

I. DNA Chip이 가져올 분자의학 혁명

황 승 용

한양대학교 생화학 및 분자생물학과

지금 전세계에서 거세게 일고 있는 게놈(genome) 연구의 결실로 우리는 박테리아에서 인체에 이르기까지 약 10만개 이상의 새로운 유전자 정보들을 3~4년 안에 가지게 될 것이다. 1995년에는 이러한 연구의 첫 결실로 *Haemophilus influenzae*의 모든 게놈 염기서열이 밝혀졌다. 이를 시작으로 지금까지 진핵생물인 *Saccharomyces cerevisiae*(12 Mbp: 효모)와 *Mycobacterium tuberculosis*(4.41 Mbp)를 비롯한 20종 이상의 원핵생물 게놈 유전자 서열이 밝혀졌다. 점점 향상되고 있는 유전자 암호 해독기술(DNA sequencing)의 발달로 이 수는 더욱 급속히 늘어날 것이다. 특히 2005년을 목표로 진행 중이던 human genome project는 J. Craig Venter와 Perkin-Elmer Corp.이 세운 새로운 회사에 의해서 3년 안에 거의 완성되리라 예상되고 있다. 즉 약 3,000 Mbp의 크기와 8~10만개에 이르는 방대한 양의 유전 정보를 가진 인체 게놈이 2001년이면 대부분 밝혀지는 것이다. 이러한 노력은 단지 게놈 염기서열만을 알기 위해서 시작된 것이 아니다. 이런 게놈 염기서열이 갖고 있는 유전자 암호를 얻는 것이 목표인 것이다. 이러한 유전자 암호로부터 우리는 몸을 구성하는 기본요소인 단백질의 모양과 성질들을 유추할 수 있다. 이들 정보는 결국 생명의 신비를 밝히는데 결정적인 도움을 줄 것이다.

지난 20년 동안 우리는 유전공학의 발전에 힘입어 유전정보를 해독하는 기술이 놀랄만큼 발전하였다. 하지만 하루에도 수백개 이상 밝혀지는 새로운 유전정보나 모든 유전 암호가 밝혀진 생물을 기존의 방법으로 연구한다는 것은 한계가 있다. 지금까지 사용하여 온 대부분의 유전공학 방법은 한 연구자가 동시에 많은 수의 유전자를 가지고 실험을 하는데 한계가 있기 때문이다. 이 한계를 극복하고 궁극적으로 게놈의 모든 유전자를 한꺼번에 검색할 수 있는 방법의 개발이 절실히 요구되는 것이다. 이와 같은 목적으로 아주 최근에 개발된 방법이 바로 DNA chip을 이용한 유전자 검색 방법이다. 본 고에서는 효모 유전자를 이용한 DNA chip의 원리와 제작 방법을 설명하고 DNA chip의 여러 가지 활용 방법과 미래에 미칠 영향 등에 대해서도 간략히 논하고자 한다.

▶ DNA chip의 개발동기

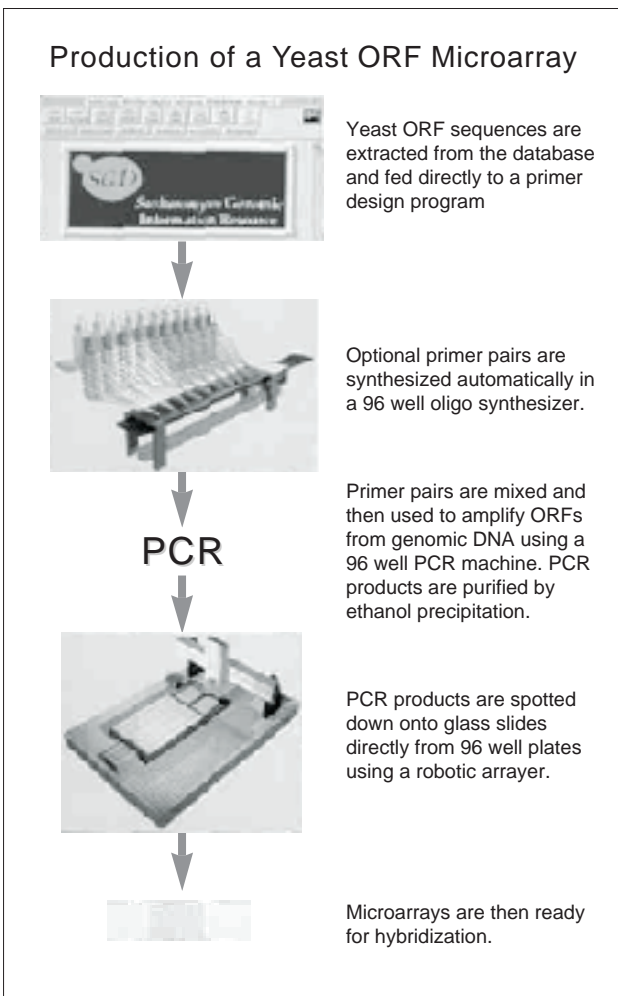
유전자의 근본을 이루는 A와 T(또는 U) 그리고 G와 C 사이에 일어나는 수소결합을 이용하여 여러 가지 유전공학 실험 방법을 개발하여 사용하고 있지만 이들 방법으로 한번에 수십개 이상의 유전자들을 검색하는데는 많은 어려움이 있다. 모든 게놈의 유전 암호가 밝혀지는 시점에 기존의 방법으로 한번에 겨우 수십개밖에 검색할 수밖에 없다면 모든 유전 암호를 검색하기 위해서는 앞으로도 엄청난 시간이 소요될 것이다. 예를 들어 약 8~10만개 이상으로 추정되는 인간 유전자들의 발현 정도를 기존의 Northern blot으로 측정하려 한다면 아마도 수천 수만번 이상을 실시해야 할 것이다. 또한 유전자간의 정확한 비례 관계를 알아보기 위해서는 항상 실험할 때마다 비교 대상이 되는 유전자도 같이 실험해야 할 것이다. 만약에 암에 걸린 사람과 정상인 사람의 유전자 발현 정도를 비교하고 싶다면 여기에 들어야 하는 시간과 노력은 거의 상상하기가 힘들 정도이다.

이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 아주 최근에 개발된 방법이 바로 DNA chip이다. DNA chip은 기존의 분자생물학적 지식에 현대에 와서 급속도로 발전한 기계 및 전자공

학의 기술을 접목하여 만들어졌다. 기계 자동화와 전자 제어 기술 등을 이용하여 적게는 수천개부터 많게는 수십만개에 이르는 DNA를 아주 작은 공간에 집어 넣을 수 있게 된 것이다. 기존의 Southern이나 Northern과 다른 큰 차이점은 유전물질을 심는 매체를 nitrocellulose 막 대신에 유리를 사용한다는 것이다. 그러므로서 아주 적은 양의 유전물질을 아주 작은 공간 안에 심을 수 있게 되는 것이다. 이들 신기술의 접목을 통하여 1995년에 미국의 Stanford 대학에서는 cDNA microarray chip 이라는 것을 만들었고, Affymetrix사에서는 oligonucleotide chip을 개발하게 되었다. 이들 DNA chip의 이름에서도 알 수 있듯이 cDNA microarray chip은 수천개의 다른 완전한 유전자(full-length open reading frame)를 chip에 가지고 있으며, Affymetrix oligonucleotide chip은 약 20~25개의 염기들로 이루어진 수만개의 다른 oligonucleotide를 하나의 chip안에 정렬하고 있다. 먼저 이 두가지 DNA chip은 유전자 발현에 관한 연구에 획기적인 전기를 마련 했을 뿐만 아니라 여러 가지 다른 목적으로서도 그 가능성을 인정 받기 시작하였다.

▶ DNA chip 개발에 효모를 모델로 이용

위에서 밝힌 바와 같이 DNA chip은 게놈 연구의 한 큰 줄기로서 유전자의 성질을 밝히기 위해 개발되었다. 궁극적으로 이 DNA chip은 2001년에 밝혀질 모든 인간 유전자를 검색하는데 쓰여질 것이다. 이를 달성하기 위해서는 앞으로 남은 2~3년의 기간동안 이들 DNA chip 기술을 더욱 더 발전 시켜야 한다. DNA chip 기술을 발전 시키기 위해서는 어떠한 실험용 대상이 필요한 것이다. 이 대상으로서 빵이나 술을 만들 때 쓰이는 효모가 이용되었다. 가장 큰 이유는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 모든 유전자 서열이 이미 밝혀졌기 때문이다. 효모는 간단하게 기를 수 있고 유전자 조작이 쉬운 단세포 이면서도 인간과 같은 진핵세포 생명체이다. 이러한 이유로 지난 수십년간 많은 유전학자들의 주요 연구대상이었으며 그 결과 많은 수의 유전자 성질이 밝혀져 있다. 이와 같이 기존의 방법으로 밝혀진 많은 정보는 DNA chip에 의하여 얻은 결과와 비교 검토하므로써 DNA chip의 발전에 많은 도움을 줄 수 있다.



수십년간의 효모에 관한 많은 연구에도 불구하고 모든 효모의 염기서열이 밝혀졌을 때 놀라운 사실들이 밝혀졌다. 효모의 게놈은 약 12 Mbp의 크기로 6,100개의 유전자로 이루어져 있는데 지금까지 알려진 유전자는 이중의 절반도 안되었던 것이다. 생물정보학자들의 도움으로 이들 새로운 유전자중에서 약 2,000개 정도는 다른 생물에서 밝혀진 사실과 비교하여 성질을 추측할수 있었다. 하지만 아직도 1,000여개 이상의 유전자는 어떠한 성질을 가졌다고 추측조차 할 수 없는 실정이다. 이러한 점들이 왜 게놈연구를 해야 하는가

의 필요성에 대한 한가지 대답이 될 수 있겠고, 간접적으로는 유전자의 성질을 밝히는 데에 쓰여진 기존 방법들의 한계도 보여준다. 이와 같은 점들이 DNA chip을 실용화하는데 효모가 적합한 실험 대상으로 쓰여진 것이다.

▶ cDNA microarray chip의 제작방법

cDNA microarray chip은 수천개의 유전자를 약 1.8 cm² 안에 넣고 유전자 발현 정도를 한번에 측정할 수 있게 만든 것이다. 그러면 어떻게 DNA chip을 만들었는지 그 과정을 살펴보기로 하자.

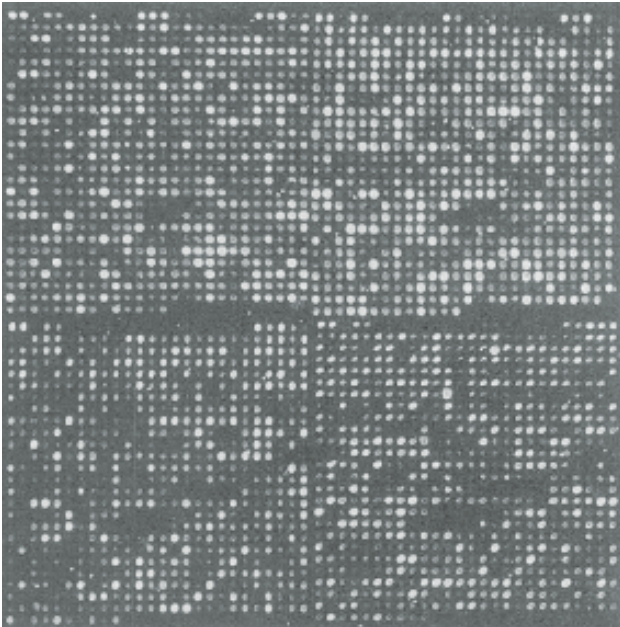
먼저 효모의 모든 염기서열이 밝혀졌기 때문에 그로부터 가능한 모든 유전자(open reading frame)의 위치를 파악한다. 각각 확인된 유전자의 시작과 끝 부분에 polymerase chain reaction(PCR)에 필요한 염기인 primer를 computer에 의하여 찾아낸다. 즉 6,100개의 모든 효모 유전자를 PCR 하기 위해서는 12,200종의 primer가 필요한 것이다. 이들 primer는 서로 비슷한 결합 온도(annealing temperature)를 가지고 있어서 동시에 여러 유전자를 PCR로 증폭할 수 있어야 한다. 이렇게 설계된 primer는 Stanford 대학에서 개발한 96-well oligonucleotide synthesizer로 합성하게 된다. 이 기계는 96개의 다른 oligonucleotide를 20 nmole의 용량으로 합성할 수 있다. 이 양은 약 100번 정도의 PCR에 사용할 수 있는 분량이다. 합성한 primer를 이용하여 효모의 genomic DNA로부터 유전자를 증폭한다. 대부분의 효모 유전자들은 intron을 가지고 있지 않으므로 바로 genomic DNA로부터 증폭된 DNA는 하나의 완벽한 유전자이다. PCR의 성공 여부를 agarose gel로 확인하며 증폭된 유전자는 ethanol을 이용하여 침전시킨다.

이렇게 증폭한 효모의 유전자는 역시 Stanford 대학에서 자체 제작한 microarrayer라는 기계에 의해 보통 현미경 실험에 자주 쓰이는 slide glass에 심어지는 것이다. 각각의 slide glass는 poly-L-lysine으로 처리되어 있으므로 유전자와 결합하여 고정할 수 있는 것이다. DNA microarrayer는 크게 세 부분으로 나눌 수 있다. 첫 번째가 100개의 slide glass를 놓는 곳이고 두 번째가 PCR로 증폭한 유전자를 담고 있는 96-well plate를 놓는 곳이다. 마지막으로 DNA를 slide glass에 옮겨 주는 역할을 하는 송곳같은 장치가 붙어 있는 robotic printhead이다. 이 송곳같은 장치가 DNA를 96-well plate로부터 담아서 100개의 slide glass에 computer가 지정한 똑같은 장소에 심어 준다. 이와 같은 연속적인 반복 동작을 통해서 수천개의 효모 유전자를 가진 cDNA microarray chip이 탄생하게 된 것이다.

▶ cDNA microarray chip을 이용한 유전자 발현 검색

두가지의 다른 환경에서 자란 세포는 그 환경에 필요한 독특한 유전자들을 발현한다. 이러한 원리를 이용하면 유전자의 성질을 분석하는데 많은 도움이 된다. 발현량이 다른 수천개의 다른 유전자들은 cDNA microarray chip을 이용하면 한번에 검색할 수 있다. 먼저 두 개의 다른 환경에서 얻은 세포로부터 mRNA를 추출한다. 이 mRNA를 역전사 반응(reverse transcription)으로 cDNA를 합성할 때 각각 다른 색깔의 형광물질을 띤 염기를 집어넣어 빨간색이나 녹색으로 수식한 cDNA를 합성한다. 수식합성한 2종의 cDNA를

같은 양으로 섞어서 하나의 cDNA microarray chip에 결합 (hybridization)시킨다. 결합되지 않은 여분의 cDNA 유전자를 씻어낸 chip을 laser fluorescence scanner로 읽는다. 각각 유전자의 형광 정도는 그 유전자의 발현정도를 나타내는 것으로 이 정보를 computer로 분석한다.



위의 그림에서는 약 2,500개의 효모 유전자를 가진 cDNA microarray chip으로 2% galactose와 glucose에서 각각 따로 자란 효모의 유전자 발현을 비교한 것이다. 이 실험에서는 galactose에서 자란 효모의 유전자들이 녹색으로, glucose에서 자란 효모의 유전자는 빨간색으로 수식되었다. 이 두가지 색깔을 띤 유전자들을 섞어서 한 chip에 결합하여 이와 같은 결과를 얻었다. 이 그림에서 각각의 동그란 점들은 서로 다른 유전자를 대표한다. 이 흑백 사진으로는 구별할 수 없지만 녹색을 띤 점들은 이 유전자가 galactose가 주어진 환경에서만 발현되는 것임을 보여주고, 빨간색을 띤 점들은 glucose가 주어진 환경에서만 발현되는 유전자를 나타낸다. 그리고 노란색 점들은 녹색과 빨간색의 보색에 의하여 나타난 것으로 이 유전자들은 두 환경에서 서로 비슷한 양이 발현함을 알 수 있다. 이 방법으로 1:50,000의 빈도로 발현하는 유전자까지 검색할 수 있다. 이렇게 cDNA microarray chip을 사용한 한번의 실험으로 특정한 환경에서만 발현하는 유전자를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 발현 정도까지도 알 수 있다.

이와 같은 방법은 사람의 암 유발 유전자를 찾아내거나 진단하는데도 널리 사용할 수 있다. 가까운 장래에 인체의 모든 유전자가 밝혀지면 이들 유전자를 하나 또는 여러개의 cDNA microarray chip에 나누어 심은 다음 위와 같이 유전자의 발현 정도를 검사할 수 있을 것이다. 정상적인 세포와 암세포에서 얻은 mRNA를 서로 다른 색깔로 합성하여 이 DNA chip에 결합시키면 되는 것이다. 암세포에만 특별히 발현되는 유전자는 이 암의 발생에 이 유전자가 어떠한 역할을 담당한다는 것을 유추할 수 있을 것이다. 또한 이렇게 해서 발견된 유전자는 그 암의 진단에도 많은 도움을 줄 수 있을 것이다. 이와 같이 암 연구 이외에도 각각 다른 장기로부터 얻은 세포들의 유전자 발현 정도를 알아냄으로써 생명의 신비를 좀 더 분명하게 밝힐 수 있을 것이다. 한마디로

요약해서 인간의 유전자 발현 청사진을 얻는 것이다. 이 청사진을 이용하면 이때까지 볼 수 없었던 유전자간의 복잡한 연결 고리를 한결 쉽게 풀 수 있을 것이다.

▶ Affymetrix oligonucleotide chip의 제작방법

미국의 silicon valley에 있는 Affymetrix라는 회사는 computer 산업계에서 computer chip을 만들기 위해서 쓰는 photolithography라는 기술을 사용하여 수만개의 다른 염기 (nucleotide)들을 하나의 유리위에 직접 합성하는데 성공하였다. 이 기술은 20세기를 대표하는 computer 산업과 21세기를 대표할 생명공학 산업의 절묘한 결합체이다. Affymetrix는 이 기술을 사용하여 1.28 cm² 안에 65,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들었고 지금은 400,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있게 되었다. 각각의 oligonucleotide들은 20~25개의 염기로 이루어져 있다.

Oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면에는 각각의 염기들을 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 평소에 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을 쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그 곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 넣으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. 물론 각각의 염기들도 빛에 민감한 화학물질로 덮여 있어 한 개씩밖에 합성이 안된다. 이러한 chip을 씻은 다음 다시 다르게 설계된 photomask를 이용하여 빛을 쏘여 주면 그 곳에 있는 보조체나 염기들이 활성화되어 다음 염기들과 합성할 수 있게 되는 것이다. 이 과정을 반복하므로써 65,000개의 다른 25 mer(25개의 염기를 가진 oligonucleotide)를 약 100 cycle 안에 합성할 수 있다.

▶ Affymetrix oligonucleotide chip을 이용한 유전자 발현검색

앞에서 설명한 cDNA microarray chip과 이 oligonucleotide chip의 다른 점은 chip에 완전한 유전자(full-length ORF) 대신에 25 mer의 합성 oligonucleotide를 심는 것이다. 이같은 차이점으로 유전자 발현을 검색하는데 쓰이는 oligonucleotide chip을 만들때 유전자의 어떤 부분을 선택하여 합성하는가가 매우 중요하다. 평균 20개의 25 mer의 oligonucleotide가 하나의 유전자를 대표하여 선택된다. 또한 각각의 결합 온도(annealing temperature)가 서로 비슷해야 한다. 가장 중요한 것은 이들 25 mer의 합성 DNA가 전체 게놈에서 유일해야 한다는 것이다. 만약에 중복 되어 있다면 결과를 해석할 수 없게 되기 때문이다. 이들 조건때문에 전체 게놈의 염기 서열이 밝혀진 생물의 chip을 만드는 것이 가장 수월하다. 그래서 Affymetrix에서도 앞에서 설명한 바와 같은 여러 가지 이유로 효모의 전체 유전자를 가진 oligonucleotide chip을 만들었다. 하나의 유전자를 대표하여 선택된 평균 20개의 25 mer의 oligonucleotide 바로 밑에는 각각의 13 번째 염기서열에 변형을 준 oligonucleotide가 합성되어 있다. 이렇게 변형된 25 mer를 만든 이유는 정상적인 DNA가 변형된 염기 때문에 이곳에 절대 붙지 않는 성질 때문이다. 이들 변형된 25 mer들은 물론 전체 게놈에 없는 염기서열이

며, 각각의 정상적인 25 mer의 oligonucleotide의 local background나 만약에 일어날 수 있는 cross hybridization을 측정하는데 쓰인다.

