내었다. 목적염기 영역을 포함하는 5' 쪽 oligonucleotide 2개와 3' 쪽 염기배열을 포함하는 2개의 oligonucleotide 등 모두

4개를 genome DNA에 annealing한다. Mismatch가 없는 경우는 내열성 ligase로 2개의 oligonucleotide가 결합한다. 두가닥 DNA의 열변성, ligase 반응을 수십회 반복하므로써 결합한 oligonucleotide가 상보가닥 oligonucleotide 결합의 주형이 되어 결합한 oligonucleotide의 수가 증폭하여 간다. 한편 genome DNA상에 mismatch가 존재하는 oligonucleotide는 결합한 분자를 만들지 않는다.

그림 9(B)는 변법의 하나인 ligase detection reaction(LDR)의 원리로 genome DNA를 직접 해석하는 것이 아니라 우선 PCR로 목적영역을 증폭하여 단편화하고 여기에 oligonucleotide를 결합한다. 이 반응에서 사용하는 oligonucleotide는 2개이다. PCR 산물의 한쪽 가닥만을 주형으로 하여 내열성 ligase로 두개의 oligonucleotide 사이를 결합한다. 2가닥 DNA의 변성, ligase 반응을 반복하므로써 결합한 oligonucleotide의 수가 증가한다. 이들 probe oligonucleotide 사이를 직접 결합하는 반응에서는 주형 DNA에 의존하지 않는 결합이 생길 가능성이 있다. 이 같은 문제를 해결하고자하는 방법이 그림 9(C), (D)에 나타낸 pLCR과 gap-LCR(G-LCR)<sup>17)</sup>이다. pLCR의 경우 4개의 oligonucleotide를 사용하나, 5' 쪽 oligonucleotide는 표식염기를 3' 말단에 갖도록 염기배열을 설정한다. 3' 쪽 oligonucleotide와는 2~3 염기의 gap을 갖는다. 이 gap을 메우는데 필요한 3종류만의 기질 nucleotide의 존재하에서 5' → 3' exonuclease 활성을 갖고 있지 않은 Stoffel fragment의 반응으로 genome DNA에 hybrid 결합한 5' 쪽 oligonucleotide의 3' 말단에 nucleotide를 첨가한다. 이 3' 말단에 mismatch가 존재하는 경우에는 이 nucleotide가 첨가되지 않는다. Gap 메움과 동시에 ligase의 존재하에서 3' 쪽 oligonucleotide와 결합한다. 2가닥 DNA의 해리, DNA polymerase 반응, ligase 반응을 수십 cycle 반복하므로써 결합한 oligonucleotide의 duplex가 증가하게 된다. 그림 9(D)에 나타낸 G-PCR은 표적염기 위치만이 gap이 되도록 5' 쪽, 3' 쪽 oligonucleotide를 설정한다. 이 예에서는 gap을 메우기 위해서는 dATP와 dTTP 만이 필요하게 되므로 이 둘의 기질만이 존재하는 상태로 Stoffel fragment의 반응으로 5' 쪽 oligonucleotide의 3' 말단에 1 nucleotide를 첨

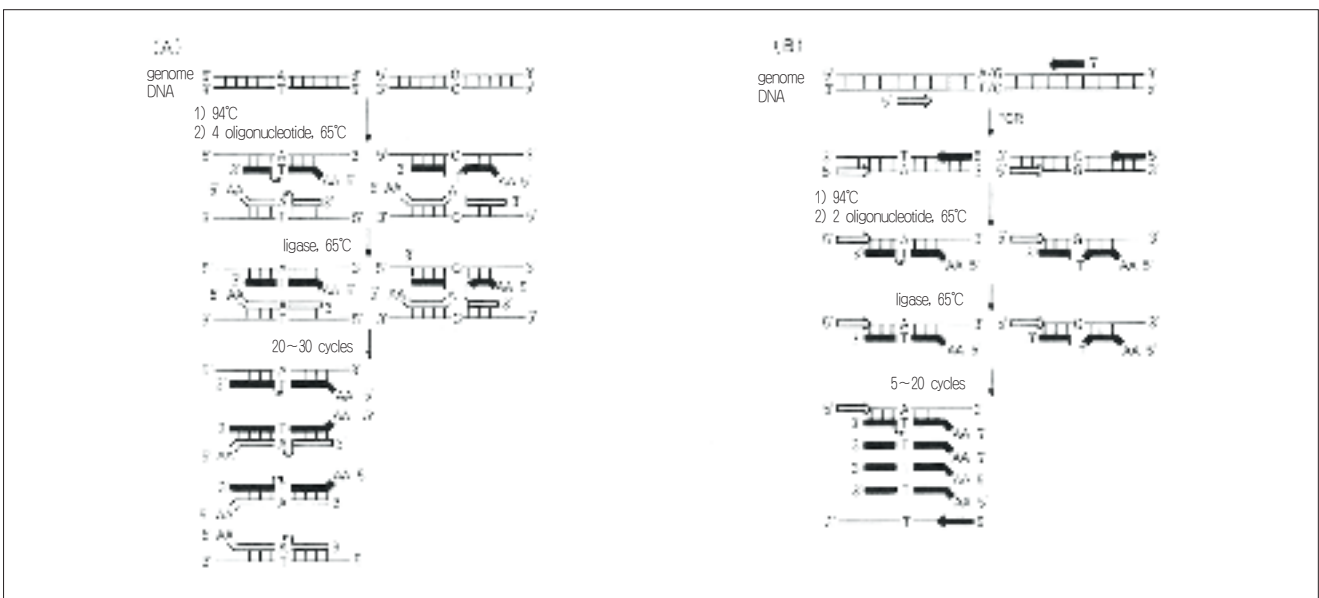


그림 9 ligase 증폭반응(LAR)의 원리

(A) ligase chain reaction(LCR) (B) ligase detection reaction(LDR)

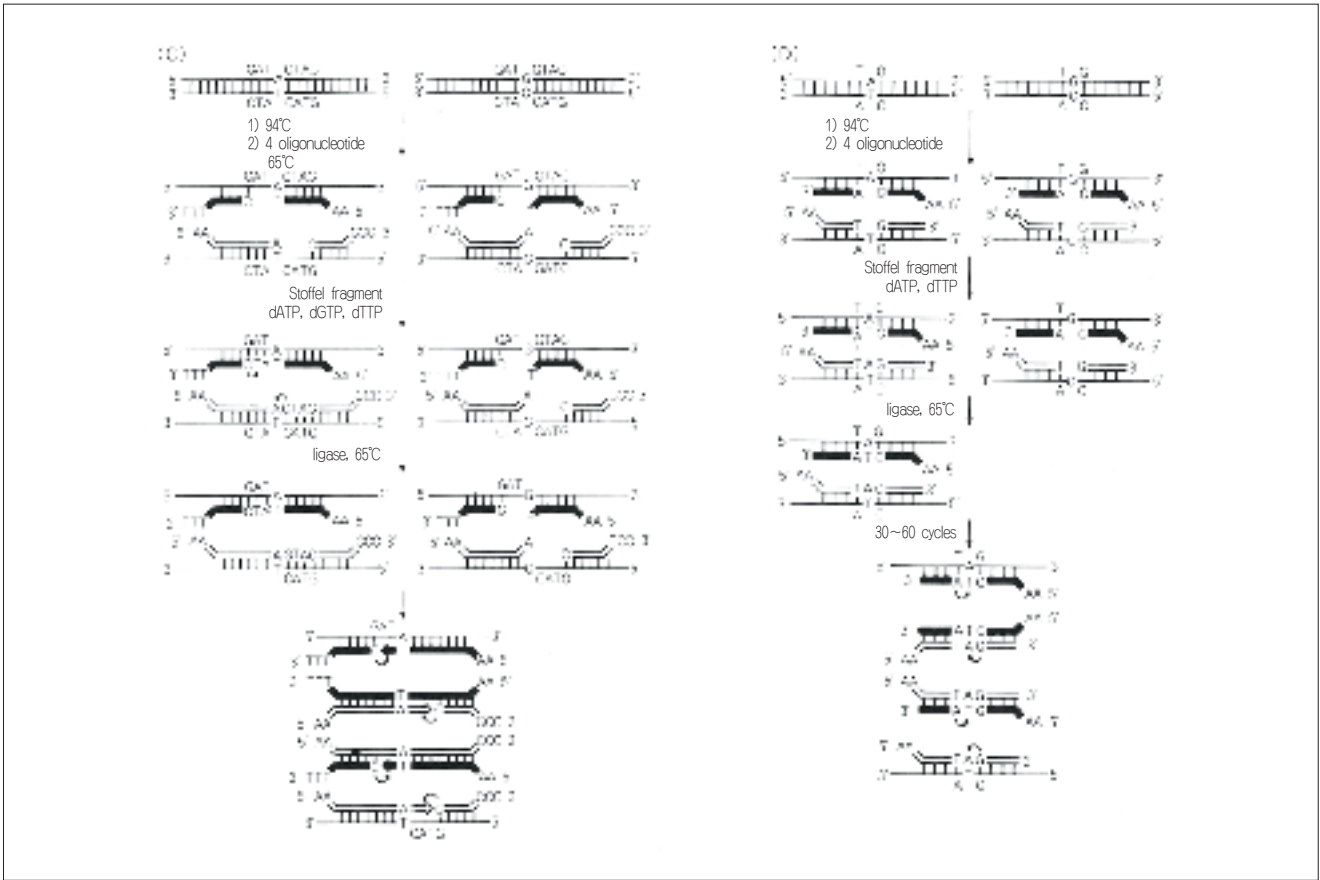


그림 9 ligase 증폭반응(LAR)의 원리

(C) p ligase chain reaction(pLCR), (D) gap LCR(G-LCR), oligonucleotide의 5' 말단의 AA, 3' 말단의 TTT, CCC는 각각 3' 말단, 5' 말단과의 결합을 방해하기 위하여 첨부한다.

가한다. Gap이 메워짐과 동시에 ligase 반응으로 3' 쪽 oligonucleotide와 결합한다. 염기배열 다형에 의해 다른 염기대를 갖는 allele에서는 이 기질로 gap이 메워지지 않으므로 ligase 반응으로 결합할 수 없다.

### 맺음말

PCR을 기반으로 하는 DNA, RNA의 해석 기술은 이외에도 여러 가지가 개발되고 개량되어 있으나 중요한 것들의 원리를 소개하였다. 기술이라고 하는 것은 무엇인가 “알고 싶다, 알고 싶다” 라고 생각한다면 아주 불가능하리라 생각하는 것도 언젠가는 가능한 방법으로 탄생하는 것인 것 같다. 이 십 수년전 nearest nabor 법으로 1년간 10염기에도 못 미치는 염기배열을 해석할 때는 훨씬 좋은 방법이 반드시 있을 것으로 생각하였으나 10년도 지나지 않아서 Maxam-Gilbert 법, Sanger법이 개발되어 현재는 자동화까지 이르게 되었다. 여러가지 새로운 기술이 필요한 것은 많으나 PCR에서 우선 무엇보다 기대하였던 것은 DNA의 구조에 관계없이 10 kbp, 20 kbp를 안정적으로 증폭할 수 있는 long PCR의 출현이었다.

### [참고문헌]

- 1) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. : *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **101**, 263-273(1986)
- 2) Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineus, I., Khorana, H. G. : *J. Mol. Biol.*, **56**, 341-361(1971)
- 3) Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K.,

- Drummond, R., Gelfand, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 6427-6437(1989)
- 4) Barnes, W. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2216-2220(1994)
- 5) Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., Higuchi, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5695-5699(1994)
- 6) Forhman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8998-9002(1988)
- 7) Loh, E. L., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., Davis, M. M. : *Science*, **245**, 217-220(1989)
- 8) Ohara, O., Dorit, R. I., Gilbert, W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5673-5677(1989)
- 9) Forhman, M. A. : in "PCR primer"(ed. Dieffenbach, C. W., Dveksler, G. S.), pp. 381-409, Cold Spring Harbar Laboratory Press(1995)
- 10) Welsh, J., MmClelland, M. : *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7215-7218(1990)
- 11) McClelland, M., Arensdorf, H., Cheng, R., Welsh, J. : *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1770-1771(1994)
- 12) Liang, P., Pardee, A. B. : *Science*, **257**, 967-971(1992)
- 13) Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D., McClelland, M. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4965-4970(1992)
- 14) Jones, D. H., Winistorfer, S. C. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 595-600(1992)
- 15) Singer-Sam, J., Riggs, A. D. : *Methods Enzymol.*, **225**, 344-351(1993)
- 16) Barany, F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 189-193(1991)
- 17) Wiedmann, M., Baany, F., Batt, C. A. : in "PCR primer" (ed. Dieffenbach, C. W., Dveksler, G. A. S.), pp. 631-652, Cold Spring Harbar Laboratory Press(1995)



### 춘계 관련 학술대회 전시회 참가

당사는 춘계학술대회 시즌을 맞이하여 관련 학술대회에 참가하여 신제품을 회원 여러분에게 적극적으로 소개하고, 고객의 불편사항을 귀기울여 듣는 기회를 마련하였습니다. 외환 위기에 따른 원가상승으로 수익성이 급격히 감소하고, 국내 경기위축으로 상당한 고통이 예상되는 해입니다. 당사도 환차손 등으로 상당한 영향을 받고 있으나 관련학회의 발전을 간접지원하므로서 학문발전에 기여하고, 고객이 되는 회원 여러분의 불편사항이나 의문사항을 적극적으로 해결하고자 예년보다 많은 학회의 학술발표회 기기전시회에 참가하였습니다.

한국미생물학회	4월 17일 - 18일	서울여자대학교
한국산업미생물학회	4월 25일	고려대학교
기초의학학술대회	4월 30일 - 5월 1일	서울교육문화회관(대리점 참가)
한국생화학회	5월 1일 - 2일	고려대학교
동물유전육종학회	5월 22일	축산기술 연구소(대리점 참가)
아시아, 태평양 신경화학회	6월 24 - 26일	서울교육문화회관
식물생명공학 심포지움	7월 3 - 4일	금호 인력개발원(대리점 참가)

### TaKaRa Taq, FMC, Novagen 제품 가격 인하!

환율 급등으로 인상하였던 TaKaRa Taq, Novagen FMC 제품의 가격을 환율의 안정화에 연동하여 가격을 대폭 인하 하였습니다. 어려운 중에도 저희 제품을 꾸준히 구매하여 주시는 고객 여러분 감사합니다. 당사는 가능한한 고객 여러분의 부담을 줄일 수 있는 방법을 적극적으로 찾아 가격인하를 통해 소비자의 부담을 줄이도록 하겠습니다. 금번 환율의 하향 안정화와 제조회사인 Takara본사, FMC bioproducts의 협력으로 가격을 인하하게 되었습니다. 자세한 가격 인하내용은 전문대리점이나 당사에 문의하시기 바랍니다.

### TaKaRa 기기 A/S 전담자 TaKaRa 본사 기술 연수

당사는 Takara PCR, Genextractor 등의 완벽한 A/S를 위하여 A/S 전담자 기술 연수를 실시하였습니다. 지난 4월 13일부터 실시한 연수에서는 (주)녹십자양행 2명, 코아바이오시스템(주) 2명의 대리점 A/S 전담자와 당사의 기술지원팀의 기기담당자 1명 등 5명이 참가하였습니다.

금번 연수는 당사의 일본 본사인 Kyoto 근교의 중앙연구소와 기기판매지원실에서 효과적인 기기 사용방법, 문제 발생시의 응급초치, 고장원인 진단, 수리에 관하여 종합적으로 이루어졌습니다. 이로서 국내에 공급되어 성능이 우수하고 사용방법이 편리하여 고객의 호평을 받고있는 PCR 및 Genextractor 등의 TaKaRa 기기 사용자에게 보다 빠르고 정확하게 A/S 할 수 있게 되었습니다.

### 연세대 생물학과 김영민 교수팀이 발견한 제한효소 Xsp I 전 세계에 공급!!

Takara는 연세대학교 생물학과 김영민 교수(생명과학연구소장)팀이 발견하여 정제하는 데 성공한 제한효소 Xsp I를 전세계에 공급하게 되었습니다. 국내에서 발견하고 제품화한 제한효소를 전세계에 공급하므로서 한국의 생명과학이나 생물공학의 수준을 알리는 좋은 기회가 될 것입니다. 앞으로 당사는 국내개발 생물재료, 연구용 시약, 기기 등을 전세계에 적극적으로 공급하여 우리의 연구자나 기업의 연구결과를 상품화하는 데 기여하고자 합니다.

혹시 귀중한 생물재료를 냉동고에서 잠재우고 계시다면 당사에 연락하여 주시기 바랍니다. 유용한 활용방법이 있을 수 있습니다.



# 형광편광도 측정 시스템 Full-Range BEACON<sup>®</sup> 2000

PanVera사의 제품입니다.

**형광편광도 측정에 의한 생체분자간의 상호작용 해석 시스템**  
**BEACON<sup>®</sup> 시리즈에 측정 파장 영역이**  
**254~700 nm에 이르는 full range type 신 등장!!**

형광편광도 측정 시스템 BEACON<sup>®</sup> 시리즈(BEACON<sup>®</sup>, BEACON<sup>®</sup> 2000)는 분자간의 상호작용을 실시간에 측정, 해석할 수 있는 시스템이다. 고정화나 반응 후의 추출, 분리, 세정 등의 조작이 필요 없는 homogeneous system으로의 해석이 가능하다. 종래의 BEACON<sup>®</sup>, BEACON<sup>®</sup> 2000은 측정가능한 형광파장영역이 360~700 nm 이었으나, 신제품인 Full-Range BEACON<sup>®</sup> 2000은 광원으로 할로겐 램프 이외에 수은 램프를 추가로 사용하여 저파장영역의 형광색소도 측정할 수 있으므로 측정파장 영역이 254~700 nm로 넓어졌다. 따라서 pyrene계, dancy계 등의 형광수명이 긴 저파장의 형광 물질도 사용할 수 있어 해석가능한 물질의 분자크기가 넓어졌다. Full-Range BEACON<sup>®</sup> 2000를 사용한 실험례를 아래에 소개한다.



**실험에 1 : Pyrene 수식 2차 항체와 1차 항체와의 결합 실험**

형광편광도의 측정에서 형광표식한 물질의 분자가 너무 크면 분자간 상호작용에 의해 크기가 변화하여도 편광도의 차이가 뚜렷하게 관찰되지 않는다. 표식가능한 물질의 분자크기는 형광물질의 형광수명에 의존하고 자주 사용하는 fluorescein의 경우 약 60 kD까지라고 알려져 있다\*. 한편 pyrene계 색소(Ex : 340 nm, Em : 380 nm)는 fluorescein보다 25배 더 긴 형광수명을 갖고 있으므로 항체와 같은 고분자간의 상호작용을 측정하는 경우에 적당하다. 종래에는 측정이 곤란하였던 항체분자간의 상호작용을 Full-Range BEACON<sup>®</sup> 2000을 사용하여 해석한 예를 소개한다.

\* : 형광편광도는 분자에 표식한 형광물질의 형광이 방출되는 사이(fluorescein : 4 ns)의 분자 회전 운동을 나타내고 있다. 고분자가 될수록 회전운동이 둔해지므로 관측에 충분한 형광편광도의 차를 얻기 어렵다. 따라서 고분자의 형광편광도를 측정하는 데는 긴 형광수명을 갖는 형광물질로 표식할 필요가 있다.

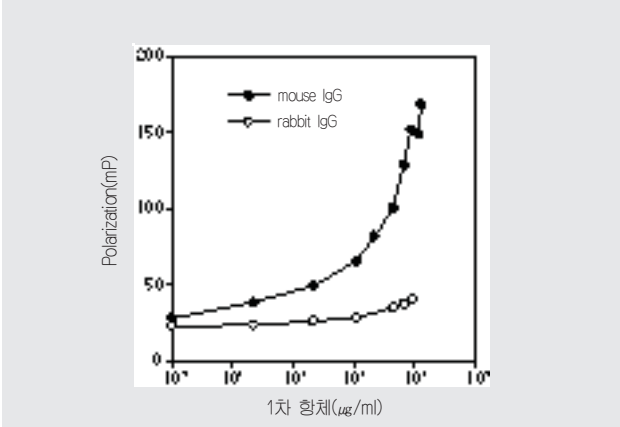


그림 1 Pyrene계 수식 2차 항체(anti-mouse IgG)와 1차 항체의 결합

**(1) 2차 항체의 Pyrene 수식**

Rabbit anti mouse IgG antibody(약 150 kDa)를 pyrene계 표식화합물[N-(1-pyrenebutanoyl) cysteic acid, succinimidyl ester]과 반응하여 gel filtration으로 정제하였다.

