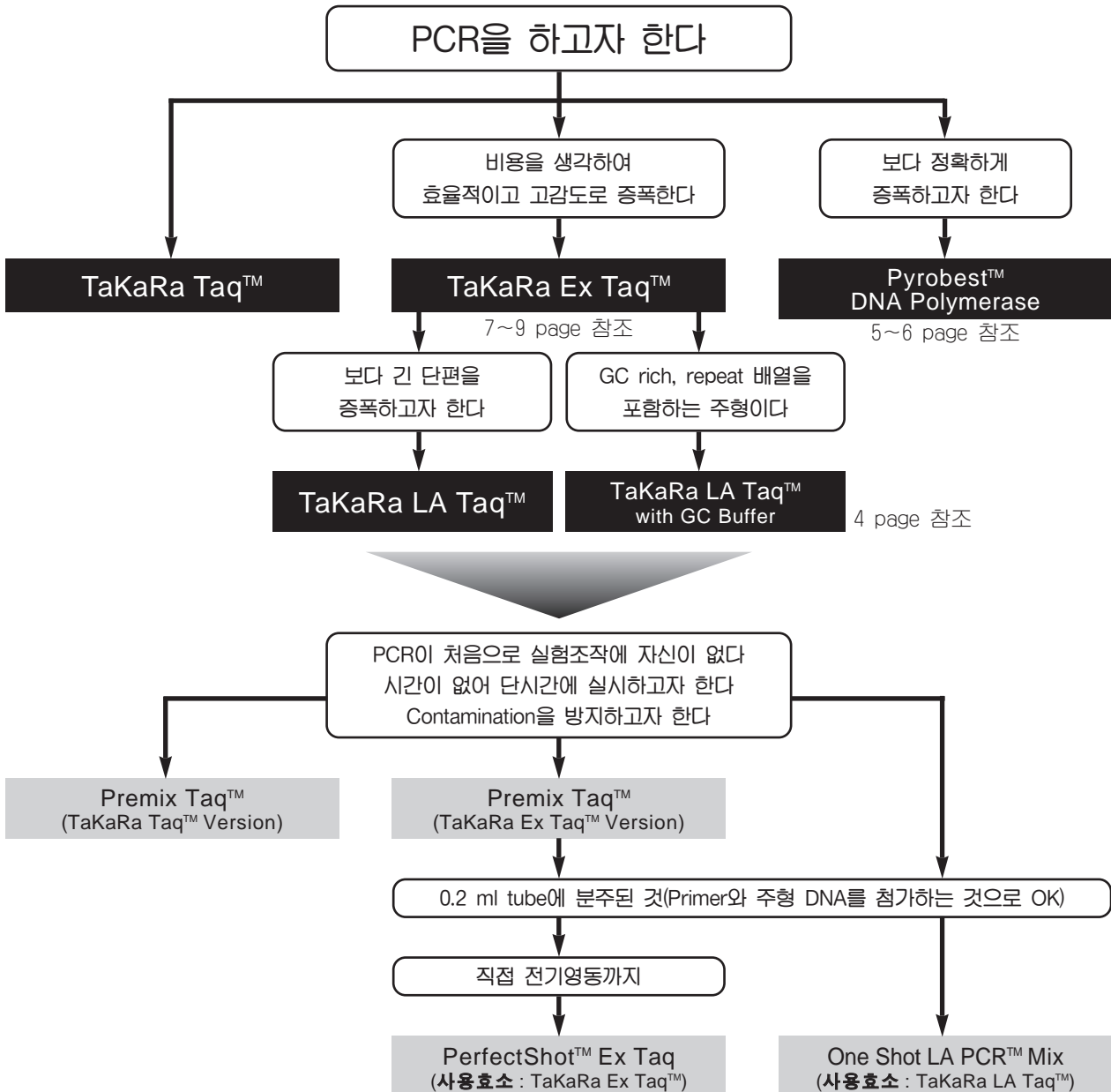


# TaKaRa PCR Enzymes

연구 목적에 맞추어, 풍부한 제품 중에서  
TaKaRa의 PCR Enzymes을 선택하여 주십시오.

TaKaRa는 TaKaRa Taq™ 발매 이래 연구자의 요구에 부응하여 여러 가지 PCR Enzyme 관련제품을 개발, 공급하여 왔다. 증폭능력을 향상시켜 PCR enzyme의 새로운 standard로 불리는 데 걸맞는 TaKaRa Ex Taq™, 증폭단편의 길이를 추구하는 TaKaRa LA Taq™ 그리고 실험시간의 단축이나 contamination을 방지하기 위해 미리 튜브에 필요한 시약을 분주해 놓은 Premix Taq™ series, One Shot series 등의 제품은 연구자 여러분의 대호평을 받고 있다.

이번에 보다 정확한 증폭이 가능한 Pyrobest™ DNA polymerase, GC rich 배열이나 repeat 배열을 갖고 있어 복잡한 2차구조를 형성하기 쉬운 주형의 증폭에 적당하도록 개발한 TaKaRa LA Taq™ with GC buffer, PCR 반응 후 그대로 전기영동 할 수 있는 PerfectShot™ Ex Taq을 새로 발매하게 되었으며, 새로운 포장의 제품을 추가하여 PCR에 익숙하지 않은 초심자에서 빈번하게 실시하는 연구자에 이르기까지 그 연구 용도에 적당한 제품을 선택할 수 있도록 PCR enzyme 관련제품의 구성을 충실히 하였다.



# TaKaRa PCR Enzymes

## 4제품의 비교

### TaKaRa Taq™/ TaKaRa Ex Taq™/ TaKaRa LA Taq™/ Pyrobest™ DNA Polymerase

TaKaRa PCR enzymes에는 TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™ 그리고 Pyrobest™ DNA polymerase의 4종류가 있으므로 각각의 용도에 맞도록 선택하여 사용하는 것이 좋다. 시료에 따라 증폭효율에 차이가 있으나 보다 효과적으로 증폭하기 위한 참고기준으로 아래의 표를 참조하면 편리하다.

#### ▶ 사용구분의 기준

증폭길이	TaKaRa Taq™ Pyrobest™ DNA Polymerase	< TaKaRa Ex Taq™	< TaKaRa LA Taq™
λ DNA			
양호하게 증폭	~6 kbp 정도	~20 kbp 정도	~35 kbp 정도
증폭가능 길이	~12 kbp 정도	~30 kbp 정도	~48 kbp 정도
human genomic DNA			
양호하게 증폭	~2 kbp 정도	~10 kbp 정도	~20 kbp 정도
증폭가능 길이	~4 kbp 정도	~20 kbp 정도	~30 kbp 정도
정확도(fidelity)	TaKaRa Taq™ < TaKaRa Ex Taq™ < TaKaRa LA Taq™ < Pyrobest™ DNA Polymerase		
증폭효율	TaKaRa Taq™ ≈ Pyrobest™ DNA Polymerase < TaKaRa LA Taq™ ≤ TaKaRa Ex Taq™		

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어지면 필요한 주형 DNA의 양이 많아집니다. 또 PCR 조건도 엄밀하게 됩니다. 자세한 내용에 관해서는 당사의 TaKaRa Biotechnology 생명공학 연구용 제품가이드 또는 Internet homepage 제품찾아보기를 이용하시기 바랍니다.

#### ▶ TaKaRa Taq™

일반적으로 1 kb이하의 단편을 증폭하는 경우는 TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™과 동등하게 양호한 증폭산물을 얻을 수 있다.

#### ▶ TaKaRa Ex Taq™

특히 길이가 ~15 kbp인 단편의 증폭에 사용하면 TaKaRa Taq™보다 적은 효소량(50~80%)으로 TaKaRa Taq™과 동등 또는 그 이상의 증폭산물을 얻을 수 있다. 또 TaKaRa Taq™에 의한 증폭에서는 검출할 수 없었던 시료도 TaKaRa Ex Taq™를 사용하므로써 검출할 수 있었던 예가 다수 보고되어 있다.

#### ▶ TaKaRa LA Taq™

어떠한 시료라도 사용할 수 있으나 특히 15 kbp 이상의 긴 단편의 증폭에 효과적이다. 또 GC rich 또는 반복배열을 갖고 있는 주형과 같이 2차구조를 형성하는 DNA의 증폭에는 TaKaRa LA Taq™ with GC buffer의 사용을 권장한다.

\* 통상의 길이(~2 kbp)의 증폭에는 감도, 증폭량, 시료량, PCR 조건의 범용성 그리고 정확도(fidelity)의 관점에서 TaKaRa Ex Taq™이 적합합니다.

#### ▶ Pyrobest™ DNA polymerase

Pyrobest™ DNA polymerase는 *Pyrococcus* sp. 유래의 초내열성 PCR enzyme이다. *Pyrococcus furiosus* 유래의 Pfu PCR enzyme과 동등하게 정확한 증폭이 가능할 뿐만 아니라 TaKaRa Taq™과 동등한 증폭효율을 얻을 수 있다. TaKaRa Taq™ 등의 Taq DNA polymerase와 달리 hot start법을 사용하지 않아도 비특이적인 증폭이 일어나지 않는 것도 특징이다.

## 복잡한 2차 구조를 갖는 주형 DNA의 증폭에 위력을 발휘!

# TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer

TaKaRa Code RR02AG	125 U	196,000원
TaKaRa Code RR02BG(AG×4)	500 U	705,600원

TaKaRa LA Taq™은 3' → 5' exonuclease 활성(proofreading 활성)을 이용한 TaKaRa LA Technology를 구사하여 개발한 DNA polymerase이다. 긴 단편을 증폭하고자 하는 경우, 특히 15 kbp 이상의 경우에 그 위력을 발휘한다.

그러나 TaKaRa LA Taq™을 사용하여도 주형이 GC rich인 배열 또는 반복배열(repeat sequence)을 갖고 있어 증폭이 되지 않는 경우가 있다. 이같은 복잡한 2차 구조를 형성하는 주형을 증폭할 수 있도록 TaKaRa LA Taq™의 LA PCR™ buffer를 개량하여 최적화한 buffer를 개발하는데 성공하였다. TaKaRa LA Taq™ with GC buffer는 이 전용의 GC buffer를 TaKaRa LA Taq™에 첨부한 제품이다.

### ▶ 내용

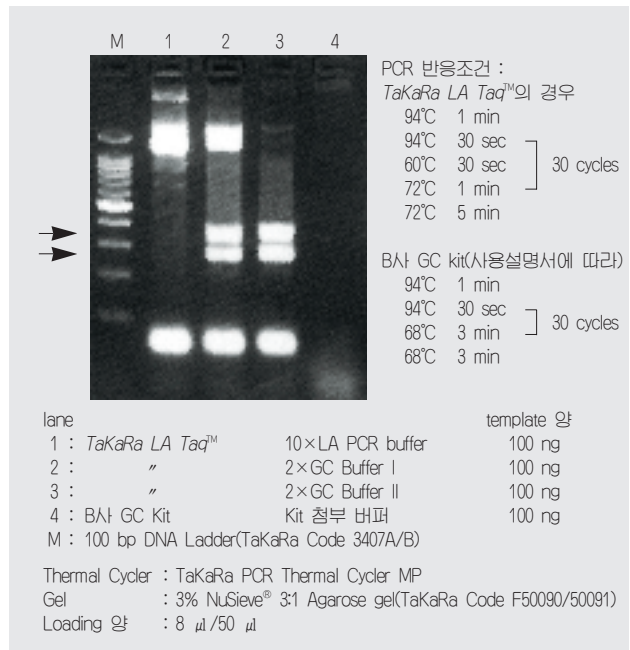
TaKaRa LA Taq™(5 U/μl)	125 U
2× GC Buffer I	1.25 ml
2× GC Buffer II	1.25 ml
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	400 μl



### 실험예 CAG repeat 배열을 갖는 GC rich한 주형의 증폭

TaKaRa LA Taq™과 새로 개발한 GC buffer 및 종래의 buffer를 각각 조합하여 사용한 것과 B사의 GC Kit를 사용하여 Huntington병 유전자(HD 유전자 IT15 CAG repeat ; size 262 bp/GC 함량 73%, 358 bp/GC 함량 71.5%)를 증폭하여 비교 검토하였다.

종래의 LA buffer나 B사의 GC Kit을 사용한 경우에는 모두 band가 검출되지 않았으나 GC buffer를 사용한 TaKaRa LA Taq™에서는 두 개의 band를 확실하게 검출할 수 있었다.



긴 DNA 단편의 증폭용 키트 TaKaRa LA PCR™ Kit 또 GC buffer를 첨부하여 Ver.2.1.로 Version Up!!

## TaKaRa LA PCR™ Kit Ver.2.1

TaKaRa Code RR013A	50 회	264,000원
TaKaRa Code RR013B(A×2)	100 회	475,200원

### ▶ 내용

1. TaKaRa LA Taq™	125 U
2. dNTP Mixture*	400 μl
3. 10× LA PCR™ Buffer II(25 mM Mg <sup>2+</sup> plus)	250 μl
4. 10× LA PCR™ Buffer II(Mg <sup>2+</sup> free)	250 μl
5. MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	500 μl
6. Control Template(100 ng/μl human genomic DNA)*	10 μl
7. Control Primer LA3(10 μM)*	10 μl
8. Control Primer LA4(10 μM)*	10 μl
9. λ-Hind III digest MW Marker(100 ng/μl)	20 μl
10. 2× GC Buffer I(5 mM Mg <sup>2+</sup> plus)**	1.25 ml
11. 2× GC Buffer II(5 mM Mg <sup>2+</sup> plus)**	1.25 ml
12. Control Primer GC 1(10 μM)**	10 μl
13. Control Primer GC 2(10 μM)**	10 μl

\* : version up으로 변경된 것

\*\* : version up으로 추가된 것

정확도가 요구되는 증폭에!

# Pyrobest™ DNA Polymerase

TaKaRa Code R005A	125 U	170,000원
TaKaRa Code R005B(A×4)	500 U	612,000원

Pyrobest™ DNA Polymerase는 *Pyrococcus* sp. 유래의 초내열성 DNA polymerase로 *Pyrococcus furiosus* 유래의 Pfu DNA polymerase나 Vent DNA Polymerase와 동등한 정확도에, Taq DNA Polymerase와 같은 높은 증폭효율을 나타낸다. TaKaRa Taq™ 등의 Taq DNA polymerase와 달리 Hot start법을 사용하지 않아도 비특이적인 증폭을 억제할 수 있다. 정확도를 요하는 증폭에 Pyrobest™ DNA Polymerase를 추천한다.

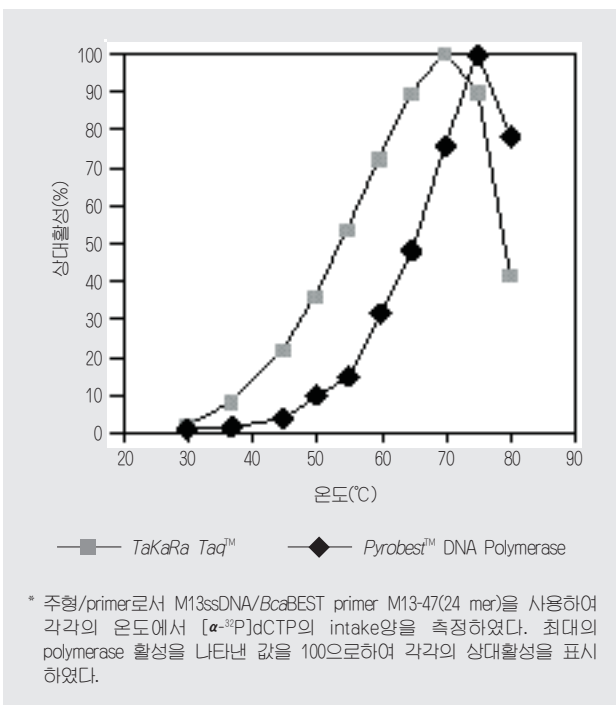
### ▶ 내용

Pyrobest™ DNA Polymerase	125 U
10× Pyrobest Buffer	500 μl
dNTP Mixture	400 μl

### ▶ Pyrobest™ DNA Polymerase와 TaKaRa Taq™의 신장활성의 비교

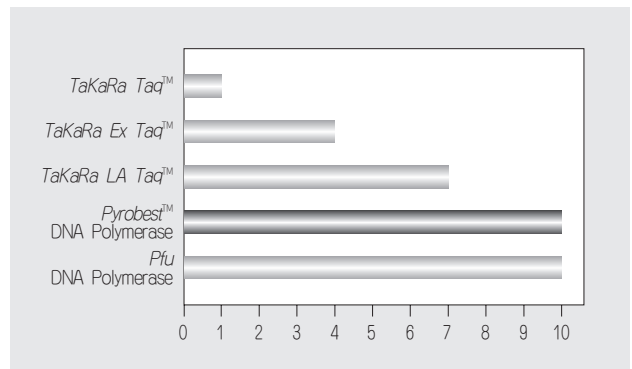
Pyrobest™ DNA Polymerase와 TaKaRa Taq™의 신장활성의 온도 의존성을 비교하기 위하여 30~80℃의 범위에서 각각의 활성을 측정하였다.

TaKaRa Taq™은 70℃ 주변에서 Pyrobest™ DNA Polymerase는 75℃ 주변에서 최대의 활성을 나타내었다. 또 Pyrobest™ DNA polymerase는 65℃ 이하에서는 TaKaRa Taq™에 비하여 polymerase 활성이 낮고 65℃ 이상에서 급격히 활성이 상승하기 때문에 Hot start법을 사용하지 않아도 비특이적 증폭을 막을 수 있을 것으로 생각된다.



### ▶ TaKaRa PCR Enzymes의 정확도(fidelity)

TaKaRa PCR Enzymes의 증폭 정확도(fidelity)를 Cline 등의 방법<sup>1)</sup>, Kunkel 등의 방법<sup>2-4)</sup>으로 측정하였다. TaKaRa Taq™을 기준으로 각 DNA polymerase의 정확도의 상대값을 그래프로 표시하였다. Pyrobest™ DNA polymerase는 Pfu DNA polymerase와 동등하게 TaKaRa Taq™의 10배 정도의 fidelity를 나타내었다.



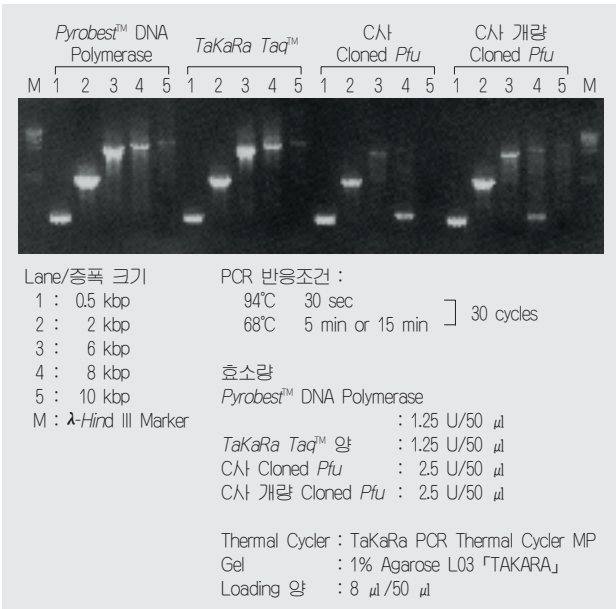
### [참고문헌]

- 1) Cline, J. Braman J. C. and Hogrefe H. H. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- 2) Kunkel, T. A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5787-5796.
- 3) Kunkel, T. A. and Soni, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4450-4459.
- 4) Tindall, K. R. and Kunkel, T. A. (1988) *Biochemistry* **27**, 6008-6013.

▶ *Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>, C사 Cloned *Pfu*와 C사 개량 Cloned *Pfu*의 증폭효율의 비교

*Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>, Cloned *Pfu*와 개량 Cloned *Pfu*(C사)를 사용하여 0.5, 2, 6, 8, 10 kbp의 λ DNA를 증폭하여 그 증폭효율을 비교 검토하였다.

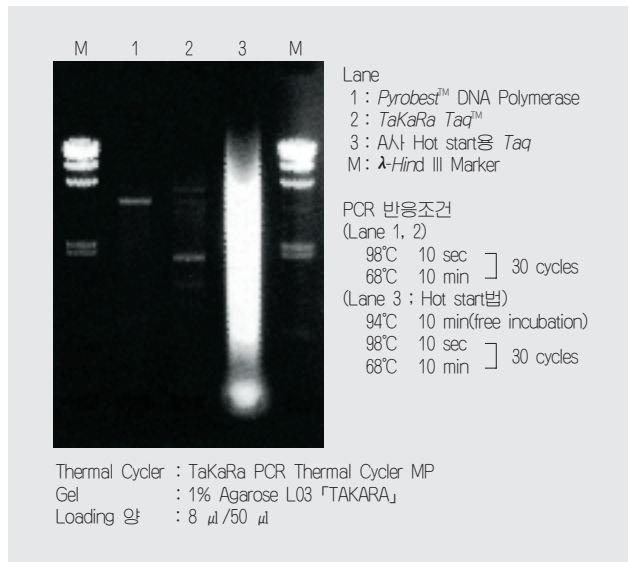
*Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase는 C사의 어떤 polymerase 보다도 높은 증폭효율을 갖고 있으며 *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>과 동등함을 알 수 있었다.



▶ *Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup> 과 A사 Hot start용 *Taq*의 비교

*Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>과 A사 Hot start용 *Taq*을 사용하여 p53 유전자 5 kbp(template 양 : 각 200 ng)를 증폭하여 비교검토 하였다. 단, *Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>에서는 통상의 방법으로, A사 Hot start용 *Taq*은 Hot start법으로 사용하였다.

*TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>과 A사 Hot start용 *Taq*에서는 목적 유전자가 증폭되지 않았으나 *Pyrobest*<sup>TM</sup> DNA Polymerase에서는 Hot start법을 사용하지 않아도 비특이적 증폭은 억제되고 목적 유전자는 증폭됨을 알 수 있었다.



# TaKaRa Taq 특별 할인 판매

**Taq 32% 할인**

250 U × 4개 456,000원  
 dNTP mix, 10× 반응버퍼 첨부

176,000원 (250 U)



**120,000원**

**Ex Taq**

IMF 이전 가격으로

250 U × 4개 612,000원  
 dNTP mix, 10× 반응버퍼 첨부

198,000원 (250 U)



**170,000원**

신 발매

Mg free buffer Version

이 행사는 9월 11일까지만 실시합니다.

# TaKaRa Ex Taq™을 사용하여 혈액시료에서 목적 DNA 단편의 직접증폭

혈액에는 효소반응을 저해하는 물질이 여러 가지 함유되어 있어 PCR 반응에 있어서도 증폭반응을 저해한다. 따라서 PCR 반응에 혈액시료를 사용하는 경우는 우선 혈액 시료에서 DNA를 추출하여야 한다. 최근 간편한 추출방법이 개발되었으나 아직도 어느 정도의 시간이 필요하고 경우에 따라서는 회수율이나 정제도가 만족스럽지 않다. 또한 이러한 작업중에 시료가 바뀔 가능성도 있다. PCR 반응액에 혈액 시료를 직접 첨가하여 충분히 증폭할 수 있다면 이와 같은 문제를 해결할 수 있다.

이 같은 목적에 Ex Taq이 적당하다. TaKaRa Ex Taq™은 3' → 5' exonuclease 활성을 이용한 TaKaRa LA Technology를 구사하여 개발한 내열성 DNA polymerase로 우수한 증폭능력을 갖고 있다. 이 경이로운 능력을 갖고 있는 TaKaRa Ex Taq™을 사용하면 혈액으로부터 목적의 DNA 단편을 직접증폭할 수 있다.

## 실험에 1 : 각종 혈액에서 목적 DNA 단편의 직접 증폭

각종 항응고제 처리혈액 시료를 사용하여 human genome DNA의 cytokeratin 19영역의 663 bp를 증폭하였다.

### (1) 반응액 조성

10× Ex Taq Buffer	5 μl
dNTPs(각 2.5 mM)	4 μl
Primer 1(20 pmol/μl)	0.5 μl
Primer 2(20 pmol/μl)	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq™(5 U/μl)	0.25 μl
혈액 sample	1~5 μl
	dH <sub>2</sub> O up to 50 μl

반응액을 조제한 다음 각종 항응고제로 처리한 혈액을 각각 1, 2, 3, 4, 5 μl 첨가하여(반응계 50 μl) TaKaRa PCR Thermal Cycler MP로 반응을 실시하였다. 이때 첨가한 혈액을 교반 혼합하면 반응성이 떨어지므로 교반하지 않도록 한다(혈액 시료는 비중이 크므로 반응액 내에서 그대로 가라앉는다).

### (2) 반응조건

94°C	4.5분	} 35 cycles
94°C	30초	
55°C	1분	
72°C	1분	
72°C	5분	

### (3) 결과

첨가하는 혈액의 양을 늘리면 전반적으로 증폭량은 감소하였으나, sodium citrate로 처리한 혈액에서는 50 μl 계에서 2 μl 까지, EDTA로 처리한 혈액에서는 50 μl 계에서 5 μl 까지 혈액 시료를 첨가하여도 증폭을 확인할 수 있었다(그림 1). 이와같이 헤파린으로 처리한 혈액 이외의 혈액 시료의 경우, 50 μl 반응계에 혈액시료를 1 μl 첨가하므로써 충분히 증폭할 수 있었다.

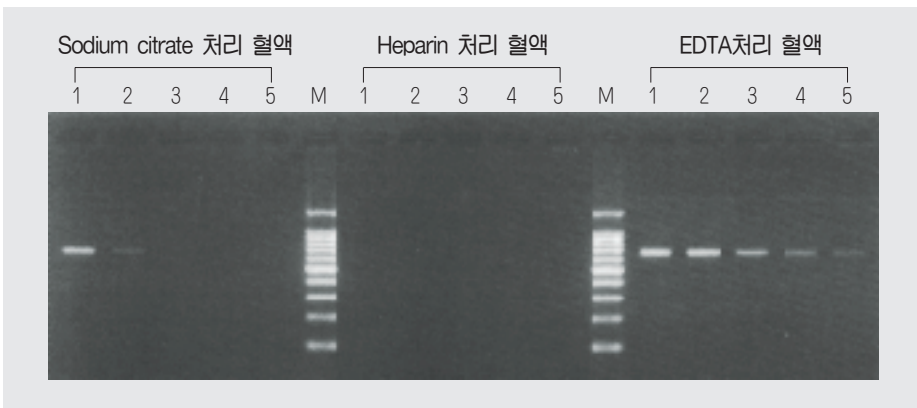


그림 1 각종 항응고제처리 혈액시료에서 목적 DNA 단편의 직접 증폭

lane	시료량
1	1 μl
2	2 μl
3	3 μl
4	4 μl
5	5 μl
M	100 bp DNA Ladder (TaKaRa Code 3407A/B)





**실험에 2 : Heparin 처리 혈액에서 DNA단편의 직접 증폭**

헤파린은 핵산관련효소의 활성을 저해한다고 알려져 있다. 실험 1에서의 헤파린처리 혈액의 경우 TaKaRa Ex Taq™으로 증폭되지 않았다. 이는 heparin이 Ex Taq의 활성에 영향을 미치기 때문이다. 그러나 이 경우에도 Heparinase I(Sigma H-2519)을 반응계에 처리하므로써 다른 항응고제로 처리한 시료와 동등하게 증폭할 수 있다. Heparin 처리 혈액을 사용하여 human genome DNA의 cytokeratine 19영역 663 bp를 증폭하였다.

**(1) 반응조성**

10× Ex Taq Buffer	5 μl
dNTPs(각 2.5 mM)	4 μl
Primer 1(20 pmol/μl)	0.5 μl
Primer 2(20 pmol/μl)	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq™(5 U/μl)	0.25 μl
Heparinase I(0.5 U/μl)	1 μl
혈액 시료	X μl
H <sub>2</sub> O up to 50 μl	

반응액을 조제한 다음 heparin으로 처리한 혈액을 각각 1, 2, 3, 4, 5 μl씩 첨가(반응계 50 μl)하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP로 반응하였다. 이때 첨가한 혈액을 교반하여 혼합하면 반응활성이 떨어지므로 교반하지 않도록 한다.

**(2) 반응조건**

30°C	30분	(Heparinase I 전처리)
94°C	4.5분	} 35 cycles
94°C	30초	
55°C	1분	
72°C	1분	
72°C	5분	

**(3) 결과**

Heparinase I을 반응계에 첨가하여 전처리 반응을 실시하므로써 heparin 처리 혈액도 목적하는 DNA를 PCR로 직접 증폭할 수 있었다(그림 2). 이번 실험에서는 50 μl의 반응계에서 3 μl의 heparin 처리 혈액시료만 첨가하여도 증폭을 확인할 수 있었다. 또 Heparinase I을 첨가하므로써 통상의 PCR 증폭 반응이 저해되지 않음을 확인하였다.

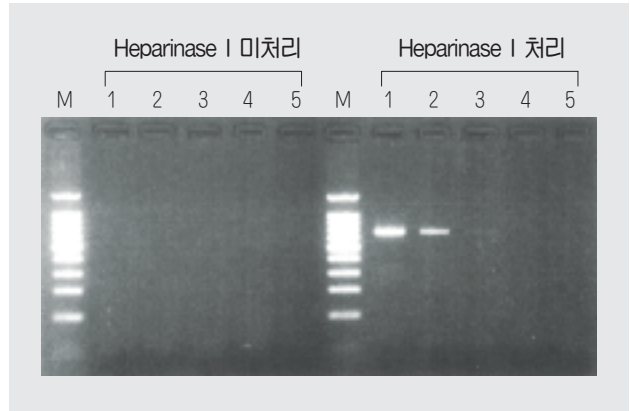


그림 2 Heparin 처리 혈액에서의 DNA 직접 증폭에 미치는 heparinase I의 효과

lane	시료량
1	1 μl
2	2 μl
3	3 μl
4	4 μl
5	5 μl
M	100 bp DNA Ladder(TaKaRa Code 3407A/B)



**실험에 3 : 혈액시료에서 직접 증폭할 수 있는 목적 DNA 단편 길이의 검토**

TaKaRa Ex Taq™ 반응계에 혈액 시료를 직접 첨가하여 증폭반응을 실시하는 경우 어느 정도까지 목적 단편을 길게 증폭할 수 있는지 검토하였다. 금번 EDTA 처리 혈액과 heparin 처리 혈액 1 μl을 시료로 실험을 실시하였다. 단 heparin 처리 혈액은 실험 2에서 실시한 것과 같이 Heparinase I을 첨가해 전처리 하였다.