Oligonucleotide chip도 cDNA microarray chip과 비슷한 과정을 거쳐 다르게 발현되는 수천개의 유전자들을 동시에 검색할 수 있다. 먼저 두 개의 다른 환경에서 얻은 세포들로부터 mRNA를 추출한다. 같은 양의 mRNA를 역전사(reverse transcription)반응으로 cDNA를 합성한다. 합성된 두 개의 cDNA를 DNA chip의 25 mer에 잘 붙게하기 위해 DNase I을 사용하여 약 100 bp보다 작게 자른다. 이렇게 토막난 cDNA의 끝에 Biotin이 붙은 염기를 붙인 다음 이것을 oligonucleotide chip에 결합시킨다. cDNA microarray chip과 다른 점은 이 두가지 cDNA를 각각 다른 oligonucleotide chip에 넣어 결합시킨다는 것이다. 그 이유는 각각의 oligonucleotide chip 안에 있는 25 mer들의 수와 질이 같기 때문에 서로 다른 두 개의 결과를 비교해 볼 수 있기 때문이다. 결합이 안된 유전자를 씻어낸 chip은 laser scanner로 해독한다. 한 유전자를 대표하는 20개의 25 mer의 밝기 정도를 평균하여 그 유전자의 발현정도를 알 수 있다. 이 chip을 이용하여 1:300,000의 빈도로 발현하는 유전자도 검색할 수 있다. 이 oligonucleotide chip도 cDNA microarray chip과 마찬가지로 한 환경에만 발현하는 유전자를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 발현 정도까지도 알 수 있다. 즉 암 유발 유전자를 찾을 수도 있고 진단에도 사용할 수 있는 것이다.

▶ DNA chip의 다른 활용 방법 : 유전병 및 암 유발 돌연변이 검색

유전자 발현을 검색하는데에는 cDNA microarray chip이나 oligonucleotide chip이 기존의 방법들보다도 모두 뛰어나다. 일단 많은 수의 유전자들을 한번에 검색할 수 있다는데 그 의미가 있는 것이다. 앞에서 밝힌 바와 같이 이 두가지의 DNA chip은 암 유발 유전자를 찾는다는가, 병의 진단 또는 유전자 발현의 청사진을 만드는데 커다란 기여를 할 것이다. 하지만 DNA chip은 유전자 발현 이외에도 다른 용도로도 쓰여질 수 있다.

먼저 염색체상의 돌연변이를 측정할 수 있는 것이다. 이점은 돌연변이들이 바로 암이나 유전병들을 유발하는 요인이기 때문에 또 다른 DNA chip의 중요한 활용 방법이다. 모든 염색체의 genomic DNA를 고루 갖춘 DNA chip을 만든다면, 특정 부분의 염색체가 없어지거나 더 만들어졌을 때 쉽게 찾아낼 수 있을 것이다. 즉 염색체가 없어진 부분은 DNA chip에 있는 genomic DNA와 붙지 않을 것이고, 염색체가 더 생긴 경우는 더 많이 붙을 것이다. 예를 들어 인체 염색체 21번이 하나 더 생겨 일어나는 다운증후군도 이 염색체를 가진 DNA chip으로 쉽게 진단 할 수 있을 것이다. 특히 Affymetrix oligonucleotide chip은 하나의 염기서열만 틀려도 결합하지 않기 때문에 한 염기에 생긴 돌연 변이(point mutation)까지도 찾아낼 수 있다. 많은 암이나 유전병들이 특정 유전자에 생긴 작은 돌연변이에 의해서 유발되기 때문에, 이것을 이용하여 지금까지 밝혀진 암 관련 유전자를 갖는 DNA chip을 만든다면 한번의 실험으로 아주 쉽게 돌연변이를 찾을 수 있다. 지금 Affymetrix사에서는 암 관련 유전자인 p53와 BRCA1을 갖는 chip을 만들어 사용하고 있고, 또한 AIDS의 원인인 HIV의 종류도 알 수 있는

chip도 가지고 있다.

다른 활용 방안으로는 게놈의 염기서열을 DNA chip을 통하여 밝히는 것이다. 개개인의 사람은 모두가 조금씩 다른 형태의 유전자(polymorphism)를 가지고 있다. 이러한 유전적 배경 때문에 모든 사람이 한가지 병에 걸렸을 때에도 개개인을 치료하는 방법이 조금씩 다르다. 다시 말하면 약의 종류, 농도나 기간을 조금씩 다르게 사용해야 한다. 만약 가까운 미래에 개개인의 모든 염색체 변이를 알 수 있고 병과의 상관 관계를 밝힌다면, 이를 토대로 우리는 자신만을 위한 약을 처방받게 될 것이다. 더 이상 이 병에는 무슨 약이라는 통설은 없어지게 되는 것이다. 이와 같이 개개인이 자신의 염기서열을 현재의 유전자 암호 해독방법(DNA sequencing)으로 밝혀려 한다면 앞으로도 전세계가 약 5년이상 한사람의 유전자에만 매달려야 할 것이다. 하지만 위에서 설명한 것과 같이 Affymetrix oligonucleotide chip으로 개인의 염기서열과 polymorphism을 밝힐 수 있게 된다. 지금 Affymetrix사는 1,000,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 개발하려 하고 있기 때문이다. 이러한 chip이 만들어 진다면 우리는 유전병을 쉽게 찾을 수 있고 또한 암 유발 유전자의 유무를 미리 알 수 있을 것이다. 즉 가까운 장래에 모든 병원들이 이 DNA chip이나 유사한 기술을 가지고 병을 진단할 것이다.

▶ 결론

이상으로 DNA chip의 원리, 제작 방법 그리고 여러 가지 활용 방법에 대하여 논하였다. 특히 cDNA microarray chip과 Affymetrix oligonucleotide chip을 이용하여 여러 가지 다른 환경에서의 효모 유전자 발현변이를 관찰하였다. 다른 환경에서 자란 효모의 유전자 발현을 검색한 결과 많은 수의 유전자가 각각의 환경에 특이하게 발현 된다는 것을 발견하였다. 많은 수의 유전자는 이미 알려진 것이었지만 대부분의 유전자 발현 변화는 지금까지 알려지지 않았던 새로운 사실이었다. 결국 이러한 새로운 지식을 완전히 해석하기 위해서는 기존의 방법이 아닌 이와 같이 한번에 모든 유전자의 변화를 관찰할 수 있는 DNA chip을 이용한 많은 실험이 진행 되어야만 할 것이다.

앞으로 곧 다가올 21 세기는 생명공학의 시대라고 자신있게 말할 수 있다. 그 이유는 첫째 모든 인간의 게놈을 포함한 다른 여러 가지 생명체들의 염기서열이 곧 밝혀지기 때문이다. 두 번째는 이와 같은 엄청난 유전정보들을 분석할 수 있는 새로운 기술이 많이 개발되고 있다는 것이다. 처음 게놈 연구를 시작할 때 많은 사람들은 인간의 모든 유전자가 밝혀지더라도 그들의 모든 성질을 밝히는 데는 100년 이상이 걸릴 것이라고 추측하였다. 하지만 앞에서 소개한 두가지의 DNA chip 이외에도 전기신호에 의하여 DNA의 결합유무를 알 수 있는 기술도 최근에 개발 되었고, 대부분의 실험을 조그만 크기의 DNA chip 안에서 기계가 할 수 있게 만든 "lab on a chip"이라는 개념의 기술도 개발된 상태이다. 이와 같은 혁신적인 기술의 개발로 유전자의 성질을 밝히는 시간은 획기적으로 단축되리라고 생각한다. 또한 이와 유사한 많은 새로운 기술들이 지금 개발 중이기 때문에 가까운 미래에 우리는 유전정보 청사진을 가지고 모든 암과 유전병을 정복할 수 있는 시대를 맞이할 것이다.

II. DNA Chip 기술과 그 응용

- Genome의 기능해석을 향하여 -

Fusao Kimizuka, Ikunoshin Kato

Biotechnology Research Laboratories, Takara Shuzo Co. Ltd., Japan

여러 생물의 모든 유전자의 기능을 효율적으로 해석하는 기술이 개발되고 있다. DNA chip은 slide glass나 silicon 등의 기판에 다수의 DNA 분자를 정렬적으로 배열한 micro array로 유전자의 발현, 변이나 다형성 등을 동시에 해석하는 데 아주 유용하며 또한 DNA 이외의 생체분자에도 적용할 수 있다. 각종 chip의 제작, 해석장치 미국을 중심으로 개발, 공급되고 있으나 일반 연구자까지는 아직 보급되고 있지 않다. 본 고에서는 DNA chip 기술의 현황과 전망을 소개함으로써 금후의 연구진전에 기여하고자 한다.

▶ 서론

Post genome 연구과제로서 functional genomics 또는 drug discovery라는 용어가 유명 학술잡지에 빈번히 등장하고 있다. 이는 genome sequencing project의 성과를 어떻게 하면 인류에 유용하게 활용할 수 있도록 하는가를 연구하는 것이다. DNA chip(DNA microarray 라고도 한다) 기술은 genome project의 성과를 비약적으로 발전시키는 새로운 기술로서 창약연구, 질병의 진단과 예방법의 개발, 에너지와 환경문제 대책 등의 연구개발에 새로운 수단으로서 기대되고 있다¹⁾. 그러나 이 기술의 개발은 현재 미국을 중심으로 진행되고 있으며 일본을 비롯한 다른 나라에서는 개발이 늦어지고 있다. 본 고는 약 2년간에 걸쳐 미국의 관련기업과 접촉하여 얻은 경험을 중심으로 정리한 것이다. 금후의 연구진전에 작으나마 도움이 되기를 바란다.

I. DNA Chip 기술의 개요

DNA chip 기술개발이 구체화 된 것은 Drmanac 등이 DNA의 염기서열을 oligonucleotide와의 hybridization에 의하여 결정하는 방법(sequencing by hybridization:SBH)을 고안한 데서 출발한다²⁾. SBH는 겔 전기영동을 사용하는 DNA 염기서열 결정법의 한계를 원리적으로 극복할 수 있는 방법으로서 주목 받았으나 실용화에는 우여곡절이 있었다. 그 후 Affymetrix사나 Stanford 대학이 고밀도 array 제작 기술을 개발하여 유전자의 발현이나 변이 또는 다형 등을 단시간에 다량으로 처리할 수 있는 소위 HTS(high throughput screening)가 가능하게 되었다^{3, 4)}. Chip 기술을 실용화하기 위해서는 다수의 DNA 단편이나 oligonucleotide를 고상표면에 정렬할 수 있는 고밀도 array(DNA Chip) 제작기술 그리고 hybridization 해석기술이 필요하며 또한 다수의 시료를 처리할 수 있는 자동화 장치를 필요로 한다.

DNA chip의 제작 방법으로는 미리 조제하여 놓은 DNA를 slide glass나 silicon 등의 기판에 고정하는 방법(DNA micro array)^{3, 5)}과 기판상에 DNA를 합성하는 방법(oligo DNA micro array)^{4, 6)} 등이 알려져 있는데 이들은 각각 장점과 단

점을 갖고 있다(그림 1). 일반적인 chip의 크기는 1~10 cm로 이 영역에 수천~수만종의 DNA를 정렬화 한다. 검출에는 1~10 μm의 해상능력을 갖는 고성능의 형광 scanner를 사용한다. 또한 형광화상을 해석하는 software도 필요하다. 이미 chip 제작용 arrayer, 형광 scanner와 해석용 software로 구성된 system이 개발되어 DNA chip 기술을 응용한 다수의 연구가 보고되고 있다.

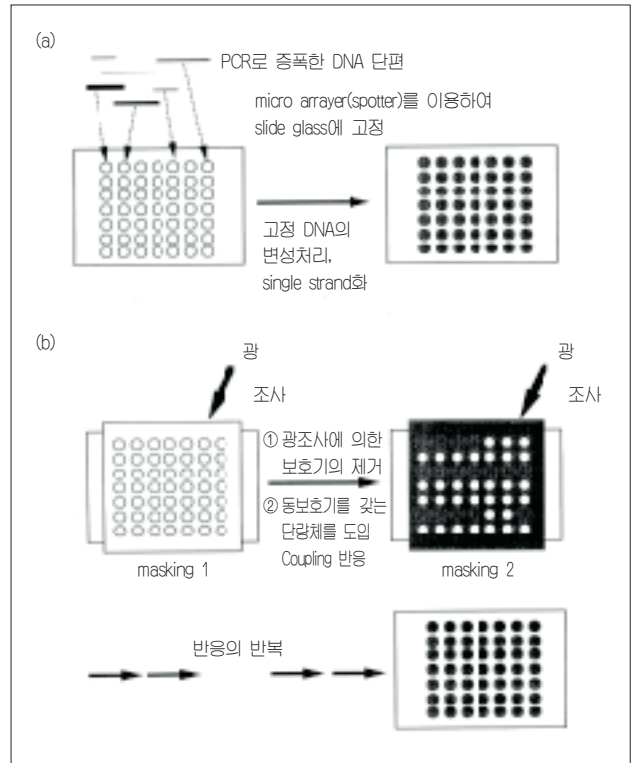


그림 1 DNA chip의 제작방법

PCR 등으로 조제한 cDNA를 arrayer를 사용하여 slide glass에 정렬하는 경우(a)와 반도체 기술을 응용하여 slide glass 위의 특정영역에 다수의 DNA를 동시에 합성하는 경우(b)의 개념도

II. DNA Chip의 제작방법

1. DNA의 고상 표면에 고정화

고정화하는 DNA는 목적에 따라 크게 2종류로 나눌수 있다. 유전자의 발현을 조사하기 위해서는 cDNA나 그 일부, 또는 3' 말단 200~300 bp 정도의 cDNA 단편(expressed sequence tag: EST라 부른다) 등의 polynucleotide(원핵생물은 open reading frame: ORF)를 고정한다. 이들의 배열이나 기능은 미지의 것이라도 좋으나, 일반적으로는 data base에 등록된 서열을 기준으로 cDNA나 genomic library 또는 전 genome 을 PCR로 증폭하여 조제한다(PCR의 신속화가 필요).

한편 유전자의 변이나 다형을 조사하는 경우는, 이미 알고 있는 표준이 되는 서열을 기본으로 변이나 다형에 대응하는 각종 oligonucleotide를 합성하게 된다. 또한 염기서열 분석의 경우에는 $4n$ (n 은 염기길이)종의 oligonucleotide를 합성한다. DNA의 고정화 방법으로는 DNA의 종류 그리고 담체의 종류에 따라 적당한 방법을 선택한다. 고정화하는 DNA가 cDNA나 PCR 산물인 경우는 DNA의 전하를 이용하여 polylysine³⁾, polyethylene imine, polyalkylamine 등의 poly cation으로 표면처리한 고정담체에 정전결합시키고 계속해서 여분의 cation을 blocking하는 것이 일반적이다(그림 1a, 그림 2a). 그러나 DNA의 5' 말단과 고상과의 공유결합을 시도한 예도 있다⁷⁾(그림 2b). Polynucleotide를 고정하는 고정담체로는 일반적으로 slide glass를 사용한다. 이는 표면처리가 용이하고 형광 scanner를 사용하는 해석이 용이하기 때문이다.

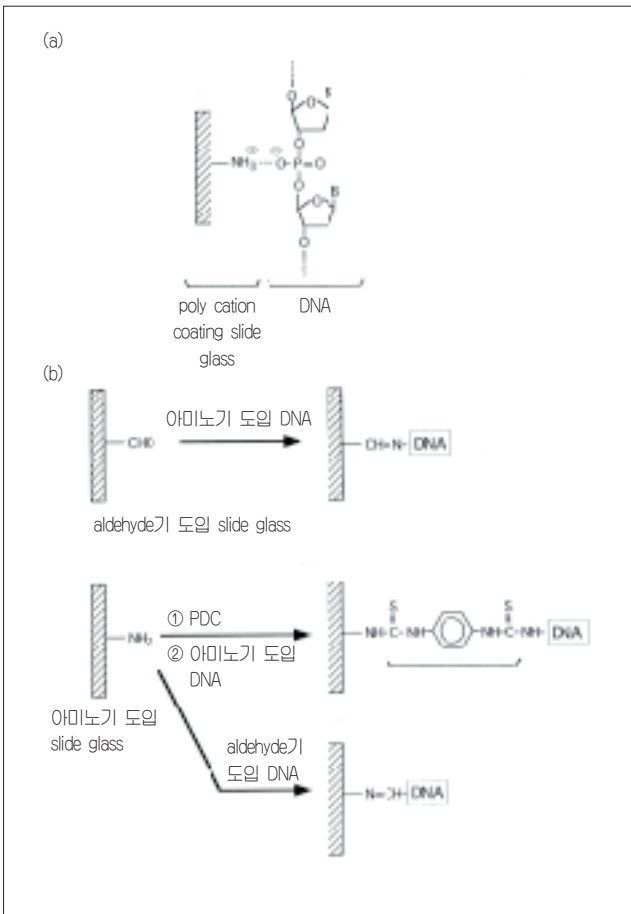


그림 2 DNA의 고상담체에의 고정화법

(a) PCR 산물 등의 긴가닥 DNA를 공유결합(정전결합)으로 slide glass에 고정하는 방법 (b) 합성 oligonucleotide를 공유결합으로 slide glass에 고정화하는 방법

합성 oligonucleotide를 고정화하는 방법으로는 두가지 방법이 있다. 하나는 glass나 silicon 기판(silica 표면층을 갖는다) 위에 직접 합성하는 방법이다(그림 1b). 이 방법은 기판표면을 4×4 의 matrix로 분획하여 다수의 반응부위에 있어서의 조합에 의한 반응(combinatorial synthesis)으로 최소의 합성회수로 다종의 DNA를 합성한다. 예를 들면 8염기의 oligonucleotide의 배열은 $4^8 = 65,536$ 종류가 있으나 이를 matrix 방법으로 합성하면 $4 \times 8 = 32$ 회의 합성 cycle로 모든 서열을 합성할 수 있다. 문제는 어떻게하여 미소한 matrix의 소정의 영역(반응부위)에 선택적으로 합성할 것인가(이를 masking 기술이라함)인데, Fodor 등은 광조사로 선택적으로 제거하는 보호기의 사용과 반도체 제조에 이용하는 photolithography 기술(그림 3a)과 고상 합성기술을 조합하여 이를 깨끗이 해결할 수 있었다⁴⁾. 즉 광화학적으로 제거할 수 있는 보호기로 수식한 linker를 아미노기를 통하여 고상에 결합시켜 놓고 반응부위에만 조사할 수 있는 mask (photolithographic mask)를 걸쳐 놓고 광을 조사한다. 계속해서 동보호기를 갖는 단량체를 도입하여 최초의 coupling 반응을 실시한다. 이 cycle을 반복하므로써 원하는 probe matrix를 제작한다(그림 1b). 여기에 photoresist의 사용으로

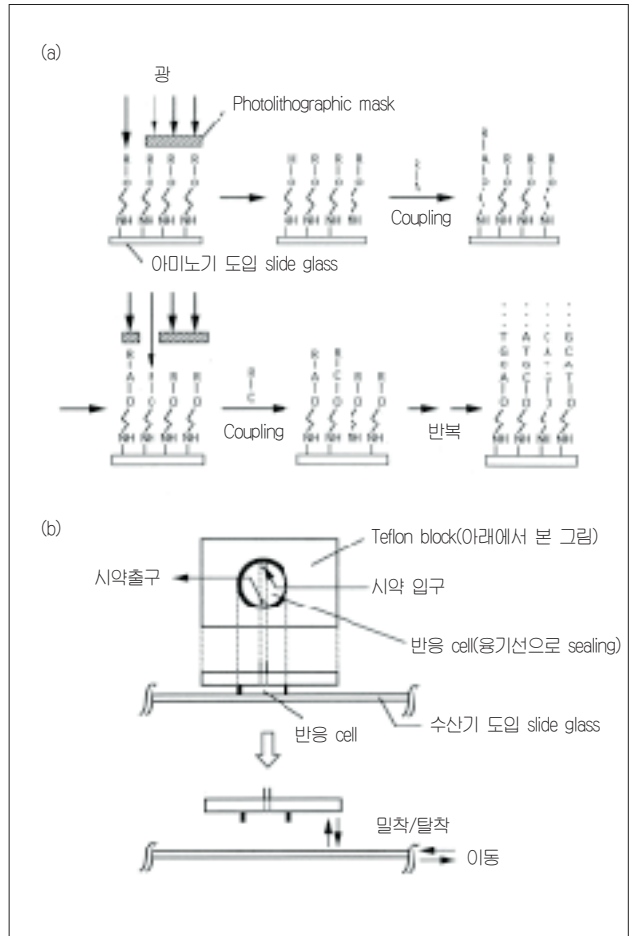


그림 3 담체 위에서 직접 DNA를 합성하는 방법(on chip 합성)

(a) photolithography에 의한 합성. alkyl amino silan으로 코팅한 glass에 광감수성 보호기(R)를 갖는 linker를 공유결합하여 놓는다. Mask를 통하여 반응부위에만 광을 조사하여 탈보호하여 최초의 합성을 실시한다. 그 다음의 반응 부위를 같은 방법으로 조사하여 두번째의 합성을 실시한다. 이 과정을 반복하므로써 소정의 장소에 원하는 DNA를 합성한다. (b) mechanical seal에 의한 합성 Teflon block의 표면에 같은 재질의 원형용기선으로 sealing한 반응 cell을 만든다. 반응 cell을 아래쪽으로 밀착하여 slide glass에 밀착하여 cell속에서 시약을 도입하여 합성을 실시한다. Cell을 탈착하여 유리를 움직여 새로운 반응 부위를 형성하고 다음의 합성을 실시한다. 이 과정을 반복한다.