- Rabbit Anti mouse IgG antibody(2 mg/ml)
  - Dialysis(10 mM Bicarbonate buffer, pH9.3)
  - N-(1-pyrenebutanoyl) cysteic acid, succinimidyl ester, Sodium salt(Molecular Probes 사) 0.4 mg 첨가
- 4°C overnight
- Gel filtration(NAP-25 ; Amersham Pharmacia Biotech사)

수식 IgG 항체의 양은 미수식의 IgG 항체를 표준으로 측정하였다.

**(2) Pyrene 수식 2차항체와 1차항체와의 결합**

Gel filtration으로 정제한 pyrene 수식 rabbit anti-mouse IgG antibody(최종농도 10 nM)에 mouse anti-human fibronectin IgG(FN12-8 : TaKaRa Code M002)를 다양한 농도로 첨가하여 양자의 결합을 Full-Range BEACON<sup>®</sup> 2000(여기 filter 350 mm, 형광 filter 390 nm)으로 측정하였다(그림 1). 이 경우 mouse IgG 항체에 특이적인 결합임을 확인하기 위한 control로 rabbit IgG 항체를 사용하였다. 단, 본 실험에서는 표식 2차 항체의 양을 10 nM로 하였으나 1 nM의 농도에서도 같은 형광편광도를 측정할 수 있음을 확인하였다.



**실험에 2 : Pyridyl amino화 당쇄와 Lectin의 상호작용 해석**

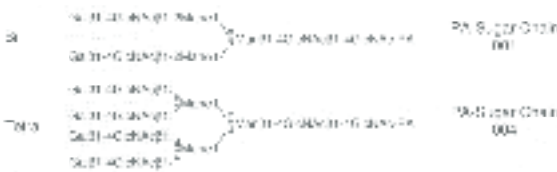
종래는 형광 편광도 측정에 적당한 표식당쇄의 조제가 곤란 하였으므로 형광편광에 의한 당쇄와 단백질의 상호작용 해석은 별로 이루어지지 못하였다. TaKaRa는 pyridyl amino화 (PA화, Ex : 310 nm; Em : 390 nm) 당쇄표준품을 판매하고 있고, 또한 미표식의 당쇄도 GlycoTAG®(TaKaRa Code GT100), PALSTATION(TaKaRa Code CA4000)을 사용하므로 높은 효율로 PA화 표식이 가능하다. 여기서는 Full-Range BEACON® 2000을 응용하여 각종 lectin과 PA화 당쇄를 해석한 예를 소개한다.

**(1) 사용한 시판 lectin의 특이성과 Pyridyl amino화 당쇄 (시판 lectin은 전부 Bonen Corp.의 제품)**

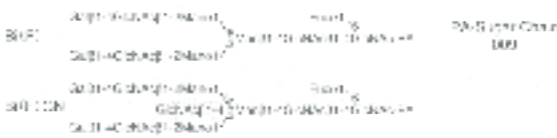
a) ConA : Mannose를 인식하며 특히 high mannose형 당쇄에 강하게 결합한다.



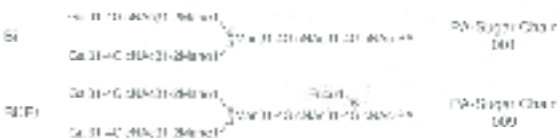
b) DSA : Lactosamine(Gal-GlcNAc)을 인식하여 가지가 많은 당쇄에 강하게 결합한다.



c) E-PHA : bisect GlcNAc를 인식한다.



d) AAL : Fucose를 인식한다.



**(2) Lectin과 pyridyl amino화 당쇄의 결합 측정**

[방법]

Binding Mixture(100  $\mu$ l)

- 100 mM Tris-HCl(pH7.5)
- 100 mM NaCl
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 mM MnCl<sub>2</sub>
- 0~3000  $\mu$ g/ml lectin
- 500 nM PA-Sugar Chain
- (1  $\mu$ M PA-Sugar Chain for ConA)

Room Temperature for 30 min

Fluorescence Polarization by Full-Range BEACON™ 2000 (Ex : 310 nm ; Em : 390 nm)

[결과]

얻은 측정값을 그래프 작성 software(GraphPad PRISM™)을 사용하여 plot 및 curve fitting하였다(그림 2). 어떤 경우도 종래에 알려진 lectin의 당쇄결합 특이성과 아주 일치하여 Full-Range BEACON® 2000과 PA화 당쇄를 조합하여 당쇄와 단백질의 결합측정법이 유용함을 알 수 있었다.

[참고문헌]

- 1) Perrin, F. (1926) *J. Phys. Radium*, **7**, 390-401.
- 2) Weder, G. (1953) *Adv. Prot. Chem.*, **8**, 415-459.
- 3) Kaneda Y., et al. (1974) 단백질 핵산 효소 별책 No. 14[형광측정의 원리와 생체계에의 응용]
- 4) Jameson, D. M. et al. (1995) *Methods in Enzymology* **246**, 283-300.

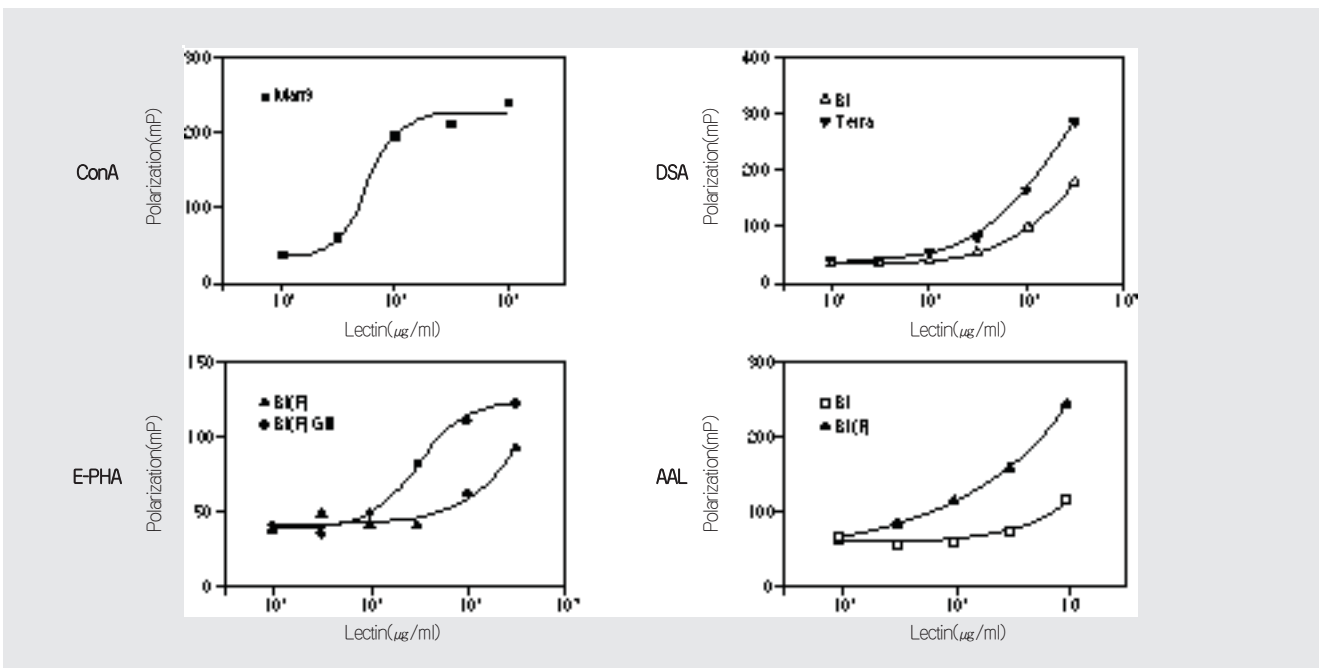


그림 2 각종 lectin 과 pyridyl amino화 당쇄와의 결합

# TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set 을 사용한 *Mycoplasma bovis* 의 검출

TaKaRa의 Mycoplasma Detection Set<sup>2)</sup>를 사용하여 *Mycoplasma bovis*를 신속하게 검출할 수 있음이 R.P. Dinsmore 등에 의해 보고되었다. *Mycoplasma bovis*는 소에 감염하여 유선증을 일으키는 병원균이다. 종래의 검출법은 배양법을 사용하는 것으로 판정까지 10~14일이 소요되었으나 PCR법을 이용하므로써 전배양을 포함하여 단 이틀만에 실시할 수 있다. 본 고에서는 TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set(TaKaRa Code 6601)를 이용하여 *Mycoplasma bovis*를 증폭할 수 있음을 확인하고 증폭단편의 크기를 결정 한 예를 소개한다.



## 실험예

### A) 1st PCR 반응

10× PCR Buffer	10 μl
dNTP mixture	8 μl
MCGp F1 Primer	1 μl
MCGp R1 Primer	1 μl
TaKaRa Taq	0.5 μl
<i>M. bovis</i> (3×10 <sup>3</sup> ccu/ml)*	5 μl
멸균증류수	74.5 μl
	100 μl

\* 동경대학 부속 동물실험시설 Harazawa 교수 제공

PCR 조건 : 94°C 30초 → 94°C 30초, 55°C 2분, 72°C 1분  
(30 cycles)

(TaKaRa PCR Thermal Cycler MP 사용)

### B) 2nd PCR 반응

10× PCR Buffer	10 μl
dNTP mixture	8 μl
MCGp F2 Primer	1 μl
MCGp R2 Primer	1 μl
TaKaRa Taq	0.5 μl
1st PCR 반응액	1 μl
멸균증류수	78.5 μl
	100 μl

PCR 조건 : 94°C 30초 → 94°C 30초, 55°C 2분, 72°C 1분  
(30 cycles)

(TaKaRa PCR Thermal Cycler MP 사용)

### C) 증폭산물의 전기영동에 의한 해석

이들 primer를 사용하여 *Mycoplasma bovis* DNA를 증폭한 결과 그림 1에서 보는 바와 같이 1st PCR에서는 480 bp의, 2nd PCR 에서는 198 bp의 단편을 각각 얻을 수 있었다.

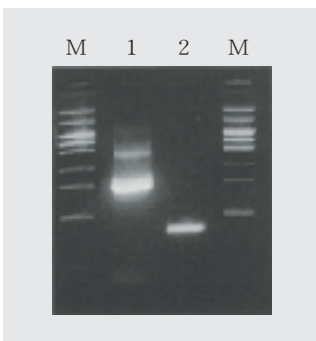


그림 1 *Mycoplasma bovis*의 PCR 증폭

lane  
M : pHY marker  
1 : 1st PCR(480 bp 단편)  
2 : 2nd PCR(198 bp 단편)  
8 μl loading  
3% NuSieve® 3:1 agarose gel

표 13종류의 Mycoplasma속에서 증폭단편의 크기

	F1 and R1(bp)	F2 and R2(bp)
<i>M. hyopneumoniae</i>	681	237
<i>M. neurolyticum</i>	501	196
<i>M. fermentans</i>	491	195
<i>M. pulmonis</i>	477	189
<i>M. hyorhinis</i>	448	211
<i>M. orale</i>	423	179
<i>M. capricolum</i>	415	179
<i>M. arthritis</i>	408	157
<i>M. salivarium</i>	403	151
<i>M. hominis</i>	370, 369	147, 148
<i>M. arginini</i>	369	145
<i>M. bovis</i>	480	198
<i>U. urealyticum</i>	482, 481	154

참고 : 우유에서의 *M. bovis* 검출조작(Dinsmore 등의 방법)

우유 10 ml에 Friis broth 0.2 ml 첨가  
↓  
5% CO<sub>2</sub>, 30°C 조건에서 24시간 배양  
↓  
증류수로 10배 또는 100배 희석  
↓  
PCR 반응  
↓  
Agarose gel 전기영동으로 판정

### [참고문헌]

- 1) Dinsmore, R. P., Collins, J. K. and Carman, J. (1997) Colorado Diagnosis of *Mycoplasma matitis* using polymerase chain reaction : Preliminary studies (Abstract for proceedings of National mastitis council meeting)
- 2) Uemori, T., Asada, K., Kato, I. and Harasawa, R. (1992) *System. Appl. Microbiol.* 15, 182-186

### ▶ 관련제품

TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set	6601	50회	350,000원
내용 : MCGp F1 primer(20 pmol/μl)		50 μl	
MCGp R1 primer(20 pmol/μl)		50 μl	
MCGp F2 primer(20 pmol/μl)		50 μl	
MCGp R2 primer(20 pmol/μl)		50 μl	
Control Template(1 ng/μl)		50 μl	
Mycoplasma Generic Primers(별도 판매)			
MCGp F1	7187	1,250 pmol	186,600원
MCGp R1	7188	1,250 pmol	186,600원
MCGp F2	7189	1,250 pmol	140,000원
MCGp R2	7190	1,250 pmol	140,000원



# 단백질 연구용 시약 소개 (3)

## - N말단 block 단백질의 새로운 해석법 -

### *Pfu* Deblocking Aminopeptidase

TaKaRa Code 7338 50 µg

사람을 비롯한 진핵생물의 세포내 단백질의 60~80%는 N말단 아미노산이 blocking되어 있어 통상의 protein sequencer에 의한 방법으로는 N말단 아미노산 배열을 해석할 수 없다. TaKaRa는 formyl기, acetyl기, myristoyl기, pyroglutamyl기 등의 acyl기로 block된 단백질이나 peptide로부터 보편적으로 N말단 block기를 유리하는 효소 *Pfu* Deblocking Aminopeptidase(DAP)를 고도호열고세균 *Pyrococcus furiosus*에서 발견하여<sup>1)</sup> 이를 재조합체로서 대장균에서 생산하는 데 성공하였다. 본 고에서는 금번 발매하는 DAP를 이용한 N말단 block 단백질의 새로운 해석법을 소개한다.

#### ▶ 개요

고도호열 고세균 *P. furiosus*에서 발견된 DAP는 N말단이 formyl기, acetyl기, myristoyl기, pyroglutamyl기 등의 acyl기로 block된 단백질이나 peptide에 작용하여 N말단 acyl기와 이에 이웃하는 아미노산 잔기를 N말단으로부터 exo형으로 순차적으로 유리하는 초내열성 효소이다. 이 효소는 X-pro 결합을 제외한 모든 peptide 결합을 절단할 수 있기 때문에 아래에 설명하는 방법으로 N말단이 block된 단백질이나 peptide의 block를 포함하는 N말단 또는 N말단 근방의 아미노산 배열을 용이하게 해석할 수 있다.

#### (1) 성질

표 1에 이 효소의 성질을 나타내었다. 한편 이 효소는 유전자 재조합 기술로 대장균에서 발현 생산하여 고순도로 정제된 것이다. 또 고도호열 고세균 *P. furiosus*에서 발견된 초내열성 효소이므로 열안정성이 높은 것도 커다란 특징이다.

표 1 *Pfu* Deblocking Aminopeptidase의 일반적인 성질

분자량	: 16.9S[~451,000(침강평형법)] : 38,581(아미노산배열 분석) : 38,586(질량분석법)
비활성	: 8~10 U <sup>*</sup> /mg
최적온도	: 85~95°C
열안정영역	: 50°C[0.1 mM CoCl <sub>2</sub> 를 함유하는 NEM <sup>**</sup> 완충액 (pH8.0 중)], 48시간 동안 100%의 활성유지
변성제 내성	: 상기의 완충액에서, 0.1% SDS 존재하, 50°C, 24시간에 기질(Met-MCA) 분해효율 90%
최적pH	: 6.5~9.0
활성화제	: CoCl <sub>2</sub>
저해제	: Amastatin(거의 완전저해), EDTA(약 60% 저해)
N말단 아미노산 배열	: MVDYELLKKWEAPGVSGYE... <sup>*3</sup>

\*1 : 75°C, 1분간에 Leu-pNA로부터 pNA 1 µmol을 생성하는 효소량

\*2 : N-ethyl morpholic acetic acid

\*3 : DAP 단백질의 N말단 아미노산의 약 10%는 V로 되어있다.

#### (2) 기질특이성

표 2에 몇몇의 아미노산-MCA<sup>\*1</sup>, Ac-Met-MCA 그리고 Ac-Pro-MCA에 대한 이 효소의 분해율을 나타내었다. 또 여기서는 언급하지 않았으나 몇몇의 peptide와 단백질을 사용한 실험으로부터 Thr, Trp, CM<sup>\*\*</sup>-Cys, Lys 등의 아미노산을 N말단에 갖는 경우의 peptide 결합도 분해하는 결과를 얻었다. 또한 본 효소의 소수성 아미노산이나 Ala, Ser 등의 아미노산이 N말단에 존재하는 peptide에 대해서는 분해속도가 보다 빠른 경향을 나타냈으나 Ac-Met-MCA와 Met-MCA에 대한 분해율의 비로부터 acetyl기에 대해서는 분해속도가 늦은 것을 알 수 있었다. 이런 경향은 DAP가 N말단 폐쇄 acyl기 보다도 아미노기에 보다 높은 친화성을 갖는 것으로 설명할 수 있다. 이같은 사실로 peptide 사슬의 길이가 길면 길수록 acyl기의 유리보다도 DAP에 의한 peptide 분해로 순차 출현하는 아미노기의 유리가 보다 현저함을 알 수 있었다. YGGFL과 Ac-YGGFL에 대한 본효소의 분해속도를 비교한 결과를 그림 1에 나타내었다.

\*1 : 4-methyl cumarin-7-amide

\*2 : carboxymethyl

표 2 *Pfu* Deblocking Aminopeptidase의 기질 특이성

아미노산-MCA	분해율(%)
Met	100
Gly	3.0
Ala	39.2
Ser	30.3
Pro	1.6
Val	12.7
Leu	85.5
Ile	13.8
Phe	16.6
Tyr	29.1
Asp	3.2
Asn	3.2
Glu	1.5
Gln	44.4
His	47.3
Arg	18.1
Ac-Met	22.2
Ac-Pro	0

E/S비 1/1000로 NEM 완충액(pH7.6)에서, 75°C, 20분간 반응하여 생성하는 AMC(7-amino-4-methyl cumarin)를 형광 측정하였다. 이 조건하에서의 실험의 Met-MCA의 분해율은 56.7%였다.

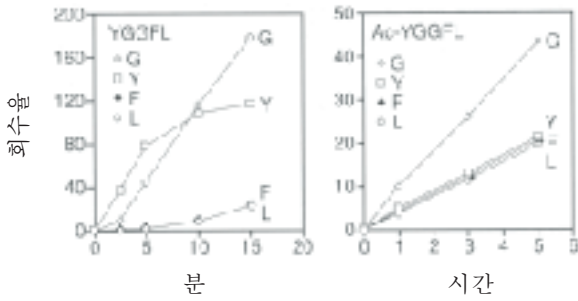


그림 1 YGGFL 과 Ac-YGGFL에 대한 DAP 분해속도의 비교  
E/S비 1/3000로 50 mM NEM 완충액(pH9.0), 37°C로 반응

### ▶ 사용례

다음은 N말단이 blocking되어 있는 단백질이나 peptide의 N말단 또는 N말단 근방의 아미노산 배열을 DAP를 사용하여 해석하는 방법을 설명한다.

#### (1) N말단이 blocking되어 있는 단백질의 N말단 근방의 아미노산 배열 해석

앞에서 설명한 바와 같이 DAP는 N말단 block기를 포함하여 X-Pro 결합을 제외한 모든 peptide 결합을 N말단부터 절단 한다. 그러나 N말단 block기에 대한 분해속도가 아미노산의 유리속도에 비하여 현저히 낮고(그림 1 참조), 각각의 아미노산을 함유하는 peptide 결합의 분해속도에 커다란 차이를 보이기 때문에(표 2 참조), N말단부터 한 잔기씩 아미노산이 유리한 반응물을 명확하게 동정하는 것은 현재의 기술로는 힘들다. 따라서 CM화 등으로 변성한 목적 단백질을 DAP를 사용하여 완전히 소화한 후 그 소화물을 protein sequencer로 해석하는 방법을 사용한다. 이 경우 소화물의 N말단 아미노산 배열은 X-pro로부터 시작하게 되어 목적 단백질의 block기나 그에 이어지는 아미노산의 동정은 불가능하나 이제까지의 방법으로는 정보를 얻기 어려웠던 N말단 근방의 아미노산 배열을 보다 쉽게 해석할 수 있다.