**(1) 목적 유전자와 증폭 크기**

β-globin	: 205, 262, 325, 1292, 1387, 1450 bp
GAPDH	: 484 bp
CK19	: 663 bp
H-ras	: 1911 bp

**(2) 결과**

EDTA 처리 혈액과 heparin 처리 혈액 모두 1387 bp까지 β-globin을 증폭할 수 있었다(그림 3). 단, 1 kbp 보다 큰 단편의 증폭 효율은 떨어지는 경향이 있어 혈액 시료를 직접 사용하는 경우는 1 kbp보다 작은 단편의 증폭에 사용하는 것이 좋다. 보다 긴 단편의 증폭에는 Single-Tube PCR Kit(from Whole Blood)(TaKaRa Code RR021)를 사용하는 것이 좋다.

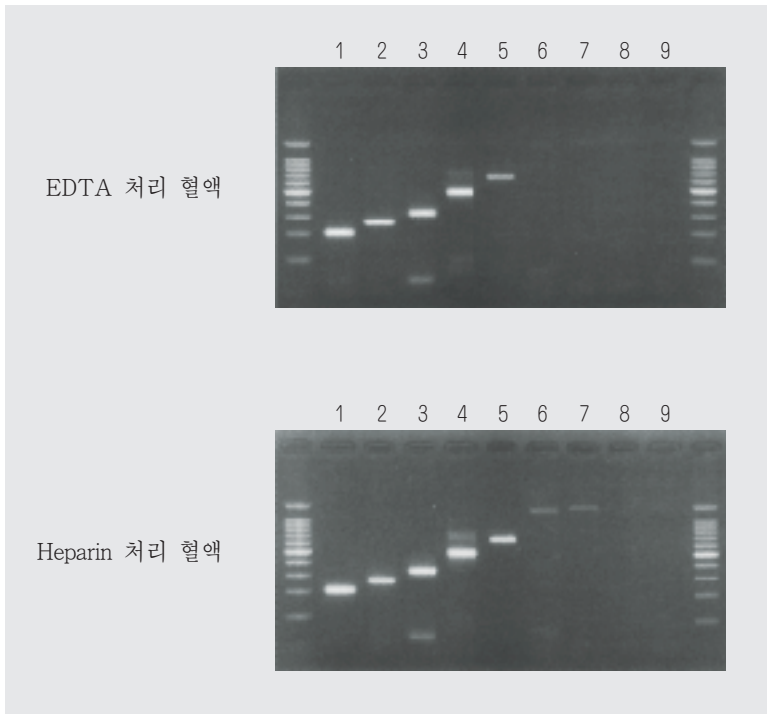


그림 3 직접 증폭할 수 있는 DNA의 단편크기 검토

lane 1	: $\beta$ -globin	205 bp
lane 2	: $\beta$ -globin	262 bp
lane 3	: $\beta$ -globin	325 bp
lane 4	: GAPDH	484 bp
lane 5	: CK19	663 bp
lane 6	: $\beta$ -globin	1,292 bp
lane 7	: $\beta$ -globin	1,387 bp
lane 8	: $\beta$ -globin	1,450 bp
lane 9	: H-ras	1,911 bp

PCR Enzymes 가격 표

제품명	TaKaRa Code	규격	가격
TaKaRa Taq™	R001A	250 U	176,000원
	R001B(A×4)	1,000 U	580,000원
	R001C(A×12)	3,000 U	1,620,000원
TaKaRa Taq™(Mg <sup>2+</sup> free Buffer)	R001AM	250 U	176,000원
	R001BM(AM×4)	1,000 U	580,000원
	R001CM(AM×12)	3,000 U	1,620,000원
TaKaRa Ex Taq™	RR001A	250 U	198,000원
	RR001B(A×4)	1,000 U	680,000원
	RR001C(A×12)	3,000 U	1,980,000원
TaKaRa Ex Taq™(Mg <sup>2+</sup> free Buffer)	RR01AM	250 U	198,000원
	RR01BM(AM×4)	1,000 U	680,000원
	RR01CM(AM×12)	3,000 U	1,980,000원
TaKaRa LA Taq™	RR002A	125 U	196,000원
	RR002B(A×4)	500 U	705,600원
TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer	RR02AG	125 U	196,000원
	RR02BG(AG×4)	500 U	705,600원
Pyrobest™ DNA Polymerase(for High-Fidelity PCR)	R005A	125 U	170,000원
	R005B(A×4)	500 U	612,000원

\* 각 PCR Enzymes에는 dNTP Mixture가 첨부되어 있습니다.

Premix/One Shot 시리즈 가격 표

제품명	TaKaRa Code	규격	가격
Premix Taq™(TaKaRa Taq™ version)	R004A	120회(150 U)	168,000원
Premix Taq™(TaKaRa Ex Taq™ version)	RR003A	120회(150 U)	210,000원
PerfectShot™ Ex Taq(Loadng dye mix)	RR005A	48검체(60 U)	110,000원
One Shot LA PCR™ Mix	RR004	24검체(60 U)	166,000원



# CTL epitope 동정용 peptide를 이용한 말초혈 단핵구(PBMC)에서의 CTL의 유도

암세포나 바이러스 감염세포에 대하여 특이적으로 세포상해성을 나타내는 T세포 (CTL)는 표적세포의 표면에 나타나는 MHC class I 분자에 결합한 9~10개의 아미노산 잔기로 구성된 항원 peptide를 인식한다. 항원 peptide는 종양관련 항원단백질이나 바이러스 단백질에서 유래한 것으로, 항원 peptide의 동정은 CTL을 이용한 면역요법의 연구·발전에 필요 불가결하다. 본 고에서는 CTL epitope 동정용 peptide를 이용하여 항원 특이적 CTL을 말초혈 단핵구(PBMC)에서 유도한 예를 소개한다.

## ▶ 서론

CTL(세포상해성 T세포)은 암세포나 바이러스 감염세포의 세포 표면에 나타나는 MHC class I 분자에 결합한 peptide를 인식하여 세포상해성을 나타낸다. 암세포에는 정상세포와 질적, 양적으로 다른 항원(종양 관련항원)이 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 최근에 종양 특이적 면역요법에 유용하다고 판단되는 각종 종양관련 항원 유래의 항원 peptide가 동정되었다. 그러나 MHC 분자는 매우 다양하고 그 종류에 따라 결합하는 항원 peptide가 다르기 때문에 결합하는 항원 peptide를 각 MHC별로 동정하여야 한다<sup>1, 2)</sup>. 현재까지 보고된 항원 peptide의 대부분은 구미인에게서 주로 관찰되는 사람 MHC class I(HLA-A1이나 A2)에 결합하는 것이며, 동양인 특히 일본인에게 아주 고빈도(약 60%)로 발현하는 HLA-A24에 결합하는 항원 peptide를 동정한 예는 별로 없다. 또한, 구미에서 많이 연구되고 있는 Melanoma가 동양인에게는 적은 반면, 위암이나 대장암 등 소화기관의 암이 동양인에게 많은 데도 이러한 소화기계암에 대한 연구가 충분히 이루어지지 않고 있는 것 같다. 따라서 동양인의 암면역요법에 있어서 소화기계 암에 발현하는 종양 관련 항원 유래의 HLA-A24 구속성 항원 peptide를 동정하는 문제가 중요한 과제이다.

지금까지 종양 항원 peptide를 동정하는 몇가지 방법이 보고되어 있다. 본 고에서는 그 중 한 가지 방법을 설명한다.

종양관련 항원단백질의 아미노산 배열로부터 MHC class I 분자에 결합능력을 갖는 9~10개의 아미노산 잔기의 후보 peptide를 화학적으로 합성한다. 목적의 MHC class I 양성의 PBMC에서 유래한 항원 제시 세포(APC)를 후보 peptide로 처리한 후 이 APC를 이용하여 CD8<sup>+</sup> 임파구를 반복하여 자극하므로써 peptide를 인식하는 effector 세포를 유도한다. 유도한 effector 세포를 이용하여 표적 세포에 대한 세포상해성을 측정하고, 특이적인 세포상해성을 나타내는 CTL을 유도한 peptide를 항원 peptide로 동정한다<sup>3, 4)</sup>.

그러나 현재 실시하고 있는 항원 peptide의 screening에서는 ① 종양 관련 항원단백질로부터 후보 peptide의 선별이 곤란하고, ② 다수의 고순도 peptide 합성이 필요하며, ③ 일정한 CTL의 유도방법이 없는 등의 문제점이 있다.

TaKaRa는 이들 문제점의 일부를 해결하는데 활용할 수 있도록 최근 주목받고 있는 종양 항원(MAGE-3, CEA, HER 2/neu) 중 특히 HLA-A24에 높은 결합능을 갖는 복수의 peptide를 선택하여 CTL epitope 동정용 peptide로서 제조, 판매하고 있다. 이번 호에서는 CEA652(9)와 FLU 38(10)을

이용하여 PBMC에서 CTL을 유도한 예를 소개한다.

## (1) Naive T 세포로부터의 CTL의 유도예(CEA652(9)를 이용한 건강한 PBMC로부터의 CTL 유도)

각종 APC를 이용하면 Naive T 세포에서 항원 peptide에 특이적 CTL이 유도되는 것으로 보고되어 있다(Primary CTL 유도)<sup>5, 6)</sup>. Primary 자극에 이용하는 APC는 MHC/peptide 복합체 뿐만 아니라 항원 자극에 필요한 CD80 등의 co-stimulatory signal 분자를 동시에 제시하여야 한다. 이들 분자를 제시하는 수상세포(Dendritic cell:DC)는 APC로서는 최적의 세포로 DC를 이용한 고효율의 CTL을 유도한 예가 있다<sup>4)</sup>.

본 고에서는 건강한 인의 PBMC에서 유도한 DC를 CEA652(9)로 처리하여 APC로 활용하고, PBMC에서 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포를 이 APC로 자극하여 CTL을 유도한 예를 소개한다.

## 【방법】

V. Tsai 등의 방법<sup>4)</sup>에 따라 CTL을 유도하였다.

### 【Day 7】

건강인 PBMC를 T-25 plastic flask에 접종하여 비접착 세포를 제거한 다음, 접착 세포를 GM-CSF(1000 U/ml), IL-4(2000 U/ml)의 존재하에서 7일간 배양하여 DC를 유도한다.

### 【Day 0】

DC( $1 \sim 2 \times 10^6$  cells/ml)에 40  $\mu$ g/ml의 CEA652(9)와 3  $\mu$ g/ml의  $\beta_2$ -microglobulin을 첨가하여 20°C에서 4시간 동안 처리한 후 X선 조사(5,000 rad)한 것을 APC로 이용한다.

↓

PBMC로부터 magnetic beads로 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포( $1 \times 10^6$  cells/ml)와 APC( $5 \times 10^4$  cells/ml)를 IL-7의 존재하에 48 well microplate(0.5 ml/well)로 배양한다.

### 【Day 7】

아래와 같이 조제한 자기 APC를 접착시킨 48 well microplate에 배양중인 CD8<sup>+</sup> 세포를 첨가하여 재자극한다. 이 후 2~3일 간격으로 IL-2(10 U/ml)를 첨가한다. (재자극용 자기 APC의 조제)

X선을 조사(5,000 rad)한 PBMC를  $4 \times 10^6$  cells/ml 단위로 48 well plate에 0.5 ml/well씩 접종한다.

↓

37°C에서 15시간 방치한 다음 비접착 세포를 제거한다.

↓  
 각 well에 CEA652(9) 용액(20 µg/ml의 peptide 및 3 µg/ml의 β<sub>2</sub>-microglobulin을 함유한 5% human serum/RPMI)을 0.25 ml씩 첨가한다.

↓  
 2시간 반응후 peptide 용액을 흡인 제거하여 재자극용 APC로 사용한다.

**[Day 14 이후 ]**

약 1주일 간격으로 자기 APC(Day 7의 기체내용과 동일)로 자극을 반복하고(2~4회), 2~3일 간격으로 IL-2 (10 U/ml)를 첨가한다.

**[2~4회 재자극한 후]**

CEA652(9)로 처리한 HLA-A24 발현세포(TISI) 및 암세포주를 표적세포로 하여 각 well 중의 CTL의 세포상해성을 <sup>51</sup>Cr 방출법으로 측정한다. 특이적 세포상해성을 나타낸 well 중의 CTL을 anti-CD3 antibody로 증식시켜 세포상해활성을 해석한다.

**[결과]**

CEA652(9)로 4회 자극한 결과 48 well 중 2 well에서 명확한 세포상해성이 확인되었다.

이 중 1 well에 CTL을 증식시켜 세포상해 활성을 해석한 결과, 이 CTL은 CEA652(9)처리 TISI 및 암세포주 MKN45(HLA-A24+, CEA+)에 대하여 effector/target 비에 의존적으로 세포상해성을 나타내었으나 peptide 미처리 TISI 및 MKN 1(HLA-A24+, CEA-)에 대해서는 세포상해성을 나타내지 않았다(그림 1). 또한 세포상해성은 anti class I antibody와 anti-CD3 antibody에 의해 특이적으로 저해되었다(그림 2).

위의 결과에서 CEA652(9)로 처리한 DC를 APC로 이용하므로서 MHC class I 구속성의 특이적 CTL이 유도됨을 알 수 있다.

본 고에는 언급하지 않았으나 CEA652(9) 이외에 CEA268(10)을 이용해도 CTL이 유도됨을 확인하였다. 이 방법을 이용하면 후보 peptide 중에서 중앙관련 항체의 epitope peptide만을 screenig할 수 있다.

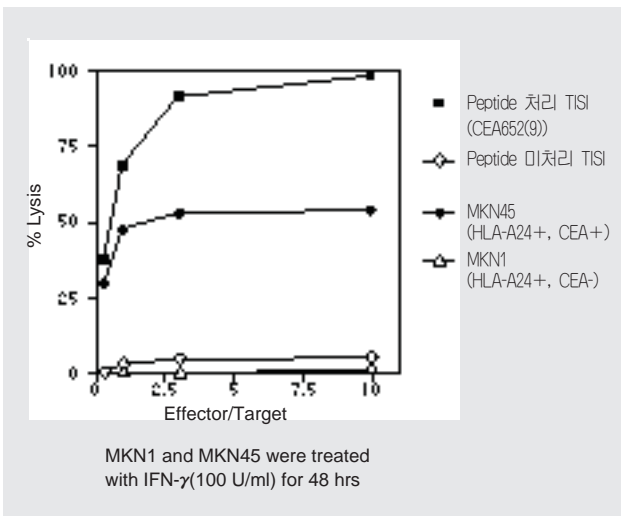


그림 1 건강인의 PBMC로부터 CEA652(9)로 유도한 CTL의 세포상해성

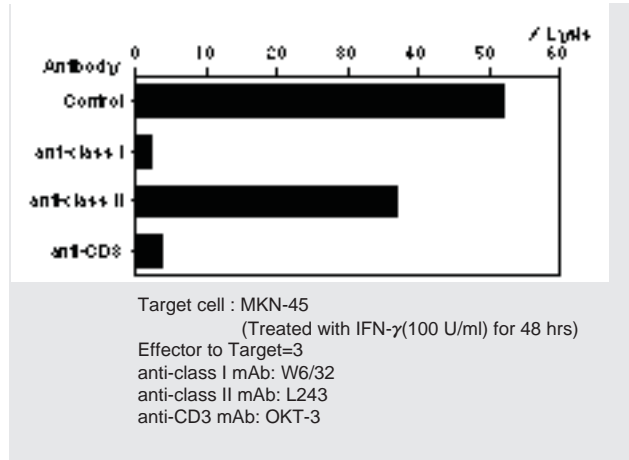


그림 2 CEA652(9)로 유도한 CTL 세포상해 활성의 항체에 의한 저해

**(2) Memory T세포로부터의 CTL 유도 (Influenza virus NP 유래의 peptide를 이용한 암환자 PBMC에서 CTL을 유도한 예)**

Influenza virus(Flu) 등의 외래항원에 대하여 CTL이 관여하는 세포성 면역이 과거에 생긴 경우에는 항원 특이적 Memory T 세포가 생체 내에 존재한다고 볼 수 있다. 이러한 경우에는 면역계가 정상일때 항원 peptide로 PBMC에 자극을 주어 배양하면 단시간(약 2주일)에 CTL을 유도할 수 있다(Recall에 의한 CTL의 유도). 암환자에서는 면역에 관여하는 세포의 활성이 저하되는 것으로 알려져 있으나, 환자의 면역상태를 파악하는 하나의 지표로서 감염이나 백신에 의해 특이적 면역이 생길 가능성이 높은 Flu 유래 peptide에 대한 반응성을 조사하는 방법이 있다.

본 고에서는 이 peptide를 이용한 암환자 PBMC에서 CTL을 유도한 예를 소개한다.

**[방법]**

Bednarek 등의 방법<sup>7)</sup>에 따라 CTL을 유도하였다.

**[Day 0]**

HLA-A24 양성 암환자의 말초혈(약 30 ml 전혈)에서 분리한 PBMC를 5% human AB serum/RPMI로 현탁한다 (8 × 10<sup>6</sup> cells/ml).

↓  
 FLU38(10)용액(peptide 20 µg/ml를 첨가한 5% human AB serum/RPMI, 필요시 정제)을 1 : 1 비율로 첨가하여 혼합한다.

↓  
 24 well microplate에 1 ml/well씩 접종하여 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 배양한다.

**[Day 3, 5]**

IL-2를 최종농도 10 U/ml가 되도록 첨가한다.

**[Day 7]**

7일간 배양한 세포를 전량 모아서 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 한 후 자기 APC를 접착시킨 24 well microplate에 1 ml/well씩 접종하여 재자극한다.

**[Day 9, 12]**

IL-2를 최종농도 10 U/ml가 되도록 첨가한다.

**[Day 14]**

peptide 처리 또는 미처리 TISI에 대한 세포상해 활성을 <sup>51</sup>Cr 방출법으로 측정한다.

**[결과]**

암환자 PBMC에서 CTL을 유도한 결과를 그림 3에 나타내었다. 건강인과 마찬가지로 환자 PBMC에서도 recall에 의한 CTL 유도법을 사용하면 항원 peptide 특이적 CTL이 유도된다. 한편 2예의 환자 PBMC의 경우 peptide 처리 유무에 관계없이 TISI에 대한 세포상해성이 인정되지 않았다.

이상의 결과로 recall에 의한 CTL 유도법과 peptide를 병용하면 단기간에 건강인과 환자의 면역상태를 추정할 수 있고 다른 실험조건도 검토할 수 있다.

상기 실험에 사용한 배지 및 혈청은 각각 RPMI 1640 (BioWhittaker, Code No. 12-115F), 사람 AB 혈청 (BioWhittaker, Code No. 14-490F)이다(상기 BioWhittaker사 제품은 TaKaRa에서 판매하고 있다).

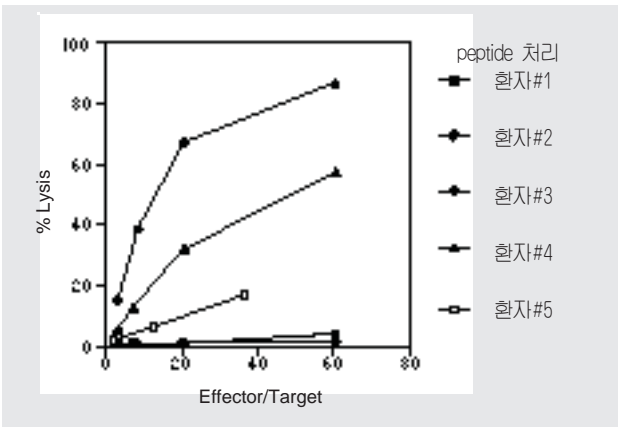


그림 3 암환자 PBMC에서 FLU38(10)로 유도한 CTL의 세포상해성

**▶ 맺음말**

CTL epitope 동정용 peptide는 Primary CTL의 유도 또는 Recall에 의한 CTL의 유도를 기본으로 한 epitope peptide의 screening에 이용할 수 있다. 단, screening할 때는 특히 ① 사용한 PBMC에는 목적의 CTL이 되는 Naive나 Memory T 세포가 존재하지 않으므로 예상한 결과를 얻을 수 없는 경우가 있고 ② 배지나 혈청에는 세심한 주의를 기울여야 한다.

**[참고문헌]**

- 1) Kubo R. T. *et al.* (1994) *J. Immunol.* **152**, 3913.
- 2) Kondo A. *et al.* (1995) *J. Immunol.* **155**, 4307.
- 3) Celis E. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2105.
- 4) Tsai V. *et al.* (1997) *J. Immunol.* **158**, 1796.
- 5) Plebanski M. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* **25**, 1783.
- 6) Tanaka F. *et al.* (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* **44**, 21.
- 7) Bednarek M. A. *et al.* (1991) *J. Immunol.* **147**, 4047.

**관련제품**

제품명	TaKaRa Code	세트내용
MAGE3(HLA-A24)	SP101	9종류(각 1 mg)
CEA(HLA-A24)	SP102	10종류(각 1 mg)
HER2/neu(HLA-A24)	SP103	10종류(각 1 mg)

각 세트에는 Influenza virus nucleoprotein 유래의 peptide가 첨부되어 있다.

보한 바이오메디칼(주)의 홈페이지에는 유용한 정보가 있습니다. 최신 바이오뉴스 등 새로운 소식이 매일 추가되고 있고, 신제품, 캠페인, 각종행사 등을 신속하게 안내하고 있습니다.

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

e-mail [bohanbio@soback.kornet21.net](mailto:bohanbio@soback.kornet21.net)

- 제품 찾아보기
- 신제품 안내
- 회사 소식
- Custom Service 안내
- 최신 바이오뉴스
- 관련 site 접속

Homepage 퀴즈쇼에 응모하시면 풍성한 선물을 받을 수 있습니다.

# '98 TaKaRa International Symposium

당사는 한국분자생물학회와 공동으로 세번째 맞는 '98 TaKaRa International Symposium을 개최합니다. 이번에는 주로 genome project의 현황과 geonome project의 결과로 얻어지는 정보를 어떻게 활용할 것인가에 초점을 맞추었습니다. 이와 관련하여 bioinformatics, DNA array chip에 관한 최신의 현황 그리고 생명과학의 필수 기술로 아주 폭넓게 이용되고 있는 PCR의 최신 기술에 관하여도 소개할 예정입니다.

일시 : 1998년 10월 23일(금요일) 오후 3시 30분

장소 : 서울대학교 문화관

주제 : Trends in Life Science & Biotechnology

Organizer & Chair : Young Min Kim, Ph.D./Yonsei Univ.

Je Hyeon Lee, Ph.D./BOHAN Biomedical Inc.

## 1. Recent progress of genome sequencing projects

Seung-Whan Park Ph.D./KRIBB, KIST, Korea

## 2. DNA array chip: New generation for functional genomics

Ikunoshin Kato Ph.D./TAKARA Biomedical Reaserch Labs., Japan

## 3. From sequencing genomics to functional genomics: The role of bioinformatics

Seung-Moak Kim Ph.D./KRIBB, KIST, Korea

## 4. Advanced Technology of Polymerase Chain Reaction(PCR): Development of new enzyme for rapid PCR technology

Kiyozo Asada Ph.D./ TAKARA Biomedical Reaserch Labs., Japan



# 정량적 PCR

PCR법을 이용한 DNA나 RNA의 정량에 있어서 튜브간에 증폭효율이 다르거나 plateau 효과 등으로 인하여 증폭산물량으로부터 증폭 전의 DNA양을 추정하는 것은 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 내부표준물질을 이용하는 방법이나 Competitive PCR법을 정량에 이용하고 있다. 본 고에서는 특히 RT-PCR법을 이용한 mRNA 정량시의 문제점과 이러한 문제점을 해결하기 위해 개발한 내부표준물질을 이용하는 방법 및 Competitive PCR법에 대해 소개하고자 한다.

## ▶ 서론

PCR법은 내열성 DNA polymerase와 두 개의 합성 oligonucleotide(primer)를 이용하여 목적 영역의 DNA를 특이적으로 증폭하는 방법이다. 따라서 극히 미량의 DNA를 고감도로 검출할 수 있다. 특히 역전사효소에 의한 cDNA의 합성반응과 RT-PCR(reverse transcription-PCR)법을 병용함으로써 지금까지 검출이 어려웠던 HIV나 HCV 등의 미량의 RNA 바이러스를 검출할 수 있게 되었다. 또한 RT-PCR법은 기존의 Northern blotting법 등에 비하여 감도가 아주 높으므로 지금까지 검출하기 어려웠던 미량의 mRNA나 소량의 조직, 세포에서도 mRNA를 검출할 수 있다.

한편 PCR법을 이용하여 DNA나 RNA를 정량할 때, 각 튜브간에 증폭효율의 차이나 plateau 효과 등으로 인하여, PCR 증폭산물의 양이 반드시 증폭전의 주형 DNA양을 반영하는 것이 아니므로 증폭산물의 양에서 단순히 증폭전의 DNA양을 추정하는 것은 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 현재는 이러한 문제점을 해결한 내부표준물질(internal standard)을 이용하는 방법이나 Competitive PCR법을 이용하고 있다.

## I. RT-PCR법을 이용한 mRNA 정량시의 문제점

RT-PCR법을 이용하여 mRNA를 정량할 때에는 ① mRNA의 추출효율 및 역전사효소에 의한 역전사 반응의 수율 ② PCR 반응시의 증폭효율의 차이 ③ PCR 반응시의 plateau 효과 등의 세가지 사항들이 문제점으로 대두된다.

### 1. mRNA의 추출효율 및 역전사 반응의 수율

mRNA를 PCR 반응에 이용하였을 경우의 RT-PCR법의 순서를 그림 1에 나타내었다. 세포나 조직에서 mRNA를 추출한 다음 oligo dT 또는 random primer를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성하고 이 cDNA를 주형 DNA로 하여 PCR 반응을 실시한다. RT-PCR법을 이용하여 mRNA를 정확하게 정량하려면 PCR 반응의 전단계인 mRNA의 추출과 역전사효소 반응시의 수율도 고려해야 한다.

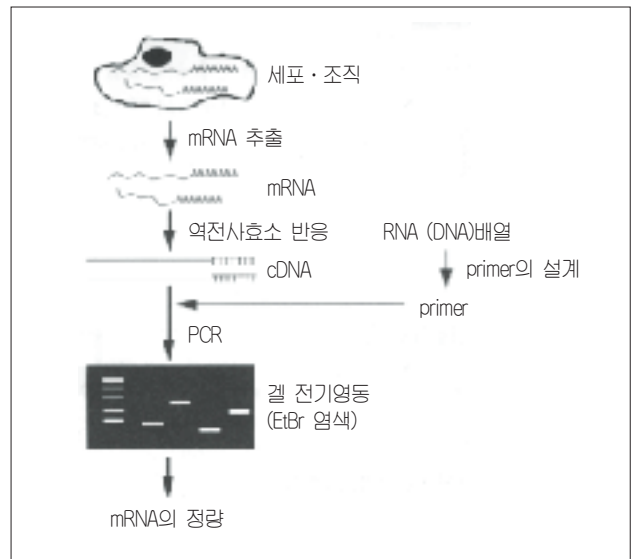


그림 1 RT-PCR법의 순서

세포나 조직에서 mRNA를 추출한 다음 oligo dT 또는 random primer를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 주형 DNA로 PCR 반응과 전기영동을 실시하여 mRNA를 검출, 정량한다.

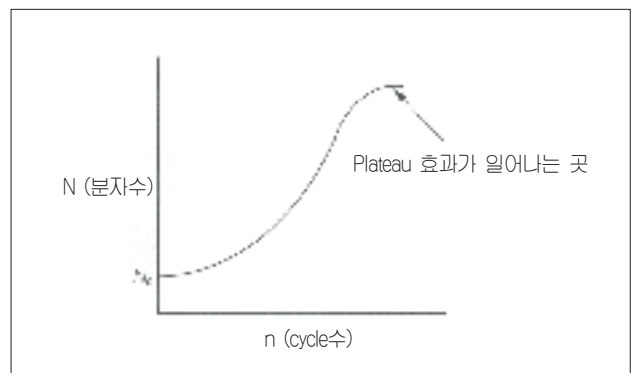


그림 2 PCR 반응시의 Plateau 효과

실제로 PCR을 해 보면 증폭산물의 양이 처음에는 cycle수에 비례하여 대수적으로 증가하지만 증폭산물의 양이 어느 한도를 넘으면 증폭효율이 떨어지면서 최종적으로는 증폭하지 않게 된다. 이런 현상을 plateau 효과라고 한다.



## 2. PCR 반응시의 증폭효율의 차이

PCR은 이론적으로 1 cycle 반응에서 목적의 DNA 단편을 2배로 증가시키므로 반응전의 최초의 주형 DNA 양을  $N_0$ 라 할때,  $n$  cycle 후의 반응생성물  $N$ 은

$$N = N_0 2^n$$

으로 나타낼 수 있다. 그러나 실제로는 primer의 annealing 효율이나 DNA 가닥의 합성효율이 반드시 100%가 되지는 않으므로 각 cycle 의 증폭효율을  $E$ 로 하여

$$N = N_0 2^n (1+E)^n$$

$$(0 \leq E \leq 1)$$

로 나타내는 경우가 많다.

$E$ 는 증폭되는 DNA의 염기배열, primer의 염기배열, 증폭되는 DNA의 크기, 반응에 사용하는 각종 시약의 질과 양, 주형 DNA의 순도 등에 영향을 받는다. PCR은 대수적인 증폭반응이기 때문에, 증폭효율( $E$ )의 차가 아주 작아도 최종 증폭산물의 양에서는 커다란 차이가 생긴다. PCR법을 이용하여 정량할 때는 이 증폭효율을 고려하여야 한다.

## 3. PCR 반응시의 Plateau 효과

실제로 PCR을 해보면 그림 2와 같이 증폭산물의 양이 처음에는 cycle수를 거듭함에 따라 대수적으로 증가하나 증폭산물의 양이 어느 한도를 넘으면 증가가 저하되면서 최종적으로는 증폭하지 않게 됨을 알 수 있다(최종적으로 증폭되지 않는 값을 plateau라고 한다). 이러한 현상을 plateau 효과라고 하며 다음과 같은 원인에 의한 것으로 추정된다.

- (1) 증폭산물간의 결합으로 인하여, primer가 주형 DNA에 annealing할 수 없게 된다.
  - (2) Pyrophosphoric acid 등 DNA polymerase의 활성을 저해하는 물질이 축적된다.
  - (3) PCR 반응에 필수적인 물질이 부족하게 된다.
- 따라서 PCR법을 이용하여 DNA나 RNA를 정량하는 경우에는 이 plateau 효과를 고려하여야 한다.