서 산으로 제거할 수 있는 종래의 보호기도 사용할 수 있게 되었다⁸⁾. Southern 등은 mechanical seal에 의한 glass 기판상에서의 oligonucleotide 합성을 실시하고 있다⁶⁾(그림 3b). 또 Hood 등은 photolithography에 의해 산화 silicon 표면에 100 μm 의 원형 photoresist를 만들어 그 주변에 소수성이 높은 silan으로 coating한 다음 resist를 제거하여 친수성의 합성부위로 이용하였다⁹⁾. 합성부위의 수식은 Southern 등의 방법을 사용하고, 합성시약의 공급에는 ink jet printer의 원리를 이용하고 있다. 이와 같이 기판상에서 직접 DNA를 합성하여 고정화하는 방법을 *in situ*(on chip) 합성이라고 한다.

이에 대하여 미리 말단에 공유결합하는 관능기를 도입한 oligomer를 합성하여 표면처리한 고상에 공유결합 시키는 방법이 있다^{5, 10)}(그림 2b). DNA에 도입하는 관능기로서는 amino기, aldehyde기, SH기, Biotin 등이 이용된다. 또 유리나 silica 등의 고상담체의 표면처리에는 amino기, aldehyde기, epoxy기 등을 갖는 각종 silan coupling을 흔히 이용한다. Oligomer는 표면처리한 고상에 spacer나 cross-linker를 통하여 공유결합하는 것이 일반적이다. 소수성 glass 표면에 polyacrylamide gel의 미소단편을 정렬하여 거기에 합성 oligomer를 공유결합시키는 방법도 있다¹¹⁾. 이 경우 부위 당 oligomer의 결합량이 많으므로 액상 hybridization이 가능하다. 특수한 방법으로서 Nanogen사의 방법이 있다¹²⁾. 이는 반도체 기술에 의해 silica chip의 위에 미소전극의 array를 제작하고, 전극에는 streptavidin을 함유하는 agarose의 침투층을 만들어 반응부위로 한다. 반응부위를 +로 하전시키므로 Biotin화 DNA를 고정화하고 부위의 전하를 제어하므로 고속으로 엄밀한 hybridization이 가능하게 된다. 이 방법은 원리적으로 모든 전하 물질에 적용할 수 있다.

2. DNA Chip 제작장치(arrayer)

기판위에서 직접 DNA를 합성하여 chip을 만드는 방법은 앞에서 설명하였으므로 여기서는 조제한 DNA를 기판에 spotting하는 장치에 관하여 설명한다. 장치의 성능으로서는 microplate에 분주한 DNA sample의 일정량(PCR 산물의 경우 1~10 fmol, 또는 중량으로서 10 ng 이하)을 수십 micron에서 수백 micron의 크기로 정해진 위치에 정량적으로 spot할 수 있는 성능이 요구된다. 동시에 유전자 발현의 정량적 해석이나 1염기 변이를 해석하기 위해서는 spot size나 모양의 변이를 최소화 할 필요가 있다. 또 head의 pin 수나 spotting 속도도 다수의 replica를 제작하기 위해서는 중요하다. Spot 방식에는 pin 끝을 기계적인 접촉으로 하는 pin(또는 pen)방식, ink jet printer의 원리를 이용하는 ink jet 방식¹³⁾, 모세관에 의한 capillary 방식¹⁴⁾ 등이 알려져 있다. 각 제조 회사 별로 특성에 맞게 제작되고 있으며 spot 후에는 필요에 따라 UV조사에 의한 cross link 형성, 표면의 blocking, 세정 등의 후처리를 실시한다. 이와 같은 방법으로 제작한

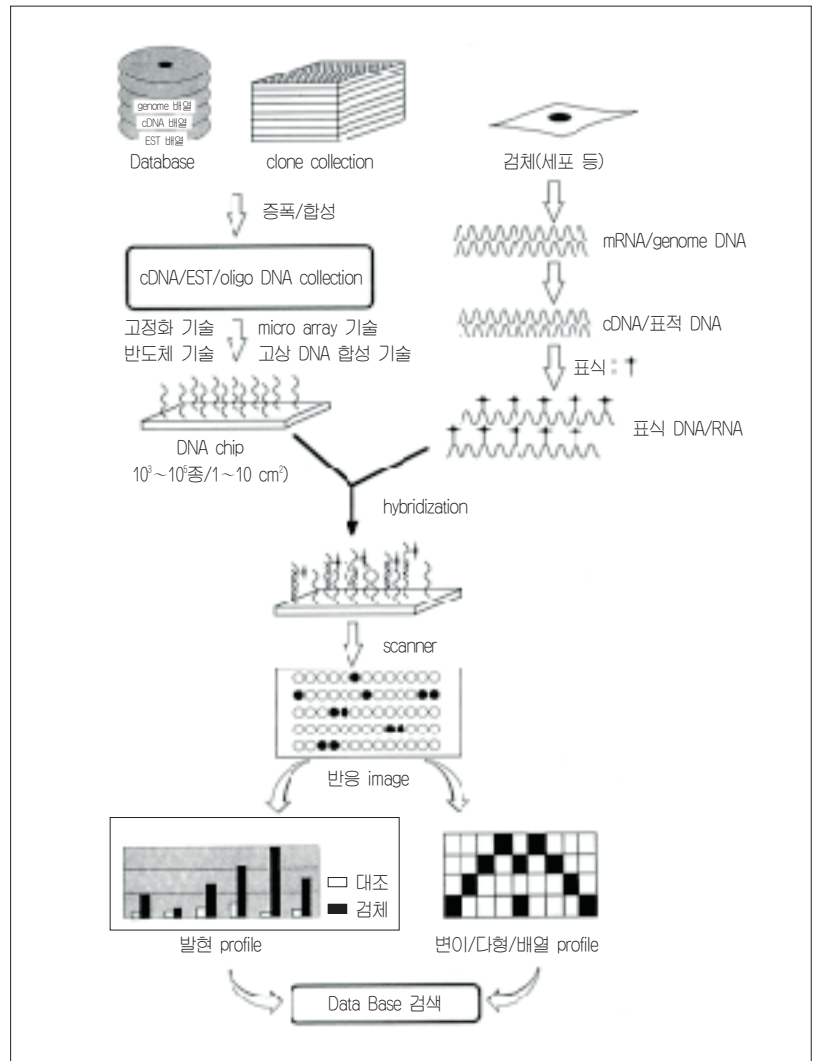


그림 4 DNA chip 기술의 전체상

DNA chip에 관계하는 기술의 전체상을 작업의 흐름에 따라서 모식적으로 표시하였다.

chip의 수명은 cDNA array는 수주간, oligonucleotide array에 서는 더욱 긴 것으로 알려져 있다.

III. DNA Chip에 의한 target의 검출

1. 시료(target)의 표식

제작한 DNA chip은 유전자 발현의 monitoring, 염기서열의 결정, 변이해석, 다형해석 등에 이용할 수 있다. 그림 4에 나타난 바와 같이 검출원리는 목적이 되는 핵산과의 hybridization이다. 목적 핵산의 표식에는 주로 RI 또는 형광을 사용하나 현재는 후자가 주류를 이루고 있다. 유전자 발현을 조사하는 경우 진핵생물에서는 세포나 조직에서 mRNA를 추출하여 역전사반응으로 표식 dNTP를 삽입하여 표식 cDNA로 사용한다³⁾. 한번의 hybridization에 사용하는 mRNA양은 액량이나 표식방법에 따라 다르나 통상 수 μg 이하이다. 한편 mRNA를 antisense로서 표식하는 방법도 있다¹⁵⁾. 단 이 방법은 antisense RNA의 증폭이 동시에 일어나므로 mRNA의 전사량을 반영한다고 단정할 수 없다. 또한 array가 oligonucleotide인 경우는 표식 핵산을 잘게 잘라 저분자화 할 필요가 있다. 세균 등의 원핵 생물에서는 mRNA를 선택적으로 추출할 수 없으므로 전 RNA를 표식하게 되나 그래도 해석이 가능한 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 한편 유전

자의 발현 해석에 있어서 mRNA의 검출감도는 세포당 수 copy 이하이며, 이는 전 mRNA중의 함량으로서 1:3~5×10⁶의 함량으로 알려져 있다^{7, 15)}. 유전자의 변이나 다형을 조사하는 경우에는 표식 primer나 표식 dNTP를 함유하는 반응계에서 target 영역을 PCR로 증폭한다. 이 외에 target 핵산을 조제한 다음 표식하는 post label법이 있으나 아직 일반적이지는 않다. target 핵산을 표식하지 않고 검출하는 방법으로는 질량분석법(MALDI-TOF MS)이 있는데¹⁷⁾ 금후의 진전이 주목된다.

2. Hybridization

Chip을 이용하는 hybridization의 특징은 막 등을 사용하는 경우에 비하여 용량이 극히 적어도 가능하다는 것이나(통상 10 μl 전후), 그에 맞는 여러가지 방법의 개발이 수반되어야 한다. 또 기관에 고정하는 DNA의 길이와 target 핵산의 종류에 따라 hybridization의 최적 조건을 설정할 필요가 있다. 예를 들면 유전자의 발현 해석에는 발현량이 적은 유전자도 충분히 검출할 수 있는 가벼운 엄밀도(stringency)의 반응조건에서 장시간(철야)의 hybridization을 실시한다. 1염기 변이의 검출에는 높은 엄밀도로 단시간의 hybridization을 실시한다. 새로운 방법으로서 Nielsen 등은 PNA(Peptide 핵산)를 개발하였다¹⁹⁾. PNA는 DNA의 phosphodiester 결합을 peptide 결합으로 변환한 인공핵산으로 합성에 무수반응이 필요없으므로 on chip 합성이 용이하고, PNA-DNA hybrid는 DNA-DNA hybrid에 비하여 특이성 및 안정성이 우수하며 hybridization에 염이 필요 없으므로 DNA 가닥의 접힘이 없는 것이 특징이다. PNA를 고정한 array와 DNA와의 hybridization이나 DNA array와 PNA probe와의 hybridization이 실제로 실시되고 있다²⁰⁾.

3. 검출

Hybridization으로 chip 위에 형성된 두가닥은 RI 또는 형광 image scanner로 해석한다. Chip 위의 형광 감도는 형광 laser 현미경과 CCD 카메라 그리고 computer를 연결한 장치로 자동적으로 측정한다. Scanner는 기본적인 성능으로서 크기가 수십 micron이고, 간격이 100 micron 정도인 spot을 정량적으로 식별할 수 있어야 한다. 보다 바람직한 것은 복수의 형광 표식에 대응할 수 있으며, 넓은 범위를 고속으로 scanning 할 수 있고, 기관의 미묘한 굴곡에도 대응할 수 있는 자동초점 기능이 있어야 한다. 데이터 해석 software는 변이나 다형의 해석과 같이 부분적으로 중복한 배열의 oligonucleotide가 다수 포함되는 복잡한 해석에도 대응할 수 있어야 한다. 또 발현 해석에는 외부 data base와의 link도 필요하다.

표 1 DNA Chip의 응용에

응용분야	실 시 예	문헌
변이해석	HIV-1 protease 유전자의 변이해석(167 검체)	21
	BRCA1의 exon 11(3.45 kb)의 변이해석(15 검체)	22
	BRCA1의 exon 11(3.45 kb)의 7염장류간에 있어서 염기서열의 비교해석	23
	CFTR(낭포성섬유증 관련 유전자)의 변이해석(10 검체)	24
	Gene targeting에 의한 효모변이주(11 주)의 제작 및 그 해석	26
	β-globin 유전자의 변이해석(β-thalassemia 환자 11 검체)	11
다형해석	Human mitochondria DNA(16.6 kb×2)의 다형해석(12 검체)	25
	2.3 Mb human genome의 SNP 해석	28
Mapping	STS marker(256종)의 array에 의한 효모 cosmid clone의 mapping	27
염기서열 해석	SBH에 의한 p53의 exon 5~8의 염기서열(12 검체)	29
	유아 뇌 cDNA library 중의 약 3만 clone의 동정	34
발현해석	냉이의 잎과 뿌리에 있어서 유전자 발현의 비교 해석	3
	류마치스 환자의 염증관련 유전자 발현과 말초혈 림파구의 유전자 발현	31
	human T cell에서의 heat shock과 phorbol ester response 유전자의 정량적 발현 해석	7
	mouse B 세포에서 cytokine 유전자의 정량적 발현 해석	15
	효모의 알콜 발효에 있어서 전 유전자의 경시적 변화	32
	생육조건에 차이(영양배지와 최소배지)에 따른 효모의 전유전자 발현의 정량적 비교	33
Immunoassay	IgG 고정화 gel chip에 의한 모델 실험	30

IV DNA Chip의 응용례

DNA chip에 의한 검출법에 대해서는 지금까지 개략을 설명하였으므로 여기서는 구체적인 실시례를 소개한다(표 1).

1. 변이나 다형 그리고 염기서열의 해석례

Kozal 등은 oligonucleotide array를 이용하여 HIV-1의 protease 유전자의 변이를 167 검체에 대하여 조사한 결과 47.5%의 아미노산 위치에 다형(변이)이 존재함을 증명하였다²¹⁾. Hacia 등은 유방암 유전자(BRCA1)의 exon 11에 있어서 다수의 변이를 검출하고 또한 염장류간의 염기서열을 비교하고 있다^{22, 23)}. 또 Cronin 등은 낭포성섬유증 관련 유전자(CFTR)의 exon 11에 있어서 다수의 변이를 검출하고 있다²⁴⁾.

Chee 등은 33 kb의 human mitochondria DNA의 다형을 조사하여 180종의 기지의 다형중에 179종의 다형을 검출하였다²⁵⁾. Shoemaker 등은 PCR에 의해 제작한 다수의 효모유전자의 결손주 표현형을 동시에 해석하는 방법을 개발하였다²⁶⁾.

이외에 Sapolsky 등은 STS(sequence-tagged site) marker의 chip으로 cosmid clone의 mapping을 실시하였다²⁷⁾. 또 최근 Wang 등은 2.3 Mb에 이르는 human genome DNA의 SNP(single nucleotide polymorphism; 1염기 다형)를 조사하여, 3,241의 SNP의 후보를 동정하고 그 중 2,227의 SNP의 유전자 지도를 작성하였다²⁸⁾.

Drmanac 등은 SBH에 의해 p53의 exon 5~8(약1 kb)의 염기서열을 12 검체에 대하여 정확하게 결정하여 진단에의 이용이 가능함을 증명하였다. 같은 방법으로 Argonne 국립연구소와 러시아 국립아카데미의 그룹은 slide glass상에 정렬화한 polyacrylamide gel의 미소단편에 DNA나 항체를 고정한 array를 사용한 모델 실험을 실시하여 그 유용성을 확인하였다.

표 2 주요 DNA chip 개발 기관의 동향

기관명	기술의 특징	개발상황
Affymetrix사	on chip DNA 합성기술 변이 다형 발현해석 기술	human 50,000 유전자 해석용 chip 개발중 “Easy Access” 프로그램과 각종 gene chip 판매중
Argonne Nat'l Lab	gel chip(MAGIChip) 개량형 SBH 기술	미국 에너지성, Motorola사, Packard사 공동으로 gel chip의 실용화 연구 개시
Genetic MicroSystems사	arrayer, scanner 기술	금년 10월 부터 arrayer, scanner 보한바이오메 디칼(주)에서 공급중
Genometrix사	CCD에의 DNA의 고정화 기술	micro array 관련 제품의 공급
Hitachi Software Engineering(주)	arrayer, scanner 기술	arrayer 수주개시
H. Packard사	arrayer, scanner 기술	Affymetrix사용 scanner의 공급 ink jet arrayer 개발중
Hyseq사	SBH의 기본기술	3 format의 “Access Program” 수주중
Incyte사	각종 genome data base 축적 array 기술	Synteni사를 매수, ink jet arrayer 개발중
Lynx Therapeutics사	MPSS(massively parallel signature sequencing) 기술	특허출원 공개중(WO 97/13877)
Molecular Dynamics사	arrayer, scanner 기술	scanner와 arrayer를 순차적으로 발매예정 “Access Program” 수주중
Nanogen사	전극 array 기술 APEX에 의한 해석기술	전극 side의 고밀도화 달성
Research Genetics사	filter array 기술, DNA 합성기술	I.M.A.G.E. clone 판매중 filter array, primer set 판매중
Sequenom사	고상 sequence 기술 MALDI-TOF MS 기술	PROBE 법을 근간으로 하는 Spectrochip을 상품화
Synteni/Incyte사	고밀도 array 기술(UniGem)	human cDNA array(40,000 유전자) 개발중 scanner 발매예정

2. 유전자 발현의 해석례

Schena 등은 냉이의 cDNA chip을 제작하여 2형광 표식법으로 잎과 뿌리에 있어서의 유전자 발현의 차이를 조사하여 그 유용성을 확인하였다³¹⁾. Heller 등은 염색관련 유전자와 말초혈 림파구의 유전자 chip을 이용하여 환자조직과 cell line화 세포에서의 유전자 발현을 조사하여 그 유용성을 확인 하였다³¹⁾. 이와 유사한 연구로서 Lockhart 등은 oligonucleotide chip을 이용하여 mouse B세포에서의 이미 보고된 cytokine 유전자의 발현을 정량적으로 해석하고 있다¹⁵⁾. DeRisi 등은 효모의 전 유전자를 함유하는 chip를 다수 제작하여 알콜발효 전후의 전유전자의 발현 변화를 경시적으로 측정하였다³²⁾. 비슷한 연구가 oligonucleotide chip을 사용하여 실시되었다³³⁾.

Nanogen사의 그룹은 silicon 기판위에 정렬화한 미소전극에 oligonucleotide를 고정한 chip을 이용한 모델 실험을 실시하여 hybridization에 대한 전기화학적 제어(APEX법)의 유용성을 나타내었다¹²⁾.

Argonne 국립연구소의 그룹은 유아의 brain cDNA library로부터 약 73,000의 cDNA filter array를 제작하여 200-320종의 ³²P 표식 oligonucleotide probe를 이용하여 약 20,000의 유전자를 동정하고 그 발현 수준을 그룹으로 구분하였다³⁴⁾.

V. 주요 DNA chip 개발 기관의 동향

DNA chip 기술의 기업화는 미국을 중심으로 급속히 전개되고 있으나, 그 중에서도 앞서가고 있는 것은 Affymetrix사이다. 동사는 Fodor 등이 개발한 고밀도 array 제작기술을 근간으로 chip(GeneChip)에 의한 해석 시스템(“Easy Access” program)을 상품화하려 하고 있다. Chip의 제작 장치는 판매하지 않으므로 이용자는 동사에 chip 제작을 위탁하거나 기존의 판매하고 있는 chip을 구입하여, GeneChip 전용의 해석 시스템을 구입하여 해석 하거나 또는 해석을 위탁하여야 한다. 이 같은 상업화의 전략은 일반연구자의 자유도를 억제하는 결과를 초래한다. 현재 human의 5만종의 유전자를 해석하는 chip을 개발중이라고 한다³⁵⁾. 최근 Incyte사에 흡수된 Synteni사는 Brown 등이 개발한 cDNA array 기술을 상업화하고 있다. 이 기술을 이용하기 위해서는 “Technology Access Program” 계약이 필요하다. 현재 scanner 와 chip당 1만개의 human 유전자를 갖는 4종의 chip(UniGem ver. 1.0-4.0)을 개발하고 있다³⁵⁾. Hyseq사는 SBH의 기본특허를 갖고 있으며 이 기술을 이용하기 위한 “Access Program”으로서 3종의 format(Hygnostics 「진단」, Gene Discovery 「유전자의 발견」, HyChip 「염기서열분석」)을 준비하고 있다³⁶⁾. 동사는 다수의 유전자의 염기서열 data를 축적하고 있다. Molecular Dynamics사는 pen방식으로 cDNA chip을 제작하는 기술을 갖고 있으며 Synteni사와 같이 “Access Program”을

보유하고 있다. 근일 내에 scanner를, 계속해서 arrayer를 발매한다고 한다^{35, 36}. Nanogen사는 금년중에 전극부위가 1,000 개인 silicon chip을 개발하고 1999년에는 1만으로 한다는 계획이다³⁷. Sequenom사는 고상 위에서 다수의 DNA template를 trap(SpectroChip)하여 sequencing 반응을 실시하고 그 data를 MALDI-TOF MS에 연결하르로서 다수시료의 염기배열을 단시간에 결정하는 방법(PROBE법)을 상품화할 예정이다. 지금까지 설명한 회사 이외의 동향에 대해서는 표 2에 정리하였다. 이외에 각종의 목적에 따라 대응할 수 있는 소위 DIY 형의 chip 제작장치나 scanner의 개발도 활발히 진행중이다³⁵. 예를 들면 최근 General Scanning사에서는 각종의 chip에 대응할 수 있는 scanner(ScanArray 3000)을 발매하였다. Genetic MicroSystem사에서는 고성능의 arrayer와 scanner를 지난 10월부터 발매하였다. 일본에서는 일본 laser 전자(주)가 arrayer와 scanner를 개발중이며 시스템으로서 주문생산을 개시하였다. Hitachi Software Engineering(주)도 arrayer의 주문생산을 개시하였다. 이들 chip 기술의 이용은 지금까지 일부의 대형 제약회사나 연구기관에 한정되어 있었으나 앞으로는 일반연구자도 사용할 수 있는 장치나 시스템의 개발이 강화되어 이용범위도 확대될 것으로 예상된다.