#### [방법]

아미노계 비휘발성염(Tris 등)\*1을 함유하지 않는 시료단백질(50~100 pmol)에 CoCl<sub>2</sub>를 함유하는 적당한 농도의 NEM-조산 완충액(pH8.0, 통상 100~500 μl의 반응계를 사용)을 첨가하여 NEM과 CO<sup>2+</sup> ion의 최종농도를 각각 25~50 mM과 0.1 mM로 조정한다. 계속해서 DAP용액을 E\*/S비로 1/2(mol/mol)이 되도록 첨가하여 50°C, 48시간 반응한다. 마지막으로 최종농도가 5%가 되도록 formic acid 용액을 첨가하여 반응을 정지한다.

\*1: HP사 protein sequencer로 column법을 사용하면 Tris 등의 amine계의 염이 함유되어 있어도 문제가 되지 않는다.

\*2: subunit 양

### ▶ Protein sequencer에 의한 해석

상기 반응액을 그대로 또는 동결건조 후 적당한 용매(통상 2% trifluoro acetic acid 사용)에 용해하여 protein sequencer 용 PVDF막(100% methanol에 미리 침지해 놓은 것) 또는 역상 column(HP사의 protein sequencer를 사용하는 경우)에 첨가하여 sequencer program에 따라서 첫번째 반응을 실시

한다(이로써 첫번째 cycle의 아미노산으로서 목적단백질의 아미노산 X와 DAP의 N말단 아미노산 M이 동정된다). 계속해서 목적단백질에서 두번째 사이클로서 반드시 Pro가 출현하는 원리를 이용하여 1 cycle 종료 후의 PVDF막 또는 역상 컬럼을 장치로부터 떼어내어 OPA(o-phthal aldehyde)를 처리한다. 이 처리로 Pro 이외의 α-아미노산의 아미노기는 모두 불가역적으로 보호되기 때문에 Pro 이외의 아미노산을 선두로 하는 단백질은 이후의 아미노산 배열해석의 반응계에 관여하지 않게 된다(그림 2). 그 후 다시 장치에 삽입하여 2 cycle 이후의 해석을 계속한다. 이로써 blocking된 시료단백질의 N말단 근방의 X-Pro 이하의 아미노산 배열을 해석할 수 있다. 한편 DAP의 N말단 아미노산 배열은 이미 알고 있으므로 첫번째 cycle부터 그대로 sequencing을 계속하여 아미노산 배열을 해석할 수도 있다. 일례로 rat 간 지방산 결합단백질의 N말단 근방의 아미노산 배열해석 결과를 그림 3에 나타내었다.

1. 첫번째 cycle 종료 후 sequencer로부터 column cartridge를 떼어낸 후 상층의 역상 1 ml의 column을 0.2 M borate-Na 완충액(pH10)으로 세정한다.
2. 상기 column을 OPA 용액으로 세정한다.
3. Micro centrifuge tube에 column을 옮겨 OPA 용액 \*1 ml을 첨가, 침지하여, 60°C, 1시간 진탕한다.
4. Column 외벽을 증류수로 세정한 후 column을 다시 cartridge에 장착하여 2 ml의 증류수로 3회 세정한다. 건조한 후 ethyl acetate 2 ml을 사용하여 같은 방법으로 반복한다.
5. Column cartridge에 새로운 하층 column을 붙혀 sequencer에 장착한다.
6. 두번째 cycle 이후의 sequencing을 실시한다. 이때 두번째 cycle은 double cartridge법으로 실시하여 proline용 프로그램을 사용한다.

\* : OPA 용액은 아래의 방법으로 사용할 때 조정한다.

0.1 mg/μl DTT함유 Borate-Na 완충액(pH10) 100 μl, 0.2 mg/μl OPA 함유 methanol 용액 100 μl에 4.8 ml의 Borate-Na 완충액(pH10)을 첨가하여 4°C에 일시 보관한 후 사용한다.

PVDF막법의 경우는 첫번째 cycle 종료 후 PVDF막을 sequencer에서 떼어내어 isopropyl alcohol로 막을 침윤한다. 그 후 상기의 순서에 따라 세정(증류수), OPA 반응, 세정(증류수 그리고 ethyl acetate), 건조의 단계를 거친 후, 다시 sequencer에 장착하여 이후의 반응에 사용한다.

그림 2 OPA 처리의 조작 순서(역상 column법)

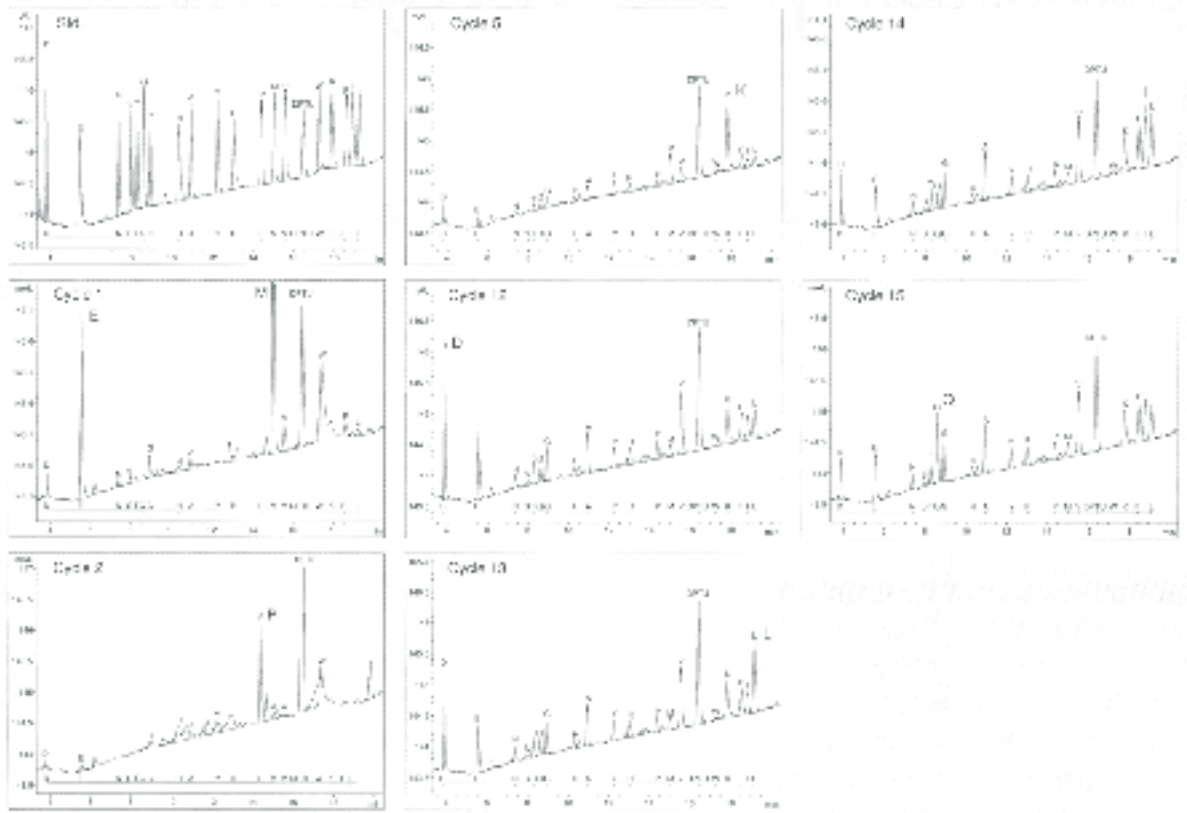


그림 3 CM화한 rat 간 지방산 결합단백질(rFABP)의 DAP 반응물의 protein sequencer에 의한 해석

CM-rFABP의 N말단 아미노산 배열예: Ac-MNFSGKYQVQSQENFEPFMKAMGLPEDLIQKGDIKGVSD...  
(밑줄은 이번에 동정한 아미노산 잔기)

시료단백질(100 pmol)을 E/S비 1/2로 하여 0.1 mM CoCl<sub>2</sub> 함유 50 mM NEM 완충액(pH8.0) 내에서 50°C로 48시간 DAP소화 후, 최종농도가 5%가 되도록 formic acid를 첨가하여 직접 protein sequencer(HP사)에 사용하였다. OPA처리는 그림 2에 기재한 순서에 따라 실시하였다. 2nd cycle의 Pro 회수율은 약 10%(모든 조각은 무보정)였다.

**(2) N말단이 blocking된 단백질 및 peptide의 block기를 갖는 아미노산 배열 해석**

지금까지 설명한 바와 같이 block기를 갖는 N말단 아미노산 배열 해석은 DAP를 사용하여도 아주 어렵다. 따라서 이와 같은 경우 우선 시료 단백질로부터 N말단 block peptide를 특이적으로 분리한 후(본지 3호 25~32 페이지, 6호 16~17 페이지 참조), MALDI-TOF 질량분석계 등을 사용하여 DAP 반응물을 경시적으로 모니터하면서 N말단부터 block기나 아미노산이 순차적으로 탈리한 peptide의 질량을 측정하여, 그 질량차로부터 block기를 갖는 아미노산을 해석할(이 방법은 random sequencing법이라 부른다) 수 있다. α-MSH(melanocyte 자극 호르몬)의 MALDI-TOF 질량분석계에 의한 해석례를 그림 4에 나타내었다.

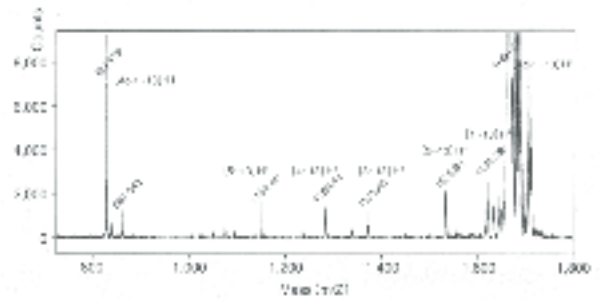


그림 4 α-MSH의 DAP 반응물의 MALDI-TOF/MS에 의한 해석

α-MSH의 N말단 아미노산 배열: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH<sub>2</sub>  
α-MSH(40 pmol)를 E/S비 1/100로 5 mM PIPES 완충액(pH6.4)에서, 37°C, 2시간의 조건으로 DAP 소화 후, 반응액을 MALDI-TOF/MS(Perceptive사 Voyager-Elite)으로 해석하였다.

이상으로 이번 호에서는 새로 발매하는 *P. furiosus* 유래의 Pfu Deblocking Aminopeptidase(DAP)에 관하여 소개하였으나, 최근의 proteom project에 대응할 수 있도록 2D-PAGE, SDS-PAGE로 분리한 단백질에 이 효소의 응용을 검토중이다. 또 DAP에 의한 N말단 block 단백질의 N말단 근방의 아미노산 배열해석의 수탁서비스도 실시할 예정이다.

**[참고문헌]**

- 1) Tanaka, T. 등 (1997) 제 48회 단백질 구조 토론회 요지 집 p1-4.
- 2) Chait, B. T. et al. (1993) *Science* **262**, 877.

NEW

# Solid Phase cDNA Synthesis Kit

TaKaRa Code 6123

25회

550,000원

## 고상으로 mRNA의 추출에서 cDNA library의 제작까지! mRNA의 손실이 적고 높은 효율의 library 제작을 실현!

Solid phase cDNA Synthesis Kit은 하나의 튜브 내에서 조직, 세포 또는 total RNA로부터 고정화 cDNA library를 제작하는 kit이다. 우선, 조직 및 세포를 homogenize한 후 그 상청액(또는 total RNA)으로부터 oligo(dT)<sub>25</sub> bound-Magnetic Porous Glass(MPG<sup>®</sup>) particle를 사용하여 mRNA를 분리한다. 이 mRNA-MPG particle을 그대로 사용하여 immobilized oligo(dT)<sub>25</sub>를 primer로 이용하는 역전사반응을 실시한다. 이러한 전과정은 한 튜브 내에서, 그리고 약 2시간 내에 실시할 수 있으므로 주형이 되는 mRNA의 손실을 방지할 수 있다. 또한 phenol 추출이나 에탄올 침전 등의 과정이 필요없어 조작이 매우 간편하다.

또, 본 제품에서 사용하는 Magnetic Porous Glass(MPG<sup>®</sup>)는 다공성의 magnetic bead로 넓은 표면적을 갖기 때문에 아주 많은 양의 mRNA를 회수할 수 있다. 이렇게 제작한 고상화 cDNA library는 4°C에서 수 개월간 안정하다. 고상화 cDNA library는 PCR 등에 활용할 수 있으며, 1회의 조작으로 얻은 library는 적어도 20회의 PCR 반응을 실시할 수 있다.

### ▶ Kit 내용(25회)

#### [Package I]

MPG <sup>®</sup> Streptavidin(10 mg/ml)	7.5 mg
Biotinylated Oligo(dT) <sub>25</sub> (0.1 mM)	7.5 nmol
Probe Binding Buffer	5.0 ml
Probe Wash Buffer	4.0 ml
2×Hybridization Binding Buffer	26 ml
Hybridization Wash Buffer I	25 ml
Hybridization Wash Buffer II	12.5 ml
Pre-RT Wash Buffer	9.5 ml × 2
TE Buffer	5 ml
Nuclease-free Water	1 ml

#### [Package II]

5×RT Buffer	250 μl
AMV Reverse Transcriptase(20U/μl)	25 μl
RNase Inhibitor(20 U/μl)	25 μl
dNTP Mixture(2.5 mM each)	200 μl
Control Mouse Liver Total RNA(lyophilized)	150 μg
Control PCR Primer(mouse p53)	8 μl

Kit 이외에 필요한 시약 :

미량 원심튜브

Magnetic rack (TaKaRa Code NV428 : Magnetight separation stand 등)

### ▶ 보존

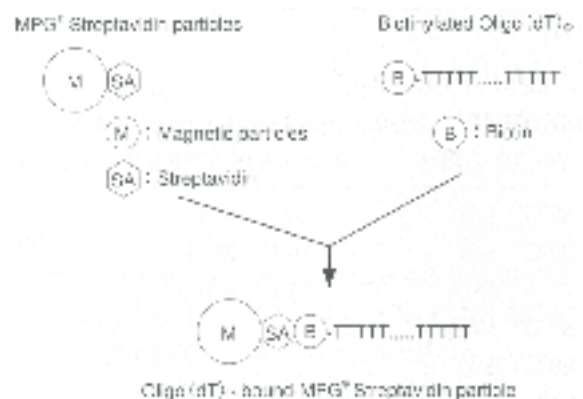
Package I	4°C
Package II	-20°C

AMV Reverse Transcriptase의 경우 동결용해를 반복하면 실활됩니다. 가능한 5 μl씩 분주하여 -80°C에 보존해 주시기 바랍니다. 한번 용해한 효소는 이후 -20°C에서 보관해 주시기 바랍니다. -20°C에서 6개월 이상 안정합니다.

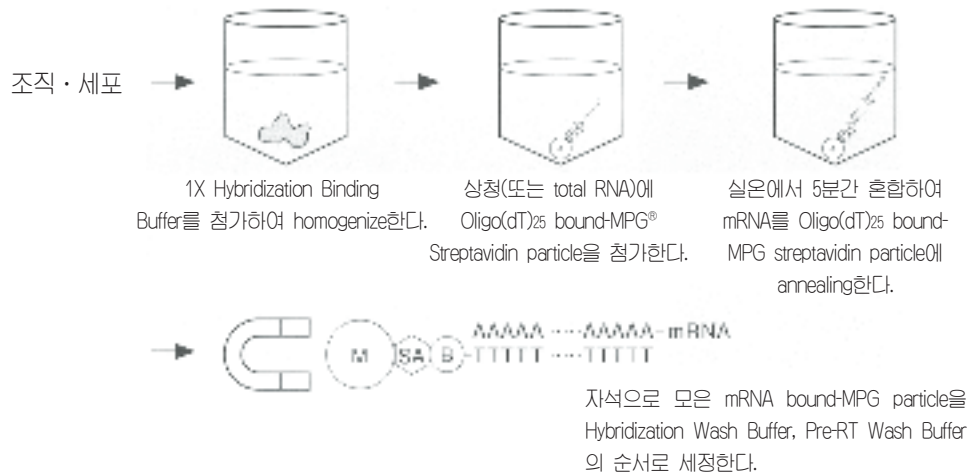
### ▶ 원리

이 방법은 ① biotin화한 Oligo(dT)<sub>25</sub>를 MPG Streptavidin particle에 결합시킨 Oligo(dT)<sub>25</sub> bound-MPG particle을 조제하는 공정, ② 이 particle을 이용하여 조직 및 세포의 homogenate(또는 total RNA)로부터 mRNA를 포획하는 공정, ③ 분리한 mRNA로부터 역전사반응으로 cDNA를 합성하는 과정으로 이루어져 있다. 이러한 각 과정을 아래의 모식도로 나타내었다.

#### (1) Oligo(dT)<sub>25</sub>의 MPG<sup>®</sup> streptavidin에의 고정

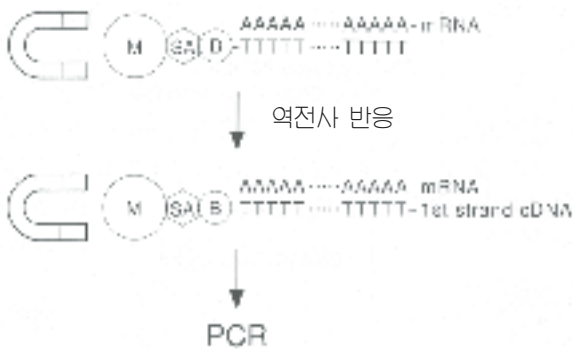



(2) Oligo(dT)<sub>25</sub> bound-MPG<sup>®</sup> streptavidin particle에 의한 mRNA의 포획



(3) 고정화 cDNA library의 구축

PCR 조건 : 94°C 2분  
 94°C 45초  
 60°C 45초  
 72°C 5분  
 30 cycles



 실험예 : RT-PCR에 의한 target의 증폭

사람 배양세포 U937(10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cells)로부터 본 kit을 이용하여 cDNA를 조제하고(50 μl), 고정화 cDNA library를 구축하였다. 이 cDNA-bound MPG particle 15 μl (1/20 양)를 50μl의 PCR 반응액에 첨가하여 사람의 transferrin receptor 영역(1 kbp, 2 kbp, 4.4 kbp)을 target로서 PCR로 증폭하였다.

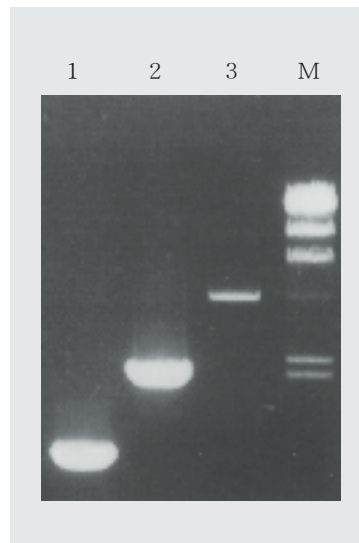


그림 1 사람 transferrin receptor 영역의 PCR 증폭

lane

1 : 1 kbp  
 2 : 2 kbp  
 3 : 4.4 kbp  
 M : λ-Hind III digest 8 μl apply

▶ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
MPG <sup>®</sup> Streptavidin	6124A	2 ml(20 mg)	550,000원
Magnetight Streptavidin Stand	NV428	1개	183,600원
TaKaRa Taq <sup>™</sup> (dNTP 첨부)	R001A	250 U	176,000원
TaKaRa Ex Taq <sup>™</sup> (dNTP 첨부)	RR001A	250 U	198,000원
TaKaRa LA PCR <sup>™</sup> Kit Ver.2.1	RR013A	50회	325,000원
TaKaRa PCR Amplification Kit	R011	100회	392,000원
Premix Taq <sup>™</sup> (TaKaRa Taq <sup>™</sup> Version)	R004	120회	168,000원
Premix Taq <sup>™</sup> (TaKaRa Ex Taq <sup>™</sup> Version)	RR003	120회	210,000원

MPG<sup>®</sup> is a registered trademark of CPG, Inc. Magnetic Porous Glass and certain applications in which it is used are covered by U.S. Patent 5,601,979 and 5,610,274 owned by CPG, Inc.