## II. 내부표준물질을 이용한 RT-PCR법으로 mRNA의 정량

내부표준물질을 이용한 RT-PCR법으로 mRNA를 정량하는 순서를 그림 3에 나타내었다. 조직이나 세포에서 추출한 mRNA를 random primer 또는 oligo dT primer를 사용하여 역전사효소로 cDNA를 합성하고, 측정하고자 하는 mRNA와 내부표준물질을 각각 동일한 반응튜브 또는 다른 반응튜브를 사용하여 PCR반응을 실시한다. 단, 내부표준물질은 거의 같은 수준으로 발현하는 내재성 유전자 즉 housekeeping 유전자의 전사산물(mRNA)을 이용하는 경우가 많다. 현재는  $\beta$ -actin 유전자나 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-

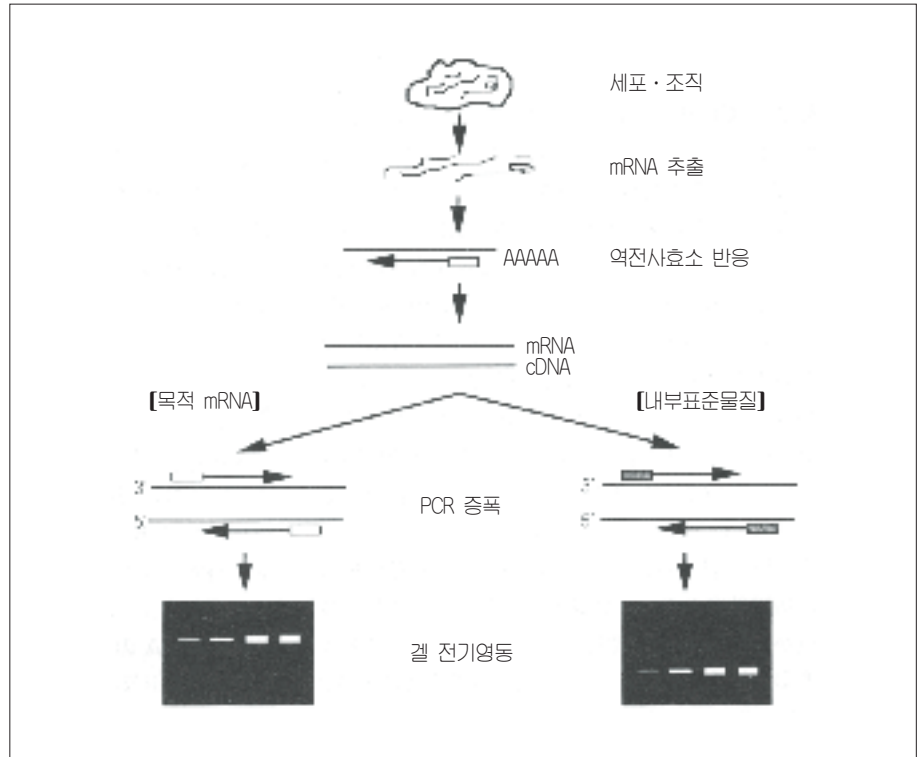


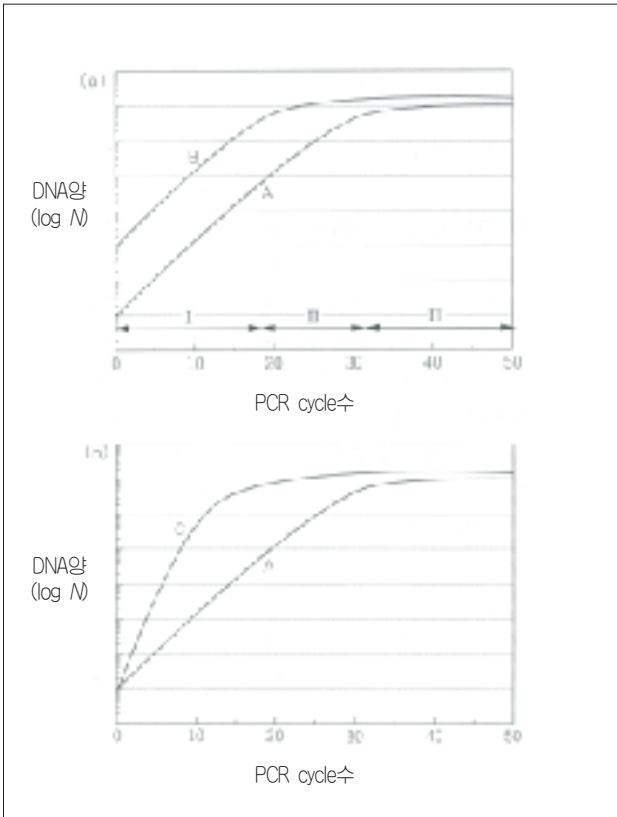
그림 3 내부표준물질을 이용한 RT-PCR법에 의한 mRNA 정량의 원리

세포 또는 조직에서 추출한 mRNA를 oligo dT 또는 random primer를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성한다. 측정하고자 하는 mRNA와 내부표준물질을 각각 동일한 반응튜브와 다른 반응튜브를 사용하여 PCR한다. 증폭산물에 대하여 전기영동과 ethidium bromide 염색하여 증폭된 각 밴드의 강도를 비교하여 정량한다. (1)밴드를 잘라내어 액체 scintillation counter로 정량한다. (2)Image scanner나 CCD analyzer로 영상화하고 컴퓨터를 이용하여 정량한다.

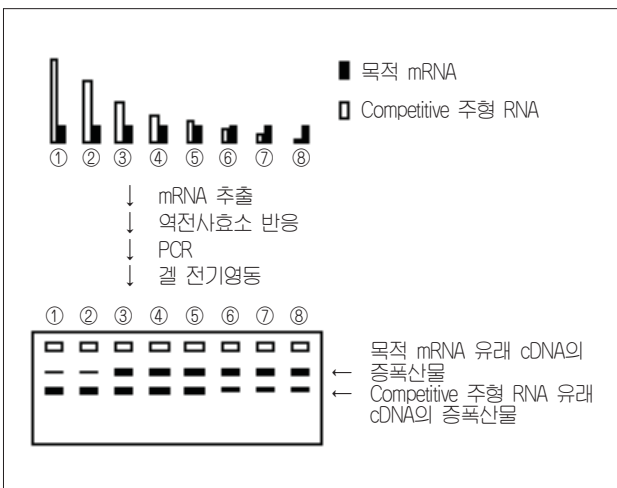
genase(G3PHD) 유전자 등의 mRNA가 자주 이용된다. 그 다음으로 전기영동과 ethidium bromide 염색으로 증폭된 각 밴드의 강도를 비교하여 정량한다. 통상  $^{32}P$ 로 표식한 primer나 dCTP를 이용한 PCR 증폭산물을 전기영동하여 ethidium bromide 염색한다. 겔에서 목적의 밴드를 잘라내어 liquid scintillation counter로 Isotope양을 측정한다. 밴드를 겔에서 절단하지 않고 직접 image scanner(BAS2000, FUJI film사)로 영상화하여 밴드의 강도를 측정하는 방법도 있다. 또, 방사성 동위원소를 사용하지 않고 PCR 증폭산물을 전기영동, ethidium bromide로 염색하여 CCD image analyzer로 각 밴드의 강도를 측정하는 방법과 최근에는 전기영동조작이 필요없이 Streptoavidin beads를 이용하여 증폭산물을 포획하여 전기적 화학발광법(Q-PCR System, Perkin-Elmer사)<sup>3)</sup>으로 검출하는 방법도 개발되어 있다. 단, 앞에서 언급한 바와 같이 PCR에는 plateau 효과란 현상이 있으므로, 두 반응물에 대하여 plateau에 도달하기 전의 단계에서 그리고 증폭효율이 거의 같은 것을 함께 비교하여야 한다.

내부표준물질을 이용하는 경우에서 PCR 반응시 cycle수의 증가에 따른 증폭산물의 변화를 그림 4에 모식적으로 나타내었다. 내부표준물질 및 목적 mRNA 유래의 증폭산물이 plateau에 도달하기 전과 증폭효율이 같은 곳(기울기가 같은)을 각각 비교하지 않으면 정확하게 정량할 수 없다. 미리 내부표준물질과 목적 mRNA를 PCR하여 cycle수별로 해석하거나, 시료를 단계적으로 희석하여 PCR함으로써 PCR 반응시의 대수 증폭영역을 확인하고 두 증폭산물에 대하여 증폭효율이 같은 지를 확인해 두어야 한다.



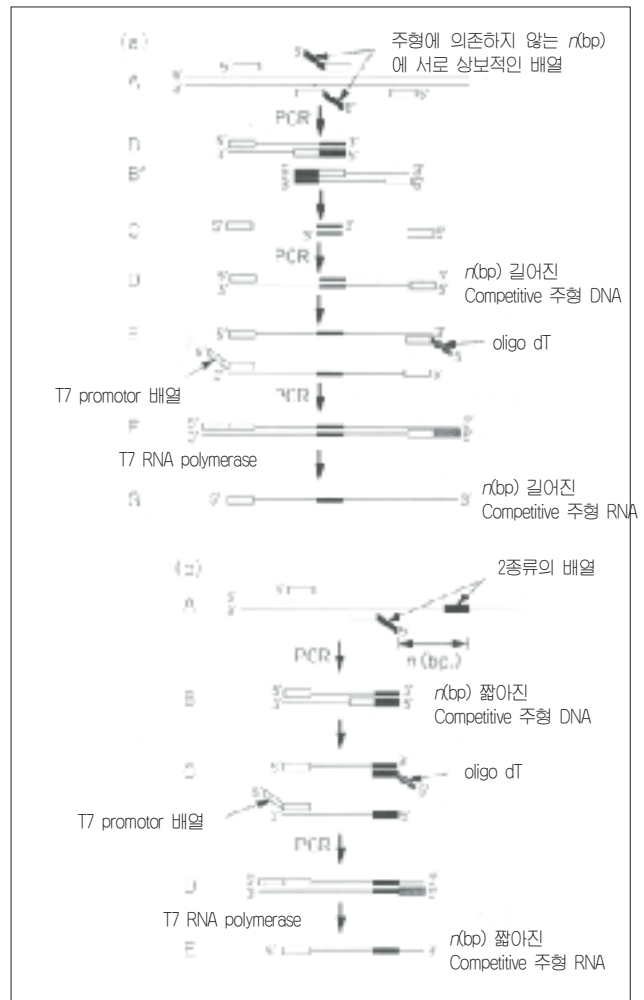


**그림 4 RT-PCR 반응시, cycle수에 따른 증폭산물량의 변화**  
 (a) 내부표준물질에서 유래하는 증폭산물량(A)과, 목적 mRNA에서 유래하는 증폭산물량(B)의 변화를 PCR의 cycle수별로 나타내었다. 영역 I은 A, B 모두 plateau에 도달하지 않았으므로 정량이 가능하다. 영역 II는 A가 plateau에 도달하지 않았으나 B가 도달했기 때문에 상호 비교가 안되므로 정량이 불가능하다. 영역 III은 A, B 모두 plateau에 도달했기 때문에 정량이 불가능하다. (b) 내부표준물질에서 유래하는 증폭산물량(A)과 목적 mRNA에서 유래하는 증폭산물량(C)의 변화를 PCR의 cycle수별로 나타내었다. A와 C는 증폭효율이 다르기 때문에 상호 비교가 안되므로 정량할 수 없다.



**그림 5 Competitive PCR법의 원리**  
 정량하고자 하는 목적 mRNA를 함유하는 시료에 단계적으로 희석한 Competitive 주형 RNA를 첨가하여 역전사 반응을 실시한다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 PCR한 후, 반응액의 일부를 겔 전기영동한다. Competitive 주형 RNA 유래의 cDNA 증폭산물은 목적 mRNA 유래의 cDNA 증폭산물과 증폭크기가 다르므로 식별할 수 있다. 두 증폭산물의 전기영동패턴을 비교하여 강도가 같은 밴드의 Competitive 주형 RNA의 양이 시료 중의 mRNA 양이 된다.

Chelly 등은 Aldolase A 유전자의 mRNA를 내부표준물질로 이용하여 길이가 길고(14 kb), copy 수가 적은 Dystrophin 유전자의 mRNA를 정량하였다<sup>4)</sup>. 또, Noonan 등과 Murphy 등은 각각  $\beta_2$ -microglobulin을 내부표준물질로 이용하여 MDR1(multidrug resistant) 유전자의 mRNA를 정량하였다<sup>5)</sup>. Horikoshi 등은  $\beta$ -actin,  $\beta_2$ -microglobulin 유전자의 mRNA를 내부표준물질로 이용하여 Thymidylc acid 합성효소, Dihydrofolate 환원효소, DT-diaphorase 유전자의 mRNA를 정량하였다<sup>7)</sup>. 또한 Kinoshita 등과 Yokoi 등은 내부표준물질로서  $\beta$ -actin 유전자의 mRNA를 이용하여 사람 T세포 백혈병(HTLV-I)의 *tax/rex* 유래의 mRNA, Cyclin B 및 *cdc25* 유전자 유래의 mRNA를 각각 정량하였다<sup>8)</sup>.



**그림 6 목적 mRNA와 상동적인 배열을 갖는 Competitive 주형의 조제법**  
 (a) 주형에 의존하지 않는  $n$ (bp)에 서로 상보적인 배열을 부가한 primer를 이용하여 PCR한다(A). 획득한 PCR 증폭산물(B, B')은 부가한 부분이 서로 상보적이므로 (C)의 단편을 얻을 수 있다. 또, 양단의 primer를 이용하여 PCR하면, (D)의 단편이 얻어진다. (B)의 단편은 (A)에 비하여 부가한  $n$ (bp) 부분이 길어진 Competitive 주형이다. 이 주형을 T7 Promotor 배열과 oligo dT를 부가한 primer로 PCR하여 이 PCR 산물을 주형으로 하여 T7 RNA Polymerase에 의한 전사반응을 실시함으로써 Competitive 주형 RNA를 조제할 수 있다. (b) 주형 DNA 배열상에  $n$ (bp)의 바깥쪽에 DNA 배열을 부가한 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시함으로써 (A)보다  $n$ (bp)만큼 짧아진 Competitive 주형 DNA를 조제할 수 있다(B). 또 T7 promotor 배열과 oligo dT를 부가한 primer로 PCR하고 이 PCR 산물을 주형으로 하여 T7 RNA Polymerase에 의한 전사반응을 실시함으로써 Competitive 주형 RNA를 조제할 수 있다.

내부표준물질을 이용한 정량법에서는 목적 mRNA의 양이 내부표준물질에 비하여 다소 나타내는 상대적인 결과만 얻을 수 있으나, mRNA의 추출 효율이나 cDNA의 합성효율은 고려하지 않아도 되는 잇점이 있다.

### III. Competitive PCR법에 의한 mRNA의 정량

Competitive PCR법이란 목적 mRNA를 검출하기 위한 primer와 상보적인 배열을 갖고 있으며 분자량 또는 제한효소부위가 목적 mRNA와는 다르지만 그 양을 알고 있는 주형 RNA(Competitive 주형 RNA)를 단계적으로 희석한 것을 시료에 첨가하여 mRNA의 추출, 역전사 반응을 거친 후 PCR반응을 실시하여 합성한 목적 mRNA와 Competitive 주형 RNA 유래의 증폭산물양을 비교함으로써 목적 mRNA 양을 측정하는 방법을 말한다.

그림 5에 Competitive PCR법의 원리를 나타내었다. Competitive PCR에서는 PCR 반응시에 Competitive 주형 RNA 유래의 cDNA와 목적 mRNA 유래의 cDNA간에 primer의 경합이 일어난다. Competitive 주형 RNA가 다량인 경우에는 Competitive 주형 RNA 유래의 cDNA가 우선적으로 증폭되나, 목적 mRNA의 양이 많은 경우에는 그와 반대로 목적 mRNA 유래의 cDNA가 우선적으로 증폭된다. Competitive 주형 RNA와 목적 mRNA의 양이 같으면 증폭산물의 양도 같아진다. 첨가한 Competitive 주형 RNA의 양은 이미 알고 있으므로 이 양으로 목적 mRNA의 양을 알 수 있다. 한편 DNA(Competitive 주형 DNA)를 Competitive 주형으로 이용하는 경우도 있으나, 이 경우는 목적 mRNA 유래의 cDNA를 정량하는 것이 된다. RNA 추출 및 cDNA 합성반응을 실시한 시료에 단계적으로 희석한 Competitive 주형 DNA를 첨가하여 PCR 반응을 실시하므로써 cDNA를 정량한다. Competitive PCR법의 최대 장점은 앞에서 설명한 plateau 효과의 영향을 받지 않는다는 점이다. 따라서 내부 표준물질을 이용하는 방법처럼 사전에 대수 증폭영역을 확인할 필요가 없다. 또한 Competitive 주형 RNA를 이용하면 RNA의 추출 효율이나 역전사효소 반응의 수율에 관한 문제도 없다.

Competitive PCR법에는 목적 mRNA와 상동적인 배열을 Competitive 주형 RNA(DNA)로 이용하는 방법과 전혀 다른 배열을 이용하는 방법이 있다.

#### 1. 목적 mRNA와 상동적인 배열을 갖는 Competitive 주형을 이용한 Competitive PCR법

Competitive 주형 RNA(DNA)에는 목적 mRNA의 배열에 부위 특이적인 변이를 이용하여 새로이 제한효소 인식배열을 도입한 것 또는 십여개의 염기쌍의 삽입이나 결실을 도입한 것을 사용한다. Competitive 주형 RNA(DNA)의 배열은 목적 mRNA와 거의 같은 배열이므로 증폭효율에는 문제가 없다. 제한효소 배열을 도입한 Competitive 주형 RNA(DNA)는 PCR 종료 후 증폭산물을 계

한효소로 절단함으로써 목적 mRNA 유래의 증폭산물과 Competitive 주형 RNA(DNA) 유래의 증폭산물을 전기영동으로 구분할 수 있다. 한편 염기배열을 결실하거나 삽입한 Competitive 주형 RNA(DNA)는 서로 분자량이 다르므로 그대로 전기영동하여 목적 mRNA 유래의 증폭산물과 Competitive 주형 RNA(DNA) 유래의 증폭 산물을 구별할 수 있다.

Becker-Andre 등은 새로이 제한효소 배열을 도입한 Competitive 주형 RNA를 이용하여 감자 배양세포 중의 4-coumarinic acid:CoA ligase의 mRNA를 정량하였다<sup>9)</sup>. 또 Gilliland 등은 small intron을 갖는 genomic DNA 단편 또는 제한효소 배열을 도입한 cDNA를 Competitive 주형 DNA로 하여 GM-CSF와 IL-3의 mRNA를 정량하였다<sup>10)</sup>. 제한효소 인식배열을 도입한 Competitive 주형 RNA(DNA)의 조제는 시간을 요하는 까다로운 조작이다. Diviacco 등은 PCR 반응을 이용하여 간단히 n 염기쌍의 DNA를 삽입시키는 Competitive 주형 DNA의 조제법을 개발하였다<sup>11)</sup>. 또한 Celi 등도 PCR 반응을 이용하여 n 염기쌍이 결실된 Competitive 주형 DNA의 조제법을 개발하였다<sup>12)</sup>. 그림 6에 위의 두가지 방법을 나타내었다. 또한 한쪽 방향의 primer에 T7 promotor 배열을 그리고 다른 한쪽의 primer에는 oligo dT 배열을 부가한 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시하여 합성한 DNA 단편을 주형 DNA로 하여 T7 RNA polymerase에 의해 Competitive 주형 RNA를 조제할 수 있다<sup>13)</sup>.

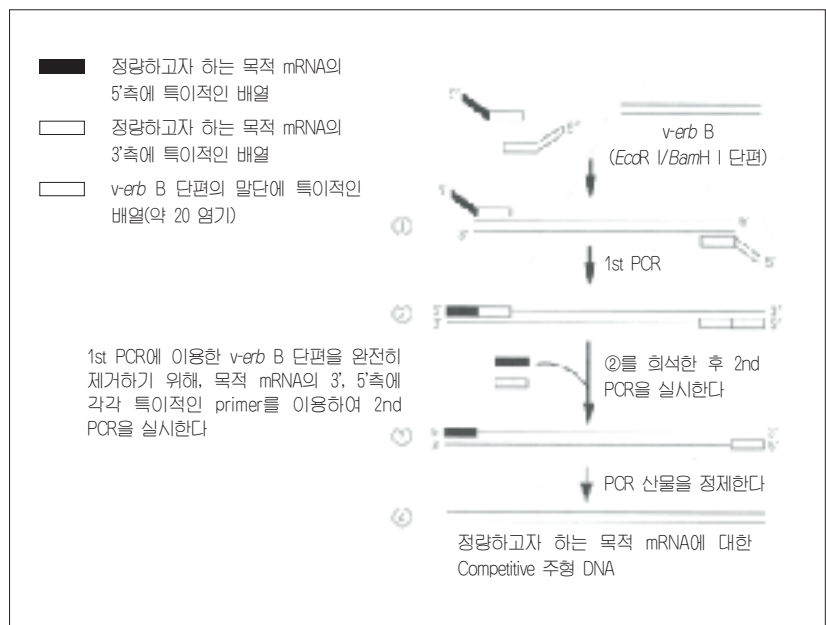


그림 7 목적 mRNA와 전혀 다른 배열을 갖는 Competitive 주형 DNA의 조제법

Primer가 annealing하는 부위 이외의 부분이 정량하고자 하는 목적 mRNA의 배열과 다른 배열을 갖는 Competitive 주형 DNA를 조제하는 방법을 나타낸다. v-erb B의 EcoRI/BamHI 단편을 이용하여 목적 mRNA의 3', 5'측에 특이적인 배열을 부가한 primer를 이용하여 PCR을 실시하면, ②의 증폭산물이 얻어진다. 또 v-erb B 단편을 완전히 제거하기 위해 ②를 희석한 다음 2nd PCR을 실시한다. 증폭산물을 정제하면 정량하고자 하는 목적 mRNA에 대한 Competitive 주형 DNA를 조제할 수 있다. 단 반응에 사용하는 임의의 단편의 증폭효율이 목적 mRNA 유래의 cDNA와 같은 지를 확인해야 한다.

## 2. 목적 mRNA와 전혀 다른 배열을 갖는 Competitive 주형 RNA(DNA)를 이용한 Competitive PCR법

목적 mRNA의 배열과 primer가 annealing부위 이외의 부분이 완전히 다른 배열을 갖는 RNA(DNA) 단편을 Competitive 주형 RNA(DNA)로 이용한다. 이 경우는 증폭되는 DNA의 배열이 목적 mRNA와 Competitive 주형 RNA(DNA)에서 다르므로 두 주형의 증폭효율이 같음을 확인하여야 한다.

Siebert 등은 600 염기쌍으로 구성되는 *v-erb B*의 *EcoR I*-*BamH I* DNA 단편을 이용한 Competitive 주형 DNA의 조제법을 개발하였다(그림 7)<sup>14, 15)</sup>. 1st PCR의 primer 배열을 목적 mRNA에 따라 변경함으로써 여러 종류의 mRNA에 대한 Competitive 주형 DNA의 조제가 가능하다. 단 조제한 Competitive 주형 DNA의 증폭효율은 목적 mRNA의 증폭효율과 거의 같은 것으로 확인되었다. 그림 8은 위의 방법으로 조제한 Competitive 주형 DNA를 사용하여 사람 태반 및 HeLa 세포 유래의 total RNA 1 μg에서 조제한 cDNA 중 TGF-β의 cDNA양을 측정된 결과를 나타낸 것이다. 단, 이 방법으로 조제한 사람 및 mouse의 cytokines의 mRNA 정량

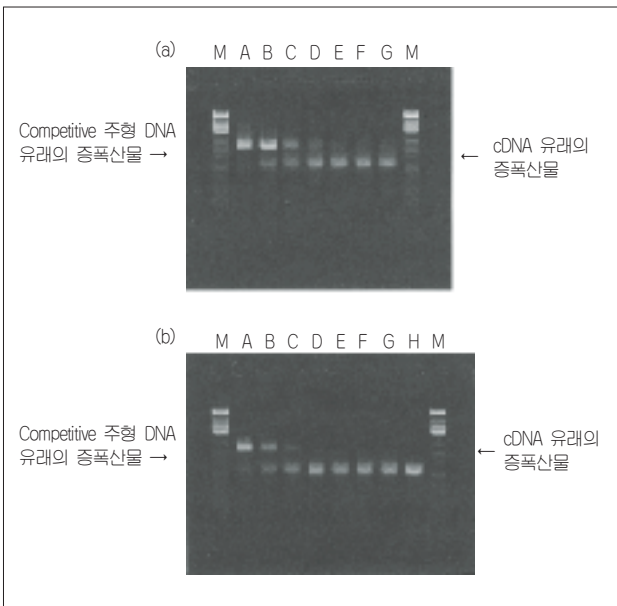


그림 8 목적 mRNA와 heterogenous한 배열을 갖는 Competitive 주형 DNA를 이용하여 정량한 실험예

(a) *v-erb B*의 *EcoR I*/*BamH I* 단편을 기본으로 한 Competitive 주형 DNA(상품명:PCR MIMICs, Clontech사)를 이용하여 사람 태반 유래의 total RNA(1 μg)에서 조제한 cDNA 중의 TGF-β 유전자의 양을 측정했다. cDNA 유래의 증폭산물의 양과 Competitive 주형 DNA 유래의 증폭산물의 양이 같아지는 곳이 lane C로, 이때 TGF-β 유전자의 양은  $1 \times 10^{-18}$  mol로 정량되었다. [반응조건] RT-PCR 키트 사용(상품명:RT-PCR high, TOYOBO). 역전사반응:(42°C, 20분)→(99°C, 5분)→(4°C, 5분), PCR 반응:(94°C, 30초)→(60°C, 30초)→(72°C, 90초)를 35 cycle로 반응하였다. [전기영동] 2% agarose gel 사용(상품명:VisiGel™ Separation Matrix, Stratagene사) (1× TAE buffer). lane M:  $\phi$ X 174/*Hinf I* 단편, lane A:Competitive 주형양  $2 \times 10^{-16}$  mol, lane B:Competitive 주형양  $2 \times 10^{-17}$  mol, lane C:Competitive 주형양  $2 \times 10^{-18}$  mol, 이하 lane G까지 각각 10배 희석을 반복한 것을 사용하였다.  
 (b)같은 방법으로 HeLa 세포 유래의 total RNA에서 조제한 cDNA 중의 TGF-β 유전자의 양을 측정하였다. cDNA 유래의 증폭산물의 양과 Competitive 주형 DNA 유래의 증폭산물의 양이 같아지는 곳은 lane B~C로, TGF-β 유전자의 양은  $1 \times 10^{-17}$ ~ $1 \times 10^{-18}$  mol로 정량되었다. 또한 Competitive 주형 DNA의 희석 계열을 세분하면 정확하게 정량할 수 있으리라 본다. [반응조건] (a)와 같음.

용 Competitive 주형 DNA(25종류)는 시판되고 있다(상품명: PCR MIMICs™, Clontech사). 반복하여 강조하면 이 Competitive 주형은 DNA이므로 RNA의 추출 효율이나 역전사효소 반응의 수율에 대한 문제는 검토할 여지가 남아 있다. 정확하게 mRNA를 정량하려면 앞에서 언급한 바와 같이 T7 RNA polymerase를 이용하여 Competitive 주형 RNA를 조제하거나 β-actin 등의 내부표준물질에 대하여 Competitive PCR 반응을 실시하여 목적 mRNA의 PCR 반응 결과와 비교해야 한다.

### ▶ 맺음말

내부표준물질을 이용한 RT-PCR법이나 Competitive PCR법을 실시함으로써 미량의 mRNA 또는 소량의 조직이나 세포로부터 mRNA의 양을 정량할 수 있다. 내부표준물질을 이용한 RT-PCR법이나 Competitive PCR법은 현재 유전자 발현 연구에 널리 이용하고 있으며 생명과학연구의 중심과제인 발생, 분화, 암 등의 기구 해명에 크게 공헌하고 있다. 본 고에서는 소개하지 않았으나 이미 임상분야에서는 HIV, HCV 등 미량의 RNA 바이러스의 정량에 Competitive PCR법을 이용하고 있다.

### [참고문헌]

- 1) Kinoshita, T., Imamura, J., Nagai, H., Shimotohno K. : *Anal. Biochem.* **206**, 231-235(1992)
- 2) Nakayama, H., Yokoi, H., Fujita, J. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4939(1992)
- 3) Dicesare, J., Grossman, B., Katz, E., Picozza, E., Ragusa, R., Woudenberg, T. : *Biotechniques*, **15**, 152-157(1993)
- 4) Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., Kahn, A. : *Nature*, **333**, 858-860(1988)
- 5) Noonan, D. E., Beck, C., Holzmayer, T. A., Chin, J. E., Wunder, J. S., Andrusis, I. L., Gazdar, A. F., Willman, C. L., Griffith, B., VonHoff, D. D., Roninson, I. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7160-7464(1990)
- 6) Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T., Bates, S. E. : *Biochemistry*, **29**, 10351-10356(1990)
- 7) Horikoshi, T., Danenberg, K. D., Stadlbauer, T. W., Volkenandt, M., Shea, L. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frösing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P., Danenberg, P. V. : *Cancer Res.*, **52**, 108-116(1992)
- 8) Yokoi, H., Natsuyama, S., Iwai, M., Noda, Y., Mori, T., Mori, K., Fujita, K., Nakayama, H., Fujita, J. : *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **195**, 769-775(1993)
- 9) Becker-Andre, M., Hahlbrock, K. : *Nucl. Acids Res.*, **17**, 9437-9446(1989)
- 10) Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2725-2729(1990)
- 11) Diviacco, S., Norio, P., Zentilin, L., Menzo, S., Clementi, M., Biamonti, G., Riva, S., Falaschi, A., Giacca, M. : *Gene*, **122**, 313-320(1992)
- 12) Celi, F. S., Zenilman, M. E., Shuldiner, A. R. : *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1047(1993)
- 13) Vanden Heuvel, J. P., Tyson, F. L., Bell, D. A. : *Biotechniques*, **14**, 395-398(1993)
- 14) Siebert, P. D., Larrick, J. W. : *Nature*, **359**, 557-558(1992)
- 15) Siebert, P. D., Larrick, J. W. : *Biotechniques*, **14**, 244-249(1993)
- 16) Hayashi 등 : *대사*, **29**, 513-517(1992)

# TaKaRa cDNA Library

Plasmid DNA형	5 $\mu$ g	600,000원
재조합균체형	500 $\mu$ l $\times$ 2	600,000원

## Mouse cDNA library 및 Human brain 부위별 cDNA library 신발매!!

발매이래 호평을 받고 있는 human cDNA library에 이어서 연구자 여러분들의 요망에 부응하여 금번 mouse cDNA library를, 또한 뇌연구를 지원하기 위하여 human brain의 부위별 cDNA library를 신발매하므로 간단히 소개한다.