▶ 맺음말

금년 1월 클린턴 대통령이 일반교서 연설에서도 언급한 바와 같이 DNA chip 기술은 genome의 기능해석을 비약적으로 발전시키기 위한 불가결한 것이며 국가적인 전략 기술이기도 하다. 또 이 기술은 방대한 계층정보를 한장의 chip에 담은 반도체 칩의 DNA version으로 그 data의 해석을 위해서는 genome project의 성과를 담은 각종 data base와 연결해야만 한다. Internet의 발달로 이들 data base와의 연결이 용이하게 되었으나 정리나 통합의 면에서 보면 반드시 사용자에게 편리하다고는 할 수 없다. Incyte사 등에서는 독자의 database나 access를 위하여 flatform을 구축하여 이를 사업으로서 전개하고 있다. 이런 의미에서 chip의 기술과 informatics 기술은 자동차의 두 바퀴와 같다. 이상에서 설명한 chip 기술은 DNA 뿐만 아니라 단백질이나 peptide, 당쇄 등의 다른 생체 분자에도 적용할 수 있는 것으로서 HTS의 수단으로서 금후 폭넓게 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

▶ 참고문헌

- 1) Irie 등: 핵산 단백질 효소, **42**, 3087-3089 (1997)
- 2) Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., Crkvenjakov, R. : *Genomics*, **4**, 114-128 (1989)
- 3) Schena, M., Shalon, D., Davis, R. D., Brown, P. O. : *Science*, **270**, 467-470 (1995)
- 4) Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas, D. : *Science*, **251**, 767-773 (1991)
- 5) Lamture, J. B. et al. : *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2121-2125 (1994)
- 6) Maskos, U., Southern, E. M. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1679-1684 (1992)
- 7) Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O., Davis, R. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10614-10619 (1996)
- 8) McGall, G., Labadie, J., Brock, P., Wallraff, G., Nguyen, T., Hinsberg, W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13555-13560 (1996)
- 9) Blanchard, A. P., Kaiser, R. J., Hood, L. E. : *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 687-690 (1996)
- 10) Guo, Z., Guilfoyle, R. A., Thiel, A. D., Wang, R., Smith, L. M. : *Nucl. Acids Res.*, **22**, 5456-5465 (1994)
- 11) Yershov, G. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4913-4918 (1996)
- 12) Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., Heller, M. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1119-1123 (1997)
- 13) Lemmo, A. V., Fisher, J. T., Geysen, J. M., Rose, D. J. : *Anal. Chem.*, **69**, 543-551 (1997)
- 14) Shalon, D., Smith, S. J., Brown, P. O. : *Genome Res.*, **6**, 639-645 (1996)
- 15) Lockhart, D. J. et al. : *Nature Biotechnol.*, **14**, 1675-1680 (1996)
- 16) Saizieu, A., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W., Mous, J. : *Nature Biotechnol.*, **16**, 45-48 (1998)
- 17) Koster, H., Tang, K., Fu, D., Braun, A., Boom, D., Smith, C. L., Cotter, R. J., Cantor, C. R. : *Nature Biotechnol.*, **14**, 1123-1128 (1996)
- 18) Griffin, T. J., Tang, W., Smith, L. M. : *Nature Biotechnol.*, **15**, 1368-1372 (1997)
- 19) Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. : *Science*, **254**, 1497-1500 (1991)
- 20) Weiler, J., Gausepohl, H., Hauser, N., Jensen, O. N., Hoseisel, J. D. : *Nucl. Acids Res.*, **25**, 2792-2799 (1997)
- 21) Kozal, M. J. et al. : *Nature Med.*, **2**, 753-759 (1996)
- 22) Hacia, J. G., Brody, L. C., Chee, M. S., Fodor, S. P. A., Brody, L. C., Collins, F. S. : *Nature Genet.*, **14**, 441-447 (1996)
- 23) Hacia, J. G., Makalowski, W., Edgemon, K., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Fodor, S. P. A., Brody, L. C., Collins, F. S. : *Nature Genet.*, **18**, 155-158 (1998)
- 24) Cronin, M. T., Fucini, R. V., Kim, S. M., Masino, R. S., Wespi, R. M., Miyada, C. G. : *Hum. Mut.*, **7**, 244-255 (1996)
- 25) Chee, M. et al. : *Science*, **274**, 610-614 (1996)
- 26) Shoemaker, D. D., Lashkari, D. A., Morris, D., Mittmann, M., Davis, R. W. : *Nature Genet.*, **14**, 450-456 (1996)
- 27) Sapolsky, R. J., Lipshuts, R. J. : *Genomics*, **33**, 445-456 (1996)
- 28) Wang, D. G. et al. : *Science*, **280**, 1077-1082 (1998)
- 29) Drmanac, S., Kita, D., Labat, I., Hauser, B., Schmidt, C., Burczak, J. D., Drmanac, R. : *Nature Biotechnol.*, **16**, 54-58 (1997)
- 30) Guschin, D., Yershov, G., Zaslavsky, A., Gemell, A., Shick, V., Proudnikov, D., Arenkov, P., Mirzabekov, A. : *Anal. Biochem.*, **250**, 203-211 (1997)
- 31) Heller, R. A., Schena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gelmore, J., Woolley, D. E., Davis, R. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2150-2155 (1997)
- 32) DeRisi, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O. : *Science*, **278**, 680-686 (1997)
- 33) Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M., Lockhart, D. : *Nature Biotechnol.*, **15**, 1359-1367 (1997)
- 34) Milosavljevic, A. et al. : *Genome Res.*, **6**, 132-141 (1996)
- 35) Editorial : *Nature Genet.*, **18**, 195-197 (1998)
- 36) Marshall, A., Hodgson, J. : *Nature Biotechnol.*, **16**, 27-31 (1998)
- 37) Heller, M. J. : in The First International Workshop on Advanced Genomics(Abstracts), pp. 28, Tokyo (1998)

초고속 PCR을 실현한 TaKaRa Z-Taq™ 신 등장!!

TaKaRa Code R006A 200 U
R006B(AX4) 800 U

20분 이내에 1 kbp의 증폭이 가능!!

TaKaRa Z-Taq™은 고속 PCR용으로 새롭게 개발한 DNA polymerase로서, 반응속도가 Taq DNA polymerase의 약 5배로 아주 빠르므로 20분 이내에 1 kbp의 DNA 단편을 증폭할 수 있다. 또한 반응성도 매우 우수하여 human genome DNA를 주형으로 적어도 17.5 kbp 이상을 증폭할 수 있으며 반응시간을 단축할 수 있으므로 다수의 시료를 처리하는데 유용하다. 그리고 cycle수 (~50 cycles)를 늘릴 수 있어 감도의 향상도 기대할 수 있다. TaKaRa Z-Taq™은 신속성, 반응성, 고감도의 삼박자를 갖춘 PCR용 효소이다.

▶ 특징

- 반응속도 : Taq DNA polymerase의 약 5배 (PCR조건에서)
- 반응최적온도(기질활용활성) : 70°C 근방
- 내열성 : 92.5°C에서의 반감기 > 130 min
- 증폭크기 : Human genome DNA 적어도 17.5 kbp 이상 증폭가능
대장균 genome DNA 적어도 20 kbp 이상 증폭가능
λ DNA 적어도 20 kbp 이상 증폭가능
- 정확성(fidelity) : Taq DNA polymerase보다 약 3배 정확한 증폭
- 증폭단편말단 : 대부분의 단편의 3' 말단에 dA가 overhang되므로 T-vector cloning이 가능하다.
- exonuclease 활성 : 3' → 5' 활성 +
5' → 3' 활성 ±
- 역전사효소 활성 : Taq DNA polymerase와 동등

▶ 반응례

(1) 신속성

주형 DNA : 대장균 genome DNA (100 ng/50 μl PCR)

증폭크기 : 1 kbp, 10 kbp, 20 kbp

반응조건 :

[1 kbp 증폭]

98°C 5초 }
66°C 2초 } 30 cycles(전체 반응시간 약 20분)

[10 kbp 증폭]

98°C 5초 }
68°C 70초 } 30 cycles(전체 반응시간 약 53분)

[20 kbp 증폭]

98°C 5초 }
68°C 150초 } 30 cycles(전체 반응시간 약 93분)

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL 사용
(TaKaRa Code TP240)(FAST mode)

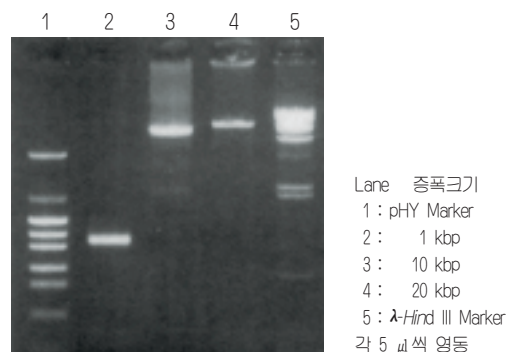


그림 1 대장균 genome DNA를 주형으로 한 고속 PCR

(2) 반응성

주형 DNA : 대장균 genome DNA

(1~10 kbp 증폭의 경우: 1 ng/50 μl PCR)

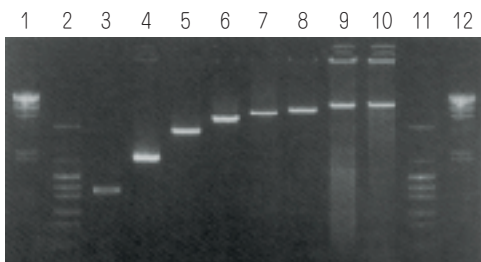
(18, 20 kbp 증폭의 경우: 10 ng/50 μl PCR)

증폭크기 : 1 kbp, 2 kbp, 4 kbp, 6 kbp, 8 kbp, 10 kbp,
18 kbp, 20 kbp

반응조건 :

[1 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	66°C 10초	
[2 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	68°C 20초	
[4 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	68°C 30초	
[6 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	68°C 50초	
[8 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	68°C 75초	
[10 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	68°C 90초	
[18 kbp, 20 kbp]	98°C 5초	} 30 cycles
	68°C 180초	

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL 사용
(FAST mode)



Lane 증폭크기
 1 : λ-Hind III 7 : 8 kbp
 2 : pHY Marker 8 : 10 kbp
 3 : 1 kbp 9 : 18 kbp
 4 : 2 kbp 10 : 20 kbp
 5 : 4 kbp 11 : pHY Marker
 6 : 6 kbp 12 : λ-Hind III
 각 5 μl씩 영동

그림 2 다양한 길이의 고속 PCR

(3) 감도

주형 DNA : human genome DNA
 증폭크기 : 1 kbp (G3PDH 영역)
 주형량 : human placenta DNA
 (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng/50 μl PCR)
 반응조건 : 98°C 5초 } 30 cycles
 68°C 20초 }

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL 사용
(FAST mode)

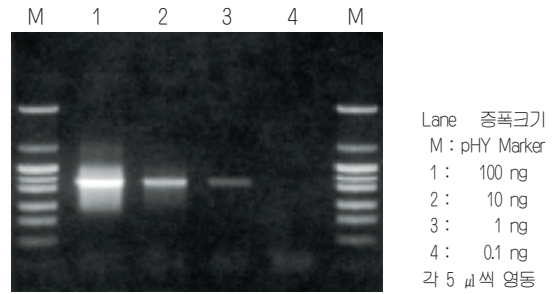


그림 3 human genome DNA를 주형으로 한 고속 PCR의 감도

(4) 긴 단편 증폭

주형 DNA 및 증폭크기 :
 human genome DNA 7.5 kbp, 17.5 kbp
 대장균 genome DNA 18 kbp, 20 kbp
 주형량 : human genome DNA 500 ng/50 μl PCR
 대장균 genome DNA 100 ng/50 μl PCR

반응조건 :
 [human 7.5 kbp]
 98°C 5초 } 30 cycles
 68°C 80초 }
 [E. coli 18 kbp, 20 kbp, human 17.5 kbp]
 98°C 5초 } 35 cycles
 68°C 180초 }

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL 사용
(FAST mode)

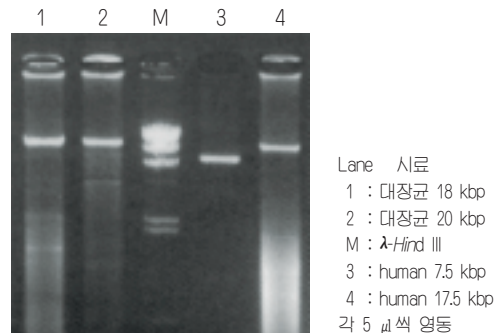


그림 4 고속 PCR에 의한 긴 단편의 증폭

TaKaRa PCR Related products are sold under licensing arrangements with Roche Molecular Systems and F. Hoffmann-La Roche Ltd. and The Perkin-Elmer Corporation. Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction(PCR) process for research use in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchased, I.E., an authorized thermal cycler.

초고속 PCR용 효소

Z-Taq 샘플 무상 제공중

일반효소보다 5배 이상 빠른 Z-Taq을 사용해 보고자 하는 연구자를 위하여 50 U의 테스트용 제품을 무상으로 제공하고 있습니다. 관심있으신 분은 당사나 전문대리점으로 연락 주시기 바랍니다. 수량이 한정되어 있으므로 서두르시기 바랍니다. 이 행사는 준비된 제품이 품절되는대로 종료합니다.

전문대리점

(주)녹십자양행 LS사업팀

Tel. 02-3471-7437 Fax. 02-581-0136/7

(주)코아바이오시스템

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

환경 호르몬의 *in vitro* assay법 (FP binding assay법)

최근 환경호르몬 즉 내분비 교란물질(Endocrine Disrupting Chemicals; EDC)의 야생생물 및 사람에 대한 영향에 관한 관심이 고조되고 있다. 따라서 다양한 환경화학물질 및 공업용 화학물질의 내분비 활성을 추정하는 실질적인 screening법이 개발되어 왔다. 어떤 화학물질을 호르몬 작용을 교란하는 물질 즉 EDC로 규정하기 위해서는 *in vivo* assay법이 필요한 것은 물론이지만, 천연화학물질이나 인공화학물질의 EDC 활성의 screening을 직접 *in vivo*로 실시하는 데 수반하는 막대한 작업량을 고려한다면 EDC 활성을 가질 가능성이 있는 화학물질을 신속하게 동정할 수 있는 실질적인 방법은 *in vitro* assay라고 생각한다. BEACON®을 이용한 FP(Fluorescence polarization) binding assay법의 유용성에 대해서는 지난 7호의 20~21페이지를 통해 소개하였지만, 본 고에서는 BEACON®의 개발 및 제조원인 PanVera사의 member가 발표한 논문(Bolger, R. *et al.* Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity (1998) *Environ. Health Perspect.* 106 : in press)을 정리하여 소개한다.

과거 20여년 동안 꾸준히 동정되었던 EDC의 유해작용의 대부분은 환경 estrogen에 의한 것이었다. 이러한 물질은 estrogen receptor(ER)에 특이적으로 결합하는 천연의 estrogen과 동일한 작용을 나타내거나 또는 그 작용을 저해하여 표적세포의 다양한 유전자의 전사를 제어한다. ER은 조직의 증식이나 분화에 관여하는 유전자의 발현을 제어하는 전사인자로, 생식기, 골격, 심혈관 계통 및 유방암 등 다양한 표적조직에서 그 기능을 발휘한다. 따라서 ER과의 결합성을 조사하는 *in vitro* screening은 EDC의 동정에 유용하다. 종래에는 ligand-ER간의 결합 상호작용을 조사하기 위한 몇 가지의 방법을 이용하여 왔다. 이들은 모두 시험 화학물질이 수용체에 결합한 방사성 표식 17β-estradiol과 치환할 수 있는지를 조사하는 competitive assay법이다. 이 방법은 방사성동위원체를 사용해야 하며, 생리온도 이하의 저온(4°C)에서 실시해야 하는 단점을 가진다. 또 ER과의 친화성이 비교적 높은 수용성의 estrogen과 같은 화학물질의 특성을 규명하는 데는 유용하지만 ER과의 친화성이나 수용성이 낮은 화학물질(EDC 또는 EDC로 추정되는 물질들의 대부분이 이에 해당)을 screening하기에는 적절하지 않다. 이 문제에 대한 하나의 해결법으로서 scintillation proximity법이 고안되었으나 방사성동위원체를 사용해야 하거나 고정화에 의해 수용체의 입체구조가 변할 가능성이 높다는 점 등의 몇 가지 단점이 있다. 본 고에서는 새로운 estrogen/ER competitive binding assay법 및 이 방법에 의해 각종 화학물질의 ER에의 결합성을 조사한 결과에 대해 서술한다. 본 법에서는 정제된 recombinant human ER에 결합한 고친화성 형광 ligand가 시험화학물질에 의해 치환되는 것을 형광편광(FP)을 이용하여 monitoring한다¹⁾.

이 방법은 생리적 온도범위에서 assay할 수 있고, 반나절 이내에 충분히 완료할 수 있으며 또 RI를 사용하지 않는 등 종래 방법의 단점을 극복할 수 있다.

▶ 재료 및 방법

이 방법에 사용하는 주요물질은 estrogen receptor(ER)과 ER과 높은 친화성으로 결합하는 형광성의 nonsteroid estrogen (FES1)이다²⁾. FES1은 ER에 대해 친화성이 높고, 다양한 용매에서도 안정하게 광양자 수율을 얻을 수 있으며, 비특이적인 결합이 상당히 낮은 것이다. 이 방법에 사용하는 ER은 recombinant baculovirus에서 제작한 full-length의 human recombinant ER³⁾이며 크기, 면역원성, 호르몬 결합특성, 인산화의 상태, DNA와의 상호작용 등이 천연의 것과 거의 동일한 것으로 확인되었다⁴⁻⁶⁾. human recombinant ER-α 및 ER-β 그리고 FES1은 PanVera사로부터 입수하였다. 결합실험에 이용한 15종의 화학물질(그림 1)은 ethanol 속에서 10 mM의 표준농도로 조제하였다.

▶ Competitive binding assay

15종의 화학물질(그림 1)에 대하여 ES1-ER복합체로부터 형광 ligand FES1을 치환할 수 있는 능력을 조사하였다. 본래의 각 시험화학물질의 10 mM stock solution으로 200 μM의 working stock solution을 조제한 뒤 screening용 완충액으로 단계 희석계열을 각각 세 번 연속(triplicate)하여 만들었다. 이러한 각종 화학물질의 단계희석액에 ER-α와 FES1을 각각 최종농도가 2 nM, 3 nM이 되도록 첨가하였다. 또 시험화학물질을 함유하지 않는 negative control(ER+FES1; 0% 저해에 상당)과 positive control(FES1만; 100% 저해에 상당) 시료를 각각 3번으로 단계희석하여 준비하였다. 각 시료를 실온에 60분간 방치한 후 BEACON®을 이용하여 형광편광도를 측정하였다. 아래의 식으로 이방성값(A)을 저해율(I)로 환산하였다.

$$I (\%) = (A_0 - A) / (A_0 - A_{100}) \times 100$$

[I(%): 저해율; A: 이방성값; A₀: 0% 저해(negative control)에 있어서 이방성값; A₁₀₀: 100% 저해(positive control)에 있어서 이방성값]

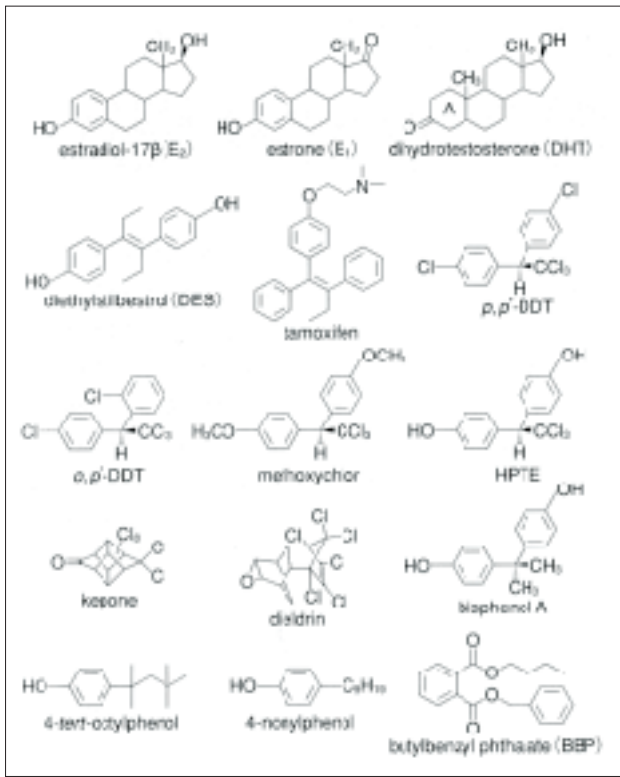


그림 1 ER 결합실험에 사용한 모든 화합물의 구조식

▶ 결과 및 고찰

FES1의 ER- α 와의 결합에 대하여 경합하는 15종의 화합물에서 얻은 경합결합곡선을 그림 2에 나타내었다. 또 각 화합물의 IC₅₀값 및 천연 ligand인 estradiol 17 β (E2)의 ER- α 에 대한 경합친화성을 100으로 한 경우의 각 화합물의 상대 결합친화성(RBA)을 표 1에 나타내었다.