NEW

# cDNA PCR Library Kit

TaKaRa Code 6119 20회 200,000원

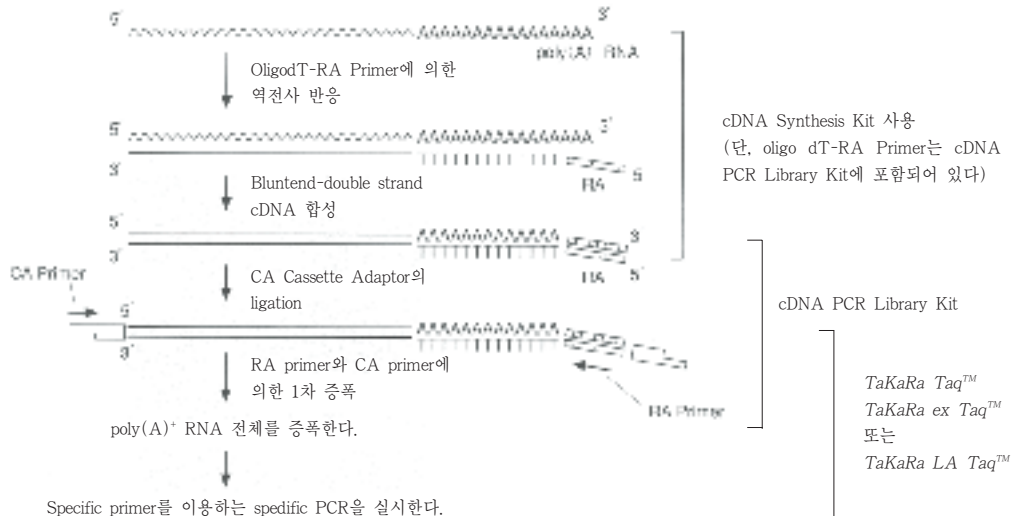
## 귀중한 RNA 시료를 library로서 증폭 및 보존

미량의 귀중한 RNA 시료를 한번의 반응으로 소진해버리는 것 때문에 고민할 필요가 없어졌다.

본 kit으로 PCR에 의해 소량의 mRNA로부터 cDNA library를 제작해 두면 얼마든지 계속해서 실험에 사용할 수 있고 또한, 보다 고감도로 검출할 수도 있다.

본 제품은 double strand cDNA를 합성하는 kit(TaKaRa cDNA Synthesis Kit) 및 Taq polymerase(TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™ 등)와 조합하여 사용한다.

### ▶ 원리



\* CA Cassette Adaptor와 CA primer는 RA primer와 CA primer로 사이의 부분만 증폭할 수 있도록 설계되었다.

### ▶ 내용(20회)

1. CA Cassette Adaptor(10 μM)	40 μl
2. Oligo dT-RA Primer(50 pmol/μl)	20 μl
3. RA Primer(20 pmol/μl)	10 μl
4. CA Primer(20 pmol/μl)	10 μl
5. Stop Solution*	80 μl
6. Ammonium Acetate(4 M)	1.4 ml
7. Ligation Solution I	240 μl
8. Ligation Solution II	120 μl

\* : 0.2 M EDTA, 2 mg/ml Glycogen pH8.0

### ▶ Kit 이외에 필요한 주요시약 및 기구류

- TaKaRa cDNA Synthesis Kit(TaKaRa Code 6120)
- PCR용 DNA Polymerase  
 TaKaRa Taq™(TaKaRa Code R001A/B/C)  
 TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code RR001A/B/C)

TaKaRa LA PCR™ Kit Ver. 2.1(TaKaRa Code RR013A/B)

One Shot LA PCR™ Mix(TaKaRa Code RR004) 등에서 선택할 수 있다.

- PCR Thermal Cycler  
 TaKaRa PCR Thermal Cycler(TaKaRa Code TP2000)  
 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480(TaKaRa Code TP480)  
 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(TaKaRa Code TP3000)  
 TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL(TaKaRa Code TP240) 등
- Mineral Oil
- Agarose 전기영동장치 및 agarose gel  
 [Nusieve® 3:1 Agarose(TaKaRa Code F50091) 등]

## ▶ Protocol

- ① 본 kit의 Oligo dT-RA primer와 TaKaRa cDNA Synthesis Kit을 이용하여 역전사 반응을 실시하고, 설명서에 따라 blunt-end double strand cDNA를 합성한다.
- ② Phenol/Choloroform 및 Choloroform으로 각각 추출하여 isopropanol 침전으로 DNA를 회수한다. DNA 침전물을 80% ethanol로 2회 세정한 뒤 ethanol을 제거하고 건조한다.
- ③ 침전물을 5  $\mu$ l의 멸균수에 녹인 후 여기에 2  $\mu$ l의 CA Cassette Adaptor를 첨가한다. 6  $\mu$ l의 Ligation Solution II를 첨가하여 잘 교반한 후 12  $\mu$ l의 Ligation Solution I을 첨가하고 잘 혼합하여 16°C에서 30분간 반응한다. Isopropanol 침전으로 DNA를 회수하여 80% ethanol로 2회 세정, ethanol을 제거하고 건조한다. 침전물을 30  $\mu$ l의 멸균수에 녹인다.
- ④ 얻은 30  $\mu$ l의 cDNA 용액을 주형으로 Taq Polymerase (TaKaRa Ex Taq™)를 이용하여, RA Primer와 CA Primer로 cDNA를 증폭한다.
 

94°C	1분	}	30 cycles
94°C	30초		
60°C	30초		
72°C	3분		
72°C	5분		
- ⑤ 이 PCR solution(cDNA PCR Library)을 specific PCR의 주형으로 사용한다. 통상 1  $\mu$ l를 50  $\mu$ l PCR 반응계에 사용하며, -20°C에서 보존한다.



## 실험예

사람 K562 배양세포의 total RNA로부터 위의 순서에 따라 PCR cDNA library를 제작하고, 이를 주형으로 하여  $\beta$ -actin,  $\beta_2$  microglobulin( $\beta_2$  m), hypoxanthine phosphoribosyl-transferase(HPRT)의 cDNA를 증폭하였다.

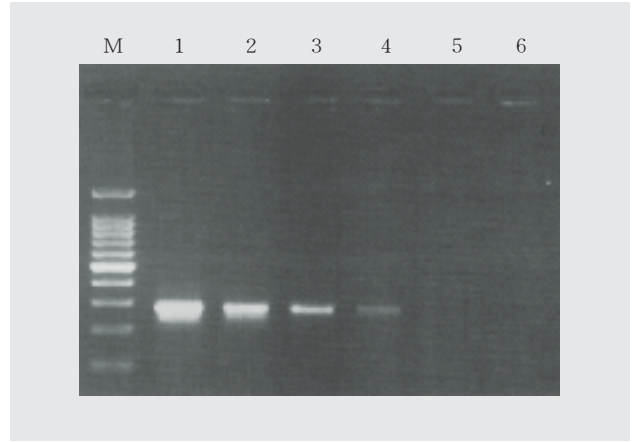
### (1) 반응액 조성

cDNA PCR Library	1 $\mu$ l
10× Ex Taq Buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP mixture	4 $\mu$ l
20 pmol/ $\mu$ l Primer #1	0.5 $\mu$ l
20 pmol/ $\mu$ l Primer #2	0.5 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq™	0.25 $\mu$ l
멸균수	38.75 $\mu$ l
total	50 $\mu$ l

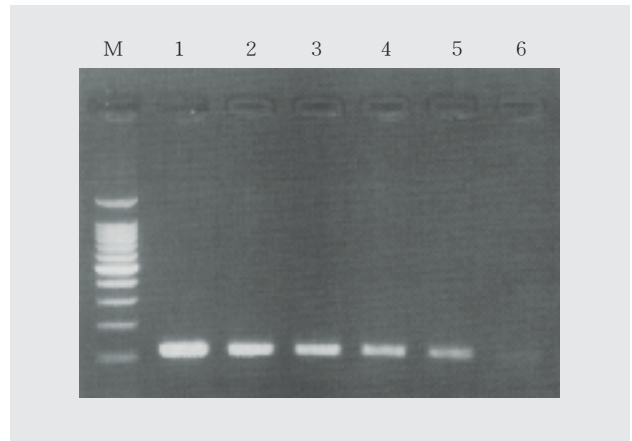
### (2) 반응조건

94°C	30초	}	35 cycles
55°C	30초		
72°C	30초		

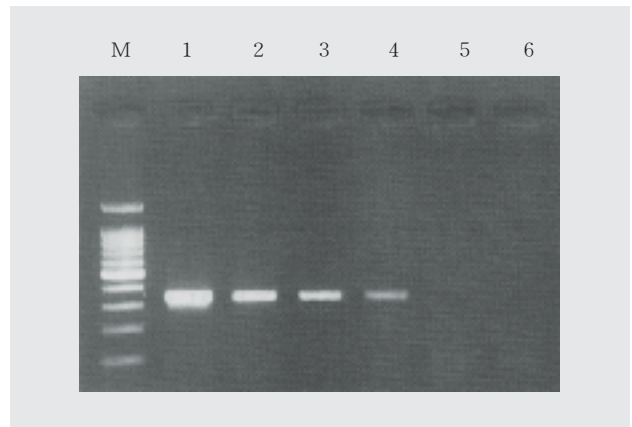
## (3) 결과



$\beta$ -actin



$\beta_2$  m



HPRT

Lane

M : 100 bp DNA ladder

1 : K562 total RNA	7.5 ng
2 : K562 total RNA	1.5 ng
3 : K562 total RNA	300 pg
4 : K562 total RNA	75 pg
5 : K562 total RNA	15 pg
6 : K562 total RNA	3 pg

상기 RNA양은 1st strand cDNA 합성시에 사용한 K562 total RNA 양이다.





# PerfectShot™ Ex Taq (Loading dye mix)

TaKaRa Code RR005 48회 112,500원

## PCR후 그대로 전기영동!! Contamination의 염려가 없다.

DNA Polymerase, 반응 buffer 및 dNTP를 미리 2배 농도로 혼합한 *Premix Taq™*은 발매를 개시한 이래 대단한 호평을 받고 있다. 금번, 이에 전기영동에 필요한 시약까지 첨가하여 0.2 ml 튜브에 미리 분주한 PerfectShot™ Ex Taq을 신발매한다. 전기영동에 필요한 시약이 함유되어 있으므로 PCR 반응 후 산물을 그대로 gel에 loading하면 되기 때문에 전기영동의 작업효율이 향상되었다. 또한 0.2 ml 튜브에 미리 분주해 놓아 primer와 시료만을 첨가하는 간편한 조작으로 PCR을 실시할 수가 있으므로 특히 많은 시료의 PCR에 아주 편리하다. 또한 cross-contamination의 위험성도 대폭 감소하였다. DNA polymerase로서 TaKaRa Ex Taq™을 사용하므로 높은 증폭 효율과 검출감도를 얻을 수 있다. 본 고에서는 PerfectShot™ Ex Taq의 사용례를 소개한다.

### ▶ 내용

0.2 ml 튜브에 다음의 시약이 함유되어 있다(액량 25μl).

1. DNA Polymerase(*TaKaRa Ex Taq™*)
2. *Ex Taq™* Buffer
3. dNTP
4. 색소 marker(2종류)
5. 비중 증가제



### 실험예

PerfectShot™ Ex Taq을 이용하여 PCR(반응액량 50 μl)을 실시하는 경우와 종래의 *TaKaRa Ex Taq™*으로 조제하여 실시하는 PCR 간의 증폭효율을 비교하였다.

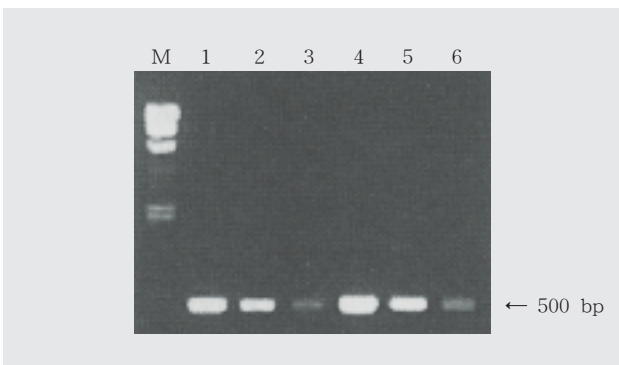


그림 1 λ DNA 500 bp영역의 증폭효율 비교

Lane	주형 DNA양
M	: λ/Hind III marker
1	: <i>TaKaRa Ex Taq™</i> 1 pg
2	: <i>TaKaRa Ex Taq™</i> 100 fg
3	: <i>TaKaRa Ex Taq™</i> 10 fg
4	: PerfectShot™ <i>Ex Taq</i> 1 pg
5	: PerfectShot™ <i>Ex Taq</i> 100 fg
6	: PerfectShot™ <i>Ex Taq</i> 10 fg

8 μl loading  
1% agarose gel

### (1) λ DNA 500 bp 영역의 증폭

PCR 반응 조건

94°C 30초	} 30 cycles
68°C 2분	

### (2) E. coli JM109 genomic DNA의 증폭

PCR 반응 조건

94°C 30초	} 30 cycles
55°C 30초	
72°C 2분	

PerfectShot™ Ex Taq으로 종래와 같은 증폭효율을 얻을 수 있음을 확인하였다.

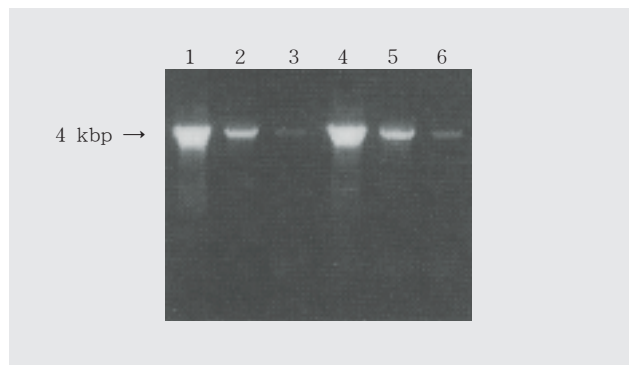


그림 2 JM109 genomic DNA의 증폭효율 비교

Lane	주형 DNA양
M	: λ/Hind III marker
1	: <i>TaKaRa Ex Taq™</i> 1 ng
2	: <i>TaKaRa Ex Taq™</i> 100 pg
3	: <i>TaKaRa Ex Taq™</i> 10 pg
4	: PerfectShot™ <i>Ex Taq</i> 1 ng
5	: PerfectShot™ <i>Ex Taq</i> 100 pg
6	: PerfectShot™ <i>Ex Taq</i> 10 pg

8 μl loading  
1% agarose gel

NEW

# DNA, RNase의 contamination 방지에 DNA-OFF™, RNase-OFF™

DNA-OFF™ TaKaRa Code 9036 500 ml 50,000원  
RNase-OFF™ TaKaRa Code 9037 500 ml 50,000원

## Contamination에 신경쓸 필요가 없습니다!

PCR 실험 및 RNA를 사용하는 실험에서 절대적으로 피해야 할 사항이 DNA 및 RNase의 contamination이다. 가볍게 닦아주는 것만으로 이러한 contamination을 미리 막을 수 있는 시약으로서 DNA-OFF™ 및 RNase-OFF™를 소개한다.

### ▶ DNA-OFF™

PCR을 이용한 실험에서는 외부 DNA(예를 들면, 다른 실험에서 유래한 PCR산물)의 혼입에 세심한 주의를 기울여도 오염으로 인하여 artifact의 밴드가 나타나서 실험결과를 제대로 분석할 수 없는 경우가 빈번히 발생한다. 이 경우 DNA-OFF™의 사용을 권장한다. DNA-OFF™는 비알칼리성, 비부식성, 비발암성의 DNA contamination 제거 시약으로, 실험대나 기구 등의 모든 표면에 존재하는 DNA를 제거할 수 있다. DNA를 완전히 분해하는 계면활성제를 함유하는 안정하여 내열성을 갖는 ready-to-use형의 시약이다.

### ▶ RNase-OFF™

RNA를 이용한 실험에서는 RNase의 혼입에 세심한 주의를 기울이지 않으면 안된다. 일단 RNase가 혼입되면 순식간에 RNA가 분해되어 실험에 막대한 지장을 초래한다. 그 때문에 RNase의 혼입을 막기 위하여 다양한 방법으로 처리하고 있으나, 기존의 방법들은 통상적으로 번거롭고 긴 시간이 소요된다. 이와 같은 이유로 RNase-OFF™의 사용을 권장한다. RNase-OFF™는 비알칼리성, 비부식성, 비발암성의 RNase contamination제거 시약으로, RNase를 실험시키는 계면활성제를 함유하는 안정하며 내열성을 갖는 ready-to-use형의 시약이다.

### ▶ 사용법

DNA-OFF™ 또는 RNase-OFF™를 아래의 방법으로 사용하므로써 DNA 또는 RNase를 완전히 분해 및 실험하여 제거할 수 있다.

#### (1) 실험대 등의 DNA/RNase의 제거

DNA-OFF™ 또는 RNase-OFF™를 실험대에 부은 후 paper towel로 넓게 펼쳐 전면을 덮는다. 그 다음 멸균수를 같은 방법으로 처리한다. 새로운 paper towel로 물기를 깨끗이 닦아낸다.

#### (2) 기구 및 장치 등의 DNA/RNase의 제거

DNA-OFF™ 또는 RNase-OFF™로 paper towel을 충분히 적셔 기구의 표면을 깨끗하게 닦아낸 다음 멸균수로 닦아낸

다. 마지막으로 새로운 paper towel로 물기를 깨끗이 닦아낸다. 작은 부품은 DNA-OFF™ 또는 RNase-OFF™에 1~2분간 담근 후 멸균수로 잘 세정한 다음 paper towel로 물기를 깨끗이 닦아낸다.

#### (3) Plastic 또는 glass 용기 등의 DNA/RNase의 제거

충분한 양의 DNA-OFF™ 또는 RNase-OFF™를 용기에 주입해 흔들어 주면서 안쪽면 전체를 골고루 씻어 준다. 액을 버린 후 멸균수로 교반하면서 세정한다(2회 반복). 물을 버린 후 건조한다.

#### (4) Pipette 등의 DNA/RNase의 제거

취급설명서에 따라 pipette을 분해한다. Shaft 부분을 DNA-OFF™/RNase-OFF™에 1분간 침지한다. 멸균수로 잘 세정한 후 paper towel로 닦아낸다. 그 다음 shaft 이외의 부분은 DNA-OFF™/RNase-OFF™에 적신 paper towel로 닦아내고 이어서 멸균수로 적신 paper towel로 닦아낸다. Paper towel로 물기를 깨끗이 닦아낸 후 pipette을 조립한다.

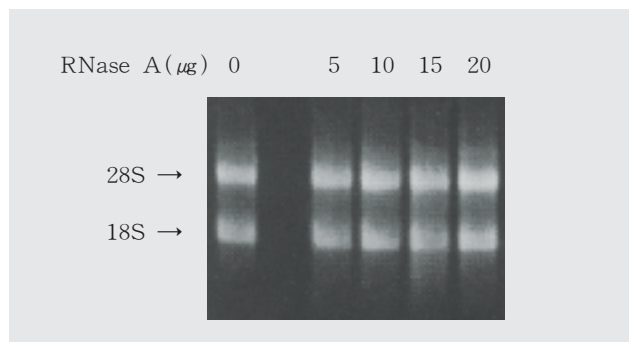


그림 RNase-OFF™에 의한 RNase의 제거

각각의 양의 RNase A를 microtube의 바닥에 건조시킨 후 1 ml의 RNase-OFF™를 첨가하여 protocol에 따라 RNase를 제거하였다. 2 μg의 mouse liver rRNA(0.1 μg/μl의 TE용액 20 μl)를 각 튜브에 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1.5% agarose gel에 전기영동한 결과, 완전한 rRNA band(28S, 18S)가 관찰되었고, 이는 RNase가 잔존하지 않음을 의미한다.