### ▶ 개요

새로 발매한 mouse cDNA library는 11종류의 각종 장기 유래의 poly(A)<sup>+</sup> RNA로부터, human brain 부위별 cDNA library는 7종류의 각 조직 유래의 poly(A)<sup>+</sup> RNA로부터 Linker-Primer법<sup>1)</sup>으로 제작한 것이다(제작법에 관한 상세한 내용은 제 3권 1호 31 page 참조) . 이러한 cDNA library는 다음과 같은 특징을 갖고 있다.

- 1) 동물세포 발현용의 plasmid vector에 cDNA가 일방향성 (*Bgl* II-*Not* I site간)으로 cloning되어 있어 바로 동물세포에서 발현할 수 있다.
- 2) Cloning 전에 spin column으로 두 차례에 걸쳐 size fractionation을 실시하여 짧은 단편(300 bp 이하)은 거의 제거된 상태이므로 insert의 평균 크기가 비교적 길다.
- 3) 액체배양법이 아닌 semi solid 배지를 이용한 고상증폭법으로 1회만 증폭하였으므로 primary library 내에는 independent clone만이 보존되어 있다.

모든 cDNA library는 plasmid DNA형과 재조합 균체형의 두 종류로 준비되어 있다. Plasmid형 cDNA library는 증폭한 library의 일부에서 plasmid DNA를 추출정제하여 제조한 것이다.

재조합균체형은 probe에 의한 colony hybridization으로, plasmid DNA형은 PCR법으로 screening하는데 적당하다.

### ▶ 제품내용

#### A. Plasmid DNA 형 :

용량 : 5.0  $\mu$ g

형상 : 10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA

#### B. 재조합균체형

Titer :  $> 1.0 \times 10^7$  cfu/ml(1 ml)

Host strain : XL1-Blue MRF<sup>+</sup>

형상 : SOB-20% glycerol

### ▶ Vector

cDNA library의 구축에 사용한 pAP3neo(그림 1) vector는 오사카대학의 Nojima 교수 등이 개발한 것으로 SV40 promoter를 갖고 있으므로 포유류 동물세포에서의 발현할 수 있으며 ssDNA를 생성시키는데 필요한 *f1 ori*와 *in vitro* RNA transcription할 수 있도록 T7 및 T3 RNA polymerase promoter를 함께 가지고 있다.

### ▶ 각종 Mouse cDNA library의 품질

각종 Mouse cDNA library의 품질과 관련된 data를 표 1에 소개하였다.

모든 library에 대하여 insert DNA를 확인하였다. 또, 각 cDNA library의 재조합 균체 1  $\mu$ l 및 plasmid DNA 10 ng 을 주형으로 실시한 PCR로 아래의 3 종류의 cDNA를 증폭하여 검출하였다(그림 2).

- 1)  $\beta$ -actin (발현량 high level)
- 2) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (발현량 moderate level)
- 3) Transferrin receptor(발현량 low level)  
(단, smooth muscle의 cDNA library에 대해서는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase의 검출은 실시하지 않았다.)



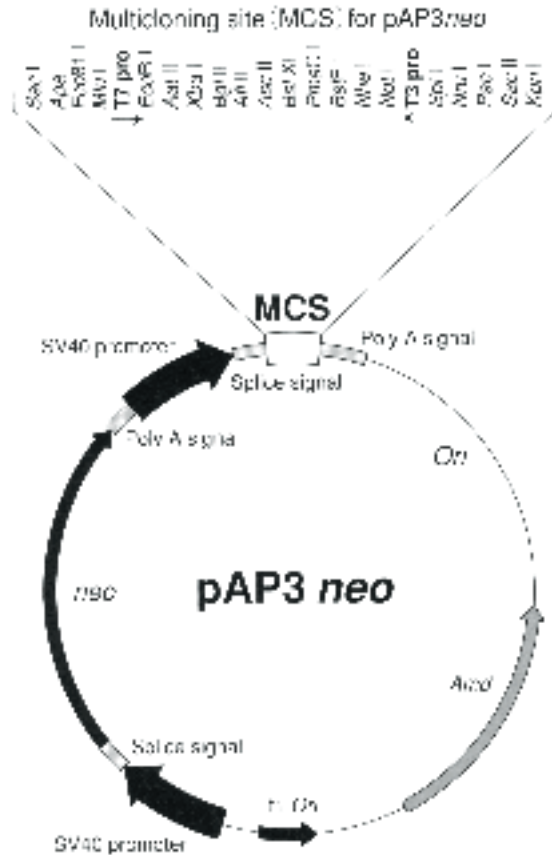


그림 1 pAPneo vector와 multicloning site

표 1 각종 Mouse cDNA library의 품질

cDNA Library	TaKaRa Code No. plasmid DNA형	재조합균체형	poly(A) <sup>+</sup> RNA Source	Primary Library size (Independent Clone)	Amplified Library Titer(cfu/ml)	Cloning후 Average Insert size(kbp)
Mouse Brain	9528	9628	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$2.3 \times 10^6$	$1.4 \times 10^8$	1.4
Mouse Heart	9529	9629	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$3.8 \times 10^6$	$8.4 \times 10^7$	1.1
Mouse Kidney	9530	9630	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-11 weeks	$2.1 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$	1.1
Mouse Liver	9531	9631	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$2.2 \times 10^6$	$1.8 \times 10^8$	1.3
Mouse Lung	9532	9632	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$2.8 \times 10^6$	$1.2 \times 10^8$	1.0
Mouse Pancreas	9533	9633	pooled from 200 BALB/c males, ages 8-12 weeks	$2.8 \times 10^6$	$4.6 \times 10^7$	1.1
Mouse Skeletal Muscle	9534	9634	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$2.5 \times 10^6$	$1.1 \times 10^8$	1.5
Mouse Smooth Muscle	9535	9635	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$2.6 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$	1.4
Mouse Spleen	9536	9636	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-11 weeks	$3.6 \times 10^6$	$1.9 \times 10^8$	1.0
Mouse Testis	9537	9637	pooled from 200 BALB/c males, ages 9-10 weeks	$4.7 \times 10^6$	$7.4 \times 10^7$	1.5
Mouse Thymus	9538	9638	pooled from 25 BALB/c males and females, ages 8-10 weeks	$3.0 \times 10^6$	$6.6 \times 10^7$	1.1

- 1) Primary Library Size (Independent clone) : 증폭전의 clone 수
- 2) Amplified Library Titer : cDNA library 제작시의 값(제품 사용시의 titer는  $> 1.0 \times 10^7$  cfu/ml)
- 3) Cloning 후의 Average Insert Size : random하게 선택한 15개 colony의 평균 insert size

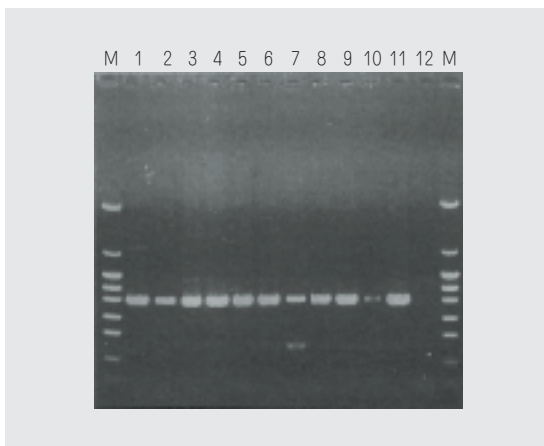


그림 2 각종 Mouse cDNA library로부터의 Transferrin receptor cDNA의 검출

10 ng의 plasmid DNA를 주형으로 하여 mouse transferrin receptor cDNA에 특이적인 primer로 PCR(30 cycles)을 실시하였다. 20  $\mu$ l 반응액 중 5  $\mu$ l를 1% agarose gel(Agarose L03 [TAKARA] : TaKaRa Code 5003)로 전기영동하였다.

- Lane  
M : pHY marker (TaKaRa Code 3404A/B)  
1 : Lung  
2 : Kidney  
3 : Liver  
4 : Spleen  
5 : Brain  
6 : Heart  
7 : Pancreas  
8 : Skeletal Muscle  
9 : Smooth Muscle  
10 : Testis  
11 : Thymus  
12 : Negative Control

## ▶ Human Brain 부위별 cDNA library의 품질

Human Brain 부위별 cDNA library의 품질에 대해 표 1에 품질 data를 소개하였다.

모든 library에 대하여 insert DNA의 크기를 확인하고 있다(그림 3). 또 각 cDNA library의 재조합 균체 1  $\mu$  및 plasmid DNA 10 ng을 주형으로 한 PCR로 아래의 3 종류 cDNA의 5' 말단 영역(약 1 kbp)을 검출하였다(그림 4).

- 1)  $\beta$ -actin (전체길이 약 1.7 kbp, 발현량 high level)
- 2) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (전체길이 약 1.2 kbp, 발현량 moderate level)
- 3) Transferrin receptor (전체길이 약 5.0 kbp, 발현량 low level)

한편 TaKaRa는 고객의 주문에 의한 cDNA library의 제작 서비스도 실시하고 있다.

표 2 Human Brain 부위별 cDNA library의 품질

cDNA Library	TaKaRa Code		poly(A) <sup>+</sup> RNA Source	Primary Library size (Independent Clone)	Amplified Library Titer(cfu/ml)	Cloning후 Average Insert size(kbp)
	plasmid DNA형	재조합균체형				
Human Brain, amygdala	9521	9621	pooled from male/female Caucasians, ages 16-75: Cause of death, sudden death	$3.2 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$	1.3
Human Brain, caudate nucleus	9522	9622	pooled from male/female Caucasians, ages 18-78: Cause of death, trauma	$2.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$	1
Human Brain, cerebellum	9523	9623	pooled from male/female Caucasians, ages 22-70: Cause of death, trauma	$4.6 \times 10^6$	$2.4 \times 10^8$	1.5
Human Brain, corpus callosum	9524	9624	pooled from male/female Caucasians, ages 22-70: Cause of death, sudden death	$5.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^8$	1.4
Human Brain, hippocampus	9525	9625	pooled from male/female Caucasians, ages 16-70: Cause of death, sudden death	$4.4 \times 10^6$	$1.2 \times 10^8$	1.1
Human Brain, substantia nigra	9526	9626	pooled from male/female Caucasians, ages 16-75: Cause of death, sudden death	$4.2 \times 10^6$	$1.2 \times 10^8$	1.6
Human Brain, thalamus	9527	9627	pooled from male/female Caucasians, ages 16-75: Cause of death, sudden death	$5.4 \times 10^6$	$1.5 \times 10^8$	1.3

- 1) Primary Library Size(Independent clone) : 증폭전의 clone 수
- 2) Amplified Library Titer : cDNA library 제작시의 값 (제품사용시의 titer는  $> 1.0 \times 10^7$  cfu/ml)
- 3) Cloning 후의 Average Insert Size : random하게 선택한 15개 colony의 평균 insert size

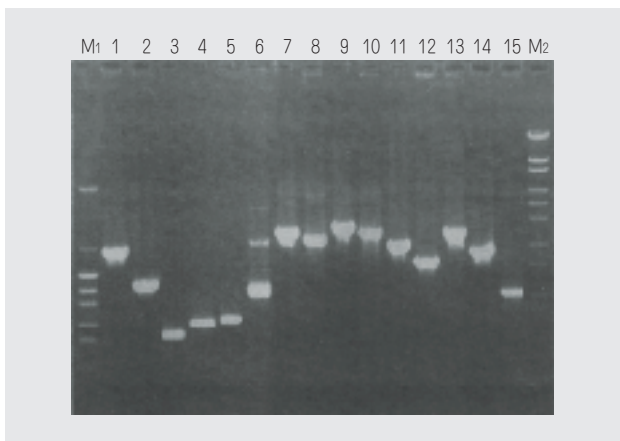


그림 3 Human Brain, substantia nigra cDNA library의 insert DNA의 확인

Random하게 선택한 clone에 대하여 T7, T3 promoter primer로 PCR을 실시하여 insert DNA를 증폭하였다.

20  $\mu$  반응액 중 5  $\mu$ 를 1% agarose gel(Agarose L03 [TAKARA] : TaKaRa Code 5003)에서 전기영동하였다.

Lane M : 1 ~ 15 : Insert cDNA  
 M1 : pHY marker(TaKaRa Code 3404A/B)  
 M2 :  $\lambda$ -EcoT14 I digest(TaKaRa Code 3401)

### [참고문헌]

- 1) Nojima H. (1994) 실험의학 별책 Biomanual Series 2 [유전자 library의 제작법] p79-94
- 2) Kobori, M., Ikeda, Y., Nara, H., Kato, M., Kumegawa, M., Nojima, H. And Kawashima, H. (1998) *Genes To Cells*, in press.

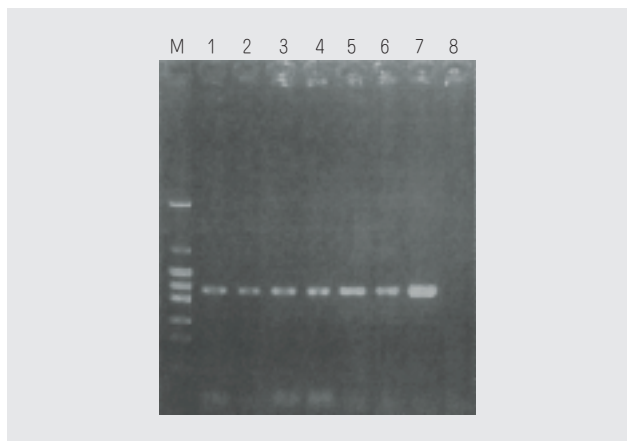


그림 4 Human Brain 부위별 cDNA library로부터의 Transferrin receptor cDNA의 검출

10 ng의 plasmid DNA를 주형으로 하여 human transferrin receptor cDNA에 특이적인 primer로 PCR(30 cycles)을 실시하였다. 20  $\mu$  반응액 중 5  $\mu$ 를 1% agarose gel(Agarose L03 [TAKARA] : TaKaRa Code 5003)에서 전기영동하였다.

Lane  
 M : pHY marker (TaKaRa Code 3404A/B)  
 1 : hippocampus  
 2 : amygdala  
 3 : thalamus  
 4 : corpus callosum  
 5 : substantia nigra  
 6 : cerebellum  
 7 : caudate nucleus  
 8 : negative control



# TaKaRa RECOCHIP

TaKaRa Code 9039 100회용 240,000원

## Agarose gel에서 DNA 단편을 신속하고 간편하게 회수!!

Agarose gel로부터 목적 DNA band를 회수하는 것은 유전공학 실험에 있어서 필수적인 조작이다. TaKaRa RECOCHIP은 전기영동 한 DNA band들 중 목적으로 하는 단편을 회수하는데 사용하는 disposable type의 chip으로 무엇보다 신속하고 간편한 것이 큰 특징이다. 다검체를 동시에 처리할 수 있으므로 routine work 등에 최적이다.

### ▶ 특징

- 전기영동 중에 RECOCHIP을 gel에 꽂는 것만으로 조작이 극히 간단하다.
- 목적 DNA가 RECOCHIP 안으로 이동하기만 하면 완료되므로 단시간 내에 회수할 수 있다(분획 분자량 14,000 이상).  
(예) 1.88 kbp의 DNA의 경우 0.7% agarose gel(TAE buffer)에서 100V, 3분 정도이다.
- 특별한 시약을 필요로 하지 않으며 또한 평상시 사용하는 전기영동장치와 미량 원심분리기만 있으면 활용된다.
- DNA에 물리적인 힘을 가하지 않으므로 DNA의 손상이 없다.

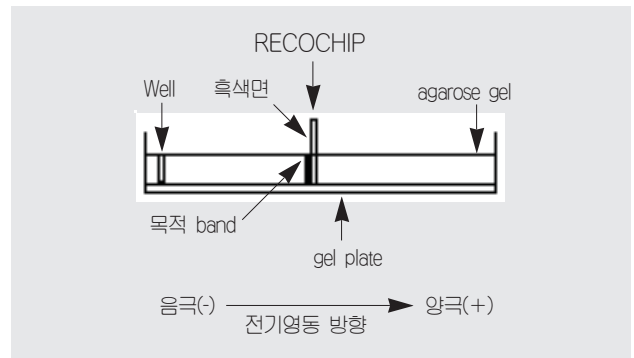
### ▶ 내용

RECOCHIP	100 개
2.0 ml tube	100 개
Gel cutter	3 개

### ▶ 사용방법

- ① 전기영동 중에 염색한 겔 상에서 목적 DNA 밴드의 바로 뒤(양극측)에 부속품인 gel cutter로 바닷까지 꽂아 넣어 gel을 자른다.
- ② 전기영동 버퍼에 침지한 RECOCHIP을 자른 부분에 꽂는다. 이 때 chip의 흑색면이 음극쪽(well 쪽)을 향하도록 한다.
- ③ 수 분간 전원을 넣어 영동한다.
- ④ 영동종료 후 RECOCHIP을 gel에서 뽑아낸다(이 때 gel에 목적의 DNA band가 잔존하면, 다시 한번 RECOCHIP을 gel에 꽂아 통전한다). RECOCHIP을 첨부한 2.0 ml 튜브에 넣어 약 5,000 rpm에서 2~3초간 원심분리한다. Tube 내에서 40±10 µl의 DNA를 회수할 수 있다.

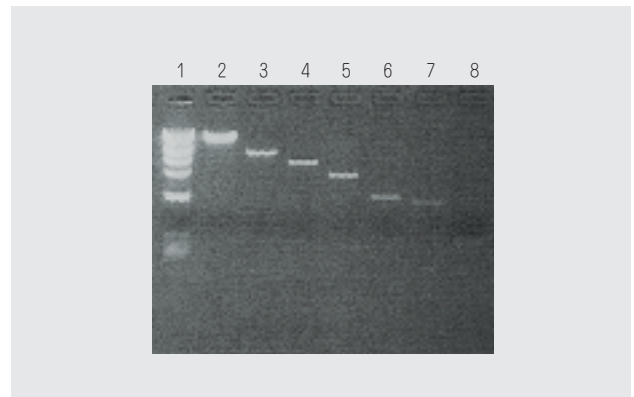
주) Gel cutter와 RECOCHIP을 꽂을 때나 뽑을 때는 가능하면 전기영동조에서 꺼내어 실시하십시오. 겔을 전기영동조에서 꺼내지 않고 실시할 때는 반드시 전원스위치를 off하여 주십시오.



### ▶ 사용례

#### λ DNA-Hind III 단편의 회수

1.5 µg의 λ DNA-Hind III digest(TaKaRa Code 3403)를 0.7% SeaKem GTG Agarose(TaKaRa Code F50071) gel로 전기영동 한 후 각 단편을 RECOCHIP을 사용하여 회수하고, 각 단편의 전기영동 양상을 조사하였다(아래 그림). 그림과 같이 각 band가 깨끗하게 회수되었으며 23.1 kbp 단편의 경우 90% 이상의 회수율을 얻을 수 있었다.



Lane

- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| 1 : λ-Hind III digest 1.5 µg | 5 : 회수 후의 4.4 kbp fragment |
| 2 : 회수 후의 23.1 kbp fragment  | 6 : 회수 후의 2.3 kbp fragment |
| 3 : 회수 후의 9.4 kbp fragment   | 7 : 회수 후의 2.0 kbp fragment |
| 4 : 회수 후의 6.6 kbp fragment   | 8 : 회수 후의 0.6 kbp fragment |

### 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
SUPREC™-01	9040	100개	250,000원
EASYTRAP™ Ver.2	9410	1 Kit	160,000원

NEW

# Long Ranger Singel™ Pack

FMC사의 제품입니다.

## 혼합하여 gel 판에 주입만 하면 되는 고품질의 sequencing gel 등장!

발매 이래 연구자 여러분의 호평을 받아 온 Long Ranger™ Gel Solution이 Ready-to-use pack의 형태로 다시태어났다. 간편한 조작으로 고품질의 sequencing gel을 단시간에 제작할 수 있다.

### ▶ Long Ranger™란?

Long Ranger는 DNA sequencing용으로 개발한 polyacrylamide gel이다. 종래의 polyacrylamide와 비교하였을 때 30% 이상 더 많은 sequence 정보를 해독할 수 있으므로 long range의 해석에는 아주 유용하다.

### ▶ Gel 제작에 필요한 모든 component가 하나의 pack에

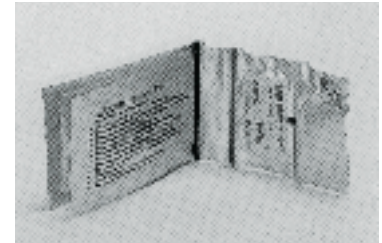
DNA sequencing에서 안정한 결과를 얻기 위해서는 고품질의 시약을 사용하고 정확한 양을 첨가하는 것이 무엇보다

중요하다. Long Ranger Singel™ Pack은 sequencing gel을 조제하는 데 필요한 모든 component들을 하나의 pack에 넣어 놓은 형태이므로 clip으로 고정해 놓은 유리판에 주입만 하면 된다. 주입구에는 filter가 부착되어 있으므로 고가의 disposable filter도 필요없다. 또 탈이온 및 탈기과정이 필요없으므로 간단한 조작으로 고품질의 gel을 제작할 수 있다.

Long Ranger Singel™ Pack에는 ABI 373A DNA Sequencer와 ABI Prism™ 377 DNA Sequencer 각각에 적합하도록 제조되어 있으며 또한 manual sequencing gel용도 있다.

### ▶ 제품 내용

Component	377-36 cm 2×	373-34 cm	373-48 cm	manual
Total Volume	50 ml	50 ml	70 ml	75 ml
Long Ranger™	5%	5.75%	5%	5.75%
Urea	6 M	7 M	8.3 M	7 M
TBE	1×	1×	1×	1×
APS	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
TEMED	0.07%	0.07%	0.07%	0.07%



## Q & A

**Q1** 종래의 Long Ranger™ Gel Solution을 이용하여 좋은 결과를 얻었는데, Long Ranger Singel™ Pack을 사용하여도 동일한 결과를 얻을 수 있나?

**A1** 결과에는 차이가 없습니다. 그러나 Long Ranger Singel™ Pack을 사용하면 안정적으로 고품질의 gel을 제작할 수 있습니다.

**Q2** ABI 373A DNA Sequencer 용과 ABI Prism™ 377 DNA Sequencer 용의 내용물의 차이점은?

**A2** ABI 373A DNA Sequencer와 ABI Prism™ 377 DNA Sequencer는 규격이 다릅니다. 따라서 위에 표기한 것처럼 각각의 기종에 적합하도록 최적화하였습니다.

### 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
Long Ranger Singel™ Pack 377-36cm 2×	F50691	5 units	96,000원
Long Ranger Singel™ Pack 373-48cm	F50692	5 units	96,000원
Long Ranger Singel™ Pack 373-34cm	F50693	5 units	96,000원
Long Ranger Singel™ Pack Manual	F50694	5 units	96,000원
Long Ranger™ Gel Solution	F50610	125 ml	
Long Ranger™ Gel Solution	F50611	250 ml	255,000원
Long Ranger™ Gel Solution	F50612	250 × 2 ml	
Long Ranger™ 6% PreMix Gel Solution	F50792	75 ml	19,200원
Long Ranger™ 6% PreMix Gel Solution	F50660	6 × 75 ml	
Long Ranger™ 6% PreMix Gel Solution	F50661	12 × 75 ml	

\* 당사는 FMC 전제품에 대하여 9월 30일까지 20% 특별할인 판매를 실시하고 있습니다.



# CTL Epitope 동정용 Peptide Set

## MAGE3(HLA-A24), CEA(HLA-A24), HER2/neu(HLA-A24)

### CTL 유도실험에 흥미가 있는 연구자 여러분께!

최근 암이나 바이러스에 대하여 CD8 양성인 세포상해성 T세포(CTL)와 관련하여 많은 기초 및 임상연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 CTL의 epitope이 되는 MHC Class I - restricted cancer antigen peptide가 동정되므로서, 이를 활용한 암의 면역치료에 관한 관심이 높아지고 있다. 그러나 60%의 일본인에게서 발견되는 HLA-A24와 관련된 CTL epitope peptide는 아쉽게도 거의 결정되어 있지 않다. Epitope peptide를 결정하는 한 가지 방법은 HLA24-A24에 결합하는 peptide의 motif를 근거로 선택한 peptide를 준비하여 그것의 CTL 유도능력을 이용하여 screening하는 것이다.

이번에 소개하는 CTL Epitope 동정용 Peptide Set는 최근 주목받고 있는 종양항원(MAGE-3, 암태아성 항원(CEA), HER2/neu) 중에서 HLA-A24에 대하여 높은 결합능력을 갖는 복수의 peptide를 선택한 것이다. 이들 peptide는 고순도이므로 각종의 CTL 유도실험에 최적적이다.

#### ▶ 서론

T. Boon 등은 CTL이 인식하는 종양 거절항원 유전자로서 Melanoma 유래의 MAGE 유전자를 발견하였고<sup>1)</sup>, 이 유전자가 발현하는 단백질 유래의 Peptide(9개의 아미노산으로 구성)가 HLA Class I 분자와 결합하므로써 CTL에 인식된다는 사실을 규명하였다. 그 후 MAGE 이외에도 다수의 종양항원들이 발견되어 이들 종양항원 peptide를 이용한 특이적인 CTL의 유도 및 면역요법으로 이용할 수 있는 시대가 열렸다(그림 1).

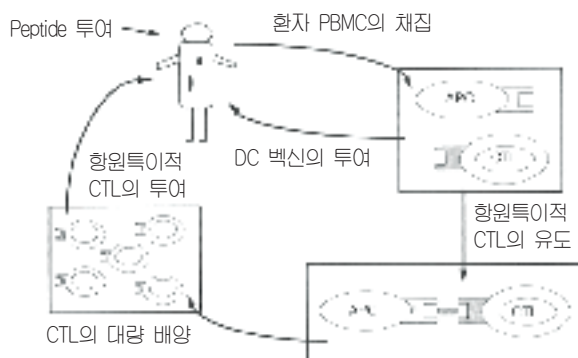


그림 1 CTL의 유도와 면역치료에의 이용

#### ▶ Class I - restricted antigen peptide의 motif

CTL은 MHC class I 분자와 peptide의 복합체를 인식하여 세포상해 능력을 발휘한다. 따라서 종양항원 peptide가 CTL에 인식되려면 우선 MHC 분자와 결합해야 한다. 지금까지 다수의 종양항원 peptide들이 동정되었지만, 이들의 대부분은 백인 혈통에서 발현하는 HLA-A2.1 또는 HLA-A1에 결합하는 것이다. 한편 동양인에게서 높은 빈도로 발현하는 class I 분자는 HLA-A24(60%)로 이에 결합하는 peptide는 표 1에 나타난 motif 구조를 갖고 있어 다른 HLA-A1, -A2.1 및 -A3의 것과는 다르다<sup>2,3)</sup>. 앞으로 동양인의 암의 면역치료법에 있어서 HLA-24-restricted cancer antigen peptide의 동정은 아주 중요한 비중을 차지하게 될 것이다.

표 1 HLA-A allele에 특이적인 MHC 결합 motif

allele	peptide position		
	2	3	9 또는 10
A24	F, Y, W, M		F, L, I, W, M
A1	T, S	D, E	Y
A2.1	L, M		V
A3	V, L, M		K

#### ▶ CTL이 인식하는 종양항원

종양항원의 경우도 지금까지 발견된 것의 대부분은 동양인에게는 발병사례가 거의 없었던 melanoma 유래의 것이었다. 따라서 동양인에게서 발병사례가 많은 위암, 대장암, 폐암 또는 자궁암 등에서 과잉발현하는 것으로 알려져 있는 CEA, HER2/neu<sup>4,5)</sup>, 그리고 melanoma 유래의 종양항원 중 폐암, 식도암, 위암, 대장암 등의 다수 종양조직에서 그 발현이 보고된 MAGE-3에 대하여 HLA-A24-restricted CTL epitope의 동정에 최적인 peptide set를 준비하였다. 또 influenza virus nucleoprotein 유래의 HLA-A24 결합 peptide도 준비 중에 있다. 이 제품은 건강인의 PBMC(peripheral blood mononuclear cell: 말초혈 단핵세포)에서 비교적 쉽게 CTL을 유도할 수 있으므로 연구방법의 검토 등에 이용하기 쉽다.

#### ▶ 종양항원 peptide의 screening법

종양항원 peptide를 동정하는 한 가지 방법은 목적으로 하는 종양항원의 아미노산 배열로부터 각 HLA에 대한 MHC 결합 motif를 함유하는 9-10 아미노산 잔기의 후보 peptide를 화학적으로 합성한 다음 이들 peptide를 처리한 항원 제시 세포(APC: antigen presenting cell)를 이용하여 CD8-positive lymphocyte에 대한 자극을 반복 실시하므로써 effector cell을 유도한다. 획득한 effector cell을 이용하여 peptide를 처리한 HLA 발현세포나 종양항원 양성의 암세포주 등의 표적 세포에 대한 세포상해성을 측정한다. 그 결과 특이적인 세포상해성을 나타내는 CTL을 유도할 수 있었던 peptide를

종양항원 peptide로 동정한다<sup>6, 7)</sup>.

그러나 하나의 종양항원의 아미노산 배열중에는 HLA motif 구조를 가진 peptide가 다수 존재하므로 이들 모두를 합성하는 것은 비용 및 시간적인 측면에서 많은 문제가 있다. 또 순도가 낮은 peptide를 사용하면 목적으로 하는 CTL을 획득할 수 없는 위험도 있다(통상 순도 90% 이상을 사용).

TaKaRa는 이러한 문제점들을 모두 해결해 줄 수 있는 CTL Epitope 동정용 Peptide Set를 상품화하였다.

## ▶ 사용방법

### (1) Influenza Virus nucleoprotein 유래 peptide에 의한 CTL의 유도

Influenza virus의 감염으로 CTL이 관여하는 모든 세포면역이 작동할 경우 높은 빈도수로 precursor CTL이 존재하게 되므로, PBMC를 항원 peptide로 자극하므로써 비교적 단기간에 CTL을 유도할 수 있다고 보고되어 있다. 그 실험례로서 HLA-A24 결합성의 Influenza virus nucleoprotein 유래 peptide를 이용한 건강한 동양인으로부터 CTL을 유도한 예를 아래와 같이 소개한다.