표 1 시험화합물의 상대 결합친화성(RBA)

	IC ₅₀	RBA
Estradiol	13 nM	100
Estrone	626 nM	2.1
DHT	126-146 μ M*	0.01-0.009
DES	11 nM	118
Tamoxifen	423 nM	3.1
p,p'-DDT	14-50 μ M*	0.09-0.03
o,p'-DDT	2.7 μ M	0.4
Methoxychlor	81-193 μ M*	0.02-0.007
HPTE	750 nM	1.7
Kepone	5.7 μ M	0.2
Dieldrin	470-4500 μ M*	0.003-0.0003
Bisphenol A	32 μ M	0.04
4-Octylphenol	7.5 μ M	0.2
4-Nonylphenol	3.9 μ M	0.3
BBP	73-120 μ M*	0.02-0.01

각각의 화합물의 IC₅₀값을 estradiol의 IC₅₀값과 비교하였다.

*을 표기한 값은 95% 신뢰한계범위를 나타낸다. 이 경우에는 통상 용해성의 한계에 의해 IC₅₀값을 구하기가 곤란하였다.

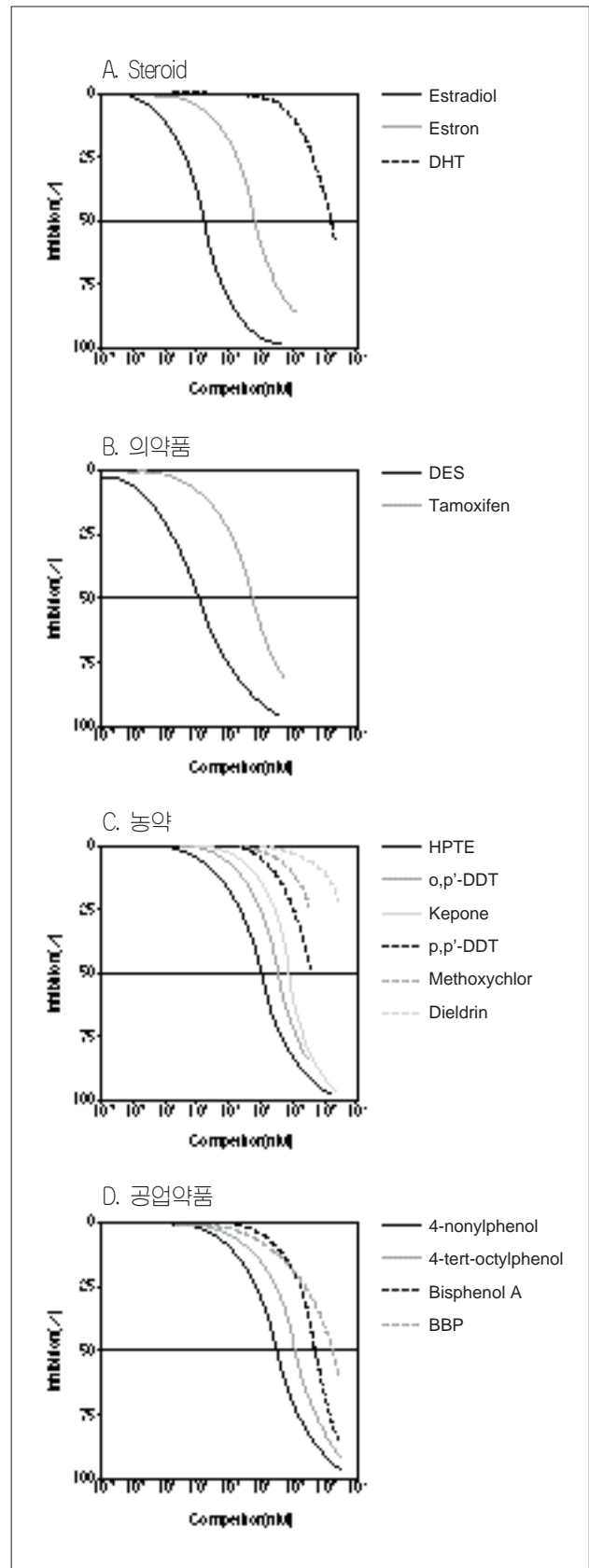


그림 2 형광 ligand/human recombinant ER- α 복합체(FES1-ER- α)에 대한 각종 화합물의 경합결합 곡선

각 화합물의 단계희석액을 ER- α 및 FES1과 함께 실온(22°C)에서 60분간 incubate한 후 BEACON[®]을 이용하여 형광편광도를 측정하였다. 편광 data를 저해율로 변환하여 경합물질의 농도에 대해 plot 하였다. Data의 점은 저해율의 평균치(n=3)를 의미한다.

각종 화합물의 내분비작용을 완전히 평가하기 위해서는 양쪽의 ER subtype(α 와 β)를 이용한 screening이 필요하다. 따라서 FP binding assay법을 ER- α 뿐만 아니라 ER- β 를 이용한 시스템에도 응용하였다. FES1-ER- β 결합에 대한 estradiol의 결합결합곡선을 그림 3에 나타내었다. 그림 3에 나타낸 것처럼 FP receptor binding assay법은 ER- β 와의 결합성에 대해서도 분석이 가능한 것으로 판명되었다. 또 동일한 방법으로 androgen receptor, glucocorticoid receptor 또는 thyroid hormone receptor 등의 다른 steroid hormone receptor를 이용한 assay법도 구축할 수 있을 것이다. FP receptor binding assay법은 다른 방법에 비해 다음과 같은 잇점을 가진다.

- (1) FP법에서는 방사성물질을 사용하지 않는다.
- (2) FP의 측정은 용액속에서 이루어지므로 현실적인 온도 범위에서 실제의 평형상태로 분자간의 상호작용을 조사할 수 있다. ER과의 결합성이 비교적 약한 것으로 생각되는 환경오염물질 등을 screening하는 경우 실제의 환경 온도에서 그러한 결합성을 조사할 수 있다는 것은 매우 유용한 것이다.
- (3) FP법에서는 receptor에 결합한 tracer와 유리 tracer를 분리할 필요가 없으며 다른 assay법에서 이용하고 있는 여과, 침전, 원심분리 등의 분리조작이 필요 없으므로 이같은 조작과정에서 signal이 소실되어 버리는 일은 일어나지 않는다.
- (4) 반응과 FP 측정을 동일한 튜브내에서 실시하므로 그 반응을 수 회 측정함으로써(예를 들면 6초마다) 반응분자가 평형에 도달하는 과정을 monitoring할 수 있어 결합 반응의 평형정수를 직접 구할 수 있다.
- (5) FP법은 시료나 receptor에 손상을 주지 않는다. 따라서 시료를 반복해서 분석할 수 있다. 다른 방법에서는 계면활성제나 과잉량의 비표식 ligand를 첨가하거나 온도를 shift하여야 하므로 반복적으로 분석할 수 없다. 또 FP법에서는 estrogen과 같은 화합물의 혼합물도 단계적으로 또는 동력학적으로 손쉽게 분석할 수 있다.
- (6) FP법은 측정조작이 아주 단순하므로 microplate 등의 사용에 의해 다수의 검체를 분석할 수 있다.

결론적으로 본 고에서 소개한 FP법은 의약품, 환경물질 및 공업용 화합물의 ER에의 결합성을 대규모로 screening할 수 있는 실용적인 assay법이다. 또 매우 균일한 receptor를 이용하고 있어 그 방법 자체가 간편하므로 이를 연구실(검사기관)간에 표준화할 수 있다. 또 다수의 내분비 활성 assay법의 하나로서 본 고에 나타낸 FP binding assay법을 이용함으로써 EDC의 작용양식 및 EDC에 의한 위해성의 유무를 알아보기 위한 사전 정보를 얻을 수 있다. 나아가 정량적인 구조-활성 모델의 구축에도 이용할 수 있다.

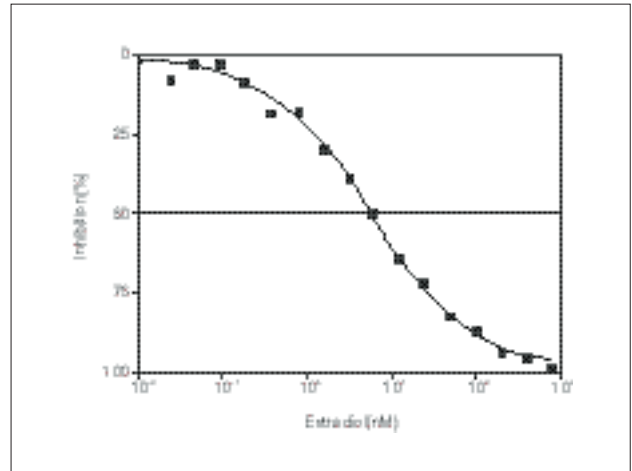


그림 3 FES1-estrogen receptor β (ER- β) 복합체에 대한 estradiol의 결합결합곡선

비표식 estradiol의 단계희석액을 FES1(최종농도 250 pM) 및 ER- β (최종농도 1 nM)와 함께 22°C에서 overnight incubation 후 형광편광도를 측정하였다. 평균 data를 저해율로 변환시켜 estradiol의 농도에 대해 plot하였다. 비선형 최소이승법을 이용한 계산에서 IC₅₀값은 5.5 nM로 결정되었다. Data의 점은 저해율의 평균값(n=3)을 의미한다.

▶ 참고문헌

- 1) Checovich W. J. *et al.* (1995) *Nature* **375**, 254-6.
- 2) Hwang K. J. *et al.* (1992) *Biochemistry* **31**, 11536-45.
- 3) Brown M. *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11238-43.
- 4) Obourn J. D. *et al.* (1993) *Biochemistry* **32**, 6229-36.
- 5) Cheskis B. J. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11384-11391.
- 6) Ozers M. S. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30405-30411.

▶ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
Full-Range BEACON® 2000	VP2370	1 대
FP Screen-for-Competitors Kit, ER- α , high sensitivity	VP2577	1 Kit

보한바이오메디칼(주)의
홈페이지에는
유익한 정보가
가득합니다.
행운도
같이 잡으세요!



www.biochem.or.kr/bohanbio.htm

12월 30일까지 한정

TaKaRa PCR

22% 할인 판매

Thermal Cycler MP

Thermal Cycler PERSONAL



- 경량, 소형 Personal Type PCR Machine
- Oil Free PCR
- 0.2 ml Tube × 24개용
- Thermal Cycler MP와 같은 간편한 program 입력 및 조작
- 정확한 온도제어, 높은 재현성

- LA PCR 등에 최적의 PCR
- 정확한 온도제어에 의한 높은 재현성
- Oil free PCR
- File의 연결기능이 충실하여 사용하기 편리한 Program
- 5종류의 Sample Block으로 다양한 시료량 및 연구목적에 대응



Code No. TP3000

Code No. TP240

1,600만원 → 1,250만원

700만원 → 550만원

구입 문의

 **주식회사 녹십자양행**

LS사업팀 Tel. 02-3471-7437(직) 581-0131(대)
Fax. 581-0136/7

대전 Tel. 042-823-6957 Fax. 832-0821
광주 Tel. 062-525-1155 Fax. 527-0821

 **(주)코아바이오시스템**

Tel. 02-841-7530
Fax. 02-841-7531
수원 0331-284-8592
대전 042-622-2726

PCR에 의한 특정 영역의 변이 검출 (1)

1. SSCP법

- 1염기치환의 간편한 검출법 -

Takeo Sekiya

Genome 염기서열에서의 1염기치환은 서열의 다형으로서 개인의 차를 식별할 수 있으며, 이 다형이 세포의 기능에 영향을 주는 경우에는 각종 유전병이나 가족성암의 원인이 된다. 그리고 체세포에서의 돌연변이는 세포의 암화의 원인이 된다. SSCP법은 double strand DNA 단편을 single strand DNA로 해리하여 그 염기서열에 의존하는 독자의 고차구조를 polyacrylamide gel로 전기영동함으로써 1염기치환을 전기이동도의 차로 검출하는 원리를 이용한 것이다. PCR 산물의 해석은 극히 간편한 검출기술로 수많은 유전병의 원인 유전자 및 암관련 유전자를 동정할 수 있게 해 주었다.

▶ 서론

생식세포에 발생한 게놈상의 염기서열의 변화는 발생, 분화, 세포의 증식 등에 영향을 주지 않는 경우에는 자손에게 전달되며, 이는 각 염색체 독자의 다형서열로써 개인의 식별이 가능하다. 세포의 기능에 영향을 미치는 경우에는 각종 유전병이나 가족성암으로 연결된다. 체세포에서의 DNA 염기서열의 변화는 그 세포의 암화의 원인이 된다.

Human DNA에서 일어나는 변화에는 유전자의 증폭, 재편성, 결실 등의 큰 변화와 염기치환이나 짧은 염기배열의 삽입, 결손 등의 작은 변화가 있다. DNA의 변화가 큰 경우에는 Southern blot법 등으로 검출할 수 있으나 점돌연변이를 비롯하여 DNA상의 작은 변화의 검출에는 몇가지 특별한 방법을 사용할 필요가 있다. 이 경우에는 짧은 DNA 단편을 해석할 수 있다는 점에서 PCR로 얻은 DNA 단편을 해석대상으로 삼을 수 있다. 1염기치환의 검출법에는 ① 가장 직접적인 방법인 표적영역의 염기서열 결정법, ② 특정위치의 염기치환만을 검출할 목적인 경우에 편리한 20염기의 합성 oligonucleotide와 표적 염기서열과의 hybrid 형성의 유무를 이용한 allele 특이적인 oligonucleotide hybridization법, ③ 표준 RNA probe와 표준 DNA 단편과의 hybrid를 Ribonuclease A로 처리하여 mismatch의 위치를 probe RNA로 절단함으로써 염기치환의 존재와 대략의 위치를 알아내는 mismatch 절단법, ④ PCR 반응으로 40개 정도의 GC 염기서열과 GC clamp를 갖는 DNA 단편을 제작하여, 변성체의 농도가

윗쪽에서 아래쪽으로 조금씩 높아지는 polyacrylamide gel에 전기영동하여 영동속도가 극단적으로 늦어지고 부분적으로 해리한 분자에로의 변화의 차를 영동속도로 비교하여 1염기치환을 검출하는 DGGE법 등이 있다. 이러한 방법은 모두 DNA/DNA, 또는 DNA/RNA hybrid의 형성, 또는 그 해리를 원리로 하고 있는데 필자들이 개발한 single strand DNA 고차구조다형(single-strand conformation polymorphism:SSCP) 해석법은 그 원리가 완전히 다른 것이다.

I. SSCP법의 원리

SSCP법의 원리를 그림 1에 나타내었다. double strand DNA 단편을 single strand로 해리하면 각 strand는 그 염기서열에 의존하는 독자의 고차구조를 형성한다. Maxam-Gilbert법에

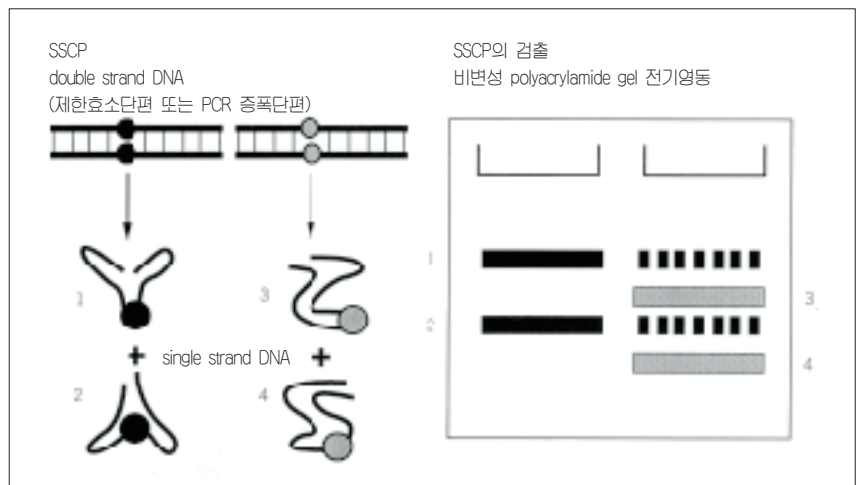


그림 1 single strand DNA 고차구조다형(SSCP) 해석법의 원리

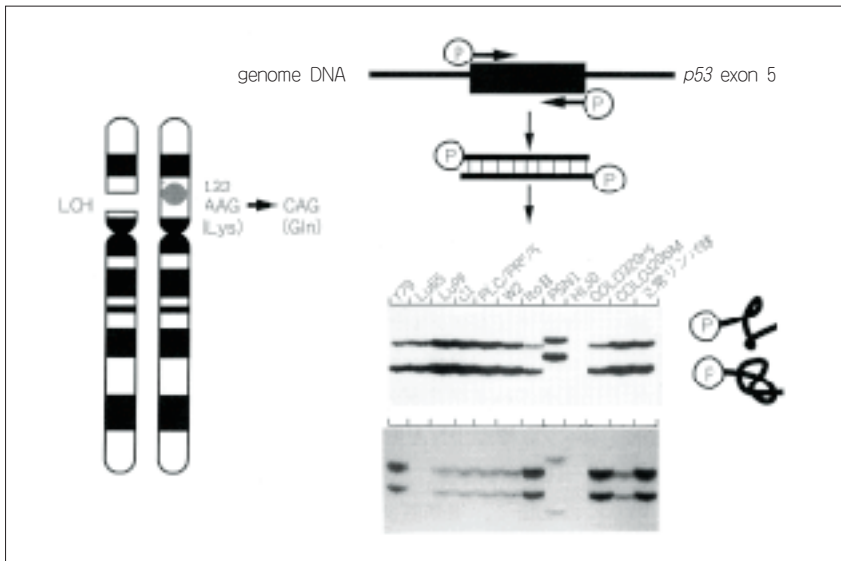


그림 2 PCR-SSCP 해석법에 의한 DNA 이상의 검출
human 배양세포주, 망막아세포종(Y 79), 폐대세포암(Lu 65, Lu 99), 대장암(C 1), 간세포암(PLC/PRF/ 5), 바이러스 종양(W 2), 정소암(1to-1), 횡장암(PSN 1), 대장암(COLO 320 HS, DM)과 정상인피부의 게놈 DNA 및 cDNA를 해석하였다.

의한 염기서열 결정법의 한 step에 있는 바와 같이 이 해리 한 DNA strand를 변성제를 함유하지 않는 polyacrylamide gel에 전기영동하면 각각의 고차구조의 차에 따라 길이가 같은 single strand DNA라도 다른 위치에 이동한다. 필자들은 1염기치환에서도 이 single strand DNA의 고차구조가 변화하여 비변성 polyacrylamide gel 전기영동에서 다른 이동도를 나타냄을 발견하였다¹⁾. ³²P로 표식한 primer를 이용한 PCR, 또는 하나의 반응기질에 ³²P 표식 nucleotide를 이용한 PCR 반응으로 표적영역을 증폭함과 동시에 표식한 DNA 단편을 얻어 반응액의 극히 일부를 시료로 사용하는 PCR-SSCP 해석은 아주 간편하고 고감도로 염기치환을 검출하는 방법으로 일반화되었다²⁾. 그림 2는 해석으로 human 횡장암 배양세포주 PSN 1에 있어서 암억제유전자 p53의 exon 5를 포함하는 DNA 단편이 다른 이동도를 나타내어 변이가 존재하고 있음을 나타내고 있다. 이상밴드 위치에 있는 겔에서 DNA 단편을 추출하고 다시 PCR로 증폭한 후 염기서열을 결정하여 codon 132의 1염기 치환을 동정하였다. 또한 SSCP 해석에서 정상 염기서열에 대응하는 밴드가 관찰되지 않는 점으로 보아 PSN 1 세포에서는 p53 유전자의 한쪽의 allele가 결실되어 있다는 것도 동시에 밝혀졌다. 그리고 RNA를 cDNA로 변환한 후 SSCP 해석으로써 mRNA의 상태도 파악할 수 있었다.