NEW

효모 · Gram 양성균으로부터 간단하게 genomic DNA를 추출할 수 있는

# Dr. GenTLE™ (효모 · Gram 양성균용)

TaKaRa Code 9083 50회 275,000원

전혈로부터 간단한 조작으로 genomic DNA를 추출할 수 있어 대호평을 받고 있는 혈액용 Dr. GenTLE™(TaKaRa Code 9081)에 이어 효모 및 Gram 양성균용의 신제품을 line up하였다. Dr. GenTLE™(효모 · Gram 양성균용)을 사용하면 고순도의 DNA를 아주 간편한 조작으로 단시간에 얻을 수 있다.

## ▶ 특징

- 조작시간은 약 30분이다.
- Phenol 등의 유해한 시약을 사용할 필요가 없다.
- 세포벽 용해 효소나 Proteinase K(TaKaRa Code 9033) 등의 효소를 사용하지 않는다
- 고순도의 DNA(효모의 경우  $OD_{260/280}=1.75\sim 1.9$ )를 조제할 수 있다.
- 효모 배양액 1.5 ml로부터 5~20  $\mu\text{g}$ 의 DNA를, 또 *Bacillus*나 *Staphylococcus* 등의 Gram 양성균 배양액 1.5 ml로부터는  $\leq 10 \mu\text{g}$ 의 DNA를 추출 및 정제할 수 있다.
- *Candida famata*와 같은 견고한 세포벽을 가진 균체에서도 DNA를 추출할 수 있다.

## ▶ Kit의 내용

1. GenTLE™ Yeast Solution I	27 ml
2. GenTLE™ Yeast Solution II	3 ml
3. GenTLE™ Yeast Solution III	15 ml
4. ddH <sub>2</sub> O	5 ml

## ▶ 조작

균체배양액을 원심분리하여 집균한 후 GenTLE™ Yeast Solution I 으로 현탁한 다음, GenTLE™ Yeast Solution II를 첨가하여 균체를 용해시킨다. GenTLE™ Yeast Solution III을 첨가하여 단백질을 변성시킨 후 원심분리하여 상등액을 isopropanol로 침전하여 DNA를 회수한다.

### 균체배양액

— 원심분리

### 균체

- GenTLE™ Yeast Solution I 현탁
- GenTLE™ Yeast Solution II 첨가
- 70°C, 10분
- GenTLE™ Yeast Solution III 첨가
- 얼음, 2~5분

### 상청

- Isopropanol 침전
- 70% ethanol로 세정 후 건조

### DNA



실험에 : *Schizosaccharomyces pombe*,  
*Saccharomyces cerevisiae* 배양액  
로부터 genomic DNA의 정제

*S. pombe* 배양액( $OD_{600} = 5$ ) 및 *S. cerevisiae* 배양액( $OD_{600}=17$ )으로부터 각각 1.5 ml를 취하여 Dr. GenTLE™(효모 · Gram 양성균용)을 이용하여 genomic DNA를 추출 및 정제하였다.

### [결과]

추출 정제한 DNA를 20  $\mu\text{l}$ 의 TE buffer로 용해하여 그 중 2  $\mu\text{l}$ 를 0.8% agarose gel로 전기영동하였다.

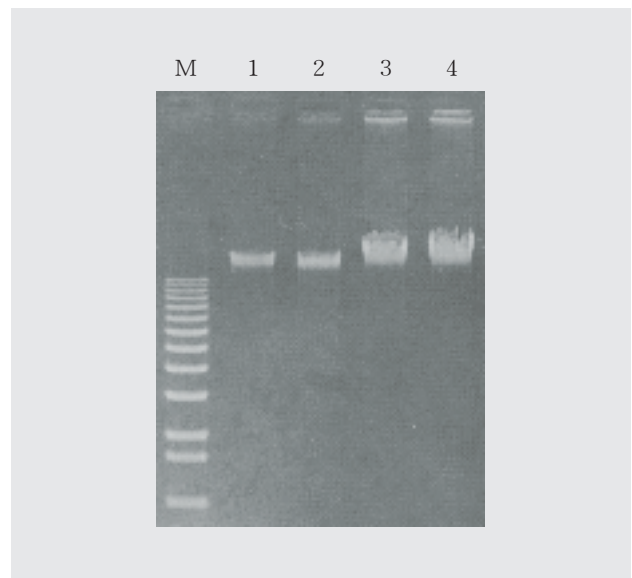


그림 1 추출 및 정제한 효모 genomic DNA의 전기영동

Lane

M : Marker

1, 2 : *S. pombe*

3, 4 : *S. cerevisiae*

주) Gram 양성균에서 추출한 DNA의 양 및 순도는 세포벽에 존재하는 다당류의 함량에 의존한다. *Pseudomonas* 등 세포벽 다당류가 많은 균은 회수량 및 순도가 낮아지는 경우도 있다.

NEW

# Positive Selection Vector pGATA

TaKaRa Code 3610 10  $\mu$ g 200,000원

## 배지에 IPTG를 첨가하는 것만으로 목적하는 clone을 얻을 수 있다! Vector의 탈인산화도 불필요!!

pGATA는 배지에 IPTG를 첨가하는 것만으로 목적의 유전자를 삽입한 clone만이 생육할 수 있는 plasmid vector이다. 통상 plasmid vector에 외래유전자를 cloning하는 경우 목적의 유전자를 가진 clone을 얻기 위한 선별작업을 실시한다. 일반적으로 활용하고 있는  $\beta$ -galactosidase 효소활성을 이용한 color selection에서는 외래유전자를 갖지 않은 clone도 생육하여 구별이 곤란하므로 cloning시 vector를 탈인산화하여 self-ligation을 방지할 필요가 있다. 반면에 pGATA는 외래유전자가 삽입되지 않은 clone은 생육할 수 없기 때문에 vector를 탈인산화 할 필요가 없다. 그 반대로 insert를 탈인산화한다면 insert간의 결합을 예방할 수도 있다. 선별은 배지에 IPTG를 첨가해 주는 것만으로 충분하므로 특수한 시약이나 배지를 사용하지 않아도 된다. 또한 숙주도 특별한 제약 없이 자유롭게 선택할 수 있다.

### ▶ 원리

pGATA는 분자내에 multicloning site를 갖는 치사성 유전자, *lac I<sup>r</sup>* 유전자, ampicillin 내성유전자 및 pBR322(Rop-)의 복제기점을 갖는다. 치사성 유전자는 세포독성을 가진 peptide를 code하는 mouse의 진행전사인자, GATA-1의 DNA-binding domain의 일부와 비활성화 시킨 glutathione-S-transferase(GST)가 융합된 형태로 구성되어 있다. 이 유전자가 code하는 독성 peptide는 발현되어 세균의 DNA복제점에 결합하므로써 생육저해를 유발한다. 치사성 유전자는 *tac* promoter의 하류에 위치하며, 동일분자 내에 존재하는 *lac I<sup>r</sup>* 유전자에 의해 그 발현이 제어되므로 IPTG의 첨가로 유도할 수 있다. Multicloning site는 glutathione-S-transferase의 glutathione-binding domain에 위치하며 13종의 제한효소 절단부위를 갖는다. 또한 그 양측에는 T3 promoter와 T7 promoter가 존재한다.

Multicloning site에 외래유전자를 삽입하면 IPTG 존재하에서도 독성 peptide가 발현될 수 없기 때문에 생육저해가 일어나지 않게 된다. 따라서, 배지에 IPTG를 첨가해 주는 것만으로 쉽게 외래유전자를 갖는 clone만을 얻을 수 있다.

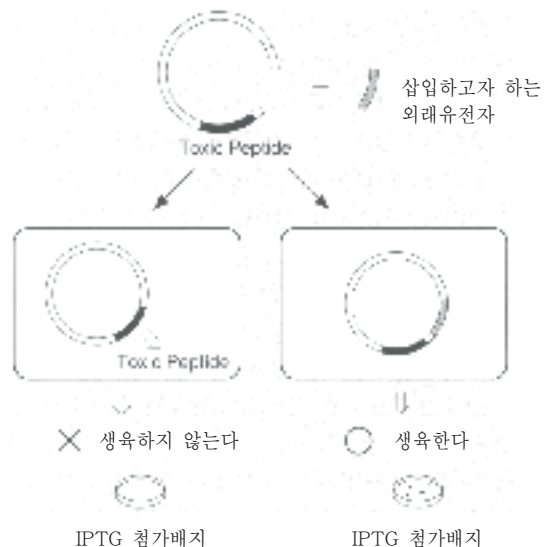


그림 2 pGATA vector의 원리

### ▶ 사용례 : Tetracyclin 내성유전자(1.5 kbp)의 cloning

제한효소 *Xba* I으로 절단한 100 ng의 pGATA와 양말단에 *Xba* I 말단을 갖는 56 ng의 tetracyclin 내성유전자를 TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 1(TaKaRa Code 6021)을 사용하여 ligation하고, *E. coli* JM109 Competent Cell(TaKaRa Code 9052 : 효율  $1.2 \times 10^8$  transformants/ $1 \mu$ g pBR322 plasmid)을 형질전환한 후 LB plate(100  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ g/ml ampicillin 함유)에 배양하여  $2 \times 10^6$ 개의 colony를 얻었다. 또한 그 중 100개의 colony를 tetracyclin이 함유된 LB plate에 도포하였더니 91개의 clone이 생육하였다.

주의 : 본 vector에 의해 발현하는 GST는 multicloning site의 도입에 의해 실행된 것이다. 따라서, glutathione 결합활성을 이용하는 융합단백질의 제작에는 사용할 수 없다.

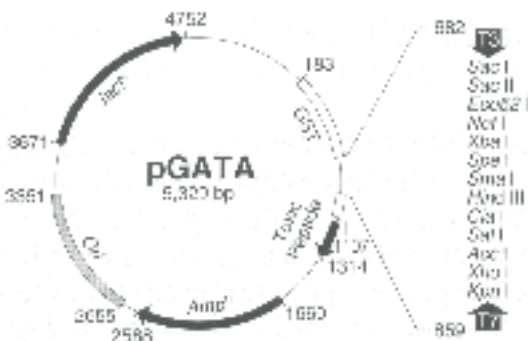


그림 1 pGATA vector의 구조 및 multicloning site



NEW

# SCDase

## (Sphingolipid ceramide *N*-deacylase)

TaKaRa Code 4462 50 mU 225,000원

다양한 sphingolipid를 lysosphingolipid와 지방산으로 가수분해하는 Sphingolipid ceramide *N*-deacylase(SCDase)를 세계 최초로 발매하였다. SCDase는 가수분해 반응 뿐만 아니라 역반응 및 지방산의 교환반응도 아주 높은 효율로 촉매하는 장점을 갖고 있다. 본 효소를 이용하면 얻기가 상당히 곤란한 lysosphingolipid와 표식 sphingolipid를 간단히 조제할 수 있다.

### ▶ 서론

Sphingolipid란 sphingosine 염기 지질의 총칭으로, sphingosine 및 sphingosine의 아미노기에 지방산이 결합한 ceramide, ceramide에 당쇄가 결합한 sphingoglycolipid, ceramide에 choline phosphate가 결합한 sphingomyelin등이 일반적으로 알려져 있다. 또 sphingolipid에서 지방산이 탈리된 것을 lysosphingolipid라 한다. 이러한 sphingolipid는 최근 세포분화나 apoptosis의 신호전달에 관여하는 분자로서 주목 받고 있다. Sphingolipid의 lyso체는 그 자체의 생리활성 연구 뿐만 아니라 lyso체가 갖는 유리 아미노기를 이용하여 sphingolipid의 표식화 및 고정화를 실시할 수 있고, 수식 sphingolipid의 재료로서도 아주 유용하다. 지금까지는 lyso체를 얻기 위해서 sphingolipid를 화학적으로 가수분해하는 방법을 이용하였지만, 이 방법을 이용하는 경우 sphingoglycolipid에서는 당쇄에 함유되어 있는 *N*-acetyl기의 탈리가 일어난다. 또한 sphingomyelin의 경우에는 sphingosine의 분해가 천연의 D-erythro형으로가 아니라 입체변성체인 L-threo형으로서도 일어나므로, 그러한 혼합물로만 구성된 lyso체를 얻을 수가 없다. 그러나 Sphingolipid ceramide *N*-deacylase (SCDase)를 이용함으로써, 폭 넓은 sphingolipid로부터 천연형과 동일한 구조를 가진 lyso체를 간단히 얻을 수 있다.<sup>1,2)</sup> SCDase의 각 반응의 기본적인 성질을 아래와 같이 소개한다.

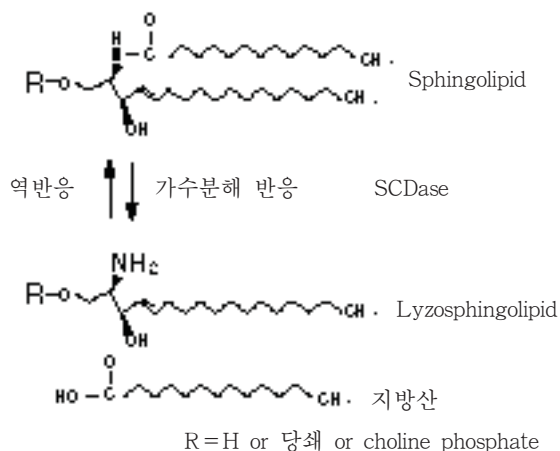


그림 1 SCDase의 반응

### ▶ 작용

SCDase는 각종 sphingolipid를 특이적으로 가수분해함으로써 그 lyso체와 지방산을 생성시킨다. 또한, lyso체와 지방산으로부터 sphingolipid를 생성하는 역반응 및 sphingolipid의 지방산을 교환하는 반응을 효율적으로 촉매한다(그림 1).<sup>3)</sup>

### ▶ 일반적 성질

유래 : *Pseudomonas* sp.  
 최적온도 : 40°C  
 최적 pH : 가수분해 5.0~6.0(0.8% Triton X-100)  
 역반응 7.0(0.1% Triton X-100)  
 금속이온의 영향 : Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에 저해 받는다.  
 Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, EDTA에 영향을 받지 않는다.  
 활성의 정의 : asialo GM1을 기질로 하여 0.8% Triton X-100을 함유하는 acetate buffer(pH5.0) 내에서 37°C, 1분간 1 μmol의 lyso-asialo GM1을 생성하는 양을 1 U로 한다.

### ▶ 가수분해 반응

산성 pH 및 고농도의 계면활성제의 존재하에서는 가수분해 반응이 우선적으로 진행된다. 본 효소는 sphingolipid 전반에 대하여 가수분해 활성을 갖는다(그림 2). 또 종래의 화학적 가수분해법과 달리 sphingosine 부분의 입체이성체화나 당쇄 부분의 *N*-acetyl기의 탈리 등의 부반응이 전혀 일어나지 않으며, 사용한 sphingolipid와 동일한 hydrophilic 부분(당쇄, choline phosphate) 및 sphingosine 염기구조를 갖는 lyso-sphingolipid를 생성한다.

### ▶ 역반응

중성 pH, 저농도 계면활성제의 존재하에서는 역반응이 우선적으로 일어난다. 통상의 가수분해효소의 역반응에서는 아주 높은 기질농도와 수분함량이 적은 반응계를 필요로 하지만, 본 효소는 수계에서 낮은 기질농도의 조건으로 역반응을 촉매한다. 또한 가수분해 반응에 비하여 특별히 많은 양의 효소를 필요로 하지는 않는다. 각종 lyso-sphingolipid와 stealic acid의 역반응에 의한 sphingolipid의 생성률은 그림 3과 같다.



그림 2 각종 sphingolipid의 가수분해 반응

0.8% Triton X-100을 함유하는 20  $\mu$ l의 20 mM sodium acetate buffer 내에서 10 nmol의 각종 sphingolipid를 2 mU의 SCDase로 37°C에서 16 시간동안 반응하였다.

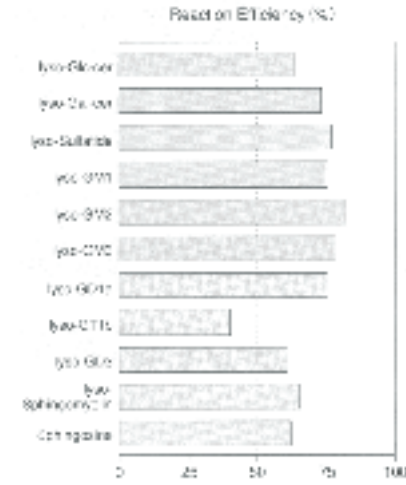


그림 3 각종 sphingolipid와 stearic acid의 역반응

0.1% Triton X-100을 함유하는 10  $\mu$ l의 25 mM sodium phosphate buffer 내에서 2 nmol의 각종 sphingolipid와 4 nmol의 stearic acid를 40  $\mu$ U의 SCDase로 37°C에서 16시간동안 반응하였다.

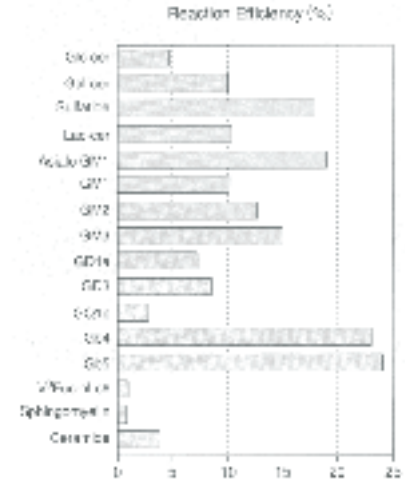


그림 4 각종 sphingolipid와 [1-<sup>14</sup>C] stearic acid의 지방산 교환반응

0.1% Triton X-100을 함유하는 10  $\mu$ l의 25 mM sodium phosphate buffer에서 2 nmol의 각종 sphingolipid와 4 nmol의 [1-<sup>14</sup>C] stearic acid를 40  $\mu$ U의 SCDase로 37°C에서 16시간동안 반응하였다.

본 효소는 C12:0~C24:0의 지방산을 잘 축합하지만, 아미노기를 block한  $\omega$ -아미노지방산, 또는 DHA나 EPA 등의 고도 불포화지방산도 lysosphingolipid에 도입할 수 있음을 확인하였다.

▶ 교환반응

SCDase는 sphingolipid의 지방산을 외부에서 첨가한 지방산과 교환하는 반응도 촉매한다. 따라서 sphingolipid와 지방산의 공존하에서 SCDase를 작용하므로서 lyso체를 조제하지 않고 sphingolipid의 지방산을 별도의 지방산과 교환할 수도 있다. 각종 sphingolipid와 [1-<sup>14</sup>C] 표식 지방산을 이용하여 교환반응을 실시했을 때의 [1-<sup>14</sup>C] 표식 sphingolipid의 생성률을 그림 4에 나타내었다.

▶ 결론

이상에서 서술한 바와 같이 SCDase를 이용하면 각종 sphingolipid로부터 그 lyso체를 얻을 수 있다. 특히 지금까지는 얻을 수 없었던 polysialoganglioside의 lyso체나 천연형과 동일한 sphingosine 구조(D-erythro)를 가진 lysosphingomyelin을 간편하게 얻을 수 있다. 또한 역반응 또는 교환반응을 이용하면 편히 지방산을 교환을 실시할 수 있고, RI표식 sphingolipid도 쉽게 얻을 수 있다. 이와 같이 SCDase에 의해 얻은 lyso체는 다양한 용도로 사용할 수 있다(그림 5). SCDase 및 lyso-sphingolipid는 sphingolipid의 기능해명에 그 위력을 발휘할 것이다.

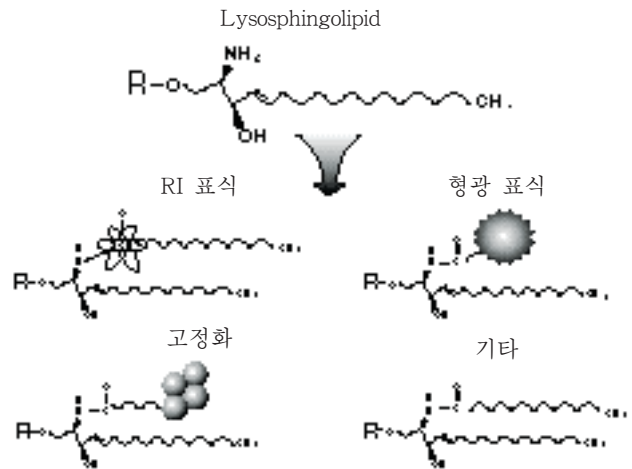


그림 5 Lyso체의 용도

[참고문헌]

- 1) Ito, M., kurita, T. and Kita, K.(1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24370-24374.
- 2) Sueyoshi, N., Izu, H. and Ito, M. (1997) *J. Lipid. Res.* **38**, 1923-1927
- 3) Mitsutake, S., kita, K, Okino, N. and Ito, M. (1997) *Anal. Biochem.* **247**, 52-57.