**[방법]** Bednarek 등의 방법에 따라서 다음과 같이 CTL을 유도하였다<sup>9)</sup>. 건강한 동양인(HLA-A24 양성)의 PBMC를 HLA-A24 결합 peptide의 존재하에서 1주일동안 배양한 후 이 배양액을 peptide를 처리한 자기 PBMC stock cell이 정착된 well로 옮겨 1주일간 더 배양하면서(APC에 의한 자극) CTL을 유도하였다.

**[결과]** 2주일 동안 유도한 CTL은 peptide를 처리한 HLA-A24 발현세포(TISI)에 비해 명확한 세포상해성을 나타내었다(그림 2).

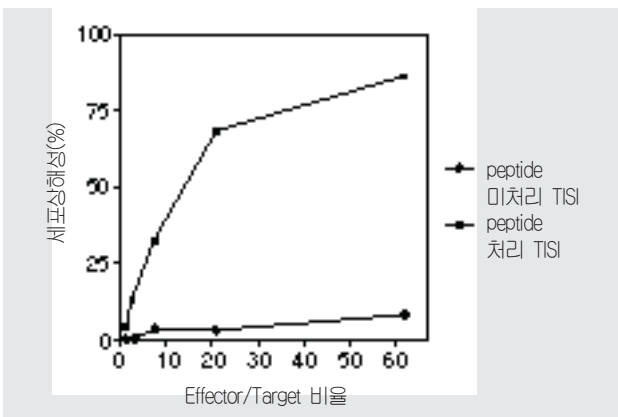


그림 2 HLA-A24 결합성 Influenza virus 유래 peptide로 유도한 CTL의 세포상해성

### (2) 종양항원 peptide를 사용한 CTL 유도예

종양항원에 대한 각종 항원제시세포(APC)를 이용하므로써 Native T cell로부터 특이적인 CTL을 유도할 수 있음이 보고되어 있다. CTL의 유도예로서 HLA-A2 결합성 MAGE-

3 peptide를 이용하여 건강한 동양인으로부터 CTL을 유도한 van der Bruggen 등<sup>9)</sup>의 보고를 소개한다<sup>10)</sup>. 또한 유도법으로는 Hill 등의 방법<sup>11, 12)</sup>, Dendritic cell을 이용하는 방법(DC법)<sup>13)</sup> 등이 있는데, 이들 방법으로도 CTL을 유도한 예가 보고되어 있다.

**[방법]** Bruggen 등의 방법에 따라 다음과 같이 CTL을 유도하였다. SAC-I(*Staphylococcus aureus* Cowan-I)의 존재하에서 배양한 PBMC에 peptide를 처리하여 항원제시세포로 이용하였다. 또 PBMC로부터 negative selection으로 CD8-positive lymphocyte를 모아 responder로 활용하였다. 앞에서 설명한 두 종류의 세포를 혼합배양하면서 약 1주일동안 peptide를 처리한 PBMC로 자극을 반복하여 CTL을 유도하였다.

**[결과]** 그림 3에 나타난 것처럼 유도된 CTL은 peptide를 처리한 HLA-A2.1 발현세포(221A2.1) 및 MAGE-3 발현세포주(526mel, KATO III)에 대해서 확실한 세포상해성을 나타내었다. 한편 peptide를 처리하지 않은 221A2.1과 MAGE-3 비발현 세포주(AZ521)에 대해서는 세포상해성을 거의 나타내지 않았다.

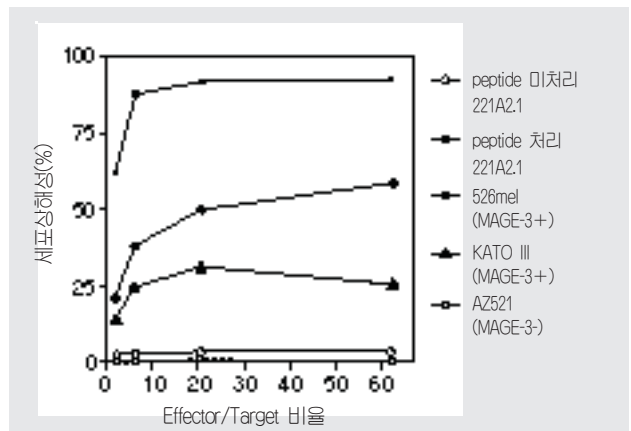


그림 3 HLA-A2.1 결합성 MAGE-3 peptide로 유도한 CTL의 세포상해성

## [참고문헌]

- 1) van der Bruggen P. et al. (1991) *Science* **254**, 1643.
- 2) Kubo R.T. et al. (1994) *J. Immunol.* **152**, 3913.
- 3) Kondo A. et al. (1995) *J. Immunol.* **155**, 4307.
- 4) Thompson J. A. et al. (1991) *J. Clin. Lab. Anal.* **5**, 344.
- 5) Slamon D. J. et al. (1989) *Science* **244**, 707.
- 6) Celis E. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2105.
- 7) Tsai V. et al. (1996) *J. Immunol.* **158**, 1796.
- 8) Bednarek M. A. et al. (1994) *J. Immunol.* **147**, 4047.
- 9) van der Bruggen et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**, 3038.
- 10) 제 55회 일본 암학회 요지집 p.490 (1996)
- 11) Plebanski M. et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* **25**, 1783.
- 12) Tanaka F. et al. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* **44**, 21.
- 13) Tsai V. et al. (1996) *J. Immunol.* **158**, 1796.

## 제품 list

제품명	TaKaRa Code	Set 내용
MAGE3 (HLA-A24)	SP101	9종 (각 1 mg)
CEA (HLA-A24)	SP102	10종 (각 1 mg)
HER/neu (HLA-A24)	SP103	10종 (각 1 mg)

각 set에는 influenza virus nucleoprotein 유래 peptide가 첨부되어 있습니다.





# 세포 상해성 측정 Kit

## LDH Cytotoxicity Detection Kit

TakaRa Code MK401

2,000 Tests

### 세포상해성 실험은 이제 Non-RI 시대

### 세포가 방출하는 LDH 활성을 고감도로 검출!!!

### 표식물질, 형광물질을 세포에 주입하여야 하는 전처리가 더 이상 필요 없습니다.

세포 상해성 측정법으로는 방사성물질(<sup>51</sup>Cr)으로 미리 표식한 세포를 이용하여 여기서 방출하는 <sup>51</sup>Cr을  $\gamma$  counter로 monitor하는 방법이 이용되고 있다. 그러나 방사성물질을 사용하여야 하고 prelabeling 조작이 필요하다는 것이 문제점이었다. 이번에 TaKaRa가 소개하는 LDH Cytotoxicity Detection Kit은 세포가 방출하는 젓산탈수소효소(LDH)를 고감도로 측정하므로써 세포상해를 측정하는 kit이다. LDH는 세포질에 존재하는 효소로서 정상인 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되어 배지내로 방출된다. 방출된 LDH는 젓산의 탈수소화를 촉매하여 pyruvic acid와 NADH를 생성시킨다. 이 NADH는 diaphorase의 촉매에 의해 tetrazolium salt(INT)를 환원시켜 490 nm에서 흡광도를 가지는 적색의 formazan을 형성한다. 따라서 방출된 LDH 활성은 490 nm에서 흡광도의 증대로 측정할 수 있다. 이번에는 본 kit을 보다 확실하고 유용하게 이용할 수 있도록

#### ▶ 특징

- (1) 안전성: 방사성 동위원소를 사용하지 않는다.
- (2) 정확성: 상해를 입은 세포의 수와 높은 상관관계를 갖는다.
- (3) 고감도:  $0.2 \sim 2 \times 10^2$  cell/well이라는 적은 세포수로도 검출할 수 있다.
- (4) 신속성: ELISA plate reader를 이용하므로 다수의 시료를 한꺼번에 측정할 수 있다. 측정시간은 0.5~1시간으로 충분하다.
- (5) 간편성: Prelabeling이나 세정작업이 필요없으며 방사성 동위원소를 사용하므로써 수반되는 위험한 조작, 실험장소의 제약, 사무처리 등으로부터 해방될 수 있다.
- (6) 확인된 성능: Lot별로 성능 검사를 실시하고 있다.

#### ▶ Kit의 내용(2,000회 분)

- Bottle 1(청색뚜껑): 촉매 diaphorase/NAD<sup>+</sup> 혼합액  
동결건조품 × 5개
- Bottle 2(적색뚜껑): 발색액(요드 tetrazolium salt(INT)와 젓산나트륨을 함유)  
45 ml × 5개

#### ▶ 서론

세포사는 지금까지 세포막의 상해를 정량함으로써 측정되어 왔고 감도나 확실성 그리고 자동화의 필요성에 의해 몇 가지의 표준방법이 개발되었다. 현재 널리 사용하고 있는 표준법은 trypan blue나 에오진 Y 등의 색소 도입이나 배제를 기본으로 하고 있으나 ①다수의 시료를 처리할 수 없고, ②상해를 입은 사세포는 정량할 수 없다는 점 등의 문제점이 있다. 두번째의 표준법은 방사성물질이나 형광물질로 미리 표식한 목적의 세포로부터 그들 물질이 방출하는 양을 측정

하는 것이다. 이 방법은 ①목적 세포를 미리 표식할 필요가 있고, ②자연적으로 방출되는 표식물질이 존재하는 등의 문제점이 있다. 세번째 방법으로는 상해 세포로부터 방출되는 세포질효소의 활성을 측정하는 방법으로 이 경우 효소활성량은 상해를 입은 세포의 비율과 상관성을 갖는다. 종래의 alkaline phosphatase나 acidic phosphatase, GOT, GPT 등을 이용하고 있지만 세포에 소량밖에 존재하지 않는다는 점이나 측정방법이 복잡하다는 이유 등으로 널리 보급되지 못했다. 젓산탈수소효소(LDH)는 모든 세포에 안정하게 존재하는 세포질효소로서 세포막이 손상되면 곧 배양상청액속으로 방출하게 된다.

#### ▶ 원리

배양상청과 LDH Cytotoxicity Detection Kit내의 반응혼합액을 반응시켜 LDH의 활성을 측정한다. 반응의 제 1단계에서 젓산이 LDH의 촉매에 의해 pyruvate로 전환되고 그 결과 NAD<sup>+</sup>가 NADH/H<sup>+</sup>로 환원된다. 제 2단계에서 diaphorase의 촉매에 의해 황색의 tetrazolium salt INT(2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl tetrazolium chloride)가 NADH/H<sup>+</sup>로 환원되면서 적색의 formazan이 된다(그림 1).

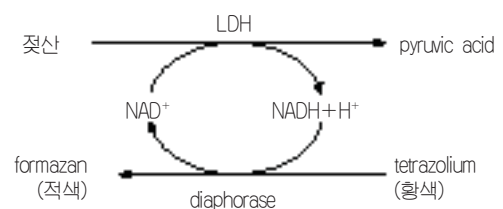


그림 1 측정원리

### ▶ 측정에 있어서의 중요점

본 kit은 background를 확실히 측정하므로써 아주 유효하게 이용할 수 있다. Background의 원인의 대부분은 조직배양에 이용하는 배지 중의 phenol red와 동물혈청 중의 LDH 때문이다. phenol red의 영향은 phenol red를 함유하지 않는 배지를 사용하므로써 해결할 수 있다. 한편, 동물혈청 내의 LDH 활성량은 동물의 종류, 혈청채취시의 건강상태 또는 처치에 따라 변동하므로 lot의 차가 상당히 존재한다. 혈청 lot의 점검에는 세포의 증식능력 뿐만 아니라 LDH 활성도 조사해

두는 것이 좋다. 일반적으로 사람 AB혈청은 아주 낮은 LDH 활성을 나타내지만 소 혈청은 꽤 높은 LDH 활성을 가진다. 혈청농도를 1%정도까지 낮추면 세포의 viability에 영향을 주지 않고 background를 낮출 수 있다.

또 혈청 대신 각종 증식인자를 함유하는 무혈청배지나 1% BSA를 이용하여도 background를 낮출 수 있지만 일반적으로 세포상해시험에서는 권장하지 않는다.

Background의 원인과 대처법(어떤 control을 설정해야 하는지)을 아래에 정리하였다.

원 인	설정해야 하는 control
Effector cell에서 LDH 자연방출	Effector cell만의 well을 설정한다.
첨가물질중의 LDH 활성	첨가물질만의 well을 설정한다.
Target cell에서 LDH 자연방출	Target cell만의 well을 설정한다.
Target cell에서 LDH 최대방출	이것을 100%상해활성으로 계산한다.
배양액중의 LDH 활성	배지만의 well을 설정한다.
첨가물질에 의한 LDH 상해활성	첨가물질과 LDH를 혼합한 well을 설정한다.

### ▶ 측정방법

#### (1) 예비실험(최적 target 세포 수의 결정)

LDH의 함량은 세포의 종류에 따라 차이가 있으므로 최적의 세포농도를 예비실험으로 결정해 둘 필요가 있다. 일반적으로 이 농도는 low control(자연방출 LDH)과 high control(최대 방출 LDH)의 차가 최대가 되는 것으로 설정한다. 대부분의 세포계에서 최적 세포농도는  $0.5 \sim 2 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ l/well(=  $0.25 \sim 1 \times 10^5$  cells/ml)의 범위이다.

#### [측정방법]

- 96 well 조직배양 plate의 모든 well(background control은 제외)에 측정배지를 100  $\mu$ l 씩 첨가한다.
- 세포를 측정배지로 세정한 다음  $2 \times 10^6$  cells/ml 농도의 세포현탁액이 되도록 측정배지를 사용하여 조제한다.
- 이 세포현탁액의 2배 희석계열을 ①의 plate 위에 만든다(3개의 well을 한 조로 한다: plate 그림 참조). 우선 측정배지 100  $\mu$ l를 함유하는 B1~3(B7~9) well에 세포현탁액을 multichannel pipette을 사용하여 100  $\mu$ l 씩 첨가한 후 혼합한다(희석 1). 그 다음 이 well로부터 희석세포현탁액을 100  $\mu$ l 씩 취하여 측정배지 100  $\mu$ l가 들어 있는 C1~3(C7~9) well에 옮긴 뒤 혼합한다(희석 2). 같은 조작을 14회 실시한다(희석 14까지).
- plate상에 다음의 control을 만든다(plate 그림 참조).
  - Background control: 3개의 빈 well에 측정배지를 200  $\mu$ l 씩 첨가한다.
  - Low control(=자연방출 LDH): 희석 세포현탁액을 100  $\mu$ l 함유하는 plate의 왼쪽 부분의 well(B~H, 1~6)에 측정배지를 100  $\mu$ l 씩 첨가한다.
  - High control(최대방출 LDH): 희석 세포현탁액을 100  $\mu$ l 함유하는 plate의 오른쪽 부분의 well(B~H, 7~12)에 Triton X-100을 100  $\mu$ l 씩 첨가한다.
- 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도의 배양조건으로 세포를 배양한다. 배양시간은 본 실험의 경우와 동일하다.

- 배양 후 조직배양 plate를 250×g에서 10분간 원심분리한다.
- 상청을 100  $\mu$ l/well 씩 취하여(세포의 침반을 흐트리지 않도록 주의한다), 별도의 투명한 96 well 평지 microtiter plate(MTP) 상에 대응하는 well에 옮긴다.
- 얻은 상청 중의 LDH활성을 측정하기 위하여 각각의 well에 kit의 반응혼합액을 100 $\mu$ l 첨가하여 실온에서 30분간 정치한다. 이 사이에 MTP는 차광하여 둔다.
- ELISA plate reader를 이용하여 490 또는 492 nm에서 흡광도를 측정한다.  
대조과장은 600 nm 이상으로 한다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	background control											
B	세포현탁액 희석 1			희석 8			세포현탁액 희석 1			희석 8		
C	희석 2			희석 9			희석 2			희석 9		
D	희석 3			희석 10			희석 3			희석 10		
E	희석 4			희석 11			희석 4			희석 11		
F	희석 5			희석 12			희석 5			희석 12		
G	희석 6			희석 13			희석 6			희석 13		
H	희석 7			희석 14			희석 7			희석 14		

low control
high control  
(3개의 well을 한조로 한다)



**(2) 세포상해성 측정**

**[세포현탁액에서의 측정방법]**

- ① 측정물질(mediator, 세포용해성 또는 세포상해성 물질)을 측정배지로 2배씩 단계적으로 희석한 뒤 각각의 희석액을 무균의 96 well 조직배양 plate의 정해진 well에 100 μl 씩 첨가한다(3개의 well을 1조로 한다; plate 그림 참조).
- ② 측정배지로 세포를 세정한 후 예비실험에서 결정한 최적 농도의 세포현탁액을 측정배지로 조제한다.
- ③ 희석한 측정물질을 함유하는 well(①)에 이 최적농도의 세포현탁액을 100 μl 씩 첨가한다.
- ④ 다음의 control을 plate에 준비한다(plate 그림 참조).
  - 1) Background control: 3개의 빈 well에 측정배지를 200 μl 씩 첨가한다.
  - 2) Low control: 3개의 빈 well에 측정배지와 세포현탁액을 각각 100 μl 씩 첨가한다.
  - 3) High control: 3개의 빈 well에 Triton X-100 용액과 세포현탁액을 각각 100 μl 씩 첨가한다.
  - 4) 물질 control(I, II): 3개의 빈 well에 측정배지와 측정물질(test에 사용하는 최대농도)을 각각 100 μl 씩 첨가한다.
- ⑤ Incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도)에서 세포를 2~24시간 배양한다.
- ⑥ 배양 후 조직배양 plate를 250×g로 10분간 원심분리한다.
- ⑦ 상청을 100 μl/well 씩 취한 후(세포의 침전이 흐트러지지 않도록 주의한다), 별도의 투명한 96 well의 평평한 MTP상의 대응하는 well에 옮겨 앞에서 서술한 방법으로 상청중의 LDH활성을 측정한다.
- ⑧ 상해세포의 비율은 아래의 식으로 계산한다.

$$\text{세포상해(\%)} = \frac{\text{실험치} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

물질 I과 II의 세포상해 활성을 측정한 경우의 예

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	background control			물질 control I (희석 1)			물질 control II (희석 1)					
B	측정물질 I 희석 1			측정물질 I 희석 8			측정물질 II 희석 1			측정물질 II 희석 8		
C	희석 2			희석 9			희석 2			희석 9		
D	희석 3			희석 10			희석 3			희석 10		
E	희석 4			희석 11			희석 4			희석 11		
F	희석 5			희석 12			희석 5			희석 12		
G	희석 6			희석 13			희석 6			희석 13		
H	희석 7			low control			희석 7			low control		
	측정물질 I의 2배 희석계열 + 세포현탁액						측정물질 II의 2배 희석계열 + 세포현탁액 (3개의 well을 1조로 test한다)					

**[접착세포에서의 측정방법]**

- ① 측정배지로 세포를 세정한 후 예비실험에서 결정한 농도로 세포를 측정배지로 희석하여 무균의 96 well 조직배양 plate의 well에 100 μl 씩 첨가한다.
- ② 세포를 강하게 접착시키기 위해 세포를 incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도)에서 하룻밤 배양한다.

- ③ 배양한 접착세포의 well에서 측정배지를 제거하고(배양중에 접착세포에서 방출한 LDH활성을 제거하기 위해), 각각의 well에 새로운 측정배지를 100 μl 씩 첨가한다.
- ④ 접착세포를 함유하는 대응 well에 희석한 측정물질을 100 μl 씩 옮겨 앞에서 서술한 방법으로 LDH 활성을 측정한다.

**▶ 실시예**

**(1) 측정에 이용한 K562 세포의 최적농도의 결정**

예비실험의 방법에 따라 측정에 이용하는 K562 세포의 최적 세포농도를 결정하였다. 결과를 그림 2에 나타내었다. 이 실험 결과 최적 세포농도가 약 1×10<sup>4</sup> cells/well임을 확인하였다.

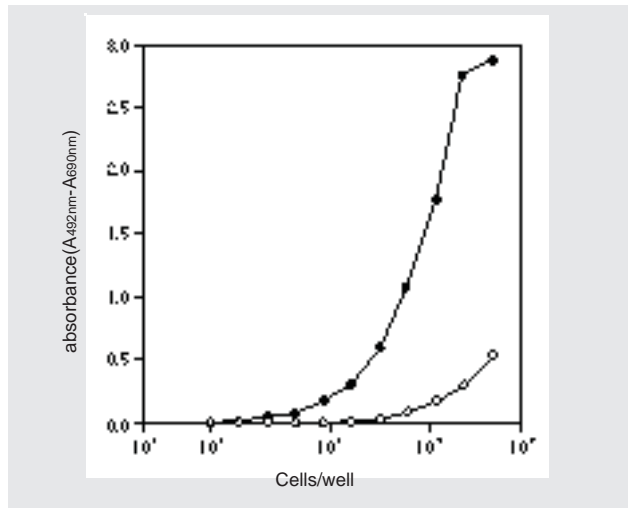


그림 2 측정에 이용하는 K562 세포의 최적농도 결정

형축 : 세포농도 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도

○ : low control      ● : high control

**(2) 다양한 계면활성제의 세포상해활성의 측정**

예비실험에서 결정한 최적 세포농도 1×10<sup>4</sup> cells/well의 P815세포에 단계희석한 Symperonic FG8, Triton X-100, Nonidet P-40을 첨가하여 이들의 세포상해활성을 측정하여 그 결과를 그림 3에 나타내었다.

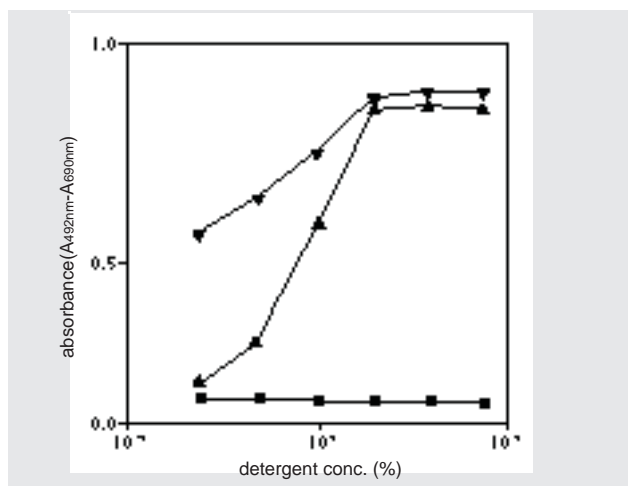


그림 3 다양한 계면활성제의 세포상해활성의 측정

배양시간: 18시간

■ : Symperonic FG8

▲ : Triton X-100

▼ : Nonidet P-40

**(3) 상동항원 자극에 의한 세포상해성 T-lymphocyte (CTL)의 세포상해활성의 측정**

C57/B16 mouse의 비장세포(H-2b)는 *in vitro*에서 P815세포(H-2d)에 자극을 받는다. 예비실험에서 결정한 최적세포농도  $1 \times 10^4$  cells/well의 target cell(P815)에 단계희석한 effector cell을 첨가하여 상해활성을 측정하였다. 물질 control I(effector cell control=effector cell이 자연적으로 방출하는 LDH양)은 각각의 effector cell 농도로 측정하였다. 결과를 그림 4에 나타내었다.

**(4) 세포배양에 따른 사세포의 측정**

Ag8 세포를  $2 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 이식하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양하였다. 배양 1, 2, 3, 5일째에 sampling 하여 그 원심상청의 LDH 활성을 측정하였다. 또한 동 시료를 trypan blue 염색법으로 생세포와 사세포를 측정하였다. 그 결과를 그림 5에 나타내었다.

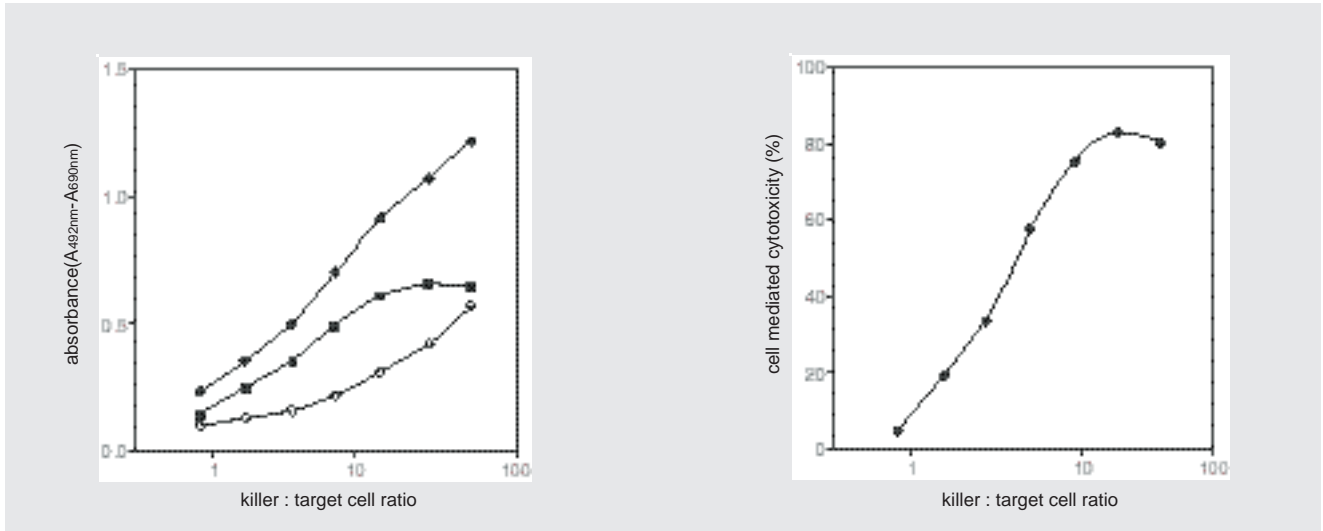


그림 4 상동항원 자극에 의한 세포상해성 T-lymphocyte(CTL)의 세포상해활성의 측정

배양시간 : 4시간

A. 흡광도 수치

- (○) effector cell control
- (●) effector-target cell 혼합물
- (■) (effector-target cell 혼합물) - (effector cell control)

B. 상해세포 비율

$$\text{세포상해(\%)} = \frac{X - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

X : (effector-target cell 혼합액) - (effector cell control)

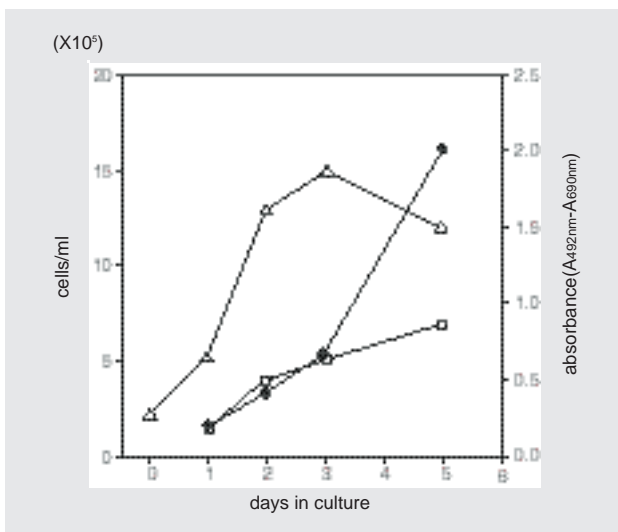


그림 5 세포배양에 따른 세포사와 LDH 방출과의 상호관계

- △ : 생세포(Trypan blue 염색법으로 측정)
- : 사세포(Trypan blue 염색법으로 측정)
- : LDH 활성

NEW

# ApoPrimer Set(Bcl-2 family)

TakaRa Code 6623 300,000원

## *bcl-2* 관련 유전자의 증폭에!

*Bcl-2*는 사람의 여포성 림프종에서 최초로 발견된 유전자로서, apoptosis를 억제하는 기능이 알려져 있다. 최근 apoptosis의 중요한 열쇠가 되는 유전자로서 *bcl-2*와 homology를 갖는 각종 *bcl-2* 관련유전자의 산물이 밝혀지고 있고 또 이들 유전자도 cloning되어 있다. *bcl-2* 관련유전자 산물에는 apoptosis를 억제하는 것도 있고, 반면에 촉진시키는 것도 있다. 전자로 분류되는 것으로는 *bcl-2*<sup>1,2)</sup>, *bcl-XL*<sup>3)</sup>, *mcl-1*<sup>4,5)</sup>, *bfl-1*<sup>6)</sup> 등을, 후자로 분류되는 것으로는 *bax*<sup>7,8)</sup>, *bak*<sup>9)</sup>, *bik*<sup>10)</sup>, *bcl-Xs*<sup>3)</sup> 등을 들 수 있다. 이번에 TaKaRa는 *bcl-2* 관련유전자의 cDNA를 증폭하는 RT-PCR용 primer set를 발매하였다.

### ▶ 포장단위(각 primer 20회 반응분)

품명	농도	용량
Human <i>mcl-1</i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human <i>bfl-1</i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human <i>bax-<math>\alpha</math></i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human <i>bcl-2</i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human <i>bak</i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human <i>bik</i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human <i>bcl-x</i> primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
Human $\beta$ -actin primer mix	각 10 pmol/ $\mu$ l	40 $\mu$ l
APO Positive Control RNA 1	10 <sup>6</sup> copies/ $\mu$ l	24 $\mu$ l

보존온도 : -20°C

### ▶ 제품설명

본 제품에는 apoptosis에 관여하는 단백질 중에서도 특히 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 human *bcl-2* family 유전자의 cDNA를 증폭하는 primer set로 구성된다.

human *bcl-2* family에 속하는 7종류 유전자의 cDNA(*mcl-1*, *bfl-1*, *bax- $\alpha$* , *bcl-2*, *bak*, *bik*, *bcl-x\**) 및  $\beta$ -actin을 각각 증폭할 수 있다. (\*human *bcl-x* primer mix는 *bcl-XL*, *bcl-Xs*의 공통배열 부분을 인식하도록 설계되어 있으므로 동일한 primer로서 *bcl-XL*, *bcl-Xs* 양쪽 모두를 증폭한다.)

APO Positive Control RNA 1에는 상기 8종류의 primer mix로 증폭할 수 있는 배열이 포함되어 있으므로, 하나의 positive control RNA로서 모든 primer쌍의 증폭을 확인할 수 있다. Positive control RNA를 주형으로 얻은 증폭단편은 실제 mRNA 유래의 증폭산물과는 크기가 다르므로 구별할 수 있다.