II. 사용하는 기구

1. PCR용 Thermal Cycler

Perkin Elmer Thermal Cycler 480, 또는 GeneAmp PCR System 9600, TaKaRa사의 PCR Thermal Cycler MP 또는 PERSONAL 등을 사용한다. 480 이외의 기종들은 mineral oil이 필요없기 때문에 조작이 간편하다.

2. Polyacrylamide gel 전기영동장치

염기서열 결정용 장치를 사용한다. 크기가 20 cm(W)×40

cm(H)인 2장의 유리판 사이에 두께 0.3 mm의 polyacrylamide gel을 제작하고 1 lane당 5 mm의 폭으로 사용한다. 영동 중의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 20 cm×26 cm×0.3 cm의 알미늄판을 유리판에 설치하고 송풍기(2대)로 양쪽에서 강하게 공냉한다. water jacket/강제 항온식 전기영동장치 AE-6160형 sequencer SSCP [ATTO]를 사용하면 30 cm(W)×40 cm(H)의 유리판으로 50 겹체를 해석할 수 있다. 이 경우 송풍기는 필요없지만 순환식 항온수조가 필요하다.

III. 사용하는 시약·시료

(1) 표준 nucleotide

[γ -³²P]ATP(160 mCi/ml, 7000 Ci/mmol, ICN), 또는 [α -³²P]dCTP(10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham)

(2) Polynucleotide kinase(10 U/ μ l,

Boehringer Mannheim사)

(3) PCR Amplification Kit

Taq DNA Polymerase(5 U/ μ l), 10× PCR 완충액(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(pH8.3), 15 mM MgCl₂, 0.1%(w/v) gelatin), 4 dNTP 용액은 PCR Kit에 들어있는 각 deoxyoligonucleotide를 혼합 희석하고 각각의 농도를 1.25 mM로 한다.

(4) Mineral oil(Light, Sigma Aldrich)

GeneAmp PCR System 9600, TaKaRa Thermal Cycler MP, PERSONAL을 사용하는 경우에는 불요

(5) 50 % acrylamide 용액

acrylamide/N, N-methylene-bis-acrylamide의 비율을 49:1 또는 99:1로 한다.

(6) 50 % glycerol

(7) 1.6 % 과황산암모늄

(8) TEMED(N, N, N', N'- tetramethyl-ethylenediamide)

(9) DNA 시료

Proteinase K/Phenol-chloroform법으로 조제한다. DNA는 TE 용액(10 mM Tris-HCl(pH7.0), 1 mM EDTA)으로 보존하며, 20 ng/ μ l의 농도가 되도록 이온교환수로 희석하여 반응에 첨가한다.

(10) Primer

Primer oligonucleotide는 그 합성을 외부로 주문하거나 DNA 합성기를 이용하여 조제한다. 후자의 경우 trityl기로 보호되어 있는 상태에서 합성을 완료한다. 암모니아수로 보호기를 제거한 후 Oligonucleotide Purification Cartridge(OPC)로 정제한 후 TE 용액으로 고농도로 녹인 후 -20°C에서 동결 보존한다. 10 μ M 용액을 조제하여 반응에 사용한다.

IV. 사용하는 용액의 조제

(1) 10× polynucleotide kinase 완충액(500 mM Tris-HCl(pH8.3), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT)를 조제한 후 200 μ l씩 분주하여 -20°C에서 보존한다.

(2) Formamide 색소(F-dye) 용액(95% formamide, 10 mM

EDTA(pH7.5), 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)을 정제하여 4°C에 보존한다. Formamide는 이온교환수지(Amber Light MBI)로 탈이온화한 것을 사용한다.

(3) 10× TBE(0.9 M Trizma base, 0.9 M Boric acid, 20 mM EDTA)를 조제하여 실온에 보존한다.

V. PCR

1. 5' 말단 표식 primer를 이용한 PCR³⁾

primer의 5' 말단표식(80 반응분)은 5 μl의 Polynucleotide kinase 반응액(1× Polynucleotide kinase 완충액, 2 μM primer 1, 2 μM primer 2, 4.6 μM [γ -³²P] ATP, 1 U/μl polynucleotide kinase) 내에서 37°C에서 30분간 반응하여 실시한다. 이 반응액에 225 μl의 이온교환수, 40 μl의 10× PCR buffer, 20 μl의 4 dNTP를 첨가하여 320 μl의 표식 primer (labeled primer : LP)액으로 한다. -20°C에 보존하면 수주간 사용할 수 있다.

LP액 40 μl에 대하여 0.5 μl(최종농도, 0.06 U/μl)의 Taq DNA Polymerase를 첨가한다. 이 PCR 용액 4 μl씩을 PCR 용 0.5 ml 원심관에 분주하고 각각에 시료 DNA(50 ng/μl) 1 μl를 첨가하여 5 μl의 mineral oil을 증층하여 수초간 원심한다. PCR 반응에 있어서의 primer와 4 dNTP의 최종농도는 각각 25 pM과 62.5 μM이다. PCR 반응시 처음에는 94°C에서 5분간 가열하여 완전히 DNA를 변성시킨 후, 30~40 cycles(예를 들면, 1 cycle : 변성 94°C 0.5분, annealing 55°C 0.5분, DNA Polymerase 반응 72°C 1분) 증폭한다.

2. 표식 deoxynucleotide를 기질로 이용한 PCR

20 반응분(80.5 μl)의 PCR 용액(1× PCR 완충액, 200 pM primer 1, 200 pM primer 2, 25 μM 4 dNTP, 1.3 μM[α -³²P] dCTP, 0.03 U/μl의 Taq DNA Polymerase)을 조제한 후 이중 4 μl씩을 PCR용 0.5 ml 원심관에 분주한다. 각 시료 DNA(50 ng/μl) 1 μl를 첨가하고 5 μl의 mineral oil을 증층하여 수초간 원심한다. 반응은 표식 primer를 이용하는 방법과 동일하다.

VI. SSCP 해석

PCR 반응용액(5 μl)에 45 μl의 F-dye 용액을 첨가하여 total 50 μl가 되도록 약 10배로 희석한다. 80°C, 5분간 열변성한 후 1 μl를 polyacrylamide gel에 전기영동하여 해석한다. Signal이 강한 경우에는 F-dye의 양을 늘려 희석배율을 높인다.

SSCP젤 제작용액은 10× TBE(1.5 ml), 50% acrylamide액(3 ml), 1.6% 과황산암모늄(1 ml)에 이온교환수를 첨가하여 30 ml로 만든다. Glycerol을 첨가하는 겔의 경우에는 최종농도 5~10%가 되도록 50% glycerol을 첨가한다. 두 장의 겔 제작용 유리판(20 cm×40 cm) 사이에 spacer(두께 0.3 mm)를 끼워넣어 조립한다. 유리판의 표면은 세제로 세정한 후 온수로 씻어내린다. 물은 paper towel로 닦아내고 에탄올을 적신 Kim's wiper로 제거한다. 귀가 붙은 유리판은 표면을 실리콘으로 처리하여 둔다. 위 용액에 30 μl의 TEMED를 첨가하여 잘 혼합하고 귀가 붙어있는 유리판을 윗쪽으로

하여 유리판사이에 주입한다. 유리판을 수평으로 유지하고 comb의 평탄한 부분을 삽입하여 중합을 기다린다. 중합이 완료되면 냉각장치가 있는 영동조에 고정한다. 선풍기로 공냉할 경우에는 알루미늄판을 한쪽으로 밀착하여 영동조에 고정한다. 영동조를 0.5× TEB로 채운다. Comb를 빼내고 PCR액 1 μl를 F-dye 용액으로 희석 변성하여 전기영동한다.

전기영동은 표준적으로는 실온(20~25 °C)에서 30~40 W의 정전력으로 영동한다. 이동도의 차이는 온도에 영향을 받지 않지만 분리가 불충분한 경우에는 4~25°C 사이에서 최대 이동도의 차이를 나타내는 온도를 검토한다. 냉각장치를 겸한 영동조를 이용하면 재현성이 좋은 결과를 얻을 수 있다. 공냉의 경우에는 유리판 양쪽에서 선풍기로 강하게 바람을 보낸다. 이동도는 염기배열, 온도, glycerol의 유무에 따라 다르기 때문에 영동시간은 예비실험으로 설정한다.

전기영동이 끝난 겔을 Whatmann 3 MM 여지에 옮기고 SaranWrap으로 덮어 gel dryer로 건조한 후 X선 필름에 감광한다. 이때 스테플러로 세 군데를 고정해 둔다. 이동도의 차가 거의 없는 경우에는 단시간 감광하고 감도가 약한 경우에는 장시간 감광하면 쉽게 검출된다.

VII. SSCP 해석으로 검출한 변이의 동정

1. allele의 분리⁴⁾

SSCP 해석의 겔 전기영동으로 분리한 정상 DNA 단편을 포함한 밴드와 변이 DNA 단편을 포함한 밴드부분을 건조 겔에서 각각 잘라낸다. Autoradiogram을 제작할 때에는 겔과 X선필름을 고정한 스테플러의 위치와 건조한 겔과 autoradiogram의 위치를 맞춘다. Light box위에서 면도날이나 cutter knife 등으로 필요한 단편을 잘라낸다. 잘라낸 겔 조각을 1 ml 원심튜브에 넣고 20 μl의 이온수를 첨가하여 80°C에서 15분간 가열한 후 1500 rpm으로 수분간 원심분리한다. Single strand DNA를 포함하는 상청액 1 μl를 이하의 반응에 사용한다

2. 분리한 DNA의 증폭

상기의 추출상청액(single strand DNA) 1 μl를 첨가하여 20 μl의 반응액(1× PCR 완충액, 125 μM 4dNTP, 1 μM primer 1, 1 μM primer 2, 0.1 U/μl Taq DNA Polymerase)으로 PCR 반응을 실시한다. 반응조건은 앞에서 언급한 바와 같다.

3. 증폭 DNA의 정제

미량용 원심분리식 농축/탈염장치를 이용하여 PCR 산물로 부터 과잉 primer 및 완충액 등을 제거한다. 실온에서 PCR 용액(20 μl)에 500 μl의 이온교환수를 첨가하여 3000 ×g, 10분간 원심분리를 2회 반복한다.

4. Cycle sequencing reaction

PCR 산물의 약 1/10양을 사용하여 반응한다. 염기배열의 결정에는 시판 kit을 사용한다.

VIII. 문제점

1. Primer의 설정

통상 한 쌍의 20 bp의 합성 oligonucleotide를 primer로 이용하여 표적 DNA 영역으로부터 증폭되는 DNA 단편의 길이가 300~350 bp 이하가 되도록 primer의 위치를 설정한다. 이 정도의 길이로 해석하면 1염기치환에 의한 이동도의 차를 높은 효율로 90% 이상의 고감도로 검출할 수 있다. Strand의 길이가 커짐에 따라 검출감도의 저하가 예상된다. 불행히도 PCR로 증폭한 DNA 단편이 단일하지 않고 부산물이 많은 경우에는 주형 DNA상의 인접 염기서열위치에 다시 primer를 설정한다.

2. Radio Isotope 표식법의 선택

시료수가 많을 때는 표식 primer를 사용하는 것이 값이 싸며 효율도 좋다. 그러나 primer의 체크나, 시료수가 적을 때, 또는 PCR 반응이 어려울 때는 표식 nucleotide로 표식하는 것이 더 간편하다.

3. 전기영동의 조건

Glycerol을 함유하는 polyacrylamide gel을 사용하면 1염기치환에 의한 이동도의 차이를 더 쉽게 검출할 수 있다. 그러나 glycerol을 첨가하지 않은 겔에서 이동도의 차이를 나타내는 경우도 있으므로 glycerol을 포함하는 겔과 포함하지 않는 겔을 모두 해석하는 것이 좋다. Glycerol의 농도는 5%이든 10%이든 기본적으로는 차이가 없다. 또한 저온(4~10°C)에서 complementary strand간의 분리도가 높아 이동도의 차이가 쉽게 검출되는 경우도 있다. 따라서 실온에서 glycerol을 첨가한 겔, 첨가하지 않은 겔, 저온에서 glycerol을 첨가하지 않은 겔 등 3가지로 전기영동함으로서 누락없이 검출할 수 있다.

분리패턴은 겔의 온도에 의존하므로 일정온도를 확보할 수 있는 water jacket을 장착한 전기영동장치를 이용하면 보다 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있다.

4. Sequencing

모든 lane에 밴드가 있는 경우에는 DNA polymerase의 물리적 정지나 주형 DNA의 2차구조가 원인이라고 판단된다. 이 경우에는 sequencing의 반응온도를 올려주는 *Tth* polymerase를 사용하거나, SSB(single strand binding) 단백질, Dimethyl Sulfoxide(DMSO) 등을 첨가해주면 유효하다고 한다. Sequencing 반응이 잘 되지 않을 때는 반대쪽의 상보가닥을 주형으로 하는 primer extension sequencing을 해 본다. 잘라낸 겔에서 추출한 DNA를 주형으로 사용한 PCR 산물의 수량이 적어서 원인이 되는 경우도 있으므로 PCR 산물을 확인하고 실험을 진행한다. 또한 Microcon으로 정제할 때 최종 회수 용량이 20 μ l 전후가 되게 농축/탈염하면 선명한 결과를 얻을 수 있다.

IX. 고찰

통상 암의 수술재료에는 상당한 양의 정상세포가 혼재되어 있기 때문에 해석결과가 약한 signal로 검출되는 경우가 많다. SSCP 해석에서는 통상 DNA 단편의 이동도가 다른 것

으로 signal을 검출하기 때문에 약한 signal이라도 암 DNA에 특이적이면 자신있게 염기치환의 존재를 알 수 있다. 이처럼 암세포가 불과 수% 정도밖에 포함되어 있지 않은 시료에서도 암 DNA에 있어서의 이상을 검출할 수 있는 것은 PCR-SSCP 해석법의 이점 중의 하나이다.

PCR-SSCP 해석법의 최대 특징은 DNA 단편상의 미지의 위치에서 발생한 1염기치환을 검출할 수 있다는 점이다. 따라서 점돌연변이의 검출뿐만 아니라 수백염기에 한 개 존재하는 것으로 알려져 있는 다형에 의한 염기치환도 그 대부분 검출이 가능하고 이들 다형에 의한 염기치환을 allele를 구별하기 위한 genetic marker로서 이용할 수 있다.

검출효율면에서는 PCR로 해석영역을 증폭할 때 두 개의 primer 양쪽을 모두 표식한 것을 이용하거나 표식 nucleotide를 기질로 사용하므로써 상보성 가닥의 양쪽을 표식하고, 또한 DNA 단편의 길이가 300~350 bp 이하가 되도록 primer를 설정하여 5 또는 10%의 glycerol을 함유한 polyacrylamide gel로 전기영동함으로서 모든 염기치환을 90% 이상의 효율로 검출할 수 있다고 생각한다. 물론 염기배열 중에는 1염기치환이 어느 쪽 상보가닥에도 고차구조에 변화를 주지 않는 경우도 있지만 그 빈도는 5% 이하로 추측되고 있다.

염기치환이 존재하는 DNA 단편을 전기영동시 이동도의 차이로 분리하기 때문에 두 allele의 분리 정제가 가능한 것도 이 방법의 커다란 특징이다. 분리한 밴드위치의 겔에서 DNA를 추출하고 PCR을 이용하여 염기서열을 결정함으로써 각 allele를 동정 및 확인할 수 있다.

Isotope의 사용은 임상응용에 있어서는 난점이지만 이 문제는 비표식 PCR 산물을 이용하여 SSCP 해석을 실시하여 겔 속의 DNA를 은염색으로 검출하는 방법, 형광표식한 primer를 사용하여 PCR 산물을 autosequencer로 해석하는 방법 등으로 해결하고 있다.

▶ 참고문헌

- 1) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-8409 (1989a)
- 2) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Genomics*, **5**, 874-879 (1989b)
- 3) Mashiyanam, S., Sekiya, T., Hayashi, K. : *in* Screening of multiple DNA samples for detection of DNA sequence changes by the PCR-SSCP analysis Technique 2, pp. 304-306 (1991)
- 4) Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Analytical Biochem.*, **192**, 82-84 (1991)

- Allele 특이적 PCR -

Sachiko Sugai, Naoko Hayashi, Yusuke Nakamura

PCR을 응용하여 암에 있어서의 돌연변이를 보다 효율적으로 검출하기 위하여 고안된 MASA(mutant allele specific amplification)법을 소개하고 이 방법을 응용한 대장암의 임파절 전이를 유전자 수준에서 진단하는 임상분야에서의 유용성에 대하여 설명한다.

▶ 서론

PCR을 이용한 유전자 진단법 중에서 돌연변이의 유전자 이상을 검출하는 방법은 이미 알고 있는 점변이를 검출하는 방법¹⁻⁴⁾과 미지의 점변이를 screening하는 방법^{5, 6)} 등 크게 2 종류로 구별된다. 본 고에서는 PCR로 이미 알고 있는 유전자 이상을 고감도로 검출하는 방법중의 하나로서 이용되는 MASA법(mutant allele specific amplification)⁷⁾의 원리와 그 응용예를 소개한다.

I. MASA법의 원리

MASA법은 약 20 염기로 구성되는 변이 DNA 특이적 합성 oligonucleotide를 제작하여 주형 DNA와 내열성 polymerase로 PCR을 실시하므로써 변이 allele만을 특이적으로 증폭하여 겔 전기영동 상에 나타나는 밴드로 돌연변이를 검출하는 방법이다.

이 방법은 그림 1에 나타난 바와 같이 변이부분을 함유하는 DNA 단편을 증폭할 때 변이부분이 한쌍의 primer 사이에 오도록 primer를 준비한다. 3' 쪽의 primer에는 정상 염기배열에 해당하는 염기가, 5' 쪽 primer에는 변이에 해당하는 염기가 3' 말단이 되도록 설계한다. 이상 allele는 효율적으로 증폭되는데 반해 정상 allele는 증폭효율이 극단적으로 떨어지도록 엄밀하게 PCR 조건을 설정함으로써 겔 상에는 변이 DNA가 존재하는 경우에만 양성밴드가 검출되도록 한다. 본 고에서는 이 방법을 이용하여 human 암에서 점돌연변이를 검출한⁸⁾ 사례를 소개한다.

PCR의 장치(동일 회사의 동일 기종이라도 미묘하게 다르므로 주의가 필요)와 주형 DNA의 농도, primer의 Tm값 등에 따라 크게 달라지나 대략적인 Tm값은 아래의 식을 이용하여 구할 수 있다.

$$Tm(°C) = (4 \times \text{primer 배열중의 G+C의 수}) + 2 \times (A+T \text{의 수})$$

① 열변성은 94°C, 30초, ② annealing은 $X(Tm \pm 10)°C$, 90초, ③ 신장반응은 70°C, 90초이고 ①에서 ③을 1 cycle로 하여 30~40 cycles 반응한다. 겔 전기영동 상에서 밴드를 관찰할 때 비특이적인 signal을 양성으로 판정하지 않도록 시료 DNA와 양성 대조(positive control), 정상 대조 및 주형을 함유하지 않는 것을 대조(negative control)로 하여 동일 조건에서 PCR 반응을 실시한다. 즉, 정상 DNA와 주형을 함유하지 않는 것이 음성 대조이므로 양성 대조만 검출되도록 조건을 설정할 필요가 있다. 특히 annealing 온도의 설정이 중요하므로 충분한 조건 검토가 필요하다.

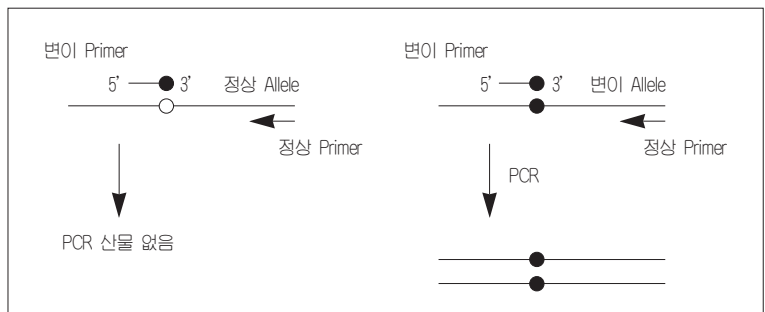


그림 1 변이 Allele 증폭법의 원리

변이 Allele의 1 염기치환 서열과 상보성을 갖는 primer를 이용하여 PCR반응을 실시함으로써 변이 allele를 특이적으로 증폭한다

II. 변이 Allele 특이적 Oligonucleotide(변이 Primer)의 제작

K-ras 유전자는 human 암에서 점돌연변이를 갖는 것으로 알려져 있는 암유전자^{9, 10)}로, Exon 1 서열 내부의 Codon 12, 13과 Exon 2의 Codon 61에서의 점변이가 암을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 따라서 K-ras의 점변이가 일어나기 쉬운 codon을 표적으로 하여 primer를 제작한다. 1 염기에 대하여 세 개의 염기가 치환될 가능성이 있으므로, 그림 2와 같이 5' 측의 primer로는 3' 말단에 변이염기에 해당하는 염기를 갖는 20 염기로 구성된 3종류의 primer를 혼합한 것을 이용한다. 3' 측의 primer K1204-L은 Codon 12, 13의 양방향에 사용한다.