[관련제품]

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
lyso-GM1	4351	1 mg	300,000원
lyso-GM2	4352	0.1 mg	300,000원
lyso-GM3	4353	0.1 mg	300,000원
lyso-GD1a	4354	0.1 mg	300,000원



# Precoat-type E-cadherin EIA Kit

TaKaRa Code MK117 96회 875,000원

## 세계 유일의 E-cadherin EIA kit가 더욱 편리해졌습니다!

지금까지 이용해 주신 human E-cadherin EIA Kit<sup>®</sup>를 precoat type으로 공급하므로써 조작이 보다 간편하고 품질도 더욱 향상되었다. Precoat type을 사용함으로써 전일 항체를 coating하거나 blocking하는 조작할 필요 없이 바로 측정을 실시할 수 있다. 또 조작시간도 약 3시간 30분으로 단축되었으며 동시 재현성 및 일차 재현성도 향상되었다. 발색기질도 종래의 OPD에서 TMBZ로 대체하여 폐기물 처리의 제한이 해소되었고 발색감도도 보다 예민해졌다. 본 고에서는 이 kit에 대해 간단히 소개한다.

### ▶ E-cadherin에 대하여

E-cadherin은 주로 상피세포에서 발현하는 세포-세포간의 접착분자로서 Ca<sup>2+</sup> 이온의 농도에 의존적으로 동일분자끼리 결합하는 성질을 갖는다. 동물체의 배발생 과정에서 E-cadherin은 상피조직 등의 구축에 아주 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

### ▶ Kit의 내용

1. Anti-human E-cadherin monoclonal antibody plate  
96 well (8 well × 12 strips) × 1
2. Peroxidase 표식 anti-human E-cadherin monoclonal antibody (동결건조품) 11 ml 용 × 1
3. 표준품(human E-cadherin 함유 표식물질 : 동결건조품) 1 ml 용 × 1
4. 검체 희석액 11 ml × 2
5. 기질액(TMBZ : 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 12 ml × 1
6. 반응정지액 (1N 황산) 12 ml × 1

### ▶ 조작법

- 시료 100 μl × 2런
- ↓ 37°C, 2시간
- 3회 세정
- ↓ 효소표식항체 100 μl
- ↓ 37°C, 1시간
- 4회 세정
- ↓ 기질 100 μl
- ↓ 실온, 15분간
- 반응정지액 100 μl
- ↓ 450 nm 측정

### ▶ 성능

#### 검출감도

최소 검출감도는 100 ng/ml이다.

E-cadherin의 각 농도에 따른 A<sub>450</sub> 값은 표 1에 나타내었다.

#### 동시 재현성 및 일차 재현성

동시 재현성 : 세농도에서 n=16으로 실시했을 때 CV 6.9~9.3%

일차 재현성 : 세농도에서 3일간 측정시 CV 4.1~5.1%

#### 첨가회수율

85~115%

#### 종래 kit와의 상관성

종래 kit(TaKaRa Code MK017)과 본 kit(TaKaRa Code MK117)를 사용하여 26종의 혈청검체를 측정하였다(그림 1).

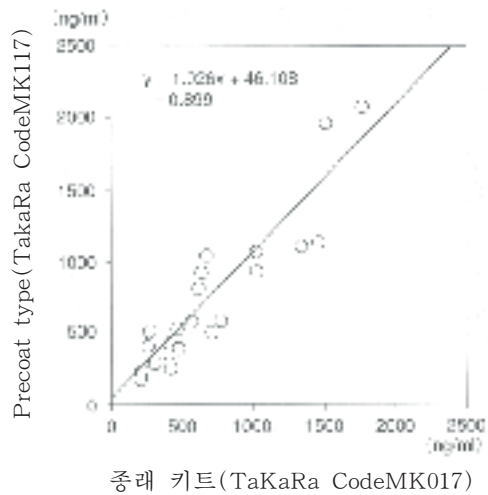


그림 1 종래 kit와 precoat type의 상관성

표 1 E-cadherin의 각 농도에 따른 A<sub>450</sub> 값

E-cadherin 농도(ng/ml)	3200	1600	800	400	200	100	50	0
A <sub>450</sub>	2.590	1.169	0.481	0.202	0.110	0.078	0.064	0.055



### ▶ 배양상청중의 E-cadherin

각종세포를 10% FCS/RPMI1640 으로 배양하여 그 상청 중의 가용성 E-cadherin을 본 kit으로 측정한 예를 그림 2에 나타내었다.

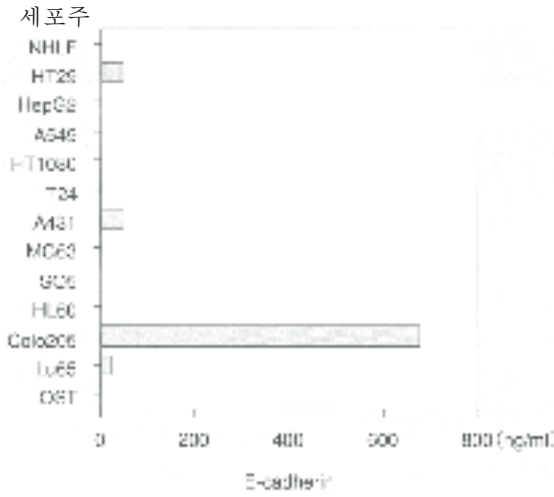


그림 2 각종세포의 배양상청액중의 가용성 E-cadherin의 측정

NHLF : 사람 정상 폐선유아세포    MG63 : 사람 골육종  
 HT29 : 사람 결장선암            SQ5 : 사람 폐암  
 HepG2 : 사람 간암                HL60 : 사람 전골수성 백혈병  
 A549 : 사람 폐암                 Colo205 : 사람 결석선암  
 HT1080 : 사람 선유육종        Lu65 : 사람 폐암  
 T24 : 사람 방광암                OST : 사람 골육종  
 A431 : 사람류 표피암

### ▶ 뇨 및 혈중 가용성 E-cadherin의 농도<sup>1)</sup>

사람의 뇨 및 혈중 E-cadherin의 농도를 종래 kit으로 측정 한 예를 그림 3 및 그림 4에 나타내었다.

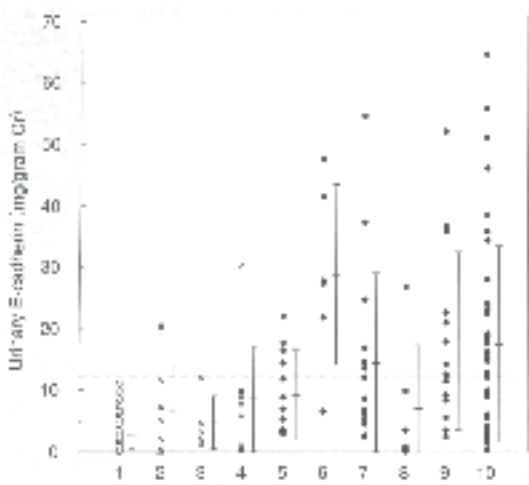


그림 3 각종 질환 환자의 가용성 E-cadherin 배설 수준<sup>2)</sup>

1 : 건강인                                6 : 담낭암 환자  
 2 : 위궤양 환자                        7 : 대장 및 결장암 환자  
 3 : 당뇨병 환자                        8 : 유암 환자  
 4 : 담석증 환자                        9 : 폐암 환자  
 5 : 간암 환자                            10 : 위암 환자

각종 질환 환자의 수시뇨 중 가용성 E-cadherin의 농도를 creatinine으로 보정하여 비교하였다. 횡선은 평균값과 표준편차를, 점선은 잠정적인 cut-off 수준을 나타낸 것이다.

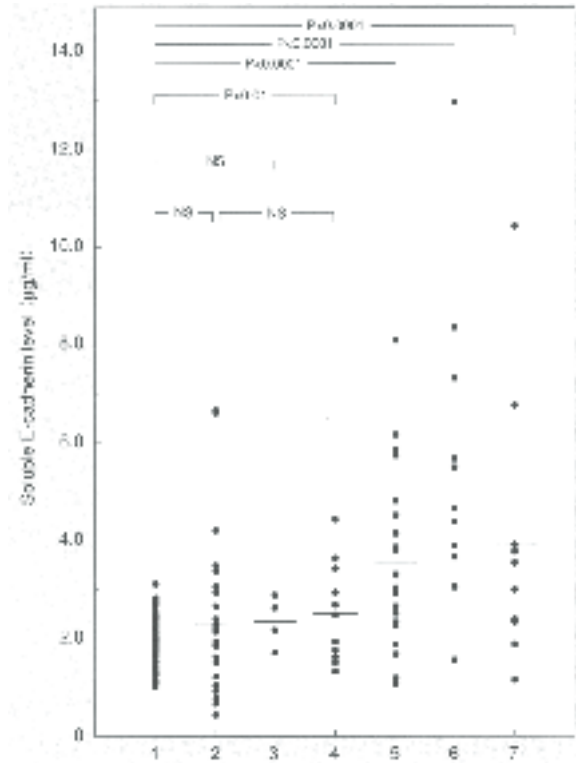


그림 4 각종 질환환자의 혈청 중 가용성 E-cadherin의 농도<sup>3)</sup>

건강한 사람군과 각 질환환자군(횡선은 각 군의 평균값)과의 측정치의 통계적 유의차는 student's t-test로 판정하였다.

1 : 건강인                                5 : 위암 환자  
 2 : 당뇨병 환자                        6 : 간암 환자  
 3 : 간염 환자                            7 : 기타 암환자  
 4 : 백혈병 환자

### [참고문헌]

- 1) BIOVIEW 10, p17-18
- 2) Katayama, M. et al. (1994) *Int. J. Oncology* **5**, 1049-1057.
- 3) Katayama, M. et al. (1994) *Br. J. Cancer* **69**, 580-585.

보한바이오메디칼(주) 홈페이지에는  
유익한 정보가 있습니다.

- 신제품 정보
- 캠페인 안내
- 최신바이오 뉴스

[www.biochem.or.kr/bohanbio.htm](http://www.biochem.or.kr/bohanbio.htm)

보한바이오메디칼(주)는 한국생화학회의 홈페이지 운영과 정보화 사업을 공식후원하고 있습니다.

NEW

# CFLP<sup>®</sup> Scanning System

## - 변이(다형)검출 시스템 -

DNA의 변형(다형)을 검출하는 방법으로서 RFLP, DGGE, SSCP 등의 다양한 방법이 고안되어 있지만, 기존의 이러한 방법들은 ① 제한효소 site에 의존해야 하며 ② gel 제작이 곤란하고 ③ 긴 단편의 경우 해석이 불가능하며 ④ 조건검토가 번거롭다는 점 등의 문제점이 있다. CFLP란 PCR로 증폭한 단편을 열변성하고 냉각한 후 Cleavase<sup>®</sup> I 효소를 처리하여 전기영동 패턴을 비교하므로써 변형(이형)을 검출하는 방법이다. 이번에 TaKaRa는 CFLP<sup>®</sup>(Cleavage Fragment Length Polymorphism)용의 Kit을 발매하였다.

### ▶ Cleavase<sup>®</sup> I 이란

*Thermus aquaticus* 유래의 구조특이적 내열성을 갖는 endonuclease로서 대장균을 이용한 재조합체로서 생산한다. Cleavase<sup>®</sup> I은 hairpin 구조나 loop 구조를 형성하는 single-strand DNA의 single strand 부분과 double strand 부분 사이를 특이적으로 인식하여 그 5' 부위를 절단한다(그림 1). 또 Cleavase<sup>®</sup> I은 Dahlberg 등에 의해<sup>1)</sup> Taq DNA polymerase의 5' exonuclease activity domain만으로 구성되어, 이미 상술한 바와 같은 특이적인 endonuclease 활성을 가진 것으로 개발되었다.



그림 1 Cleavase<sup>®</sup> I의 절단부위

### ▶ CFLP<sup>®</sup>란

PCR로 증폭한 단편을 열변성한 후 냉각하면 동일분자내에서 이차구조를 형성하여 특이적인 hairpin 구조를 가지는 single strand DNA가 된다. 그 구조는 DNA 배열에 의존하므로 한 군데에서만 point mutation이 발생하여도 2차구조가 변화한다. 이 single strand DNA를 Cleavase<sup>®</sup> I으로 부분 소화하여 전기영동 하면 야생형과 변이형 사이의 차이가 드러나므로 양자를 비교하므로써 변이 검출이나 typing할 수 있다(그림 2).

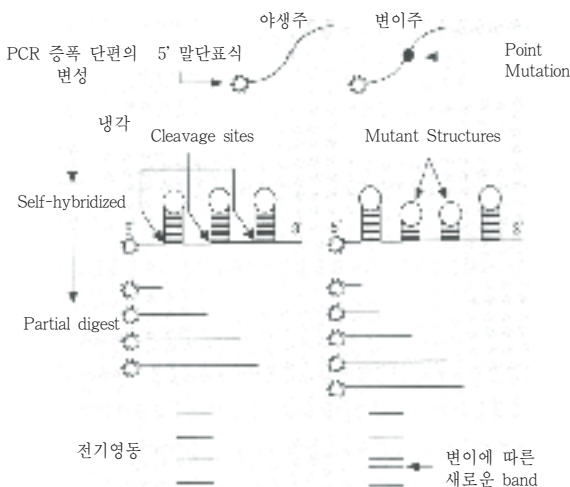


그림 2 CFLP<sup>®</sup>의 원리

### ▶ 특징

- 100 ~ 2,000 bp의 PCR product의 변이를 검출 가능
- 다검체 처리 가능
- 높은 재현성
- SSCP나 DGGE보다 조건검토가 쉽고 정확도가 높다.
- 전기영동 결과로부터 변이 여부 및 그 위치를 확인
- 5'말단표식으로 RI 및 non-RI 모두 사용 가능

### CFLP<sup>®</sup> Scanning system Reagent Kit-S (0.1 ~ 1.0 kb의 단편해석용)

TaKaRa Code 6620	100 반응분	750,000원
Kit의 내용		
Cleavase <sup>®</sup> I Enzyme(25 U/ $\mu$ l)		100 $\mu$ l
10 $\times$ CFLP <sup>®</sup> Buffer		200 $\mu$ l
2 mM MnCl <sub>2</sub>		200 $\mu$ l
CFLP <sup>®</sup> Stop Solution		1.0 ml $\times$ 2
CFLP <sup>®</sup> Fluoro Stop Solution		1.0 ml $\times$ 2
DNA Dilution Buffer		1.3 ml
Wild Type Control DNA-S1 (516 bp tyrosine kinase 유전자, Biotin 표식)		20 $\mu$ l
Wild Type Control DNA-S2 (516 bp tyrosine kinase 유전자, TET 표식)		20 $\mu$ l
Mutant Control DNA-S1 (516 bp tyrosine kinase 유전자, Biotin 표식)		20 $\mu$ l
Mutant Control DNA-S2 (516 bp tyrosine kinase 유전자, TET 표식)		20 $\mu$ l

### CFLP<sup>®</sup> Scanning system Reagent Kit-L (0.5 ~ 2.0 kb의 단편해석용)

TaKaRa Code 6621	75 반응분	
Kit의 내용		
Cleavase <sup>®</sup> I Enzyme (25 U/ $\mu$ l)		75 $\mu$ l
10 $\times$ CFLP <sup>®</sup> Buffer		200 $\mu$ l
2 mM MnCl <sub>2</sub>		200 $\mu$ l
2 mM MgCl <sub>2</sub>		200 $\mu$ l
CFLP <sup>®</sup> Stop Solution		1.0 ml $\times$ 2
CFLP <sup>®</sup> Fluoro Stop Solution		1.0 ml $\times$ 2
DNA Dilution Buffer		1.3 ml
Wild Type Control DNA-L1 (1,059 bp tyrosine kinase 유전자, Biotin 표식)		20 $\mu$ l
Wild Type Control DNA-L2 (1,059 bp tyrosine kinase 유전자, TET 표식)		20 $\mu$ l
Mutant Control DNA-L1 (1,059 bp tyrosine kinase 유전자, Biotin 표식)		20 $\mu$ l
Mutant Control DNA-L2 (1,059 bp tyrosine kinase 유전자, TET 표식)		20 $\mu$ l

▶ **조작순서**

Primer의 5' 말단표식(형광물질, biotin, <sup>32</sup>P 등)  
 ↓  
 PCR 증폭  
 ↓  
 증폭 단편의 정제  
 ↓  
 반응액을 조제한 후 열변성(95°C, 15초)  
 ↓  
 최적반응온도까지 냉각(50~75°C)  
 ↓ ← Cleavase® I 첨가 및 반응개시  
 1 ~7분간 반응  
 ↓ ← 반응온도 조건에서 Stop solution 첨가  
 Denatured polyacrylamide gel electrophoresis  
 ↓  
 Autoradiography, Chemiluminescence 등에 의한 검출



**실험에 1 : p53 exon 5/6의 CFLP®에 의한 변이검출(그림 3)**

p53cDNA clone의 exon5/6영역을 TET로 표식한 primer로 PCR 증폭을 실시하고, 얻은 471 bp의 증폭단편을 열변성한 뒤 다시 냉각하여 Cleavase® I을 45°C에서 4분간 처리하였다. 10% polyacrylamide gel(7 M urea)에서 전기영동을 실시한 후 형광 image analyzer하여 FMBIO® II Multi-View를 이용하여 변이를 검출하였다.

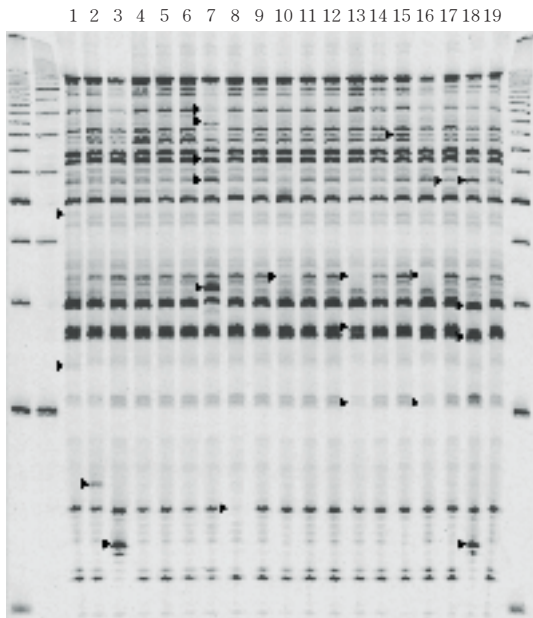


그림 3 CFLP®에 의한 p53 exon 5/6 영역의 변이검출

Lane	변이 열기(position)	Lane	변이 열기(position)
1	A→G (13167)	11	정상형
2	A→G (13170)	12	정상형
3	A→G (13463)	13	C→T (13109)
4	정상형	14	정상형
5	정상형	15	C→T (13061)
6	정상형	16	C→T (13109)
7	T→C (13274)	17	G→A (13352)
8	T→C (13422)	18	G 결실 (13352)
9	정상형	19	A→G (13463)
10	T→C (13124)		정상형
	G→T (13347)		

primer :

forward = TET-5' -TTTCAACTCTGTCTCCTTCC-3'  
 (position : 13,025-13,043)  
 reverse = TET-5' -CGGAGGGCCACTGACAACCA-3'  
 (position : 13,494-13,475)



**실험에 2 : HCV의 CFLP®에 의한 typing (그림 4)**

각 type의 HCV(Human Cytomegalovirus) clone의 5' untranslated region을 TET 표식한 primer로 PCR증폭을 실시하였다. 244 bp의 증폭단편을 열변성하고 냉각시킨 후 Cleavase® I을 1 mM MgCl<sub>2</sub> 함유 buffer에서 45°C, 4분간 처리하였다. 10% polyacrylamide gel(7 M urea)에서 전기영동을 실시한 후 FMBIO® II Multi-View를 이용하여 전기영동 패턴을 조사하였다.

primer :

forward = TET-5' GCAGAAAGCGTCTAGCCATGG-3'  
 (position : 274-251)  
 reverse = 5' CTGGCAAGCACCTATCAGGC-3'  
 (position : 30-54)

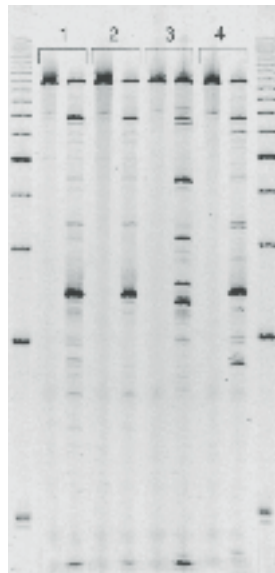


그림 4 CFLP®에 의한 HCV typing

Lane  
 1 : Subtype 1a  
 2 : Subtype 2b  
 3 : Subtype 2c  
 4 : Subtype 3a  
 각각의 왼쪽 lane은 Cleavase® I 미처리

[참고문헌]

- 1) Lyamichev, V. et al. (1993) *Science* **260**, 778.
- 2) Rossetti, S. et al. (1997) *Molecular and Cellular Probes* **11**, 155.
- 3) Brow, M.A.D. et al. (1996) *J. Clin. Microbiol* **34**, 3129

[주의]

본 제품에는 PCR용 시약이 함유되어 있지 않으므로 TaKaRa Taq™(TaKaRa Code R001A), TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code RR001A), TaKaRa LA PCR™ Kit Ver. 2(TaKaRa Code RR013A) 등과 함께 사용해 주시기 바랍니다.