### ▶ Primer와 증폭단편 크기

Primer mix	Primer	Positive control RNA 유래	mRNA 유래
<i>mcl-1</i> primer mix	<i>mcl-1</i> S, <i>mcl-1</i> A	358 bp	449 bp
<i>bfl-1</i> primer mix	<i>bfl-1</i> S, <i>bfl-1</i> A	331 bp	413 bp
<i>bax-<math>\alpha</math></i> primer mix	<i>bax-<math>\alpha</math></i> S, <i>bax-<math>\alpha</math></i> A	330 bp	412 bp
<i>bcl-2</i> primer mix	<i>bcl-2</i> S, <i>bcl-2</i> A	304 bp	380 bp
<i>bak</i> primer mix	<i>bak</i> S, <i>bak</i> A	297 bp	371 bp
<i>bik</i> primer mix	<i>bik</i> S, <i>bik</i> A	296 bp	370 bp
<i>bcl-x</i> primer mix	<i>bcl-x</i> S*, <i>bcl-x</i> A*	272 bp	XL : 340 bp Xs : 151 bp
$\beta$ -actin primer mix	$\beta$ -actin S, $\beta$ -actin A	340 bp	275 bp

\* *bcl-x* primer mix는 *bcl-XL*, *bcl-Xs*의 공통 배열부분을 인식하도록 설계되어 있어 동일한 primer로서 양쪽 모두를 증폭할 수 있다.

## APO Positive Control RNA I



### ▶ RT-PCR 반응레

(TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 사용)

#### (1) RT-PCR 반응액 조성

##### [RT mix]

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 μl
10× RNA PCR Buffer	2 μl
dNTP mix(각 10 mM)	2 μl
RNase Inhibitor(40 U/μl)	0.5 μl
AMV RTase(5 U/μl)	1 μl
Random 9 mer(50 pmol/μl)	1 μl
RNA	1 μl
H <sub>2</sub> O	8.5 μl
Total	20 μl

##### [PCR mix]

RT 반응액	20 μl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6 μl
10X RNA PCR Buffer	8 μl
TaKaRa Taq™(5 U/μl)	0.5 μl
각 Primer mix(each 10 pmol/μl)*	2 μl
H <sub>2</sub> O	63.5 μl
Total	100 μl

\* Primer dimer를 형성할 가능성이 있으므로 94°C에서 2분간 열처리한 다음 급냉하여 사용한다.

#### (2) 반응조건

RT	30°C	10분	1 cycle
	42°C	15분	
	99°C	2분	
	5°C	5분	
PCR	94°C	30초	35 cycles
	60°C	30초	
	72°C	30초	

### ▶ mRNA 염기배열

(EMBL/GeneBank/DDBJ databases)

Entry name/Accession number

mRNA	Entry name	Accession number
<i>mcl-1</i>	HUMMCL1X	L08246
<i>bfl-1</i>	HSU27467	U27467
<i>bax-α</i>	HUMBAXA	L22473
<i>bcl-2</i>	HUMBCL2C	M14745
<i>bak</i>	HSU16811	U16811
<i>bik(bip-1, NBK)</i>	HSNBKGENE	X89986
<i>bcl-X<sub>L</sub></i>	HSBCLXL	Z23115, L20121
<i>bcl-X<sub>S</sub></i>	HSBCLXS	Z23116, L20122
<i>β-actin</i>	HSAC07	X00351, J00074, M10278

### [참고문헌]

- 1) Cleary, M. L. *et al.* (1986) *Cell* **47**, 19-28.
- 2) Bargon, R. C. *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 2651-2659.
- 3) Benito, A. *et al.* (1996) *Blood* **87**, 3837-3843.
- 4) Kozopas, K. M. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3516-3520
- 5) Zhan, Q. *et al.* (1997) *Oncogene* **14**, 1031-1039.
- 6) Sun, S. C. *et al.* (1995) *Oncogene* **11**, 1693-1698.
- 7) Oltvai, Z. N. *et al.* (1993) *Cell* **74**, 609-619.
- 8) Silva, M. *et al.* (1996) *Blood* **88**, 1576-1582.
- 9) Kiefer, M. C. *et al.* (1995) *Nature* **374**, 736-739.
- 10) Boyd, J. M. *et al.* (1995) *Oncogene* **11**, 1921-1928.

### 관련제품

제품명	TaKaRa Code	용량	가격
TaKaRa One Step RNA PCR Kit	RR024A	50회	360,000원
TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1	RR012A	50회	480,000원
TaKaRa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.2.1	R019A	50회	360,000원
<i>BcaBEST</i> ™ RNA PCR Kit	RR023A	50회	324,000원
Nusieve 3:1 Agarose*	F50091	25 g	144,000원

\* 당사는 FMC 전제품에 대하여 9월 30일까지 20% 특별할인 판매를 실시합니다.

NEW

# 핵산 표식용 시약 Label IT™

PanVera사의 제품입니다(Patent pending).

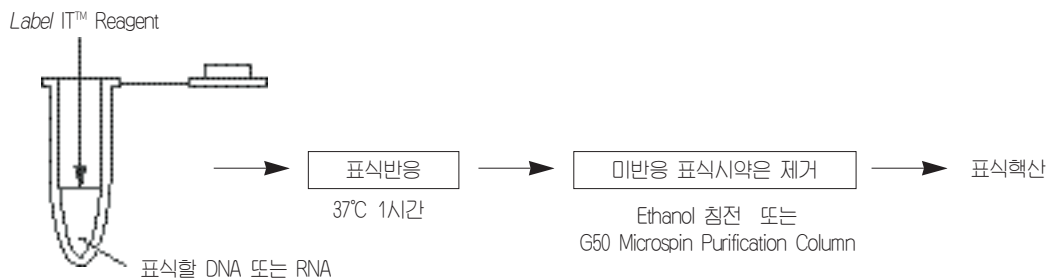
## One-Step의 신속하고 고효율의 non-RI labeling 실현!

본 제품은 전혀 새로운 형태의 단일시약으로 구성된 one-step의 non-RI 핵산 표식용 시약이다. 종래의 non-RI 표식법 (random priming이나 nick translation법 등) 에서는 효소를 이용하여 표식반응을 실시하기 때문에 표식효율이 일정하지 않은 반면에, 본 제품은 비효소적인 표식법을 이용하므로 핵산을 고효율성으로 재현성 높게 표식을 할 수 있게 되었다. 또, 핵산에 열처리 등의 전처리를 해 줄 필요가 없고, intact한 상태로 guanine잔기를 화학적으로 표식해 준다. Label IT™로 표식한 핵산은 각종의 다양한 hybridization (예를 들면 FISH, Southern Blotting, Northern Blotting 등) 에 이용될 수 있다. 표식물질로는 Rhodamine, Fluorescein, Digoxin, Biotin 등의 4가지 type을 준비하고 있다.

### ▶ Label IT™ Product List

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
Label IT™ Rhodamine Labeling Kit	V3125	1 Kit(25 $\mu$ g용)	325,000원
Label IT™ Rhodamine Labeling Kit	V3100	1 Kit(100 $\mu$ g용)	1,040,000원
Label IT™ fluorescein Labeling Kit	V3225	1 Kit(25 $\mu$ g용)	325,000원
Label IT™ fluorescein Labeling Kit	V3200	1 Kit(100 $\mu$ g용)	1,040,000원
Label IT™ Digoxin Labeling Kit	V3325	1 Kit(25 $\mu$ g용)	325,000원
Label IT™ Digoxin Labeling Kit	V3300	1 Kit(100 $\mu$ g용)	1,040,000원
Label IT™ Biotin Labeling Kit	V3425	1 Kit(25 $\mu$ g용)	325,000원
Label IT™ Biotin Labeling Kit	V3400	1 Kit(100 $\mu$ g용)	1,040,000원

### ▶ Label IT™에 의한 핵산표식 순서



### ▶ 내용물

(25 $\mu$ g 용)	1. Label IT™ Reagent	25 $\mu$ l
	2. Mirus Labeling Buffer A	125 $\mu$ l
	3. Mirus Denaturation Buffer D1	125 $\mu$ l
	4. Mirus Neutralization Buffer N1	125 $\mu$ l
	5. G50 Microspin Purification Columns	5개
(100 $\mu$ g 용)	1. Label IT™ Reagent	100 $\mu$ l
	2. Mirus Labeling Buffer A	500 $\mu$ l
	3. Mirus Denaturation Buffer D1	500 $\mu$ l
	4. Mirus Neutralization Buffer N1	500 $\mu$ l
	5. G50 Microspin Purification Columns	20개

### ▶ 특징

- 목적의 핵산과 표식시약을 혼합하는 것만으로 간단히 표식할 수 있다.
- 효소를 사용하지 않고 고효율로 재현성이 높은 표식이 가능하다.
- Single strand DNA, double strand DNA, Supercoil DNA, Linear DNA, RNA, 그리고 oligonucleotide를 intact한 상태로 표식할 수 있다.
- Scale-Up이 용이하다.
- 표식한 핵산의 변성제 및 중화제가 첨부되어 있다.

▶ **Label IT™을 이용하여 표식한 DNA의 검출**

(1) 미표식의 linear double strand DNA 단편 및 Label IT™ Rhodamine Labeling Kit으로 표식한 linear double strand DNA 단편을 각각 전기영동한 후 전자는 ethidium bromide 염색하여(그림 1-A), 후자는 그대로(그림 1-B) UV transilluminator로 검출하였다. 그 결과 Label IT™ 핵산표식용 시약으로 목적의 핵산을 높은 효율로 표식할 수 있었으며 표식으로 인하여 크기나 conformation의 변화는 일어나지 않았다.

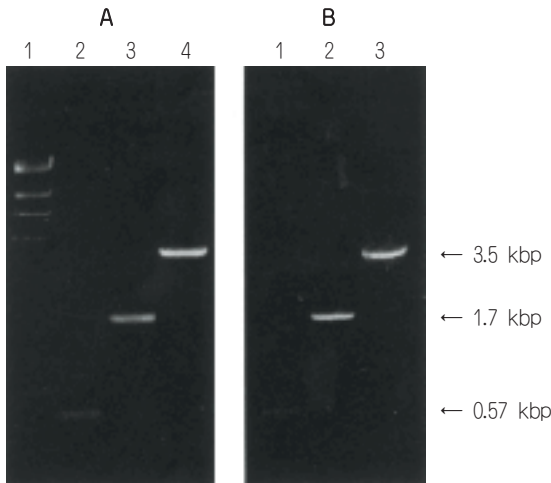


그림 1 Linear double strand DNA의 검출

A : Ethidium bromide로 염색한 미표식 DNA 단편  
 Lane 1 :  $\lambda$ -Hind III digest size marker  
 Lane 2~4 : 크기가 다른 3종류의 미표식 DNA 단편  
 B : Label IT™로 표식한 DNA 단편  
 Lane 1~3 : 크기가 다른 3종류의 표식 DNA 단편

(2) Plasmid DNA를 Label IT™ Rhodamine Labeling Kit으로 표식하고, 이것을 유전자도입용 시약인 Trans IT™-100(TaKaRa Code V2100)을 이용하여 NIH3T3 세포에 transfection한 후 세포를 공초점 형광현미경으로 관찰하였다(그림 2). 밝은 빛을 내는 spot들이 표식된 DNA의 존재를 나타내 준다.

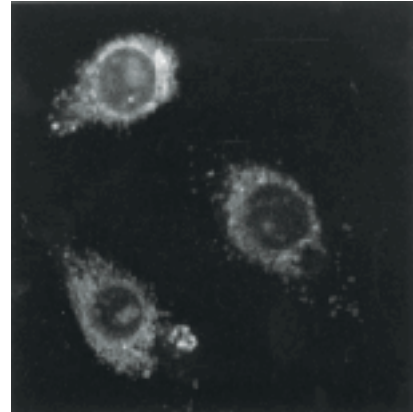


그림 2 Label IT™로 표식한 plasmid DNA를 transfection한 세포의 공초점 형광현미경 검출

**Q & A**

**Q1** Label IT™로 표식한 핵산을 hybridization의 probe로 사용할 때의 변성방법은?

**A1** Kit에 첨부한 Mirus Denaturation Buffer D1과 Mirus Neutralization Buffer N1을 이용하여 변성 및 중화해 주면 됩니다. 표식이 떨어져나갈 수 있으므로 열변성은 삼가해 주시기 바랍니다.

**Q2** Label IT™ Digoxin Labeling Kit으로 표식된 핵산은 시판하는 anti-DIG antibody와도 반응하는지요?

**A2** Boehringer Mannheim사의 anti-DIG antibody 및 Pierce사의 anti-digoxin antibody와 문제없이 반응함을 확인하였습니다.

**Q3** Label IT™ 사용시 표식빈도는? 또 표식효율을 상승시키려면 어떻게 하면 되는지요?

**A3** Standard protocol은 각종의 application에 최적의 효율로 표식할 수 있도록 설정되어 있어 20~60 염기당 1개의 비율로 labeling 됩니다. 30염기 이하의 핵산을 표식할 경우에는 Label IT™ Reagent:핵산 = 3  $\mu$ l:1  $\mu$ g(통상은 1  $\mu$ l:1  $\mu$ g)의 비율로 섞어주세요. 그러면 약 10염기당 1개의 비율로 labeling이 일어납니다.



NEW

# mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1

TaKaRa Code RR025A  
TaKaRa Code RR025B

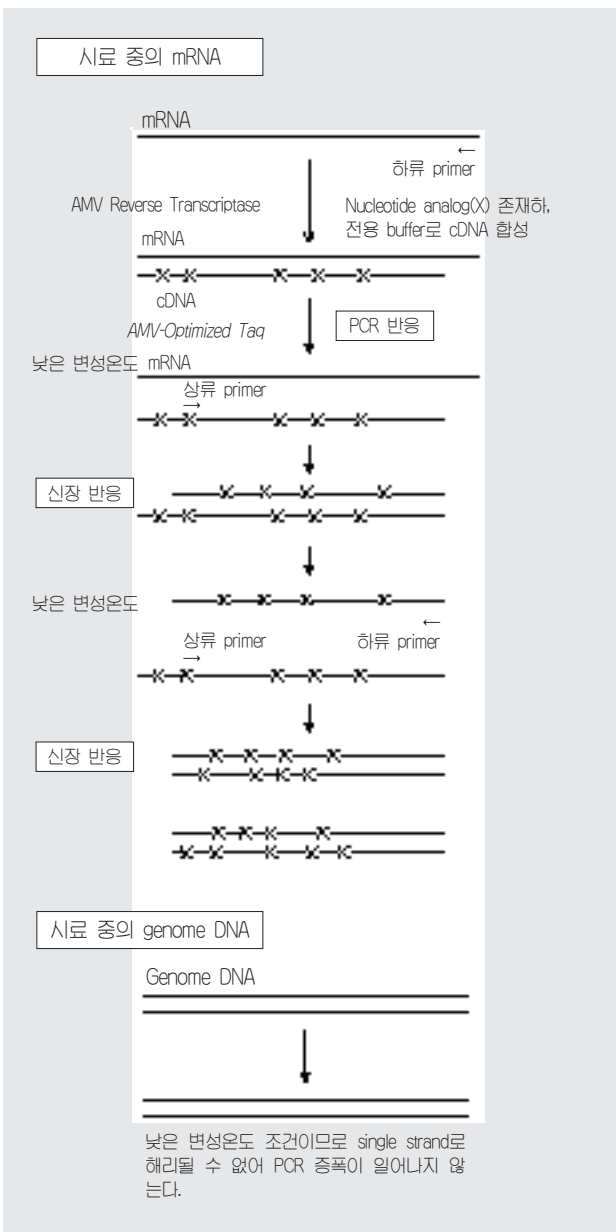
50회  
50회 × 2

420,000원  
756,000원

One Step 반응뿐만 아니라  
Two Step 반응에도 대응할 수 있는 kit로 변신!

mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1은 RT-PCR을 실시할 때 RNA 시료 중에 genome DNA가 혼입되어 있어도 RNA 유래의 cDNA만을 증폭할 수 있도록 고안 한 것으로 발매 이래 호평을 받고 있다. 이번에 Oligo-dT primer와 random 9 mers primer를 추가하여 two step 반응에도 사용할 수 있도록 하였다. 따라서 목적에 따라 폭넓게 이용할 수 있다.

## ▶ mRNA Selective PCR Kit의 원리



## ▶ 내용(50회분)

1. AMV Reverse Transcriptase XL(5 U/μl)	50 μl
2. RNase Inhibitor(40 U/μl)	50 μl
3. AMV-Optimized Taq(5 U/μl)	50 μl
4. 2× mRNA Selective PCR Buffer I*	1.25 ml
5. 2× mRNA Selective PCR Buffer II*	1.25 ml
6. MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	500 μl
7. dNTP/analog mixture**	250 μl
8. Control F-1 primer(20 μM)	10 μl
9. Control R-1 primer(20 μM)	10 μl
10. Control Template	10 μl
11. RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 ml
12. Random 9 mers(50 μM)	50 μl
13. Oligo dT Primer(50 μM)	50 μl

\*1 : 통상은 Buffer I을 사용해 주세요. Buffer II는 GC함량이 낮아서 mRNA를 증폭하기 어려운 경우에 사용합니다.

\*2 : dNTP 각 10 mM에 nucleotide analogue가 혼합된 것입니다.

## ▶ Two-Step법의 protocol

아래의 반응액을 조제한다.

### [RT 반응]

시약	사용량	최종농도
2× mRNA Selective PCR Buffer I or II	25 μl	1×
MgCl <sub>2</sub>	10 μl	5 mM
dNTP/analog mixture	5 μl	1 mM
RNase Inhibitor	1 μl	0.8 U/μl
AMV RTase XL	1 μl	0.1 U/μl
Oligo dT primer or Random 9 mers (또는 down stream specific primer)	1 μl (1 μl)	1 μM (0.4 μM)
Control Template or Sample RNA (Total RNA의 경우에는 약 1 μg/반응)	1 μl	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6 μl	
	50 μl	

반응조건 : 30°C 10분  
42~50°C 15~30분  
5°C 5분 } 1 cycle

**[PCR반응]**

시약	사용량	최종농도
2× mRNA Selective PCR Buffer I or II	20 μl	1×
MgCl <sub>2</sub>	8 μl	5 mM
dNTP/analogue mixture	4 μl	1 mM
AMV-Optimized Taq(5 U/μl)	1 μl	0.1 U/μl
Upstream Specific primer(20 μM)(sense)	1 μl	0.4 μM
Downstream Specific primer(20 μM)(antisense)	1 μl	0.4 μM
RT 반응액	10 μl	
dH <sub>2</sub> O	5 μl	
	50 μl	

반응조건 85°C 30초~1분  
37~65°C 30초~1분 } 25~30 cycles  
72°C 1~5분



**실험예**

Control Template(human HT29 배양세포 유래의 total RNA 와 genome DNA를 함유)를 주형으로 Random 9 mers 또는 Oligo dT primer로 cDNA를 합성한 후 Control F-1 primer 와 Control R-1 primer로 PCR반응을 실시하여 cytokeratin mRNA의 252 bp영역을 증폭하였다.

또한 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit Ver. 1.1을 이용한 반응 도 동시에 실시하여 결과를 비교하였다.

**[Selective 조건]**

RT 반응조건 : 30°C 10분, 42°C 15분, 5°C 5분  
PCR 반응조건 : 85°C 1분  
45°C 1분 } 25 cycles  
72°C 1분

TaKaRa RNA LA PCR™ Kit Ver.1.1

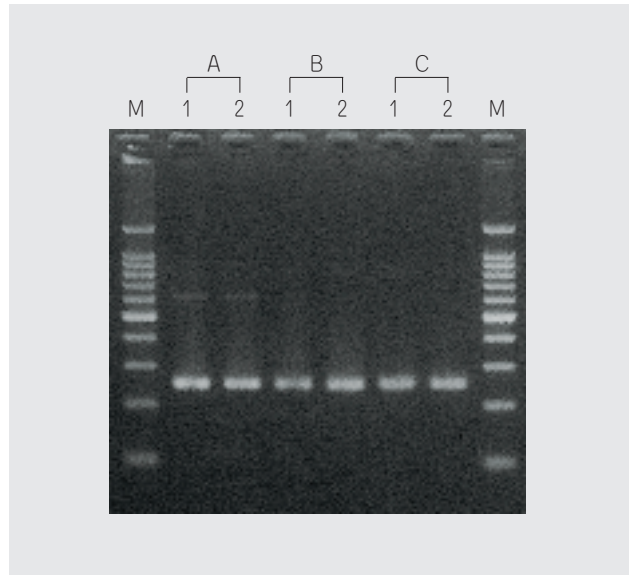
(사용설명서에 따라 반응액을 조제하였다.)

RT 반응조건 : 30°C 10분, 42°C 15분, 98°C 5분, 5°C 5분

PCR 반응조건 : 94°C 30초  
60°C 30초 } 25 cycles  
72°C 1분

**▶ 결과**

TaKaRa RNA LA PCR™ Kit Ver. 1.1을 이용한 경우에는, genome 유래의 DNA(604 bp)도 증폭되었지만, mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1을 사용한 경우는 증폭이 일어나지 않았다.



RT 반응시

A : TaKaRa RNA LA PCR™ Kit Ver. 1.1

B : mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1 Buffer I을 사용

C : mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1 Buffer II를 사용

Lane

1 : Oligo dT primer

2 : Random 9 mers

M : 100 bp DNA Ladder(TaKaRa Code 3407A/B)

# TaKaRa 전 제품 가격 대폭 인하

외환 위기로 40% 인상 하였던 TaKaRa 제한 효소, 수식 효소, 키트, PCR 제품 등 전 제품의 가격을 환율 안정으로 약 20% 인하 하였습니다.

인하 가격은 당사나 전문대리점으로 문의하십시오.



# Non-RI Labeling BcaBEST™ DIG Labeling Kit

TaKaRa Code 6125 40회

## DIG-dUTP 를 이 용한 non-RI DNA labeling Kit!

TaKaRa는 BcaBEST™ DNA Polymerase를 이용한 Random Primer DNA Labeling법으로 digoxigenin-labeled deoxyridinetriphosphate (DIG-dUTP : Boehringer Mannheim사 제품)을 DNA에 삽입시켜 DIG-labeled probe를 조제하는 kit을 발매하였다. BcaBEST™ DNA Polymerase는 반응 최적온도가 높아 주형 DNA의 GC함량이 높거나 복잡한 2차구조를 형성하기 쉬운 경우에도 높은 효율로 DIG-labeled DNA를 조제할 수 있다. 또 Klenow fragment와 비교했을때 반응속도가 빠르므로 보다 짧은 시간에 표식물을 얻을 수 있으며 exonuclease 활성을 유전공학적으로 결실시켜 장시간 반응하여도 합성된 DIG-labeled DNA가 소화되지 않는다.

본 kit으로 합성한 DIG-labeled DNA probe는 Southern blot analysis 등의 hybridization에 이용할 수 있으며, DIG-dUTP는 알칼리에 대해 불안정하므로 reprobing이 용이하다.

### ▶ 특징

- 소량의 주형 DNA로부터 단시간내에 다량의 DIG 표식 DNA probe를 조제할 수 있다.
- GC함량이 높거나 복잡한 고차구조를 형성하기 쉬운 DNA에서도 고효율의 DIG 표식 DNA를 얻을 수 있다.
- Overnight incubation을 실시해도 합성된 DIG 표식 DNA의 분해는 일어나지 않는다.
- Reprobing이 용이하다.

- 5) 2 µl의 Stop Solution을 첨가하여 반응을 정지시킨다.
- 6) 95°C에서 3분간 가열한 후 다시 ice water로 급냉하여 적당량을 그대로\*3 hybridization에 이용한다.

\*1 : 주형 DNA의 크기가 300 bp 이하인 경우에는 합성량이 저하되는 경우도 있다.  
 \*2 : Overnight incubation을 하여도 합성된 DIG 표식 DNA가 분해되는 일은 없다.  
 \*3 : 미반응의 DIG-dUTP 및 dNTP를 제거하고자 할 때는 filter 여과(SUPREC™-02 : TaKaRa Code 9041) 또는 gel 여과로 제거할 수 있다. 에탄올 침전은 그 과정에서 시료의 훼손이 일어날 수 있으므로 삼가해야 한다.

### ▶ 내용물 (40회)

1. Random Primer (9 mer)	80 µl
2. 10× Buffer	80 µl
3. DIG DNA Labeling Mix(Boehringer Mannheim사 제품)	80 µl
4. BcaBEST™ DNA Polymerase (2 U/µl)	40 µl
5. Stop Solution(330 mM EDTA)	80 µl
6. Control DNA(λ DNA-Hind III Fragment 25 ng/µl)	10 µl

### ▶ Protocol

- 1) Microcentrifuge tube에 다음의 반응액을 조제한다.  
 주형 DNA\*1 10 ng~1 µg  
 Random Primer(9 mer) 2 µl  
 멸균수 또는 TE Buffer 15 µl 까지 fill-up
- 2) 95°C에서 3분간 가열한 후 ice water로 급냉하여 5분이 상 방치한다.
- 3) 10× Buffer와 DIG DNA Labeling Mix를 각각 2 µl씩 첨가한다.
- 4) 1 µl의 BcaBEST™ DNA Polymerase를 첨가하여 50~55°C에서 1시간\*2 동안 반응시킨다.

### ▶ Klenow Fragment를 이용한 경우와의 비교

효소로서 BcaBEST™ DNA Polymerase를 이용한 경우(본 kit)와 Klenow fragment를 이용한 경우의 비교 data를 아래에 나타내었다. 25 ng의 λ Hind III Fragment를 주형 DNA로 사용하여 protocol에 따라(반응시간:1시간) DIG-labeled DNA를 조제하였다. 다음에 반응액을 단계적으로 희석하여 1 µl씩 nylon membrane에 dot blot하여 합성된 DIG-labeled DNA의 양을 화학발색으로 검출하여 비교하였다. 그 결과 본 kit을 이용한 경우에는 Klenow fragment를 이용하는 경우 보다 3~10배 더 많은 DIG-labeled DNA를 함유함을 알 수 있었다(그림 1).



그림 1 Dot blot에 의한 DIG-labeled DNA 생성량의 비교

### 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량	가격
BcaBEST™ DNA Polymerase	2710A	300 U	96,000원
BcaBEST™ DNA Polymerase	2710B	1,500 U	384,000원
SUPREC™-02	9041	100 개	250,000원



# Universal Tyrosine Phosphatase Assay Kit

TaKaRa Code MK411

96회

## 간편하고 신속하게 각종 tyrosine phosphatase 활성을 측정 !!

단백질의 인산화 반응 및 탈인산화 반응은 세포내에서 중요한 역할을 담당하는 많은 단백질의 활성을 조절하는 기구로서 기능하고 있다. 그 동적균형을 유지해 주는 탈인산화반응을 일으키는 효소로서 Ser/Thr phosphatase에 대한 연구가 활발히 선행되어 왔으나 1988년에 Tonks 등에 의해 protein tyrosine phosphatase(PTP)가 처음으로 cloning되면서 주목을 받게 되었다. PTP는 tyrosine kinase와 같이 수용체형과 세포내형의 두 가지로 분류되며, 이들이 작용하는 기질도 조혈간세포의 분화과정에서 신호전달을 담당하는 것(SH-PTP-1, PTP-β2, CD45 등), 세포접착신호를 전달하는 것(PTP1B-LP, LAR, PTPμ, PTPκ 등), 신경세포의 분화에 관여하는 것(SHP-1), lymphocyte의 항원수용체로부터의 신호전달에 관여하는 것(PEP, CD45), 그리고 생식세포에 특이적인 정보전달을 담당하는 것(Typ) 등 다양하게 존재한다<sup>2)</sup>. 이번에 TaKaRa는 *in vitro*에서 PTP활성을 간편하면서 신속하게 측정할 수 있는 non-RI ELISA kit을 신발매하였기에 이에 소개한다. PTP 자체의 screening 뿐만 아니라 PTP의 선택적 저해제에 대한 screening에도 유용하게 사용할 수 있다.

### ▶ 특징

- non-RI법으로 RI에 필적하는 감도를 나타낸다.
- 간편하고 신속하게 검출할 수 있다.
- 각종 PTP에 대하여 폭넓은 특이성을 가진다.
- Ser/Thr phosphatase와 교차반응하지 않는다.
- Background가 낮고 감도가 높다.
- 시약조제가 간편하다
- Tyrosine phosphatase 표준품이 첨부되어 있다.
- 특이적인 항체와 조합하여 특이적 PTP활성을 측정할 수 있다.

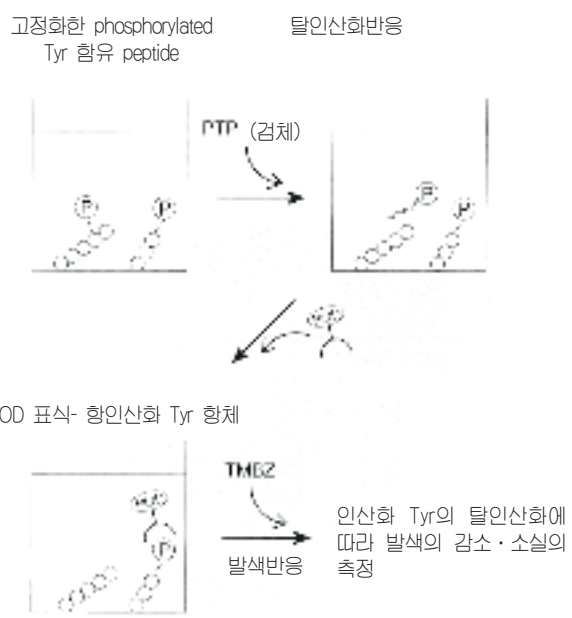
### ▶ 원리

PTP의 기질(인산화 tyrosine을 함유하는 합성 peptide)을 고정화한 plate의 well에 검체(PTP)를 첨가하여 탈인산화반응을 실시한다. 반응 후 인산화 tyrosine에 결합하는 POD-labeled antibody(PY20)를 첨가한다. POD-labeled PY20 antibody는 탈인산화반응이 일어나지 않은 기질에만 결합한다. 다음에 POD의 기질인 TMBZ를 첨가하여 발색반응을 실시하여 OD<sub>450</sub>에서의 흡광도를 측정한다. 검체중의 PTP의 활성은 OD<sub>450</sub>에서의 흡광도의 감소 및 소실로서 측정한다. 표준물질을 이용하여 작성한 검량선을 기준으로 검체중의 PTP양을 구한다.