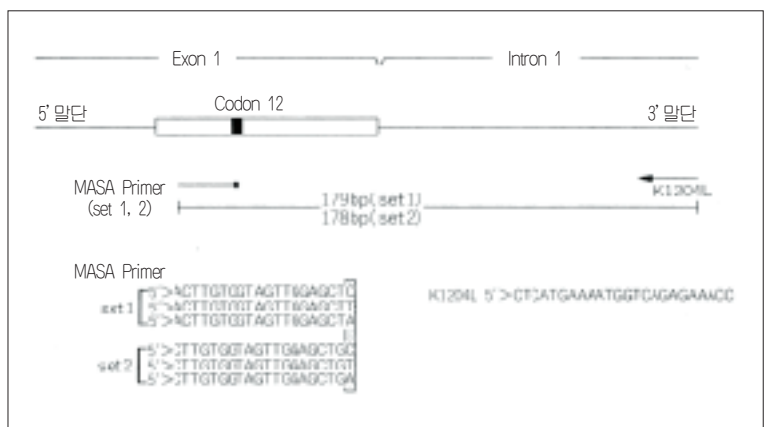


그림 2 K-ras Codon 12에서의 MASA primer의 염기배열

Codon 12 GGT(Gly)의 1염기치환의 검출에 사용하는 Primer는 set 1(3 종)과 set 2(3 종)의 6 종류를 제작한다

III. PCR 조건

PCR의 각 과정에서의 온도와 시간은 사용하는

IV. 주형

PCR에 이용하는 주형 DNA의 농도는 일정량으로 조정하여 사용한다(50~300 ng/ μ l). DNA의 농도와 PCR에 사용하는 양을 일정하게 맞추는 것이 false positive, false negative를 방지하는 하나의 방법이 된다. 또한 이 방법에서는 체액이나 혈액중의 세포, 수술 후의 생표본, 파라핀조직에서 추출한 DNA를 모두 사용할 수 있다.

V. 전기영동

Ethidium Bromide를 함유하는 2% agarose gel의 well에 5~10 μ l의 PCR 산물을 넣고 marker와 함께 약 100V의 정전압으로 전기영동한다. 그림 3은 대장암의 수술 생표본에서 추출한 종양 DNA와 정상 점막 DNA, 그리고 동일 환자의 임파절 DNA를 대조로 하여 MASA primer로 PCR반응을 실시하여 그 산물을 전기영동한 것이다. 암조직과 동일한 DNA 변이 단편이 임파절에서도 확인되어 임파절 전이 양성으로 진단되었다.

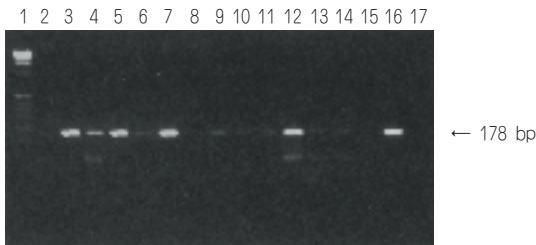


그림 3 MASA법에 의한 대장암의 임파절 전이 진단

1 : DNA size marker. 2 : 정상 점막 DNA. 3 : 종양 DNA. 4~14 : 임파절 DNA. 15 : 정제수, 16 : 양성 대조, 17 : 정상 대조

표 1 대장암에서의 임파절 전이 진단과 예후

임파절 전이 진단	재발	
	+	-
gn(+)	27	10
gn(-)	0	34
계	27	44

VI. MASA법에 의한 대장암의 임파절 진단

이 방법으로 대장암의 미소 임파절 전이를 검출할 수 있는가를 검토하였다. 수술시에 원격 전이가 인정되지 않은 대장암 수술 증례에서 DNA를 추출하여, 먼저 원발소에서의 K-ras, p53 유전자의 변이를 검색하였다. K-ras의 변이는 codon 12, 13, 61을 MASA법으로 검색하고 p53의 변이는 exon 5~8을 sequencing함으로써 동정하였다. 원발소에서 변이가 동정된 증례에 대해서는 원발소에 소속한 임파절에 원발소와 동일한 유전자 변이를 갖는 세포가 존재 하는지를 조사하기 위하여 각 변이에 해당하는 MASA primer를 설계하고 임파절에서 추출한 DNA를 MASA법으로 검색하였다. 원격 전이가 없는 수술 증례에서 병리 조직학적으로 no로 진단을 받았음에도 불구하고 5년 이내에 재발한 증례 45예와, 대조군으로는 no이면서 수술후 5년 경과해도 재발하지

않은 증례 75예에 대하여 동일한 방법으로 유전자에 의한 임파절 전이를 진단하였다.

원발소에 K-ras, 또는 p53의 변이를 인정한 증례는 no 재발에 45예중 27예, no 비재발에 75예 중 44예이며 이들 증례의 임파절에 대해 검색하였다. 표 1에 나타낸 바와 같이 유전자 진단에서 임파절 전이 양성 [gn(+)]으로 판명된 37예중 27예는 5년 이내에 재발하고 유전자 진단에서 임파절 전이 음성 [gn(-)]으로 판명된 34예는 수술 후 5년이 경과해도 모든 예에서 재발이 관찰되지 않았다. 이처럼 종래의 병리진단에서는 생각지도 못한 미소 임파절 전이가 예후에 영향을 주고 있을 가능성을 강력하게 시사하였다.

▶ 맺음말

MASA법은 PCR 기기와 전기영동장치 및 반응시약이 있으면 실시할 수 있는 비교적 간단한 방법이다. 중요한 것은 적절한 PCR primer의 설계와 PCR 조건이며 이를 충분히 검토하면 재현성이 높은 고밀도의 결과를 얻을 수 있다. 또한 변이가 염기서열과 관련되어 있는 경우에는 primer의 설계에 따라서는 1 염기치환 뿐만 아니라 응용도 가능하다.

▶ 참고문헌

- 1) Chehab, F. F., Kan, Y. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9178-9182 (1989)
- 2) Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Wallace, R. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2757-2760 (1989)
- 3) Newton, C. R., Kalsheker, N., Graham, A., Riley, J., Powell, S., Gammack, A., Markham, A. : *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2503-2516 (1989)
- 4) Gibbs, R. A., Nguyen, P. N., Caskey, C. T. : *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2437-2488 (1989)
- 5) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989)
- 6) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Genomics*, **5**, 874-879 (1989)
- 7) Takeda, S., Ichii, S., Nakamura, Y. : *Hum. Mutation*, **2**, 112-117 (1993)
- 8) Hayashi, N., Arakawa, H., Nagase, H., Yanagisawa, A., Kato, Y., Ohta, H., Takano, S., Ogawa, N., Nakamura, Y. : *Cancer Res.*, **54**, 3853-3856 (1994)
- 9) Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., VerLean de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., Vogelssein, B. : *Nature*, **327**, 293-297 (1987)
- 10) Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Dunitz, J., Arnheim, N., Perucho, M. : *Cell*, **53**, 549-554 (1988)
- 11) Hayashi, N., Ito, I., Yanagisawa, A., Kato, Y., Nakamori, S., Imaoka, S., Watanabe, H., Ogawa, M., Nakamura, Y. : *Lancet*, **345**, 1257-1259 (1995)

췌장암의 유전자 진단을 목적으로 K-ras Codon 12에 변이를 갖지 않는 대량의 정상형 유전자의 존재하에서 소량의 1염기변이를 갖는 변이형 유전자의 검출을 목표로 allele 특이적 PCR을 이용하여 검출방법을 모색하였다. 변이 유전자의 검출 빈도를 높이고 비특이적인 증폭을 억제하기 위해서는 Hot start, Taq Polymerase, Stoffel fragment의 사용, dNTP 농도의 조절, PCR 반응 시간의 대폭적인 단축 등이 중요한 요인이며 이들을 조합함으로써 변이 유전자의 비율($10^{-4} \sim 10^{-5}$)까지 검출 가능한 방법을 확립하였다.

서론

PCR에 의한 1염기치환의 검출은 PCR 증폭산물의 allele 특이적 hybridization법, 직접 sequence법 등의 개발로 PCR법의 개발 당초보다 훨씬 용이하게 되어 간단한 유전자 변이의 검출법으로서 보급되고 있다. 단, 이러한 방법으로는 1염기의 치환을 갖는 변이 유전자와 변이가 없는 유전자가 혼재하는 경우, 변이 유전자의 비율이 약 20% 이하일 때에는 정상 유전자의 영향으로 검출이 불가능하였다. 극히 소량의 비율로 존재하는 변이 유전자를 검출할 수 있으면 암 특이적 유전자 변이를 검출할 수 있으며 암의 유전자적 진단, 약제내성 등의 특징을 갖는 미량의 변이 바이러스의 존재 진단 등에 응용할 수 있다.

Single strand conformation polymorphism(SSCP)법, 변성 구배 겔 전기영동법(denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE)법, nucleotide extension법이 고안되어 변이 유전자 비율의 3%정도까지 검출할 수 있게 되었다. 변이 유전자의 검출감도가 가장 높은 것은 allele 특이적 PCR이다. 이 방법은 primer의 3' 말단에 mismatch가 존재할 때 PCR의 효율이 저하되는 것을 응용하여 3' 말단을 변이 특이적 염기로 설정하여 PCR하는 것으로 amplification refractory mutation system, mismatch amplification, mutant allele specific amplification 등 보고자에 따라 호칭이 다양하다.

필자들은 이 방법을 응용하여 K-ras 유전자의 Codon 12에 변이를 갖는 유전자의 비율을 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 까지 검출할 수 있는 방법을 확립하고 췌장암 환자의 체액, 말초혈 등에 극소량 존재하는 변이 ras 유전자를 검출함에 따라 췌장암의 유전자 진단을 시도해 왔다²⁾. Allele 특이적 PCR법을 개량한 내용을 덧붙여 변이 유전자의 검출 감도 향상에 필요한 요인에 대해서 설명한다.

I. Primer의 설정

Allele 특이적 PCR의 경우, 3' 말단에 검출하고자 하는 1염기변이가 오도록 설계한다. 또한 이 primer는 통상의 20염기보다 짧은 14~17염기가 효과적인 것으로 보고되어 있다¹⁾. 여기서는 변이 검출 primer로는 14염기를, 쌍을 이루는 antisense primer로는 통상 20염기를 사용하였다(그림 1). 변이 검출 primer를 20염기로 한 경우에는 1염기변이의 차를 검출하는 효율이 떨어졌다.

Primer 3' 말단의 1염기변이의 PCR 증폭 효율에 대한 영향은 그 부위와 mismatch의 조합에 따라 크게 다르므로 예상하기 어렵다³⁾. 이 시스템은 C:C와 C:T mismatch에 효과적이며, CGT, GTT형 변이유전자는 10^6 배까지 식별이 가능하였으나 C:A mismatch는 효과가 나빠 GAT형 변이 유전자는 10^4 배에 머물렀다.

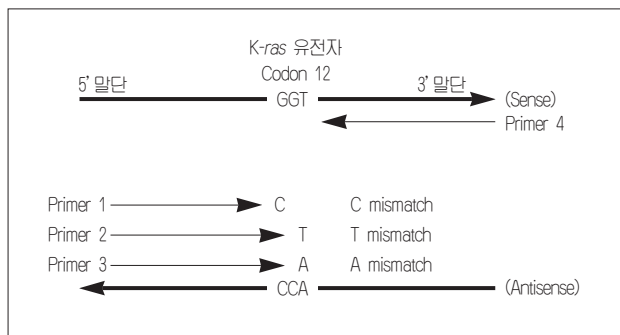


그림 1 primer의 설계

췌장암에서 인정되는 K-ras Codon 12의 3종류의 변이를 검출하기 위해 3' 말단에 변이형에는 특이적이지만 정상형과는 mismatch를 갖는 primer 1, 2, 3을 제작하였다. 각 정상인 K-ras Codon 12의 염기배열 GGT에 대하여 CGT, GTT, GAT의 변이를 검출하도록 설정하고 각 변이 유전자를 검출하기 위하여 primer 1-4, 2-4, 3-4의 조합으로 동일검체를 사용하여 별개의 3종류의 PCR 반응을 실시하였다.

II. Hot start

PCR로 목적하는 유전자를 증폭하기 위해서는 cycle 초기의 반응이 정확하게 이루어지는 것이 중요하다. Taq polymerase는 70°C 전후의 최적온도보다 더 낮은 온도에서도 활성을 갖고 있기 때문에 PCR의 변성단계 이전에 섞여 두면 특이성이 낮은 증폭이 일어난다. 이같은 현상을 방지하기 위하여 변성단계에서 비교적 반응액이 고온에 이를 때 Taq Polymerase를 작용하게 하는 hot start라는 방법이 고안되었다⁴⁾. 이는 1염기변이의 식별효율 향상에 필수적인 방법이다(그림 2).

III. dNTP 농도

통상의 PCR에서는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP는 각각 100~200 μM의 농도로 사용한다. 이 농도를 2 μM로 낮추면 H-ras 유전자의 Codon 12에 변이를 갖는 유전자의 비율을 10^{-7} 까지 검출 가능하다는 보고가 있었으나⁵⁾ 본 실험에서는 이 농도에서 PCR의 증폭효율이 저하하여 실험을 재현할 수 없었다. dNTP의 농도가 높으면 primer 3' 말단에 1염기의 변이가 있어도 PCR의 증폭이 일어나기 쉽고, 또한 농도가 너무 낮으면 변이가 없는 primer를 사용해도 증폭효율이 현저하게 저하되기 때문에 50 μM를 사용하였다²⁾.

IV. PCR 완충액

pH에 의해 어떤 종의 염기쌍의 안정성이 변화한다는 보고가 있다⁶⁾. 그래서 PCR 완충액의 pH를 바꾸어 1염기변이의 인식효율이 변화하는 지를 검토하였지만 확실한 인식효율의 향상을 얻지는 못하였다. 그 외에 K⁺농도의 조정, glycerol의 첨가 등을 검토하였으나 변화가 없었다.

V. PCR Parameter

DNA Polymerase는 double strand DNA가 완전히 상보적인 경우에 비하여 mismatch가 있으면 DNA 신장반응에 보다 긴 시간을 요하고, 이 시간은 mismatch 염기쌍의 종류에 따라 다르다고 보고되어 있다⁷⁾. 이 현상을 이용하여 PCR의 신장단계를 생략하고 annealing 단계(동시에 신장단계를 겸한다)의 시간을 5~10초로 단축함으로써 1염기변이의 검출 능력을 향상시킬 수 있었다. 통상의 PCR용 기기로는 PCR의 각 단계의 시간을 짧게 설정해도 다음 단계로 이행할 때의 온도변화에 시간이 걸려 유효하게 증폭되지 않는다. 따라서 고성능의 PCR기기를 사용할 필요가 있다.

맺음말

위에서 언급한 방법을 병용함으로써 채장암에서 확인된 *K-ras* 유전자의 Codon 12의 3 종류의 변이에 대하여 이 유전자의 비율이 10^{-4} ~ 10^{-5} 까지 검출 가능한 방법을 확립하여 채장암의 유전적 진단에 응용하였다²⁾(그림 3). 단, primer 3' 말단의 mismatch에 의해 PCR 증폭이 완전히 억제되는 것은 아니고 어디까지나 완전한 상보성이 있는 경우의 증폭효율과의 상대적인 차를 이용하여 검토하고 있다(그림 3). 따라서 항상 양성, 음성 대조검체를 사용하고 있다. 또한 1염기변이의 검출감도가 높아짐에 따라 약간의 pH, EDTA 농도 등의 변화가 PCR의 효율에 영향을 미친다. 따라서 본법을 도입할 때에는 사전에 다수의 대조(특히 음성의)검체를 사용하여 충분히 조건을 설정하여야 한다.

▶ 참고문헌

- 1) Rolfs, F., Schuller, I., finckh, U., Weber-Rolfs, I., (ed.) : *in PCR : Clinical diagnostics and research*, pp. 149-167, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- 2) Tada, M., Omata, M., Kawai, S., Saisho, H., Ohto, M., Saiki, R. K., Sninsky, J. J. : *Cancer Res.*, **53**, 2472-2474 (1993)
- 3) Kwok, S., Kellog, D. E., McKinney, M., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J. J. : *Nucl. Acids. Res.*, **18**, 999-1005 (1990)
- 4) Chou, Q., Russel, M., Birch, D. E., Raymond, J., Bloch, W. : *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 1717-1723 (1992)
- 5) Ehlen, T., Dubeau, L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 441-447 (1989)
- 6) Boulard, Y., Cognet, J. A. H., Gabarro-Arpa, J., Bret, M. L., Sowers, L. C., Fazakery, G. V. : *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 1933-1941 (1992)
- 7) Huang, M.-M., Arnheim, N., Goodman, M. F. : *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 4567-4573 (1992)

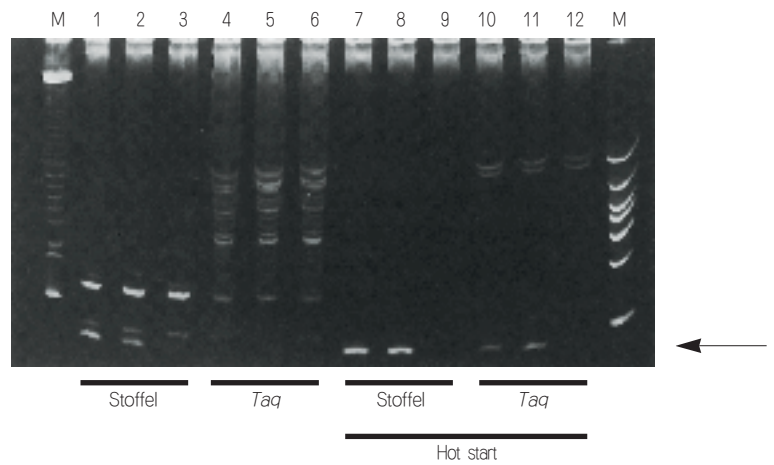


그림 2 Hot start법과 DNA Polymerase, Stoffel fragment의 조합효과

K-ras Codon 12의 CGT형 돌연변이체를 검출하는 primer 1과 4 (그림 1)를 사용하여 hot start의 유무, DNA Polymerase의 차이에 의한 효과를 나타낸다. 검체로서 lane 3, 6, 9, 12는 변이가 없는 human DNA 100 ng을 lane 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11은 human DNA 100 ng중 CGT형 돌연변이체를 0.1 ng 함유하는 것을 사용하여 PCR하였다. 오른쪽 끝의 M은 marker이며 크기는 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1000 bp이다. 화살표는 기대되는 증폭산물의 크기를 나타낸다. Lane 1~6은 Hot start법을 사용하지 않고 PCR하였는데 비특이적인 증폭산물이 많다. 또한 lane 3에 나타난 바와 같이 돌연변이체를 갖지 않는 검체에서도 *ras* 유전자가 증폭되었다. Lane 7~12는 hot start를 사용한 것으로 비특이적 증폭은 상당히 억제되었다. 또한 *Taq* Polymerase, Stoffel fragment를 사용하면 통상의 *Taq* Polymerase 사용시에 인정되는 1000염기 전후크기의 큰 비특이적 증폭산물도 소실되면서 목적산물의 증폭이 증가하였다(lane 7, 8).

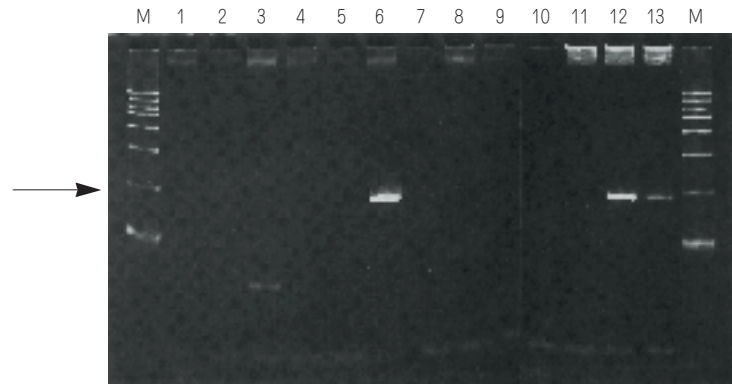


그림 3 채장암 환자의 채액으로부터 변이 *ras* 유전자의 검출

K-ras Codon 12의 첫번째 염기가 G에서 C로 변이된 유전자(GGT→CGT)를 검출하는 PCR예를 나타낸다. 그림 1에서 나타난 primer 1과 primer 2를 조합하여 사용하였다. 화살표는 목적 증폭산물의 크기를 나타낸다. lane 1에서 lane 10은 환자 채액의 DNA를 검체로 한 것이며, lane 11은 negative control로 변이가 없는 1 μ g의 human DNA 검체를 사용한 것으로 증폭단편이 검출되지 않았다. 한편, 양성대조에 해당하는 lane 12, 13은 human DNA 1 μ g중 CGT 변이형 유전자를 각각 0.1 ng, 0.01 ng 함유하는 검체를 사용한 것으로 모두 단편이 검출되었다.