처음으로 면역조직화학적 염색을 실시하는 분들을 위한

# 면역 조직 화학 염색법의 기초

## ▶ 서론

면역조직(세포) 화학염색은 면역항체반응을 이용하여 조직이나 세포중의 특정 물질을 특이적으로 검출하는 방법이다.

이 방법은 병리학 분야에서는 조직진단 및 세포진단법 중 하나로서 일찍이 도입되었으나, 최근에는 세포생물학 및 의학을 중심으로 자연과학의 폭넓은 분야까지 응용되고 있다. 한편 새로운 염색방법과 항체의 개발로 새로운 방법들이 속속히 개발되고 있어 여러 분야의 연구자들이 보다 간편하게 연구를 수행할 수 있게 되었다. 항원항체 반응을 이용하므로써 목적물질(항원)의 localization도 확인할 수 있다. 항원에 대한 항체의 결합은 특이성이 높아서 감도가 아주 좋다. 양자의 결합을 그 상태로 현미경으로는 관찰할 수는 없으나 항체를 marker(형광, 효소, 금속 등)로 표식하므로써 가능하다. 그 방법으로는 목적의 항원에 대한 항체에 marker 물질을 직접 표식하는 직접법과 목적의 항원에 대한 항체(1차항체)에는 표식하지 않고 그 항체에 대한 항체(2차항체)를 표식하는 간접법 등의 2가지가 있다. 본 고에서는 peroxidase로 표식한 2차항체를 이용한 간접법을 예를 들어, paraffin 절편의 염색에 관해서 설명한다.

## ▶ Paraffin 절편의 염색

### (1) 항체 보존 방법

염색을 위해서는 우선 항혈청 또는 항체를 준비해야 한다. 그리고 동일한 재현성을 항상 유지하기 위해서는 적절히 보관하여야 한다. 항혈청 또는 정제항체를 입수한 채로 보존하는 경우, 방부제를 첨가해 주면 열화는 어느 정도 방지할 수 있다. 그러나 희석한 항체를 사용후에 장기간 보존할 경우에는 희석시 1% BSA를 함유하는 PBS 또는 대체할 수 있는 기지의 단백질 용액을 이용할 필요가 있다. 어떻든 가능하면 원액 상태로 4°C에서 보존하는 것이 좋다. 보다 장기간 보존하기 위해서는 deep freezer(-80°C)에서 보존해야 한다. 이 경우는 반복적인 동결융해를 피하기 위해 소량씩 분주(10~50 μl)해 두는 것이 좋다(단, 항체에 따라 동결할 수 없는 것이 있으니 각 제조회사의 주의사항에 따라 보존한다). 또 방부제가 함유되어 있지 않은 항혈청 또는 항체에서 잡균에 의한 오염 가능성이 있는 경우는 방부제(예를 들면 0.1% sodium azide 및 Proclin-300[ZYMED사] 등)를 첨가해 준다. 그러나 배양세포 등을 이용한 생체계 실험에 이용할 가능성이 있는 경우는 방부제의 첨가를 피하는 것이 좋다. 또 sodium azide는

peroxidase의 작용을 저해하므로 POD 표식항체에는 첨가하지 않는다.

### (2) 시약

- Xylene
- Ethanol (100%, 90%, 80%)
- 증류수
- Washing buffer(PBS[TaKaRa Code T900] 또는 TBS [TaKaRa Code T903])
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 항체(1차 항체, 표식 2차 항체)
- 항체 희석액(Blockase[대일본제약], BSA 등)
- 발색기질 DAB[SIGMA/DAKO] 등)
- 대비염색액(Hematoxylin 또는 Methyl Green)
- Mount medium(봉입제)

### (3) 기구 및 시약

Coplinzar(슬라이드 염색 받드), Micropipette, Microtube, humidity chamber, Cover slip, Cover glass, 핀셋, 현미경

### (4) Formalin 고정 paraffin 절편의 염색 순서

조직의 고정과 paraffin 포매 및 박절의 조작순서에 관한 설명은 생략하고 여기서는 탈 파라핀조작부터 설명한다.

#### [탈 파라핀 조작]

Xylene(5분) → Xylene(5분) → Xylene(5분) →  
 100% ethanol(5분) → 100% ethanol(5분) → 90% ethanol(5분) →  
 80% ethanol(5분) → 흐르는 물에 세정 → 증류수에 침지

주) 실온이 낮은 경우는 탈파라핀을 충분히 할 수 없는 경우가 있으므로 Xylene에 침지하는 시간을 충분히 길게하여 파라핀을 제거해 주시기 바랍니다.

면역, 조직, 화학적 염색은 항원항체반응을 이용하여 조직이나 세포중의 특정물질을 특이적으로 검출하는 방법으로서 폭 넓게 활용되고 있다. 이번 호의 실험강좌에서는 면역조직 화학염색법의 기초(1)로서 조직절편의 염색법을 소개한다.

# - 조직절편 -

## ▶ 효소항체법

효소항체법의 염색키트로서 현재 우수한 제품들이 많이 시판되고 있지만, 여기서는 이 중 비교적 간편하게 단시간에 염색할 수 있고 고감도로 검출할 수 있는 2가지의 방법을 소개한다.

### (1) Streptoavidin-Biotin법

1. 항원 부활처리 (항원이 formalin 고정에 의해 mask 되어 있는 경우)

효소처리(pepsin, trypsin, proteinase K 등)  
또는 가열처리(autoclave, 은욕, micro파 등)

2. Blocking (필요한 경우)

내인성 peroxidase의 blocking

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 엮어서 반응 5분  
반응 후 TBS(또는 PBS)로 세정 5분×1회

내인성 biotin의 blocking

15 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>를 함유하는 0.1% avidin용액을 엮어서 반응 10분  
반응 후 TBS(PBS)로 헹구어 TBS(PBS)에 침지 5분×1회  
15 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>를 함유하는 0.01% biotin 용액을 엮어서 반응 10분  
반응 후 TBS(PBS)로 헹구어 TBS(PBS)에 침지 5분 5분×1회

비특이적 반응의 blocking

Blockase 원액 또는 1% BSA/TBS(PBS)를 엮는다 5~15분  
반응 후 TBS(PBS)로 헹구어 TBS(PBS)에 침지 5분 5분×3회

3. 1차 항체의 반응

1차 항체(5~10 μg/ml)를 엮어서 반응 2~30분  
(2~5 μg/ml의 저농도로 4°C에서 하룻밤 반응시켜도 된다)  
항체희석액 : 25% blockase/TBS(PBS) 또는 1% BSA/TBS(PBS)  
반응 후 TBS(PBS)로 헹구어 TBS(PBS)에 침지 5분×3회

4. Biotin 표식 2차항체의 반응

Biotin 표식 2차항체를 엮어서 반응 10~30분  
반응 후 TBS(PBS)로 헹구어 TBS(PBS)에 침지 5분×3회

5. Peroxidase 표식 Streptoavidin의 반응

Peroxidase 표식 Streptoavidin을 엮어서 반응 10~30분  
반응 후 TBS (PBS)로 헹구어 TBS(PBS)에 침지(충분히 세정한다) 5분×3~4회

6. Peroxidase의 표식

DAB 사용시 제조 5~10분  
DAB 기질용액으로 발색(차색)  
증류수로 씻어 내리고 증류수에 침지

7. 핵대비염색 (핵염색)

Mayer's hematoxylin 액(또는 3% Methyl Green)에 침지 수초~수분  
흐르는 물로 씻어낸다(hematoxylin) 10분~15분  
(Methyl green의 경우는 여분의 염색액을 가볍게 물로 씻어낸 후 바로 탈수하여 투철조작으로 넘어간다)

8. 탈수 및 투철

80% Ethanol → 90% Ethanol → 100% Ethanol →  
100% Ethanol → Xylene → Xylene → Xylene

9. 봉입

Mount medium으로 봉입한다.

### (2) 2단계법(2차 항체에 peroxidase표식 dextran결합 항체를 이용한 방법 ; ENVISION+[DAKO사])

1. 내인성 peroxidase의 blocking 5분
2. 1차항체의 반응 30분
3. ENVISION+ polymer의 반응 30분
4. Peroxidase의 발색 5분~10분
5. 핵대비염색
6. 탈수, 투철, 봉입

### ▶ 주의점

- 비특이적인 항체반응이 일어나지 않으며 염색조작이 제대로 실시되었는가를 확인하기 위하여 처음에는 반드시 검체와 함께 control도 염색해야 한다.
- 반응시간이나 1차 항체의 농도는 조직절편의 상태에 따라 차이가 있으므로 상세한 검토가 필요한 경우도 있다.
- 염색 조작을 실시하는 동안에는 조직절편이 건조되지 않도록 cover slip이나 습윤상을 사용하고, 반응액이 조직 위에 균일하게 엮어지도록 한다.
- 반응은 모두 상온에서 실시할 수 있다.



# pET CBD Fusion System

## Cellulose binding domain을 이용한 새로운 Tag system

### ▶ Cellulose binding domain 이란

Cellulose는 안정하고 우수한 물리적 특성을 갖는 담체이다. Cellulose를 affinity 정제의 담체로 사용하기 위해서는 생리 활성 단백질과 cellulose 담체와의 결합을 증가하는 것이 필요하다. 이 때문에 cellulose에 특이적으로 결합하는 cellulose binding domain(CBD)의 사용이 시도되어 왔다.

목적 단백질을 CBD와 융합시킨 형태로 발현시키므로써 그 단백질을 cellulose 담체로 affinity 정제할 수 있다. 지금까지 CBD와 효소단백질, Protein A, streptoavidin, alkaline phosphatase 등과의 융합단백질의 발현 및 정제가 보고되었다. CBD는 지금까지 120종 이상의 배열이 밝혀져 있는데, 그 유사성에 의해 11개 이상의 family로 분류하고 있다<sup>1),2)</sup>. 특히 I형부터 IV형까지의 family에 대하여는 잘 연구되어 있어, 발현용 Tag로서 세포질 또는 periplasm에서의 발현이나 융합단백질의 정제에 이용되고 있다<sup>3-9)</sup>. pET system은 이중 표 1에 나타낸 3종류의 배열을 사용하고 있다.

표 1 Novagen사 vector중의 CBD · Tag

CBD · Tag	CBD Family	Molecular Wt.	Protein Source
CBD <sub>clos</sub> · Tag	Ila	17.0 kDa	Cellulose-binding Protein A; <i>Clostridium cellulovorans</i>
CBD <sub>cenA</sub> · Tag	Ila	11.7 kDa	Endo-1,4-β-glucanase A; <i>Cellulomonas fimi</i>
CBD <sub>cex</sub> · Tag	Ila	10.8 kDa	Endo-1,4-β-glucanase A; <i>Cellulomonas fimi</i>

표 2 pET CBD vector의 특징 일람

Vector	CBD Type	CBD Size	CBD Location	Signal seq.	Protease sites	S · Tag	C-Term. His · Tag	T7 lac Promoter	Kan <sup>r</sup>	f1 ori
pET-34b(+)	Clos	17.0 kDa 158 aa	N-term	No	Tb, Ek	Yes	Optional	Yes	Yes	Yes
pET-35b(+)	Clos	17.0 kDa 158 aa	N-term	No	Tb, Xa	Yes	Optional	Yes	Yes	Yes
pET-36b(+)	CenA	11.7 kDa 114 aa	N-term	Yes	Tb, Ek	Yes	Optional	Yes	Yes	Yes
pET-37b(+)	CenA	11.7 kDa 114 aa	N-term	Yes	Tb, Xa	Yes	Optional	Yes	Yes	Yes
pET-38b(+)	Cex	10.8 kDa 107 aa	C-term	Yes	Tb	No	Yes	Yes	Yes	Yes

aa=amino acid, CBD=cellulose binding domain, kDa=kilo dalton, Ek=enterokinase, kan<sup>r</sup>=kanamycin resistance, Tb=thrombin, Xa=Factor Xa

CBD II 및 III는 비결정성 및 결정성 cellulose나 chitin과 강하게 결합하여 여러 가지 조건에서 용출한다. CBD와 융합한 상태라도 목적 단백질의 활성이 유지된다는 보고<sup>3-5, 7)</sup>나 CBD와의 융합에 의해 목적 단백질의 열안정성이 향상된다는 보고<sup>6)</sup>도 있다. 다양한 형태의 cellulose 담체(beads, powder, 섬유, 막, hydrogel, filter, sheet)를 사용할 수 있는 것도 CBD · Tag의 특징이다.

### ▶ pET CBD vector에 관하여

현재 크게 나누어서 5종류의 pET CBD vector를 사용하고 있다. 그 특징을 표 2에 그리고 multicloning site의 주변영역을 그림 1에 나타내었다.

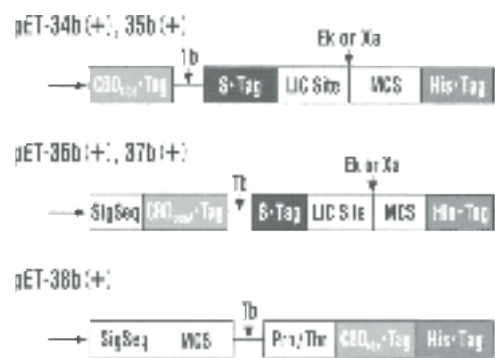


그림 1 pET CBD vector의 모식도

모든 vector는 T7 lac promoter, kanamycin resistance marker, 그리고 ssDNA의 조제를 위한 f1 origin을 갖고 있다. 또 PCR산물의 cloning이 쉽도록 pET-34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다. 34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다. 34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다. 34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다.

### ▶ pET-34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+)

융합단백질의 N말단에 CBD · Tag을 부가한 경우는 34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다. 34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다. 34b(+), 35b(+), 36b(+), 37b(+), 38b(+), 또는 각각의 LIC vector를 사용할 수 있다.

가지므로 periplasm으로 분비된다. 34b(+), 36b(+)  
 Thrombin과 enterokinase를, 35b(+), 37b(+)  
 Thrombin과 Factor Xa 절단부위를 갖는다. 이 4  
 종류의 vector는 검출, 정량, 정제에 사용하는  
 S·Tag배열을 갖고 있으며, Factor Xa 또는  
 enterokinase로 절단하므로 목적단백질과  
 CBD·Tag 및 S·Tag배열을 잘라낼 수 있다.  
 또, Thrombin으로 절단한 경우는 CBD·Tag  
 만을 잘라낸다. 이러한 vector는 C 말단에  
 His·Tag를 추가할 수 있으므로 정제효율을  
 높이거나 2단계 정제에 의해 완전한 길이의  
 발현산물만을 분리할 수도 있다.

### ▶ pET-38b(+)

pET-38b(+)  
 vector에서의 CBD·Tag는 목적단백질의 C  
 말단에 추가되어 있다. 따라서 insert가 stop  
 codon을 갖고 있지 않은 경우 codon이 어긋나지  
 않도록 맞춤 필요가 있다. CBD·Tag를 제거  
 하기 위해서 multicloning site는 Thrombin  
 절단위치의 상류에 위치하도록 설계하였다.  
 짧은 proline-threonine(PT)배열이 Thrombin  
 절단위치와 CBDcex 배열 사이에 위치한다  
 (PT배열은 천연의 cellulase로도 CBD배열과  
 촉매활성 영역을 나눌 수 있도록 존재한다).  
 융합단백질을 2단계로 정제할 수 있도록  
 His·Tag 배열을 CBDcex domain의 C말단  
 측에 추가하였다.

### ▶ CBD 융합단백질의 정제

세포질, periplasm 또는 배지 중에 축적 또는  
 누출된 CBD 융합단백질은 전용의 column,  
 cartridge, resin, 그리고 흡인장치 등(표 3)  
 을 사용하여 정제할 수 있다.

정제하는 융합단백질의 양에 따라 각 형태  
 의 CBIND 제품을 이용할 수 있다.

CBIND resin에 흡착한 융합단백질은  
 ethylene glycol, 물, 저염농도용액 등으로  
 용출할 수 있다. 용출조건은 CBD의 종류와  
 목적단백질에 따라 다르다. CBD의 종류에  
 따라, 예를 들면, 물, 저염농도(< 5 mM  
 NaCl) 용액, pH9 이상의 buffer 등이  
 용출액으로 이용된다. Ethylene glycol은  
 모든 형태의 CBD를 효율적으로 용출할 수  
 있어 온화한 용출액으로서 일반적으로  
 이용되고 있다.

CBD·Tag·BAP 융합단백질의 정제법을  
 그림 2에 나타내었다. CBIND cartridge에  
 의해 융합단백질이 배지중에서 고순도로  
 정제할 수 있음을 알 수 있다.

표 3 CBD·Tag 융합단백질 정제관련 제품

제품명	흡착성능 등
CBIND ReadyRun Columns	~10 mg protein/run
CBIND 300 Cartridge	1.5 mg protein, 연결사용 가능
CBIND 900 Cartridge	4.5 mg protein, 연결사용 가능
CBIND 100 Resin	~40 mg protein/g dry resin, batch 정제용
CBIND 200 Resin	5 mg protein/g dry resin, 고유속용 (600 ml·cm <sup>2</sup> /h)
Novagen Vacuum Manifold	~12 시료까지 동시처리 가능

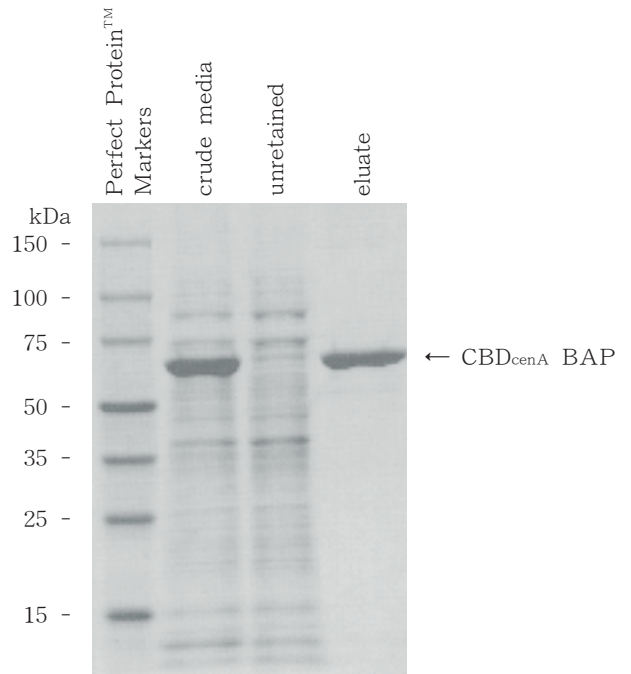


그림 2 CBIND 300 Cartridge와 CBIND Buffer Kit을 이용한  
 CBDcenA·BAP 융합단백질의 정제

Bacterial alkaline phosphatase(BAP) 유전자를 재조합한 pET-36 LIC  
 Vector로 형질전환한 BL21(DE3)주를 배양하고, induction 후의 배지 5  
 ml을 CBIND 300 Cartridge와 CBIND Buffer Kit을 이용하여 정제하였다.  
 SDS-PAGE(4~20% gradient) 후 comassie brilliant blue로 염색하였다.