### ▶ Kit의 내용 (96회)

인산화 tyrosine peptide 기질을 고정화한	
96 well 분리형 Microtiter plate	8 well × 12
Tyrosine Phosphatase 반응용 완충액	11 ml × 1
세포추출용 완충액	11 ml × 1
Tyrosine Phosphatase 표준품	0.5 ml 용 × 1
(동결건조품. unit는 lot별로 표시)	
POD 표식-항 인산화 tyrosine 항체(PY20)	5.5 ml-용 × 1
(동결건조품)	
Blocking buffer	11 ml × 1
발색시약(TMBZ)	12 ml × 1

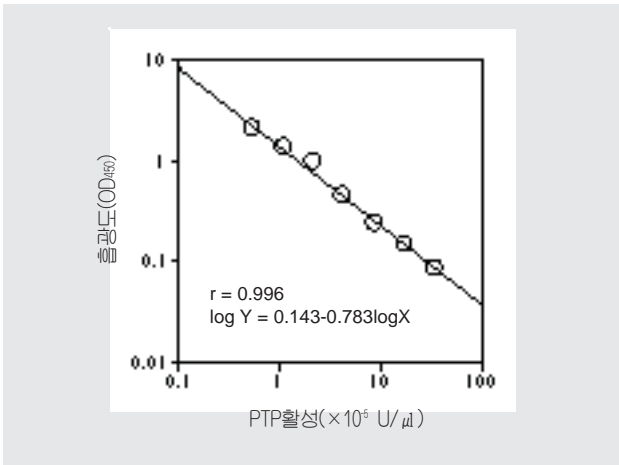
보존 : 4°C



▶ 측정성능

(1) 특이성

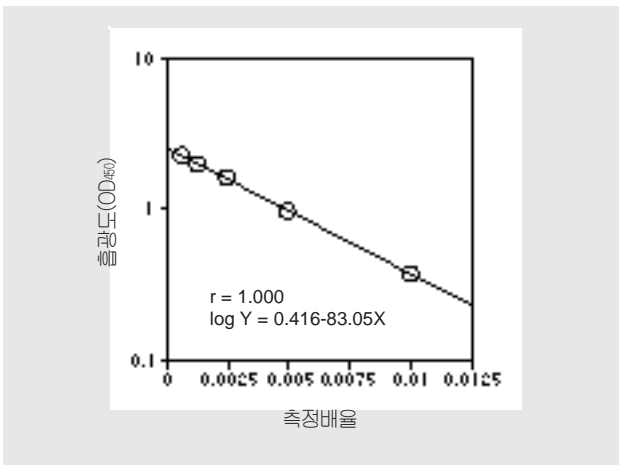
a) Recombinant human CD45 정제품을 검체로 이용했을 때의 PTP활성과 흡광도의 관계



PTP활성( $\times 10^5$ U/ $\mu$ l)	32	16	8	4	2	1	0.5	0
흡광도(OD <sub>450</sub> )	0.095	0.152	0.246	0.472	1.007	1.393	2.143	3.470

b) A431세포 추출액을 검체로 사용했을 때의 희석 직선성

직경이 90 mm인 petri dish 한장에 포화상태가 되도록 A431세포를 배양하였다. 배양상청을 제거한 다음 1 ml의 세포추출용 완충액을 첨가하여 rubber policeman으로 세포를 회수하였다. 14,500 rpm (10,000 $\times$ g)으로 원심분리한 후 상청을 단계적으로 희석하여 검체로 사용하였다.



희석배율	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
흡광도(OD <sub>450</sub> )	0.190	0.386	0.994	1.641	2.043	2.310

(2) 감도

CD45를 표준품으로 사용한 경우  $0.125 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ l까지 측정할 수 있다.

(3) 활성의 정의

pH7.0에서 30°C, 1분동안 1 nmol의 p-nitrophenylphosphate를 탈인산화할 수 있는 효소량을 1 U로 한다.

(4) 측정소요시간

효소반응시간에 따라 다소 차이가 있지만, 통상 1.5~3시간이다.

(5) 측정 parameter

시료중의 PTP함량은 그 유래에 따라 큰 차이가 있으므로 실험 목적에 맞도록 시료의 농도나 phosphatase의 반응시간 등을 조정해야 한다.

(6) 기질

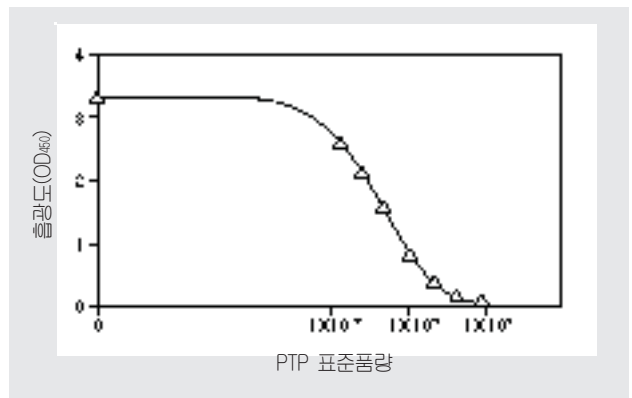
각종 PTP에 대하여 폭넓은 특이성을 갖는 합성 peptide 기질 [poly(Glu-Tyr)]을 well에 고정화하여 천연 tyrosine kinase로 tyrosine을 모두 인산화시킨다.

(7) 측정범위 및 표준곡선

PTP 활성은 kit에 들어 있는 PTP 표준품을 이용하여 획득한 흡광도와 비교하여 결정한다. 본 kit의 측정범위는  $90 \times 10^{-5} \sim 0.125 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ l이다.

[표준곡선의 대표적인 예]

사용시료량 50  $\mu$ l/well, 효소반응시간 37°C, 45분



PTP활성( $\times 10^5$ U/ $\mu$ l)	88.4	44.2	22.1	11.1	5.5	2.8	1.4	0
흡광도(OD <sub>450</sub> )	0.126	0.176	0.399	0.888	1.596	2.139	2.624	3.363

(8) 시료중의 tyrosine kinase에 의한 방해

반응계에 ATP를 첨가하지 않는 한 기질 peptide의 인산화는 일어나지 않음을 확인하였다. 따라서 한번 인산화된 tyrosine잔기가 다시 인산화될 염려는 없다.

(9) 시료중의 기타 protein phosphatase 및 acid-, alkaline phosphatase에 의한 비특이적 탈인산화

많은 경우에 조제한 PTP 시료중에는 다른 phosphatase가 함유되어 있다. 본 kit는 이러한 효소에 의해 일어나는 탈인산화를 미연에 방지하기 위해 세포추출용 완충액과 tyrosine phosphatase 반응용 완충액의 양쪽 모두에 5 mM EDTA-2Na 와 50 mM NaF를 첨가한다.



## Q & A

**Q1** PTP활성 측정 kit의 원리는?

**A1** 종래에는 tyrosine phosphatase 활성측정법으로서 탈인산화 반응으로 유리된 phosphate를 인몰리브덴산으로 정량하는 방법이 있었지만, 시료 중의 인산을 미리 탈염처리로 제거하여야 하는 번잡한 과정이 필요하였습니다.

본 kit는 인산화된 tyrosine 잔기를 함유하는 peptide 기질을 고정화시킨 96 well microtiter plate에 검체를 첨가하여 탈인산화반응을 실시한 후 POD표식-항인산화 tyrosine 항체를 작용시켜 발색반응으로 측정합니다.

**Q2** PTP이외의 phosphatase는 검출되지 않는지요?

**A2** Protein phosphatase로서 PTP이외에 Ser/Thr phosphatase가 존재합니다. 그러나 검출계에는 인산화 Ser/Thr 과는 반응하지 않는 항체를, 그리고 합성기질로는 poly(Glu-Tyr)를 이용하기 때문에 PTP 이외의 protein phosphatase의 활성이 동시에 측정되는 것은 원리적으로 불가능합니다. 또 다른 효소에 의한 비특이적인 탈인산화 반응은 저해제를 공존시키므로써 방지할 수 있습니다.

**Q3** 검체로서는 어떤 것을 사용할 수 있나요?

**A3** 본 kit는 기본적으로 배양세포 또는 혈액 등에서 분획한 혈구성분용으로 개발한 것입니다. 조직검체에 대한 data는 몇 가지 사례밖에 갖고 있지 않으나, 이 경우 조직과 조직추출용 완충액을 혼합하여 homogenize한 후 원심분리하여 얻은 상청을 측정에 사용합니다.

**Q4** 본 kit에서 사용하고 있는 합성 peptide 기질의 특이성 범위는?

**A4** 합성 peptide 기질로서는 PTP에 대하여 광범위한 특이성을 가지는 poly(Glu-Tyr)(4:1, 20~50 kDa)을 천연의 kinase로 모두 인산화시킨 것을 사용합니다.

타사의 kit은 효소특이적인 합성기질을 사용하고 있고, 광범위한 PTP활성을 측정하기 위해서는 다양한 기질들을 준비해야 하므로 아주 불편합니다. 또, 감도도 충분하다고 말할 수 없습니다.

**Q5** PTP 표준품이란?

**A5** 백혈구 공통항원인 tyrosine phosphatase[CD45 (CALBIOCHEM사 제품)로 조제한 동결건조품]이며, lot별로 unit를 관리합니다.

**Q6** PTP의 검출이 가능한 세포수는?

**A6** 세포의 종류 및 세포에 주는 자극의 종류와 정도에 따라서 차이가 있지만, 예를 들면 K562세포의 경우 500개 이상이면 PTP를 검출할 수 있습니다.

**Q7** 배양세포나 장기조직내의 PTP를 측정하고자 할 때 유의점은?

**A7** 세포나 조직을 세포추출용 완충액으로 현탁하여 시료를 조제하지만 이 시료내의 PTP활성은 꽤 강하므로 시료를 계열희석하여 사용할 필요가 있습니다. 적어도 50~100배 정도의 희석을 권장합니다.

**Q8** 특이항체를 사용하여 PTP활성을 조사하는 방법은?

**A8** Protein A-agarose 또는 Protein G-agarose에 비특이적으로 결합하는 PTP가 세포추출액에 함유되어 있을 수 있으므로, 이러한 담체에 대한 전처리 조작을 충분히 실시하고, blank 항체에 관하여도 같은 반응과정으로 실시하여 background를 평가할 필요가 있습니다.



# Bender MedSystems

## Transfection 시약 및 세포막 투과성 촉진 시약

from Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership

### ▶ Polyethylenimine-Transferrinfection Kit (Tf PEI-Kit)

본 제품은 transferrin receptor가 관여하는 endocytosis를 이용한 transfection kit이다. 세포가 자연적으로 갖고 있는 생리적 현상을 이용하므로 세포가 받는 손상은 최소화하면서 높은 도입효율을 얻을 수 있다. 또 다양한 세포에 높은 효율의 유전자 도입을 증대하는 것으로 잘 알려진 polyethylenimine과 transferrin의 conjugate를 이용하므로써 한층 높은 효율의 유전자도입을 실현할 수 있게 되었다. Transfection 효율은 각 세포의 표면에 존재하는 transferrin receptor의 발현수준에 의존한다. Neuro 2A와 Jurkat, K562 등의 tumor cell line에서는 거의 100%의 도입효율을 나타내며, HeLa나 CHO, COS 등과 그 외의 cell line에서도 재현성이 고효율로 도입할 수 있다.

#### Polyethylenimine-Transferrinfection Kit

TaKaRa Code H1003 32회분 (4 × 10<sup>6</sup> cells)  
TaKaRa Code H1003 80회분 (1 × 10<sup>7</sup> cells)

내용 : Transferrin-Polyethylenimine-conjugate(동결건조품) × 2(or 5)  
Deferrioxamine(동결건조품) × 1  
HBS buffer concentrate (20×) (1 ml × 1)

### ▶ IntraStain

본 제품은 항체에 의한 세포내 단백질의 검출 감도를 높여 주기 위한 kit이다.

세포내의 각종 단백질들에 대한 항체를 반응시키기 전에 본 kit으로 세포를 처리하면 세포에의 항체의 투과성이 증가하여 목적 단백질의 검출감도가 높아진다. 또 본 kit으로 세포를 처리해도 세포의 골격구조는 손상되지 않으므로 세포표면 및 내부의 물질을 복수의 항체로서 동시에 검출하는 경우에도 유용하다. 예를 들면 cell surface marker 또는 세포내의 표적 단백질을 표식하는 항체를 조합하여 이용하므로써 목적세포에 존재하면서 표적 단백질이 발현되고 있는 세포를 동정하는 경우에도 유용하다.

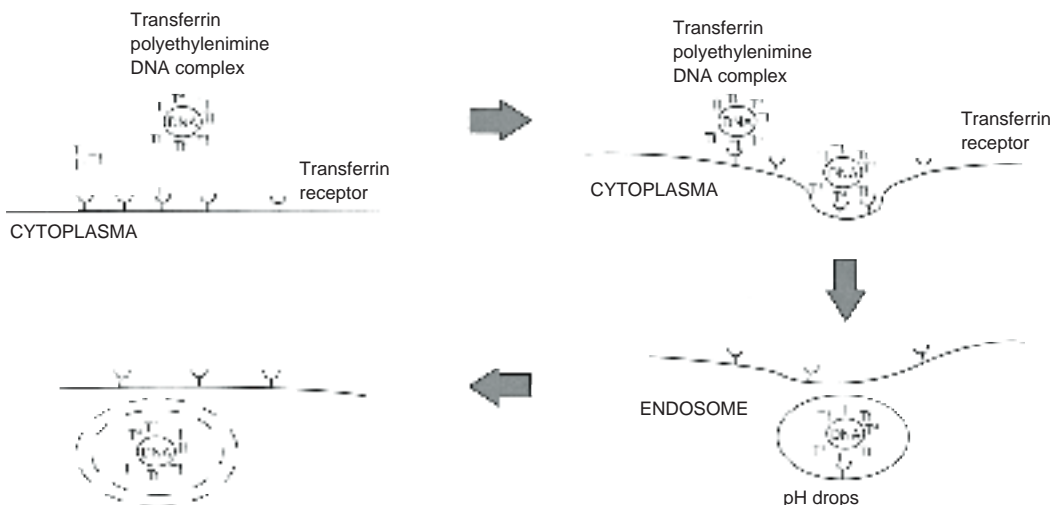
#### IntraStain

TaKaRa Code H1101 100회분  
TaKaRa Code H1100 250회분

내용 :

(H1101) 10× fixative(50 ml)  
10× PBS(50 ml)  
10× permeabilization buffer(100 ml)  
(H1100) 10× fixative(50 ml)  
10× PBS(100 ml)  
10× permeabilization buffer(250 ml)

### ▶ Tf PEI-Kit을 이용한 유전자 도입 원리





# FMC사 신제품 등장 !

## ● Reliant<sup>®</sup> RNA Gel System 1.25% SeaKem<sup>®</sup> Gold Agarose

TaKaRa Code F4922 200#

### ▶ 사용방법

본 제품은 0.25~10 kb 크기의 RNA를 전기영동하는데 최적인 RNase-free의 precast agarose gel 이다. 미리 plastic tray 내에 개별적으로 포장되어 있어 번잡한 RNase 제거할 필요가 없다. 뒷 덮개의 seal을 벗긴 후 gel을 tray와 함께 영동조에 set하고 여기에 buffer를 첨가하여 시료를 loading 하기만 하면 바로 전기영동을 실시할 수 있어 매우 간편하다. 또 통상의 경우와 같이 전기영동전에 formaldehyde나 glyoxal 등으로 RNA를 변성할 필요가 없다. 또 변성제가 함유되어 있지 않으므로 EtBr염색의 저해나 목적 RNA의 손상도 없다.

각종 시료에서 추출한 RNA의 순도 확인이나 Northern blot analysis 등에 최적이다.

### ▶ 제품사양

Tray size : 6,8 × 10,2 cm  
Gel size : 6,0 × 9,5 cm  
Gel 두께 : 5,5 mm  
Well 수 : 8 wells  
Well 용량 : 20  $\mu$ l  
사용 buffer : MOPS(pH7.0)

## ● MutationFinder<sup>™</sup> Kit

TaKaRa Code F0570 1 Kit(120 reactions)

### ▶ 사용방법

본 제품은 Non-Isotopic RNase Cleavage Assay법 (NIRCA<sup>™</sup>법)<sup>1, 2)</sup>을 개량한 방법으로 DNA에 발생한 변이를 신속하게 고감도로 검출하기 위한 kit이다. 본 kit은 약 500~1,000 bp의 PCR산물에 대해 변이를 검출할 수 있다. 종래의 SSCP법보다 더 큰 size에서 검출할 수 있으므로 긴 exon 영역에 존재하는 변이의 검출에 유효하다. 또 SSCP법과 같이 복잡한 조건설정도 필요 없다.

본 kit은 표적배열의 야생형(WT)과 mismatch를 갖는 배열(MU)을 PCR로 증폭한 후 T7 및 SP6 promoter 배열을 함유하는 nested primer로 재증폭하여 단편을 검출원으로 사용한다. 그림 1에 그 원리를 소개하였다.

우선 T7 RNA Polymerase나 SP6 RNA Polymerase를 이용한 *in vitro* transcription으로 생성한 RNA를 cross hybridization 하여 double strand RNA를 형성한다. 이 RNA-RNA hybrid중 WT/MU는 mismatch를 가지므로 RNase에 분해되지만, mismatch가 없는 WT/WT는 분해되지 않는다. 이러한 RNase 처리산물의 전기영동 형태를 변이가 없는 야생형의 것과 비교하므로써 대략적인 변이영역을 결정할 수 있다.

또 SSCP법과는 달리 sequencing하여야 하는 target의 대략적인 위치를 압축해 갈 수 있다.

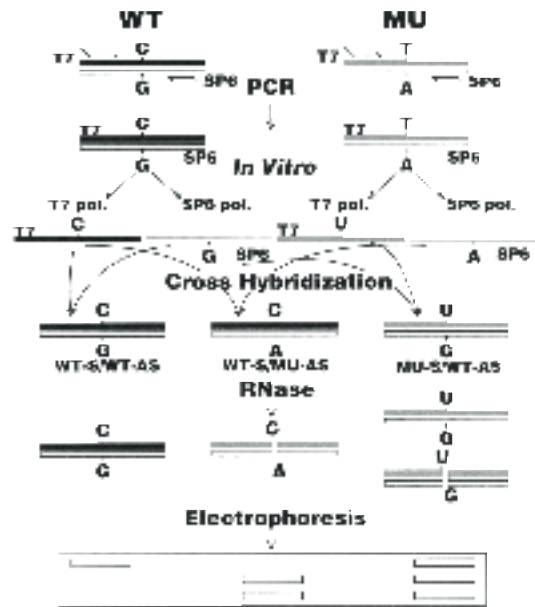


그림 1 MutationFinder<sup>™</sup> Kit의 원리

### [참고문헌]

- 1) Myers, R. M. *et al.* (1985) *Science* **230**, 1242-1246.
- 2) Winter, E. *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **82**, 7575-7579

# AMINOCHROME™-II 태반 양수세포 배양용 배지

## Normal Human Neural Progenitor cell & Osteoblast cell

Biowhittaker사의 제품입니다.

### ▶ AMINOCHROME™-II 태반 양수세포 배양용 배지

이 제품은 출생전 진단에 사용하는 태반 유래 양수 세포의 배양에 최적인 배지이다.

양수세포의 핵형분석(성결정, 염색체이상 검사), 효소활성측정, 특정물질의 대사, 동태조사 등을 실시할 때 양수천자로 얻을 수 있는 사람의 양수세포를 복잡한 첨가물들을 섞어주지 않아도 아주 높은 효율로 배양할 수 있다. 또한 phenol red의 함량이 적으므로 독성이 낮고, 또 뛰어난 완충성을 가지므로 배양환경 중의 CO<sub>2</sub> 농도에 영향을 받을 염려가 없다.

제품명	TaKaRa Code	용량
AMNIOCHROME™-II Complete Medium System (B27563+B75241)	B27561	1 system
AMNIOCHROME™-II Complete Medium System (B27564+B75242)	B27562	1 system
기본배지		
AMNIOCHROME™-II Basal Medium	B27563	100 ml
AMNIOCHROME™-II Basal Medium	B27564	500 ml
첨가배지		
AMNIOCHROME™-II Supplement	B75241	7 ml
AMNIOCHROME™-II Supplement	B75242	35 ml

### ▶ Normal Human Neural Progenitor Cell : NHNP

이 제품은 single donor 유래의 Normal Human Neural Progenitor(NHNP) Cell 이다.

이 세포를 배양하는 전용배지로는 NPMM™ Bullet Kit®을 권장한다. 전용배지 키트는 기본배지와 첨가인자 set로 구성되어 있으며, 각각 단품으로도 구입할 수 있다. 또 본 세포에 최적인 plating과 분화에 유효한 coating 시약도 판매한다. 신경조직의 발생 및 분화 등의 연구에 최적이다.

제품명	TaKaRa Code
Normal Human Neural Progenitor Cell 동결보존품(12×10 <sup>5</sup> cells/cryovial)	C2599
전용배지 키트 NPMM™ BulletKit®(B3210+B4241)	B3209
기본배지 Neural Progenitor Basal Medium(NPBM™)(200 ml)	B3210
첨가인자 셋트 NPMM™ SingleQuots®	B4241
hFGF-B(재조합 사람 선유아세포 성장인자, 열기성)	0.4 ml
hEGF(재조합 사람 상피세포 성장인자)	0.4 ml
NSF-1(신경 생존 인자)	4.0 ml
GA-100(Gentamycin, Amphotericin B)	0.4 ml
Coating 시약 Polyethyleneimine(PEI) (5%) Plating Substrate	B4195 1.0 ml

### ▶ Normal Human Osteoblast Cell : NHOst

이 제품은 single donor 유래의 Normal Human Osteoblast(NHOst) Cell이다. 골아세포(Osteoblast)는 골형성 능력을 갖는 단핵세포로서 전용배지키트(기본배지와 첨가인자 set로 구성되어 있다)를 이용하여 높은 효율로 배양할 수 있다.

또 Differentiation SingleQuots®(분화유도용 첨가인자 셋트)을 사용하므로써 석회화를 유도할 수도 있다.

제품명	TaKaRa Code
Normal Human Osteoblast(NHOst) Cell 동결보존품(5×10 <sup>5</sup> cells/cryovial)	C2538
전용배지 키트 OGM™ BulletKit®(B3208+B4193)	B3207
기본배지 Osteoblast Basal Medum(OBM™)(500 ml)	B3208
첨가인자 셋트 OGM™ SingleQuots®	B4193
Ascorbic acid	0.5 ml
FBS(소 태아 혈청)	2×25 ml
GA-1000(Gentamycin, Amphotericin B)	0.5 ml
Osteoblast Differentiation SingleQuots®	B4194
hydrocortisone	0.5 ml
β-glycerophosphate	5 ml

.....  
 단 2주만에 cDNA를 클로닝하여 드립니다.  
 .....

# Rapid cDNA Screening Service

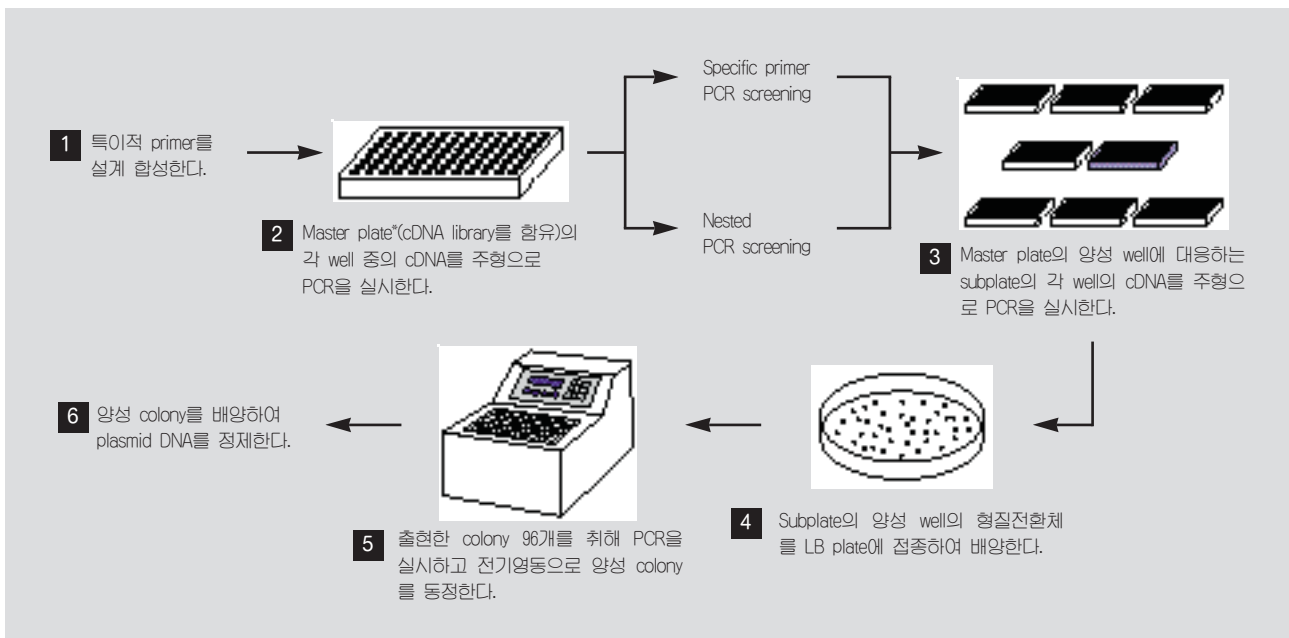
OriGene Technologies사가 개발한 Rapid-Screen™ cDNA Library Panel을 사용하여 목적의 cDNA를 library로부터 신속하게 screening하여 드리는 cDNA screening service입니다.

이 서비스는 종래의 수주간 이상 소요되는 hybridization법을 사용하지 않고 독특한 3번의 PCR screening법으로 목적의 cDNA clone을 얻으므로 단기간에 목적의 cDNA를 screening할 수 있어 단 2주정도에 cDNA clone을 제공할 수 있습니다.

당사는 Human Placenta, Human Spleen, Human Fetal Brain, Human Prostate, Human Liver, Human Heart, Human PBL(Peripheral Blood Leukocyte), Fetal Mouse의 각 cDNA Library를 준비하고 있습니다.

■ 본 screening service의 특징

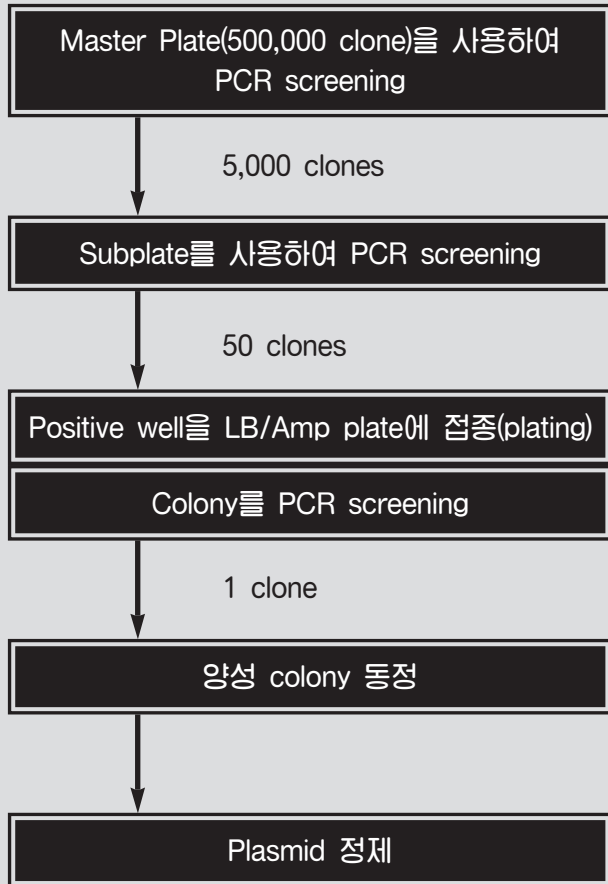
- 약 500,000 clone으로부터 screening합니다.
- 의뢰에서 납품까지 약 2주일 정도로 아주 짧습니다.
- cDNA library의 해당 clone(동물세포에서 발현 가능)을 제공합니다(PCR 산물이 아님).
- cDNA library는 cDNA size별로 분획하여 구축되어 있습니다. 평균 insert의 길이가 3~4 kb로 길기 때문에 완전한 길이의 cDNA를 얻기 쉽습니다.



\* 96 well master plate에는 각 well에 5000 clone에 상당하는 plasmid의 mini prep이 들어있다. Subplate의 각 well에는 대장균의 형질전환체가 cDNA의 크기별로 각 50 clone 씩 되도록 미리 분주되어 있다.



# Rapid cDNA Screening Service



## ▼ Primer 합성

### ▼ 1st PCR

Master plate의 각 well 중의 cDNA를 주형으로 PCR하여 전기영동으로 증폭 유무 확인  
[500,000 clone을 screening하여, 양성 well(약 5,000 clone)을 확인]\*

### ▼ 2nd PCR

Master plate의 양성 well에 대응하는 subplate의 각 well중의 형질전환체를 주형으로 PCR하여 전기영동으로 증폭 유무 확인  
[5,000 clone을 screening하여, 양성 well(약 50 clone)을 확인]\*

### ▼ 3rd PCR

Subplate의 양성 well의 형질전환체를 plating 하고 출현한 colony 96개를 임의로 선발하여 직접 PCR로 증폭유무 확인  
[양성 colony는 목적 cDNA를 갖는 대장균 형질 전환체]

### ▼ Plasmid DNA 정제

양성 colony를 최대 5개까지 배양하여 plasmid DNA를 정제(정제한 plasmid를 PCR로 확인)

\* 여러 개의 well에서 얻어진 경우는 번호가 작은 것(insert의 크기가 길다고 생각하는 것)을 선택합니다.

## ■ 표준 가격

1st PCR의 선택에 따라 다릅니다.

### A. Specific Primer PCR 440만원 부터

목적 cDNA의 이미 알고 있는 특이적 primer를 사용하여 PCR screening을 실시합니다.

\* 1st PCR에서 양성 well이 얻어지지 않은 경우는 set up 요금으로 80만 원을 청구합니다.

### B. Nested PCR 500만원 부터

목적 cDNA의 5' 말단을 증폭할 수 있도록 vector primer와 이미 알고 있는 특이적 primer를 사용하여 nested PCR screening을 실시합니다.

\* 1st PCR에서 양성 well이 얻어지지 않은 경우는 set up 요금으로 100만 원을 청구합니다.