### [pET CBD Fusion System의 내용]

pET Vector DNA	10 µg
Induction Control glycerol stock	0.2 ml
BL21 glycerol stock	0.2 ml
BL21(DE3) glycerol stock	0.2 ml
BL21(DE3) pLysS glycerol stock	0.2 ml
CBIND 300 Cartridge	5
CBIND 900 Cartridge	5
Elution Reagent	20 ml
Novagen Vector Diskette	1

pET CBD Fusion system plus Competent cells의 경우는 위  
 의 내용물 이외에 아래의 component가 추가된다.

NovaBlue Competent Cells	0.2 ml
BL21(DE3) Competent Cells	0.2 ml
BL21(DE3) pLysS Competent Cells	0.2 ml
SOC Medium	2 × 2 ml
Test Plasmid	5 µl

## [참고문헌]

- Tomme, P., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Jr., Kilburn, D.G. and Gilkes, N.R. (1995) In *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, Saddler, J.N. and Penner, M.H., Eds. American chemical Society, Symposium Series **618**, 142-163.
- Tomme, P., Warren, R.A.J. and Gilkes, N.R. (1995) *Advances Microb. Physiol.* **37**, 1-81
- Greenwood, J.M., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Jr. and Warren, R.A.J. (1989) *FEBS Lett.* **244**, 127-131
- Ong, E., Gilkes, N.R., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Jr. and Kilburn, D.G. (1989) *Bio/Technol.* **7**, 604-607.
- Greenwood, J.M., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Jr., Kilburn, D.G. and Warren, R.A.J. (1994) *Biotech. and Bioengin.* **44**, 1285-1305
- Ong, E., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Jr., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G. (1991) *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 59-65.
- Greenwood, J.M., Ong, E., Gilkes, N.R., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Jr., and Kilburn, D.G. (1992) *Protein Engin.* **5**, 361-365
- Ramirez, C., Fung, J., Miller, R.C., Jr., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G. (1993) *Bio/Technol.* **11**, 1570-1573.
- Le, K. D., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Jr., Saddler, J. N. and Warren, R.A.J. (1994) *Enzym Microb. Technol.* **16**, 496-500.

## ▶ pET CBD Fusion System 제품 목록

제품명	TaKaRa Code	Novagen Code	포장량	가격
pET CBD Fusion System 34b	NV760	70110-3	1 Kit	453,600원
pET CBD Fusion System 34b plus Competent Cells	NV7601	70112-3	1 Kit	583,200원
pET CBD Fusion System 35b	NV761	70111-3	1 Kit	453,600
pET CBD Fusion System 35b plus Competent Cells	NV7611	70113-3	1 Kit	583,200
pET CBD Fusion System 36b	NV765	70146-3	1 Kit	453,600
pET CBD Fusion System 36b plus Competent Cells	NV7651	70148-3	1 Kit	583,200
pET CBD Fusion System 37b	NV766	70149-3	1 Kit	453,600
pET CBD Fusion System 37b plus Competent Cells	NV7661	70150-3	1 Kit	583,200
pET CBD Fusion System 38b	NV767	70151-3	1 Kit	453,600
pET CBD Fusion System 38b plus Competent Cells	NV7671	70152-3	1 Kit	583,200
pET-34b (+) DNA	NV758	70102-3	10 $\mu$ g	237,600원
pET-35b (+) DNA	NV759	70103-3	10 $\mu$ g	237,600원
pET-36b (+) DNA	NV762	70133-3	10 $\mu$ g	237,600원
pET-37b (+) DNA	NV763	70135-3	10 $\mu$ g	237,600원
pET-38b (+) DNA	NV764	70137-3	10 $\mu$ g	237,600원
pET-34 LIC Vector Kit	NV858	70114-3	20회	594,000원
pET-35 Xa/LIC Vector Kit	NV859	70115-3	20회	594,000원
pET-36 LIC Vector Kit	NV866	70145-3	20회	594,000원
pET-37 Xa/LIC Vector Kit	NV868	70153-3	20회	594,000원
pET-34 LIC Vector DNA	NV864	70100-3	1 $\mu$ g	248,400원
pET-35 Xa/LIC Vector DNA	NV865	70101-3	1 $\mu$ g	248,400원
pET-36 LIC Vector DNA	NV867	70134-3	1 $\mu$ g	248,400원
pET-37 Xa/LIC Vector DNA	NV869	70136-3	1 $\mu$ g	248,400원
CBD <sub>cloS</sub> · Tag primer	NV780	70118-1	500 pmol	97,200원
CBD <sub>benA</sub> · Tag primer	NV789	70141-3	500 pmol	97,200원
CBD <sub>dex</sub> LEAD primer	NV790	70142-3	500 pmol	97,200원
AS-CBD <sub>dex</sub> primer	NV791	70143-3	500 pmol	97,200원
CBD <sub>cloS</sub> · Tag Antibody	NV781	70119-3	50 $\mu$ l	205,200원
CBD <sub>cloS</sub> · Tag Protein Solubilization Kit	NV785	70123-3	1 Kit	162,000원
CBIND 100 resin	NV782	70120-3	50 ml	86,400원
CBIND 200 resin	NV783	70121-3	50 ml	86,400원
CBIND 300 Catridges	NV786	70124-3	pkg/10	54,000원
CBIND 300 Catridges	NV7861	70124-4	pkg/50	216,000원
CBIND 900 Catridges	NV787	70132-3	pkg/10	64,800원
CBIND 900 Catridges	NV7871	70132-4	pkg/50	259,200원
CBIND ReadyRun Columns	NV788	70144-3	pkg/12	82,080원
CBIND ReadyRun Columns	NV7881	70144-4	pkg/62	328,320원
CBIND Buffer Kit	NV784	70122-3	1 Kit	162,000원
Novagen Vacuum Manifold	NV647	70147-3	1set	961,200원

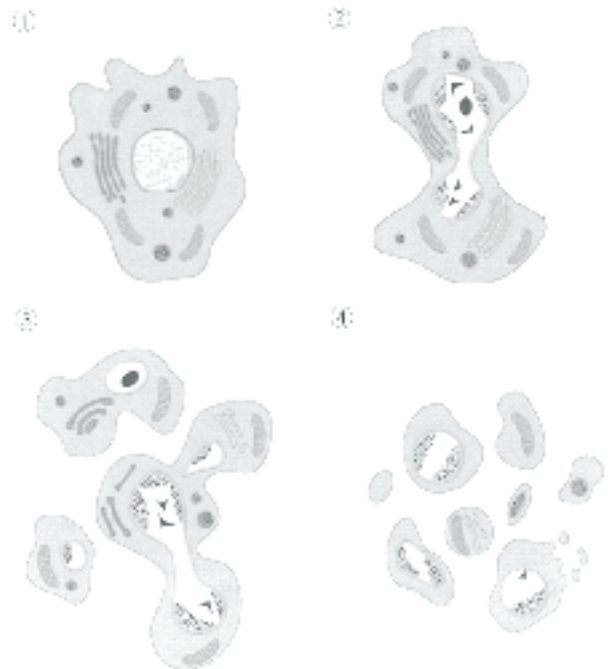


# Bender Med Systems Apoptosis 연구용 제품

TaKaRa는 Bender Med Systems의 고품질 apoptosis 연구용 제품을 Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership사로부터 수입 판매하고 있다. 본 고에서는 이 제품에 관하여 소개한다.

## ▶ APO-1/Fas

APO-1/Fas(CD95)는 1개의 transmembrane domain을 갖는 분자량 48 kDa의 세포표면 당단백질로서 TNF/NGF receptor superfamily에 속한다. B세포나 각종 T세포, 다양한 종양세포, 사람 정상조직(홍선, 폐, 심장, 간장, 난소 등)에서 그 발현이 확인되어 있다. APO-1 ligand나 APO-1항체 [Anti-APO-1/Fas(SM1/1)이나 Anti-APO-1/Fas(APO1-3 등)]의 작용에 의해 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 또 일부의 항 APO-1 항체[Anti-APO-1/Fas(SM1/23)]와 함께 세포를 preincubation 하면 APO-1 유도형 apoptosis가 억제된다는 사실이 밝혀져 있다. sAPO-1은 transmembrane domain이 결실된 가용성의 APO-1으로 각종 백혈병 환자나 전신성 에리테마토데스 환자의 혈청 중에 높은 수준으로 존재한다는 보고가 있다.



Apoptosis중의 형태변화

### (1) Monoclonal antibody

기능이 다른 monoclonal antibody를 준비하고 있다.

#### ● Apoptosis를 유도하는 항체

제품명	clone	subclass	표식	포장량	TaKaRa Code
Anti-APO-1/Fas (SM1/1)	SM1/1	Mouse IgG <sub>2a</sub>	비표식	1 ml (100 $\mu$ g/ml)	H138
Anti-APO-1/Fas (APO-1-3)	APO-1-3	Mouse IgG <sub>3</sub>	비표식	1 ml (100 $\mu$ g/ml)	H142
Anti-APO-1/Fas (APO-1-3)/BIOTIN	APO-1-3	Mouse IgG <sub>3</sub>	BIOTIN 표식	1 ml (100 tests)	H1421
Anti-APO-1/Fas (APO-1-3)/FITC	APO-1-3	Mouse IgG <sub>3</sub>	FITC 표식	1 ml (100 tests)	H1422

#### ● Apoptosis를 유도하지 않는 항체

제품명	clone	subclass	표식	포장량	TaKaRa Code
Anti-APO-1/Fas (SM1/17)	SM1/17	Mouse IgG <sub>1</sub>	비표식	1 ml (100 $\mu$ g/ml)	H139
Anti-APO-1/Fas (SM1/17)/FITC	SM1/17	Mouse IgG <sub>1</sub>	FITC 표식	1 ml (100 tests)	H1392

#### ● Apoptosis를 저해하는 항체

제품명	clone	subclass	표식	포장량	TaKaRa Code
Anti-APO-1/Fas (SM1/23)	SM1/23	Mouse IgG <sub>2b</sub>	비표식	1 ml (100 $\mu$ g/ml)	H140
Anti-APO-1/Fas (SM1/23)/BIOTIN	SM1/23	Mouse IgG <sub>2b</sub>	BIOTIN 표식	1 ml (100 tests)	H1401
Anti-APO-1/Fas (SM1/23)/FITC	SM1/23	Mouse IgG <sub>2b</sub>	FITC 표식	1 ml (100 tests)	H1402

## (2) ELISA Kit

가용성 APO-1 (sAPO-1)을 정량하는 kit이다.

### Human sAPO-1/Fas ELISA Kit

TaKaRa Code H230 96 test

농도 : 0.23 ~ 15 U/ml

감도 : 0.2 U/ml

시료용량 : 10  $\mu$ l

Assay 시간 : 185분

발색효소 : HRP(horse radish peroxidase)

기질 : TMB(tetramethylbenzidine)

### ▶ Annexin V-FITC

Annexin V는 calcium 의존적으로 phospholipid에 결합하는 Annexin family에 속하며 그중에서도 phosphatidyl serine (PS)에 높은 친화성을 갖는다. PS는 정상 혈구세포의 세포막 내측에 국재하는데 세포사가 일어나면 외측으로 이동한다. 이 현상은 세포막의 형태적 변화를 보이지 않는 apoptosis 초기에 일어나므로 FITC로 표식한 Annexin V를 이용함으로써 초기 apoptosis를 쉽게 검출·정량할 수 있다. 또 apoptosis가 일어나고 있는 세포막에는 propidium iodide(PI)가 유입되지 않으므로 Annexin V-FITC와 PI를 병용함으로써 apoptosis와 necrosis를 식별하여 apoptosis를 일으키고 있는 세포를 보다 확실하게 검출할 수 있다.

## (1) Apoptosis Detection Kit

### Annexin V-FITC Kit

TaKaRa Code H3061 300 test분

내용 : Annexin V-FITC 1.5 ml

4 × Binding Buffer 50 ml × 4

20  $\mu$ g/ml propidium iodide 1.6 ml × 4

Annexin V-FITC Kit을 사용한 flow cytometry

1. 4× Binding Buffer를 증류수로 4배 희석해 놓는다.

2. 세포를 PBS로 세정한다.

3. 희석한 Binding Buffer로 세포를 2~5×10<sup>5</sup> cells/ml이 되도록 현탁한다.

4. 195  $\mu$ l의 세포현탁액을 취하여 5  $\mu$ l의 Annexin V-FITC를 첨가한다.

5. 암실에서 10분간 실온배양한다.

6. 10  $\mu$ l의 propidium iodide를 첨가한다.

7. FACS(Fluorescence-activated cell sorting)로 분석한다.

## (2) Annexin V-FITC 단품

### Annexin V-FITC

TaKaRa Code H3062 100  $\mu$ l

본 제품은 대장균에서 생산한 재조합 human Annexin V의 FITC 표식물이다.

상기 kit의 20 test분에 상당하는 양이다.

### ▶ Cu/Zn SOD ELISA Kit

Cu/Zn Superoxidase Dismutase(Cu/Zn SOD)는 진핵세포의 세포질에 존재하는 분자량 32 kDa의 dimer구조를 갖는 효소로 2개의 subunit는 Cu<sup>2+</sup>와 Zn<sup>2+</sup>를 각각 1원자씩 함유하고 있다. SOD는 생체 내에서 발생하는 활성산소 O<sub>2</sub><sup>-</sup>로부터 O<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생산하는 반응을 촉매하고 O<sub>2</sub><sup>-</sup>에 의한 damage로부터 세포를 방어해 준다.

Cu/Zn SOD ELISA Kit은 세포막의 손상이나 세포 내 Cu/Zn SOD의 방출이 관찰되는 후기 apoptosis 세포의 정량에 사용할 수 있다.

### Human Cu/Zn SOD ELISA Kit

TaKaRa Code H222 96 test

농도 : 0.08 ~ 5 ng/ml

감도 : 0.07 ng/ml

시료용량 : 10  $\mu$ l

Assay 시간 : 75분

발색효소 : HRP(horse radish peroxidase)

기질 : TMB(tetra methylbenzidine)

## TaKaRa와 함께 할 Post-Doc 연구원을 모집합니다.

모집부문 : 유전공학을 중심으로 한 생명공학 연구용 제품, 기술의 연구 개발

자격 : 유전자를 이용한 각종 실험 등에 익숙한 관련전공의 박사 학위 소지자 또는 동등의 자격으로 인정할 수 있는 자

근무지 : TaKaRa Biotechnology(DALIAN) CO., LTD.  
대련, 중국

대우 : 자격과 경력 등을 고려, 상담에 의해 결정. 숙소 제공

제출서류 : 이력서, 자기소개서, 연구실적 목록 및 주요논문 별쇄

문의 및 접수 : 보한바이오테크놀로지(주) ☎135-272 서울 강남구 도곡2동 451-3

Tel. 02-577-2002 Fax. 02-577-3691



## 신제품 안내



형광편광도 측정시스템

### Full-Range BEACON<sup>®</sup> 2000

TaKaRa Code VP2370

PanVera사의 제품입니다.



DNA, RNase의 contamination 방지에

### DNA-OFF<sup>™</sup>, RNase-OFF<sup>™</sup>

DNA-OFF<sup>™</sup>

TaKaRa Code 9036      500 ml      50,000원

RNase-OFF<sup>™</sup>

TaKaRa Code 9037      500 ml      50,000원



귀중한 RNA 시료를 library로서 증폭·보존

### cDNA PCR Library Kit

TaKaRa Code 6119      20회      200,000원



### MPG Streptavidin

TaKaRa Code 6124A      2 ml (20 mg)      550,000원



mRNA 추출에서 cDNA library 제작까지

### Solid Phase cDNA Synthesis Kit

TaKaRa Code 6123      25회      550,000원



복잡한 2차구조를 가진 mRNA의 RT-PCR에

### BcaBEST<sup>™</sup> RNA PCR Kit Ver. 1.1

TaKaRa Code RR023A      50회      378,000원

TaKaRa Code RR023B      100회      656,000원



IPTG만 첨가해도 clone 선별이 가능한

### Positive Selection Vector pGATA

TaKaRa Code 3610      10 µg      200,000원



GC Rich DNA 증폭에 신기원

### LA Taq (GC buffer)

TaKaRa Code RR002AG      125 U      196,000원



효모·그람양성균으로부터의 genome DNA 추출에

### Dr. GenTLE<sup>™</sup> (효모·그람 양성균용)

TaKaRa Code 9083      50회      275,000원



PCR 후에 바로 전기영동할 수 있는

### PerfectShot<sup>™</sup> Ex Taq (Loading dye mix)

TaKaRa Code RR005A      48회      112,500원



Retronectin Vector를 이용한 고효율 유전자 도입에

### Retronectin<sup>™</sup> Dish

TaKaRa Code T110A      10 dishes      50회      500,000원



Mg free buffer 첨부

### Ex Taq (dNTP 첨부)

TaKaRa Code RR001AM      250 U      198,000원

Recombinant human Fibronectin Fragment "RetroNectin<sup>™</sup>"을 35 mm dish에 coating한 것입니다. 따라서 coating 조각이 필요 없고, 일정한 유전자 도입효율을 얻을 수가 있습니다.

**NEW** non-R1 핵산표식용 시약 **Label IT™**

Label IT™ Rhodamine Labeling Kit		
TaKaRa Code V3125	1 Kit(25 µg 용)	325,000원
TaKaRa Code V3100	1 Kit(100 µg 용)	1,040,000원

Label IT™ Fluorescein Labeling Kit		
TaKaRa Code V3225	1 Kit(25 µg 용)	325,000원
TaKaRa Code V3200	1 Kit(100 µg 용)	1,040,000원

Label IT™ Digoxin Labeling Kit		
TaKaRa Code V3325	1 Kit(25 µg 용)	325,000원
TaKaRa Code V3300	1 Kit(100 µg 용)	1,040,000원

Label IT™ Biotin Labeling Kit		
TaKaRa Code V3425	1 Kit(25 µg 용)	325,000원
TaKaRa Code V3400	1 Kit(100 µg 용)	1,040,000원

PanVera사의 제품입니다.

**NEW** **BcaBEST™ DIG Labeling Kit**

TaKaRa Code 6128	40회
------------------	-----

**NEW** **E-cadherin EIA Kit(Precoated)**

TaKaRa Code MK117	96회	875,000원
-------------------	-----	----------

**NEW** **SCDase**  
(Sphingolipid ceramide N-deacylase)

TaKaRa Code 4462	50 mU
------------------	-------

**NEW** Alkaline Phosphatase용 형광기질  
**HNPP-Fast Red TR, AttoPhos®**

HNPP-Fast Red TR		
TaKaRa Code AC001		500,000원

AttoPhos® Set		
TaKaRa Code J001		400,000원

**NEW** Lysophingo 당질의 기능 연구에  
**Lyso-gangliosides**

Lyso-GM1		
TaKaRa Code 4351	0.1 mg	375,000원

Lyso-GM2		
TaKaRa Code 4352	0.1 mg	375,000원

Lyso-GM3		
TaKaRa Code 4353	0.1 mg	375,000원

Lyso-GD1a		
TaKaRa Code 4354	0.1 mg	375,000원

**NEW** His · Taq 단백질용 면역 adjuvant **Z-Max™**

TaKaRa Code ZN001	5 ml	200,000원
-------------------	------	----------

**NEW** Human recombinant Protein  
**Estrogen Receptor(β), rHuman**

TaKaRa Code V2466	750 pmol	529,000원
TaKaRa Code V2467	3,750 pmol	2,137,000원

PanVera사의 제품입니다.

**NEW** N말단 block 단백질의 구조해석에  
**Pfu deblocking Aminopeptidase(DAP)**

TaKaRa Code 7338	50 µg
------------------	-------

**NEW** **E. coli DH5α**  
Competent cells      Electro-cells

TaKaRa Code 9057	TaKaRa Code 9027
------------------	------------------

**NEW** 식품, 환경미생물의 간이 검사 시스템  
**TaKaRa BIO CHECKER**

TaKaRa Code 9101
------------------