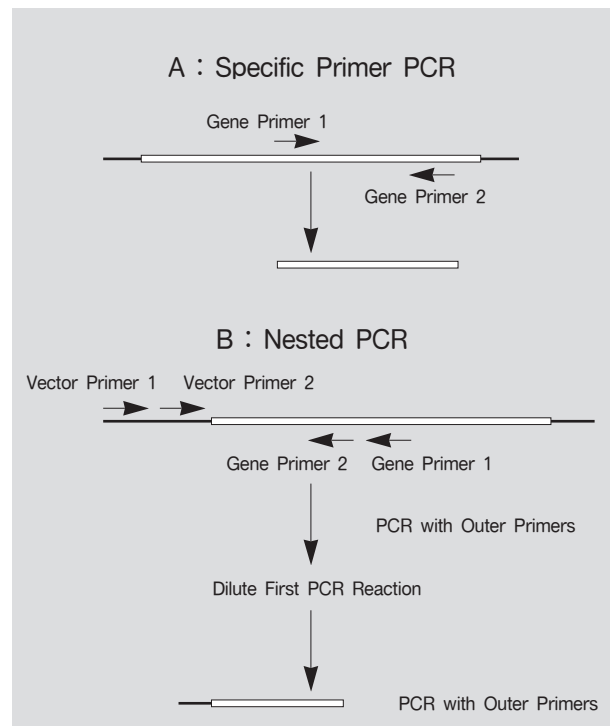
## ■ Option

- ▶ Master plate에서 복수의 양성 well이 검출된 경우는 희망에 따라 추가로 대응하는 subplate를 선택하여 같은 조작을 실시합니다.

80만원/subplate 1매 추가마다

- ▶ 얻은 plasmid의 염기배열 해석을 실시합니다.

13만원/1 clone



## ■ Screening 실시예

Human Fetal Brain의 cDNA library를 사용하여 Rapid cDNA screening법으로 human Transferrin receptor(TR; 전체길이 약 5 kb)를 선별하였습니다.

3회의 screening으로 1주일만에 full length의 cDNA clone을 얻을 수 있었습니다.

① Primer의 설계, 합성

② Master plate의 96 well에 대하여 PCR screening을 실시하였다. PCR 산물을 아가로스 겔로 전기영동하여 확인한 바, well No. 5D에서 양성인 밴드가 검출되었다.

③ Well No. 5D에 대응하는 subplate plate No. 5D의 96 well PCR screening을 실시하였다. PCR 산물을 아가로스 겔로 전기영동하여 확인한 바, well No.8D에서 양성인 밴드가 검출되었다.

④ No. 8D well의 형질전환체를 LB/Amp plate에 적당량 도포하여 37°C에서 overnight 배양하였다.

⑤ 배양한 LB/Amp plate에서 random으로 취한 96개의 colony에 대하여 96 well PCR screening을 실시하였다.

⑥ 양성으로 나타난 colony를 배양하여 plasmid DNA를 정제하였다.

1% Agarose gel 전기영동  
marker: PHY marker

① Human TR cDNA의 5' 말단 약 400 bp가 증폭될 수 있도록 TR 특이적 Primer를 설계, 합성하였다.

**Gene Primer 1 :**

5' -CTACTTGGGCTATTGTAAAG-3'

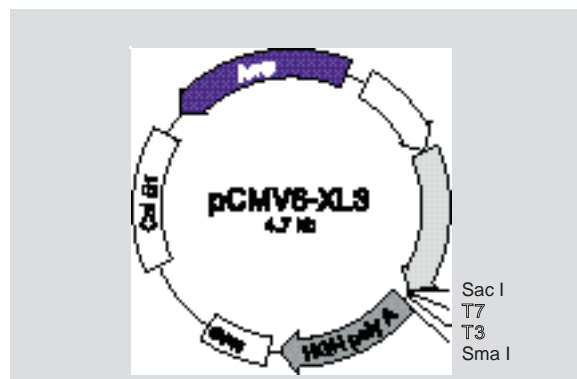
**Gene Primer 2 :**

5' -CACATAACCCCCAGGATTCT-3'

## ■ Cloning Vector

Cloning vector pCMV6-XL3은 cytomegalovirus promoter를 갖고 있으므로 동물세포에서 발현할 수 있습니다. 또 ssDNA 형성에 필요한 f1 ori, RNA 합성에 필요한 T7 promoter, T3 promoter를 갖고 있습니다. cDNA는 *EcoR* I site와 *Sal* I site 사이에 directional cloning되어 있습니다(insert의 평균 길이는 3~4 kb).

Cloning vector pCMV6-XL3



# PCR Primer의 선택방법

## ▶ Nested PCR

PCR 반응의 감도를 높이거나 특이성을 향상시키고자 하는 경우에는 nested PCR(그림 1)이 효과적이다. 첫번째의 primer 쌍으로서 증폭한 DNA 단편의 안쪽에 annealing하는 두번째의 primer를 제작하여 1st PCR로 증폭한 산물을 주형으로 하여 2nd PCR을 실시한다. 이러한 두번째의 primer를 nested primer, 그리고 두번째의 PCR을 nested PCR이라 한다. 이 기법은 특이성을 그다지 기대할 수 없는 degenerate PCR 등에 효과적이다.

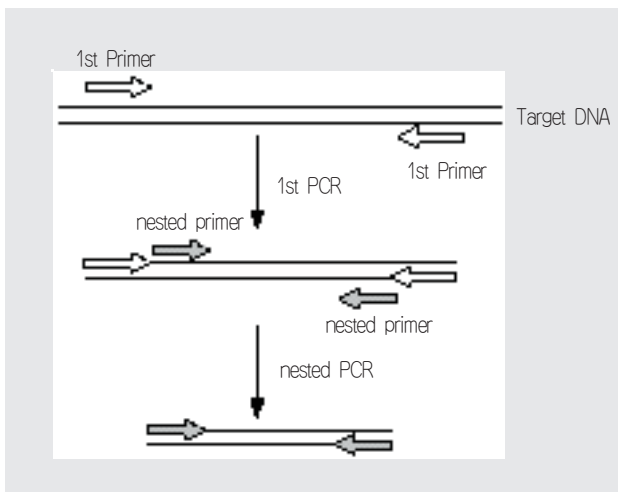


그림 1 Nested PCR

Nested PCR을 실시하는 경우 통상 첫번째의 primer 쌍으로 PCR을 실시한 후 그 반응액을 별도의 tube로 옮겨 nested PCR의 주형으로 이용한다. 그러나 primer의 크기 및 사용농도를 조정하므로써 동일 튜브 내에서 연속적으로 nested PCR을 실시할 수도 있다. 이 경우에는 다음과 같이 1st primer와 nested primer를 동일 튜브내에 함께 첨가한 후 2단계의 조건으로 PCR을 실시한다.

### [Step 1]

1st primer 쌍에 의한 PCR을 다음과 같은 조건으로 20 cycle 실시한다. 이 1st primer의 크기는 20염기 이상으로 하고 PCR에 필요한 최소한의 농도로 사용한다. 또 annealing 온도는 60°C 이상으로 설정한다.

### [Step 2]

계속해서 nested primer에 의한 PCR을 다음과 같은 조건으로 5~12 cycle 실시한다.

Nested primer의 크기는 15염기 이하로 선택하고 annealing 온도는 45°C 이하로 설정한다.

이상과 같이 2단계의 조건을 설정함으로써 동일튜브내에서 연속적으로 nested PCR을 실시할 수 있다.

## ▶ Multiplex PCR

Multiplex PCR은 복수의 primer pair를 한개의 튜브내에서 동시에 사용하여 복수의 target를 동시에 증폭하는 방법이다. 시료의 양을 최소한으로 할 수 있고, 노력이나 시간 및 비용 등을 절약할 수 있을 뿐만 아니라 시료간의 cross-contamination의 가능성을 줄일 수 있다. Duchenne형 muscle dystrophy병(DMD)의 유전자 변이 해석에 있어서 dystrophin 유전자의 적어도 9개 영역을 1회의 PCR로 동시에 증폭할 수 있었다는 보고가 있다<sup>1)</sup>.

### Primer design시의 유의점

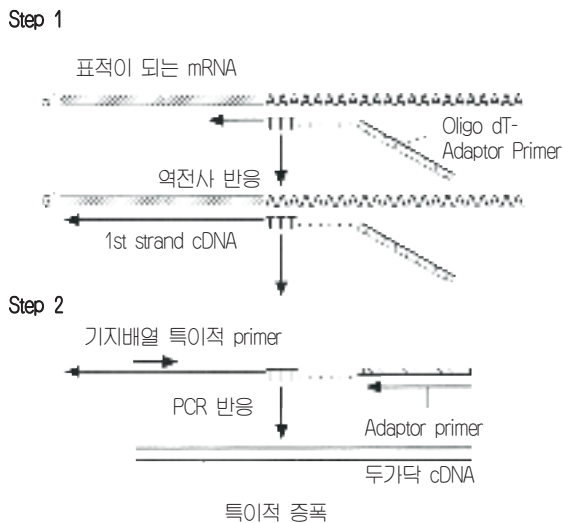
- 1) 다수의 증폭단편이 agarose gel 상에서 충분히 분리 및 식별할 수 있도록 증폭크기를 고려해야 한다.
- 2) Primer의 길이는 22~30 염기로 약간 길게 하므로써 보다 특이성이 높은 Multiplex PCR을 할 수 있다.
- 3) GC 함량은 35~50% 범위 내에서 선택한다. GC함량이 낮으면 비특이적 반응이 많이 일어나므로 extra band가 생기게 된다. Annealing 온도는 비교적 높게 설정한다. 또 반응액 중에 10% DMSO를 첨가해 주면 좋은 결과를 얻을 수 있는 경우도 있다.

## - 응용편 (2)

Life Science & Biotechnology 제 5호의 primer의 선택방법의 기초편과 또 제 6호의 응용편(1)을 통해 Mix Primer 및 제한효소 인식배열 부가 primer에 관해서 소개한 바 있다. 이번에는 그 후속편으로서 nested PCR 및 Multiplex PCR, 그리고 Anchor PCR에 이용하는 primer의 선택에 관해서 설명하고자 한다.

### ▶ Anchor PCR

PCR은 기지의 primer 쌍의 사이에 있는 영역을 증폭하는 방법이나, 유전자에 특이적인 primer와 말단에 인위적으로 배열을 첨가한 primer를 함께 사용하므로써 3' 또는 5'측의 미지영역을 증폭할 수 있다. mRNA의 3'말단을 함유하는 영역을 특이적으로 증폭하는 방법으로서 anchor PCR법중의 하나인 3'-RACE(3'-rapid amplification of cDNA ends) 법을 소개한다.



### [Step 1]

poly(A)를 가진 mRNA에 Oligo dT-Adaptor Primer를 annealing시켜 역전사반응으로 1st strand cDNA를 합성한다. 이때 사용하는 Oligo dT의 길이는 15~20 염기, adaptor의 길이는 20~25 염기가 적당하다.

### [Step 2]

기지의 배열에 특이적인 upstream primer와 Adaptor Primer로 PCR을 실시한다.

### ▶ 표식 primer

수식 primer(예를 들면 5'-biotin labeled primer, 5'-fluorescent labeled primer, 5'-digoxigenin primer)를 제작한 후 PCR에 사용하므로써 표식 PCR 증폭산물을 얻을 수 있는데, 이를 활용하면 다양한 해석이 가능해진다. 수식 primer를 이용한 PCR에서는 통상의 미수식 primer를 이용한 경우와 최적조건이 달라지는 경우가 있으므로 주의해야 한다. 특히, annealing temperature 를 낮게 설정한 쪽이 좋은 경향이 있다.

### [참고문헌]

1) Erlich, H. A. 편 (1990) PCR Technology, p244



## 보한 안내

### FMC 전제품 특별 할인 판매 실시 !

당사는 최고급 품질에 다양한 제품으로 정평이 나있는 FMC의 아가로스를 비롯한 전제품의 특별할인 판매를 약 두달간 실시합니다.

경제위기와 사회적 불안정으로 마음고생이 많은 우리의 연구자들에게 조금이나마 위로를 드리는 마음으로 본 행사를 준비 하였습니다. 많은 이용 바랍니다.

행사내용: FMC agarose를 비롯한 FMC사의 전제품 20% 특별할인 판매

행사기간: 9월 30일 까지(주문일 기준)

주요제품의 할인가격(안표지 광고 참조)

### TaKaRa 제품 가격 대폭 인하 !

외환위기의 발생으로 부득이하게 환율인상분의 50%만을 반영하여 지난 2월 1일 제품 가격을 인상 하였습니다. 다행히 정부와 각 기업, 온 국민의 노력으로 환율이 상당히 안정되게 되었습니다. 물론 엔화의 경우, 97년 1월부터 11월까지의 평균환율인 7.4원/1엔에 비하면 아직도 상당히 높은 9.3원/1엔으로 약25% 이상 인상 되었습니다. 당사로서도 초기의 급등한 환율로 인하여 상당한 환차손을 입게 되었습니다. 환차손, 수입에 소요되는 기간, 금후 변화할 환율의 동향 그리고 재고제품 등을 생각하면 가격을 인하할 수 없는 상황임니다만, 가능한한 하루라도 빨리 환율 안정화의 기쁨을 느끼실 수 있도록 조기 인하를 결정 하였습니다. 고객여러분의 성원으로 경제위기 상황에서라도 당사는 꾸준히 성장, 발전하고 있습니다. 앞으로도 새로운 차원의 서비스를 제공하므로서 국내 생명과학 발전에 공헌하고자 합니다.

가격인하 내용

종전가격 = 종합카다로그 가격 x 1.4 (2월 1일 인상)

인하가격 = 종합카다로그 가격 x 1.2 (8월 3일 부터 시행)

### '98 TaKaRa International Symposium !

당사는 한국분자생물학회와 공동으로 '98 TaKaRa International Symposium을 개최합니다. 금년이 세번째로 한국분자생물학회의 추계학술대회기간인 10월 23일 오후에 서울대학교 문화관에서 열리게 됩니다.

예년과 마찬가지로 생명과학이나 생명공학에서 화제가 되는 주제를 선정하여 알기쉽게 현재의 연구진행상황, 금후의 전망 등에 관하여 소개합니다. 금년은 DNA chip에 관한 현황과 금후 전망, genome project의 진행현황, bioinformatics(생물정보학)에 관한 overview, PCR 기술의 최신 진보인 초고속 PCR효소에 관하여 일선의 최전선에서 활약하는 연구자들이 발표할 예정입니다. 많은 참여를 부탁 드립니다.

### 여러분의 연구결과를 상품화하여 전세계에 공급하여 드립니다 !

당사는 우리의 연구자가 개발하거나 발견, 발명한 생명과학제품을 전세계에 공급하여 드립니다. 연세대 생명과학연구소 김영민 소장(생물학과 교수) 팀이 발견한 제한효소는 멀지 않아 상품화되어 전세계의 생명과학 연구자에게 공급할 예정입니다. 이외에도 현재 수개의 제품에 관하여 상품화 검토를 진행하고 있습니다. 당사는 보다 많은 우리의 제품이 당사의 개발팀과 협력하여, 전세계의 TaKaRa network을 이용하여 공급하고자 합니다. 관심있는 분은 어떠한 것이라도 연락 주시면, 전문가가 검토하여 산업화 할 수 있도록 하겠습니다.





## 종합적인 DNA Chip 사업 전개!!

Takara의 바이오사업부문은 미국 Genetic Micro System사(GMS사)의 DNA Chip 제작장치와 DNA Chip 해석장치에 관한 아시아(일본, 한국, 중국, 타이완)에서의 독점 판매권을 획득하였다. 금년 가을 부터 우선 일본에서 판매를 개시한다. 또 동시에 이들 장치를 이용하여 제조한 DNA Chip의 전세계에 대한 제조판매권도 취득하였다.

### 〈DNA Chip이란?〉

현재까지 전세계적으로 유전자의 구조 해석이 진행되어 사람의 유전자를 비롯하여 다수의 유전자 구조가 밝혀져 왔으나, 이들 유전자의 기능은 아직 베일에 쌓여있다. DNA Chip 기술의 개발은 PCR법에 이은 또 하나의 바이오 혁명이라고 불려지고 있으며 구조가 밝혀진 무수한 유전자의 기능해명이나 나아가 새로운 유전자의 발견에 사용한다.

DNA Chip은 현미경 슬라이드 글래스 등의 기판위에 1만종이상의 DNA 단편을 micro spot으로서 정렬로 고정하는 것이다. 이 DNA Chip과 연구대상세포의 발현유전자를 형광 색소 등으로 표식한 시료로 반응(hybridization)시키면 서로 상보적인 DNA간에 반응하여 그 spot가 발색한다. 이 micro spot의 색을 고해상도로 해석하는 DNA Chip 해석장치로 읽어내어 원래의 chip 위치의 DNA로부터 시료 DNA의 기능을 추정한다. 이 정보가 질환의 예방과 진단, 의약품의 개발에 새로운 길을 열어줄 것이다.

### 〈DNA Chip 제작 장치와 해석 장치에 대하여〉

GMS사의 DNA Chip 제작장치는 1만종 이상의 DNA를 5/100 mm에서 30/100 mm의 크기로 spot할 수 있다. 한시간 이내에 1만개이상의 spot가 가능하고, 한번에 40개의 DNA Chip을 제작할 수 있다. 한편 DNA Chip 해석장치는 3분 내에 1 cm<sup>2</sup>의 DNA Chip 6400 spot를 주사할 수 있고, 한번에 3파장의 형광을 사용하여 해독할 수 있다. 또 슬라이드 글래스의 미묘한 요철에 대응하여 autofocus로 정확한 scanning을 실시한다.

### 〈TaKaRa와 GMS사의 전략〉

이미 알려진 DNA Chip 기술의 유력한 회사로서는 Incyte사나 Affymetrix사가 있다. Incyte사는 고객에게 DNA Chip의 제작을 허용하지 않고 이미 제작한 1만종류의 공개되어 있는 사람의 유전자를 붙인 DNA Chip을 사용하여 고객이 의뢰한 시료를 해석하여 주는 서비스를 실시하고 있다. 또 Affymetrix는 암세포에서 열쇠를 쥐고 있는 p53 유전자나 에이즈 유전자의 oligo DNA를 부착한 주로 진단용의 DNA Chip과 해석장치를 판매하고 있어 고객은 이들 목적에 한정된 시료만을 해석할 수 있다.

한편 당사의 전략은 해석장치에 한정하지 않고 DNA Chip 제작 장치도 판매하여 고객이 스스로 목적에 맞는 DNA Chip을 사용하여 연구할 수 있도록 모든 것을 고객에 맡기는 것이다. 따라서 고객에 대하여 기기 뿐만아니라 software의 서비스도 제공하는 것이 필수이다.

당사에서는 soft면울 충실화 하기 위하여 공개된 유전자 뿐만아니라 각 연구 기관이 보유하고 있는 유전자를 모 집하고, 당사가 갖고있는 유전자도 합하여 새로운 DNA Chip을 제조판매하게 된다. 우선은 Kazusa DNA 연구소와 공동으로 남조류의 DNA Chip을 개발하여 일본 최초의 본격적인 DNA Chip을 제조하여 나갈 예정으로 공동 개발에 착수 하였다. 또 당사가 개발한 DNA Chip의 미국 판매는 GMS사가 하게 된다. 또 고객으로 부터 시료를 받아 모든 해석을 실시하는 소위 연구지원 서비스도 실시한다.

이와 같이 당사와 GMS의 전략은 세계에서 처음으로 조합형 Chip 비즈니스를 구축하는 것이다.

## 홍조류 유리의 천연 올리고당이 암억제작용!

Takara의 바이오사업부문에서는 동양인 특히 일본인이 흔히 먹는 해조에 초점을 맞추어 해조가 함유하고 있는 다당류의 화학구조와 그 생리기능을 해명하고자 최근 10여년간 연구를 계속하고 있다. 금번 해조종에서도 홍조에 함유되어 있는 agarose라는 다당류로부터 생성되는 천연의 올리고당 (Agaro oligo당)이 사람의 암세포주에 대하여 특이적으로 자살을 일으키는 apoptosis 작용을 갖는 것 뿐만 아니라 mouse에 대하여도 경구투여로 암억제작용을 나타내는 것을 세계 최초로 발견하였다. 이 성과는 갈조류에 속하는 다시마의 다당류인 U-Fucoidan이 항암작용을 하는 발견(1996년 일본 암학회 등 발표)에 이은 것이다. 이번 결과에 대해서는 금년의 일본당질학회, 일본 암학회 등에 발표할 예정이다.

## 신규 백신 발견!!

Takara의 바이오사업부문은 금번 Candida증, Aspergillus증 등의 진균증에 대하여 효과가 있는 백신을 발견하였다. 이 백신의 유효성분은 Candida균의 일종인 *Candida albicans*의 막단백질로 된 막항원이다. 종래에 사용한 항진균제와는 완전히 달라 환자 자신의 Candida균에 대한 면역력을 높이므로써 발증을 예방하고 나아가 치료하고자 하는 것이다.

Mouse를 사용한 동물실험에서는 저용량으로 지속적인 감염 예방면역을 유도하여 안전성과 효과면에서 현재 사용하고 있는 항진균제보다 월등히 우수한 결과를 얻었다.

진균증은 곰팡이 효모에 의하여 일어나는 감염증으로 그 중에서 Candida증은 감염빈도가 높다. Candida균 특히 *Candida albicans*는 상재균으로 90% 이상의 건강한 사람의 구강, 소화관, 질 등에 존재하고 있으나, 통상은 인체의 면역력으로 과잉의 증식을 억제하기 때문에 병적 증상을 나타내지 않는다. 그러나 AIDS나 암에 대한 항암제 치료, 각종 질환에 대한 스테로이드제, 광범위 항균항생물질의 남용 등으로 면역력이 떨어진 경우에 발증한다. 이러한 경향은 전세계에 있어서 해마다 증가하고 있다. Aspergillus증은 Candida증 다음으로 감염빈도가 높은 것으로 근년 Candida증과 함께 증가하고 있다.

진균증에 대한 치료약으로서 현재 수종의 항진균제가 있으나, 종류가 적고, 투여기간이 길어 내성균의 출현도 보고 되어 있으므로 중대한 문제를 일으킬 수 있을 것으로 지적되고 있다.

당사의 바이오연구소에서는 보다 안전하고 내성균 출현의 가능성이 적은 종래의 것과는 다른 작용기작을 갖는 항진균제의 개발을 목표로 백신에 의한 진균증의 치료방법을 탐색하여 온 결과 *Candida albicans*의 Protoplast세포에서 얻은 막단백질 중심의 항원에 부작용이 아주 적고 유효성이 높은 백신 활성을 발견하였다.

이 항원은 mouse를 사용한 동물실험에서 adjuvant(면역력을 높이는 보조제)와 같이 주 1회 2주 투여만으로 종래의 항진균제를 1주간 매일 투여하는 경우보다도 우수한 효과를 나타내었다. 또한 현재 사용하고 있는 항진균제인 후루코나졸을 병용하면 한층 유효성이 높아지는 것을 확인 하였다.

향후 사람의 진균증은 물론 가축, 애완동물 등의 감염증에의 이용을 목표로 안전성의 확인과 함께 임상적 유효성을 밝혀 나갈 계획이다.

## 초내열성 protease에 관한 광범위한 유전자 특허 미국에서 취득!

TaKaRa의 바이오사업부는 금번 초내열성 protease 유전자에 관한 기본특허를 미국에서 취득하였다. 또 특허 기술에 따라 초호열 고세균 *Pyrococcus furiosus* 유래의 Pfu protease S를 연구용 시약으로서 발매한다.

당사의 바이오연구소는 노벨화학상 수상자인 고 C. B. Anfinsen 박사(당시 Johns Hopkins 대학교수)와 *Pyrococcus furiosus* 유래의 초내열  $\alpha$ -amylase를 대상으로 1991년에 공동연구를 실시하였다. 우선 *Pyrococcus furiosus* 유전자를 재조합하여 도입한 대장균의 추출액중에 고온(95°C)에서도 작용하는 초내열 protease 활성을 발견하여 초호열 고세균에도 상온균과 마찬가지로 subtilisin이 존재하는 것을 밝혀내었다. 또한 *Pyrococcus furiosus*를 비롯하여 *Thermococcus celer* 등의 각종의 초내열 protease의 유전자를 cloning하는데 성공하였다. 이들 성과를 근거로 특허를 출원하여(일본을 비롯하여 세계 각국에 출원 중) subtilisin형 초호열성 protease에 관한 특허를 미국에서 획득하였다.

현재까지 protease는 단백질 때를 분해하는 세제용 효소로서 사용하거나, 식품의 생산이나 가공에 이용되어 왔다. 그러나 현재까지 공업분야에서 사용되고 있는 protease는 초내열성이 아니므로 그 응용 분야가 한정적이었다.

이번에 발매하는 Pfu protease S는 열에 대하여 극히 안정성이 높아 끓는 물에서도 실화하지 않고 충분한 활성을 나타낸다. 또 고농도의 유기용매나 변성제에 대해서도 강한 내성을 갖고 있다. 이와 같은 특징을 가지므로 종래의 용도 뿐만아니라 지금까지의 효소에서는 공업공정도 그 사용이 기대된다.

# 신제품 안내



Genome DNA Analysis Grade 제한효소

**Swa I**

TaKaRa Code 1110A	200 U
TaKaRa Code 1110B(A×5)	1,000 U

ATTT | AAAT  
TAAA | TTTA  
농도 : 4~12 U/μl  
반응온도 : 25°C  
첨부 · 활성측정버퍼 : H  
보존 : -20°C

QC용 genome DNA의 완전분해에 필요한 효소량

QC용 genome	DNA의 완전분해에 필요한 효소량	
<i>Esherichia coli</i>	5시간반응	20시간반응
	10 U	5 U

절단부위수

pUC19	pUC119	pBR322	φX174	ColE1	M13mp18	λ	Ad2	pKF3	SV40
0	0	0	0	0	1	0	1	0	1



[정확도]를 추구하는 PCR 증폭에!

**Pyrobest™ DNA Polymerase**

5~6 page 참조

TaKaRa Code R005A	125 U	170,000원
TaKaRa Code R005B(A×4)	500 U	612,000원



복잡한 2차구조를 형성하는 주형의 증폭에!

**TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer**

4 page 참조

TaKaRa Code RR02AG	125 U	196,000원
TaKaRa Code RR02BG(AG×4)	500 U	705,600원



**iaKaRa Ex Taq™ (Mg<sup>2+</sup> free Buffer)**

TaKaRa Code RR01AM	250 U	176,000원
TaKaRa Code RR01BM(AM×4)	1,000 U	680,000원
TaKaRa Code RR01CM(AM×12)	3,000 U	1,980,000원



Two Step 반응에도 대응할 수 있는 Kit로의 변신!

**mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1**

TaKaRa Code RR025A	50회	420,000원
TaKaRa Code RR025B	50회×2	756,000원



Mouse 및 human brain 부위별 cDNA Library !

**TaKaRa cDNA Library**



고효율로 안정성이 높은 Competent Cell, Electro Cell

***E. coli* DH5α Cells**

***E. coli* DH5α Competent Cells**

TaKaRa Code 9057	1 Set(100 μl × 10개)
------------------	---------------------

***E. coli* DH5α Electro-Cells**

TaKaRa Code 9027	1 Set(50 μl × 10개)
------------------	--------------------



Agarose gel에서의 DNA 회수를 신속하고 용이하게!

**TaKaRa RECOCHIP**

TaKaRa Code 9039	100회	240,000원
------------------	------	----------



Readymade 형태의 RNA 전기영동용 gel

**Reliant® RNA Gel System**

TaKaRa Code F54922	20매
--------------------	-----

FMC사의 제품입니다.



신속하게 고감도로 변이를 검출  
**MutationFinder™ Kit**

TaKaRa Code F50570 1 Kit(120 reactions)

FMC사의 제품입니다.

**내용 :**

**\* Transcription/hybridization용 시약**

• 10X MutationFinder Transcription Buffer	0.4 ml
• MutationFinder Ribonucleotide Mix	0.6 ml
• T7 RNA Polymerase, 20 units/ $\mu$ l	150 $\mu$ l
• SP6 RNA Polymerase, 20 unit/ $\mu$ l	150 $\mu$ l
• MutationFinder hybridization Buffer	4.0 ml
• RNase-free dH <sub>2</sub> O	4.0 ml

**\* RNase 소화/검출용 시약**

• MutationFinder RNase Digestion Buffer	20.0 ml
• RNase Stock Solution #1 (RNase 1)	250 $\mu$ l
• RNase Stock Solution #2 (RNase T1)	25 $\mu$ l
• RNase Stock Solution #3 (RNase A)	250 $\mu$ l
• MutationFinder Gel Loading Solution	6.0 ml

**\* Positive Control 반응용 시약**

• Mutant Plasmid Control Solution (10 ng/ml)	50 $\mu$ l
• Wild type Plasmid Control Solution (10 ng/ml)	50 $\mu$ l
• Control Primer Solution with promoters (5 $\mu$ M each, T7-Sense primer/SP6-Antisense primer)	25 $\mu$ l

주의) 본 kit에는 PCR에 필요한 시약은 포함되어 있지 않습니다.



Prelabel 정제로 협잡물을 간단하게 제거!  
**Cellulose Cartridge Glycan preparation kit**

TaKaRa Code 4403

1 Kit



Full-Range BEACON® 2000을 이용한  
환경호르몬 연구에!  
**FP Screen-for-Competitors Kit, ER- $\alpha$**

TaKaRa Code VP2313

1 Kit

PanVera사의 제품입니다.



**BioWhittaker사**  
**배지 및 Normal Human Cells**

**AMINOCHROME™-II 태아유래 양수세포 배양용 배지**

Complete Medium System

TaKaRa Code B27561 1 system

TaKaRa Code B27562 1 system

**정상 사람 신경전구세포**

Normal Human Neural Progenitor Cell(NHNP)

TaKaRa Code C2599

**정상 사람 골아세포**

Normal Human Osteoblast Cell(NHOst)

TaKaRa Code C2538



간편 · 신속하게 각종 Tyrosine phosphatase 활성을 측정!  
**Universal Tyrosine Phosphatase Assay Kit**

TaKaRa Code MK411

96회



식품 · 환경중의 미생물의 간이검사에!  
**TaKaRa BioChecker**

**TaKaRa BioChecker**

TaKaRa Code 9101 10개 130,000원

**TaKaRa Suspension Kit for BioChecker (희석키트)**

TaKaRa Code 9102 10개 99,000원