DNA Chip - Introduction -

TaKaRa는 미국 Genetic MicroSystem사(GMS사)의 DNA chip 제작장치와 DNA chip 해석장치를 공급하게 되었다. 또, 이 장치를 이용하여 조제한 DNA Chip의 판매나 수탁해석도 실시할 예정이다.

▶ Functional Genomics

전세계적으로 인체의 유전자를 중심으로 하는 genome project의 수행 결과 많은 유전자의 구조가 속속 밝혀지고 있다. 그러나 다양한 생물들이 갖는 유전자의 구조해석 결과 그 자체가 인류의 소중한 자산이 될 수 있지만, 이것을 유효하게 이용하는 post genome project의 일환으로서 유전자의 기능 및 발현 연구는 질병의 예방과 진단, 의약품의 개발 등에 새로운 길을 개척하는데 아주 중요한 테마가 되고 있다. DNA chip은 다수의 유전자의 발현이나 변이, 다형성을 동시에 해석할 수 있으므로 이들 연구를 간편하면서도 신속하게 수행할 수 있게 해 준다.

▶ DNA Chip

DNA chip은 slide glass등의 기판상에 만개 이상의 미량의 DNA 단편을 고밀도로 spot하여 정렬화한 것이다. 이 DNA chip과 형광색소 등으로 표식한 연구대상 세포의 mRNA를 hybridization시켜 그 signal을 DNA chip 해석장치로 해독하므로써 시료 DNA의 기능을 추정한다. DNA chip으로 질병 관련 유전자의 선별 및 진단, 표적 대사경로의 탐구, lead chemicals의 screening, 약제독성/약제선택성(특이성), 약효/약제감수성 등의 연구를 추진할 수 있다.

▶ GMS사의 제품에 대하여

DNA chip 제작장치[GMS 417 Arrayer]

독자적인 pin & ring 방식을 채용한 DNA chip 제작용 microspotting 장치이다. Ring으로 microtiter plate 내의 시료 용액을 reserve하여 pin으로 용액을 slide glass위에 spot한다.

종래의 quill(pen 끝) spotting 방식은 복수의 DNA chip을 만들기 위해서 1 spotting 공정마다 pin이 slide glass와 microplate 사이를 왕복하여야 하므로 이 때 pen 끝의 DNA 용액이 건조하거나 복수의 pen이 유리표면에 접촉하지 않아 spot되지 않는 경우가 있다.

GMS사의 방식은 ring으로 시료를 한번 trap하면 한번에 42장의 slide glass에 spotting하므로 아주 빠른 속도로 진행된다. Microplate상의 sample을 slide glass상에 50 μ m에서 300 μ m의 크기로 spot할 수 있으며 42장의 DNA chip을 한번에 제작할 수 있다. 1장의 slide glass(25 mm \times 75 mm)에 10만개 이상의 DNA를 아주 높은 재현성으로 spot할 수 있다.

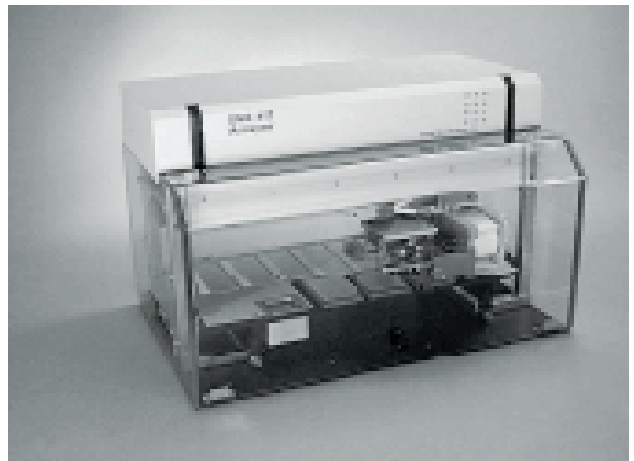
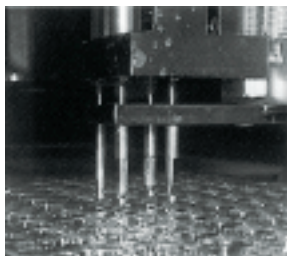
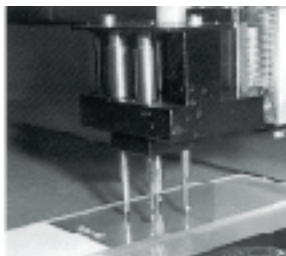


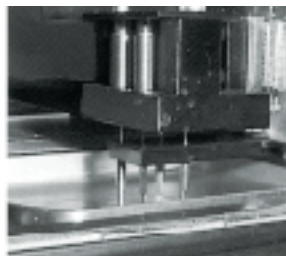
사진 1 GMS 417 Arrayer



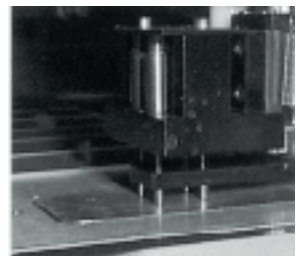
1. 시료를 reserve



2. Spotting



3. Washing



4. Drying

사진 2 Spotting 공정

DNA chip 해석장치[GMS 418 Array Reader]

Confocal laser 현미경 기술을 베이스로 독자적인 scanning 방법을 채용한 DNA chip 해독용 고속 형광 scanning 장치이다. 10 μm 의 고해상도 해석기능을 갖고 있으며 2파장으로 검출한다. 자동초점 기능과 laser 출력 monitoring 기능으로 안정적이고 정확한 scanning이 가능하다. 또한 대구경의 lens를 사용한 새로운 집광 기능으로 고광도로 검출할 수 있을 뿐만 아니라 새로운 고속 scanning 방식으로 빠르게 해독할 수 있다.

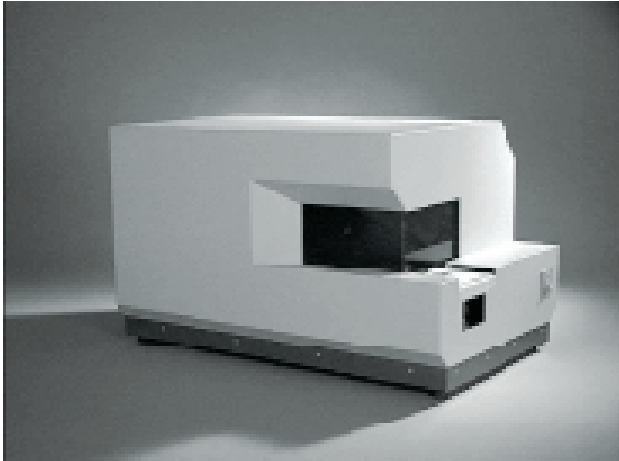


사진 3 GMS 418 Array Reader



사진 4 형광표식한 DNA를 spot
eosin표식한 DNA를 spot

▶ 기기사양

[GMS 417 Arrayer]

Spot size	: 50~300 μm
Spot 간격	: 10 μm 단위로 자유설정
Spot 속도	: 4 spotting/sec.
사용 slide glass	: 표준크기(25 mm×75 mm) 42매 장착 가능
사용 micro plate	: 표준크기(96 well, 384 well), 3매 set 가능
외형치수	: 80 cm(W) × 53 cm(D) × 50 cm(H)
중량	: 65 kg
사용전력	: 600 W
사용 computer	: IBM 호환, Pentium® class, RAM 16 MB 이상, 10 MB 이상 hard disk 가용

[GMS 418 Array Reader]

해상도	: 10 μm
Scanning 속도	: 6.25분 이하/22 mm × 75 mm
여기파장	: 532 nm 및 635 nm
검출방식	: 광전자 증배관
외형치수	: 38 cm(W) × 61 cm(D) × 38 cm(H)
중량	: 25 kg
사용전력	: 500 W
Output file	: TIFF (16 bit), BMP
사용 computer	: IBM 호환, Pentium® class, RAM 64MB 이상, 100 MB 이상 hard disk 가용, 빈 PCI slot × 1

* 본 사양은 개량을 위하여 예고없이 변경될 수 있습니다.

창사 3주년 기념
감사의 큰 잔치 실시 중
12월 30일까지

품목 및 가격은 다음 페이지 참조

감사 큰잔치 해당제품 가격표 (12월 30일 까지)

제한 효소

Product	Code	단위	소비자가	할인가	Product	Code	단위	소비자가	할인가
<i>Bam</i> H I	1010A	10,000 U	60,000	42,000	<i>Not</i> I	1166A	500 U	84,000	59,000
<i>Bgl</i> II	1021A	2,000 U	96,000	67,000	<i>Pst</i> I	1073A	10,000 U	66,000	46,000
<i>Cla</i> I	1034A	1,000 U	84,000	59,000	<i>Pvu</i> I	1075A	200 U	84,000	59,000
<i>Eco</i> R I	1040A	10,000 U	60,000	42,000	<i>Pvu</i> II	1076A	2,000 U	60,000	42,000
<i>Eco</i> R V	1042A	3,000 U	72,000	51,000	<i>Sac</i> I	1078A	2,000 U	84,000	59,000
<i>Hha</i> I	1056A	2,000 U	78,000	55,000	<i>Sac</i> II	1079A	1,000 U	60,000	42,000
<i>Hinc</i> II	1059A	1,000 U	60,000	42,000	<i>Sal</i> I	1080A	3,000 U	66,000	46,000
<i>Hind</i> III	1060A	10,000 U	60,000	42,000	<i>Sau</i> BA I	1082A	200 U	60,000	42,000
<i>Hinf</i> I	1061A	3,000 U	60,000	42,000	<i>Sca</i> I	1084A	1,500 U	78,000	55,000
<i>Hpa</i> I	1064A	500 U	60,000	42,000	<i>Sma</i> I	1085A	2,000 U	60,000	42,000
<i>Kpn</i> I	1068A	5,000 U	96,000	67,000	<i>Spe</i> I	1086A	300 U	90,000	63,000
<i>Mlu</i> I	1071A	1,000 U	60,000	42,000	<i>Sph</i> I	1180A	400 U	108,000	76,000
<i>Nco</i> I	1160A	500 U	99,600	70,000	<i>Stu</i> I	1088A	500 U	60,000	42,000
<i>Nde</i> I	1161A	400 U	60,000	42,000	<i>Xba</i> I	1093A	3,000 U	66,000	46,000
<i>Nhe</i> I	1162A	500 U	72,000	51,000	<i>Xho</i> I	1094A	5,000 U	72,000	51,000

수식 효소

Product	Code	단위	소비자가	할인가
T4 DNA Ligase	2011A	25,000 U	72,000	51,000
T4 Polynucleotide Kinase	2021A	1,000 U	66,000	46,000
T4 Polynucleotide Kinase	2021S	500 U	60,000	42,000
T4 DNA Polymerase	2040A	100 U	66,000	46,000
Klenow Fragment (<i>E. coli</i> DNA Pol. I)	2140A	200 U	72,000	51,000
Ribonuclease H(RNase H)	2150A	1,000 U	72,000	51,000
Exonuclease III	2170A	5,000 U	60,000	42,000
DNase I (용액)	2210A	30,000 U	72,000	51,000
DNase I (동결건조품)	2210LA	10 mg	72,000	51,000
DNase I (RNase-free)	2215A	5,000 U	75,000	53,000
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	2230A	300 U	60,000	42,000
DNA Topoisomerase I	2240A	100 U	60,000	42,000
Alkaline Phosphatase(Calf intestine)	2250A	1,000 U	66,000	46,000
RNase Inhibitor	2310A	5,000 U	108,000	76,000
S1 Nuclease	2410A	20,000 U	60,000	42,000
Mung Bean Nuclease	2420A	2,000 U	72,000	51,000
SP6 RNA Polymerase	2520A	3,000 U	78,000	55,000
T7 RNA Polymerase	2540A	5,000 U	72,000	51,000
Reverse Transcriptase XL(AMV)	2620A	500 U	250,000	175,000

유전 공학용 키트

DNA Ligation Kit	6022	50 회	199,900	160,000
DNA Blunting Kit	6025A	20 회	150,000	120,000
Kilo-Sequence용 Deletion Kit	6030A	5 회	224,400	180,000
Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2	6045	30 회	220,000	176,000
BcaBEST Labeling Kit	6046	40 회	180,000	144,000
MEGALABEL	6070	20 회	180,000	144,000
Cosmid Mapping Kit	6080	50 회	450,000	360,000
Enforcement Cloning System pKF3	6086	10 회	360,000	288,000
Mutan-Express Km Enzyme/Oligo Set	6090	20 회	330,000	264,000
Mutan-Express Km Vector/Host Set	6091		150,000	120,000
Mutan-Super Express Km	RR022	20 회	360,000	288,000
cDNA PCR Library Kit	6119	20 회	200,000	160,000
cDNA Synthesis Kit	6120	RNA 20 μ g분	450,000	360,000
3' -Full RACE core Kit	6121		288,000	230,000
5' -Full RACE core Kit	6122		360,000	288,000
Solid Phase cDNA Synthesis Kit	6123	20 회	500,000	400,000
Competitive RNA Transcription Kit	6125	10 회	129,600	104,000

PCR 용 효소/PCR용 키트

Product	Code	단위	소비자가	할인가
TaKaRa Taq	R001A	250 U	176,000	120,000
TaKaRa Taq	R001B	1,000 U	580,000	456,000
TaKaRa Taq	R001C	3,000 U	1,620,000	1,296,000
TaKaRa Ex Taq	RR001A	250 U	198,000	159,000
TaKaRa Ex Taq	RR001B	1,000 U	680,000	570,000
TaKaRa Ex Taq	RR001C	3,000 U	1,980,000	1,680,000
TaKaRa LA Taq	RR002A	125 U	196,000	157,000
Pyrobest DNA Polymerase	R005A	125 U	170,000	136,000
Premix Taq (TaKaRa Taq Version)	R004A	120 회	144,000	115,000
Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version)	RR003A	120 회	180,000	144,000
TaKaRa PCR Amplification Kit	R011	100 회	336,000	269,000
TaKaRa RNA LA PCR Kit(AMV)	RR012A	50 회	480,000	384,000
TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2	RR013A	50 회	264,000	211,000
TaKaRa LA PCR Cloning Kit	RR015A	10 회	360,000	288,000
TaKaRa LA PCR in vitro Mutagenesis Kit	RR016	10 회	360,000	288,000
Competitive DNA Construction Kit	RR017	10 회	144,000	115,000
TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2	R019A	50 회	360,000	288,000
BcaBEST RNA PCR Kit	RR023A	50 회	324,000	259,000
One Step RNA PCR Kit	RR024A	50 회	360,000	288,000
mRNA Selective PCR Kit	RR025A	50 회	420,000	336,000

FMC Agarose

Product	Code	단위	소비자가	할인가
SeaKem LE Agarose	F50000	125 g	252,000	201,000
SeaKem LE Agarose	F50001	25 g	60,000	48,000
SeaKem ME Agarose	F50010	125 g	285,000	228,000
SeaKem GTG Agarose	F50070	125 g	369,000	295,000
SeaKem GTG Agarose	F50071	25 g	81,000	65,000
NuSieve GTG Agarose	F50080	125 g	483,000	387,000
NuSieve GTG Agarose	F50081	25 g	150,000	120,000
NuSieve 3:1 Agarose	F50090	125 g	462,000	370,000
NuSieve 3:1 Agarose	F50091	25 g	144,000	115,000
SeaPlaque Agarose	F50101	25 g	171,000	137,000
SeaPlaque GTG Agarose	F50110	125 g	852,000	682,000
SeaPlaque GTG Agarose	F50111	25 g	264,000	211,000
SeaKem GOLD Agarose	F50150	125 g	753,000	603,000
MetaPhor Agarose	F50180	125 g	501,000	401,000
MetaPhor Agarose	F50181	25 g	165,000	132,000
Long Ranger 50% Gel Solution	F50611	250 ml	255,000	204,000
MDE Gel Solution	F50620	250 ml	183,000	147,000
SYPRO Red Protein Gel Stain	F50542	10 X 50 μ l	267,000	214,000
SYBR Green I	F50512	1000 μ l	564,000	451,000
SYBR Green I	F50513	500 μ l	300,000	240,000
SYBR Green II	F50522	2 X 500 μ l	564,000	451,000
SYBR Green II	F50523	10 X 50 μ l	300,000	240,000

PCR 기기

Product	Code	단위	소비자가	할인가
Thermal Cycler MP	TP3000	1 대	16,000,000	12,500,000
Thermal Cycler PERSONAL	TP240	1 대	7,000,000	5,500,000

- 현금구매에 한합니다.
- 다른 FMC 제품의 가격에 관하여는 문의하여 주시기 바랍니다.
- 2일 이내에 공급할 수 있으나 일부 상품은 재고 상황에 따라 납품이 다소 늦어질 수도 있습니다.
- 이 행사는 한국 고객을 위하여 TaKaRa 본사의 지원으로 실시합니다.

Cellulose Cartridge Glycan preparation kit

을 이용한 당질의 정제

Cellulose Cartridge Glycan preparation kit

TaKaRa Code 4403

1 Kit

Cellulose Cartridge Glycan preparation kit은 Cellulose Cartridge column을 이용하여 당단백질의 hydrazine 분해물 등에서 협잡물을 제거하여 당쇄분획을 조제하기 위한 kit이다. 본 고에서는 1) 계면활성제를 함유한 효소반응액으로부터 N-glycan의 회수, 2) 당단백질의 pronase 소화물로부터 당 peptide의 회수, 3) 당쇄의 pyridyl amino(PA)화 후 잔존시약의 제거에 본 kit를 이용한 예를 소개한다.

▶ 계면활성제를 함유하는 효소반응액으로부터 N-glycan의 회수

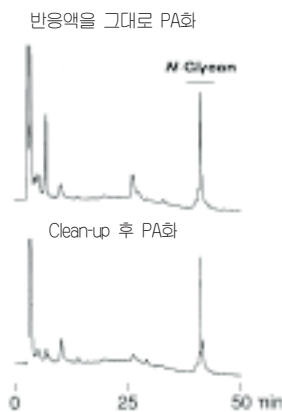
당단백질에 Glycopeptidase F(TaKaRa Code 4450)을 작용하여 N-glycan을 유리한 후 당쇄표식으로 당쇄를 분석하는 경우, 당쇄표식 전에 반응액 속의 염류, 계면활성제를 제거하여야 한다. 종래 사용하던 kit의 protocol에서는 이 전처리에 Cellulose Cartridge를 사용하여도 계면활성제가 cartridge 충전제에 당쇄가 흡착하는 것을 저해하기 때문에 회수율이 좋지 않았었다. 이번엔 이 protocol을 변형시키므로써 계면활성제를 함유하는 반응액에서 당쇄를 고효율로 회수할 수 있게 되었다. 그 실험례를 아래에 소개한다.

25 μ g의 human transferrin을 함유한 25 μ l의 100 mM Tris-HCl(0.1% SDS, 1% NP-40, pH8.6) 완충액에 1 mU의 Glycopeptidase F를 첨가하여 37°C에서 16시간 동안 소화시킨 후, 반응액에서 N-glycan을 Cellulose Cartridge Glycan preparation kit의 개량 protocol에 따라 회수 및 정제하였다. 반응액을 Cellulose Cartridge로 정제한 시료와 정제하지 않은 시료의 일부를 각각 GlycoTAG[®]으로 pyridyl amino(PA)화하고 순상 HPLC로 분석하였다(그림 1). 양자의 N-glycan의 peak 면적을 비교함으로써 당쇄가 정량적으로 회수되었음을 알 수 있었다. 또 여기서는 data를 소개하지 않았으나 N-glycan이 Cellulose Cartridge의 세정분획으로는 누출되지 않았음을 확인하였다.

▶ 당단백질의 pronase 소화물로부터의 당 peptide의 회수

Cellulose Cartridge는 당쇄 뿐만 아니라 당 peptide에도 특이적으로 흡착하기 때문에 당단백질의 pronase 소화물로부터 당 peptide를 간편하게 조제할 수 있다. 그 실험례를 아래에 소개하였다.

각 1 mg(10 mg/ml)의 소의 fetuin 및 ovoalbumin을 각각 pronase로 완전히 소화하였다. Boiling으로 반응을 정지시킨 후 반응액을 Cellulose Cartridge에 걸어, 세정 및 용출하였다. 용출액을 농축한 후 silica gel TLC(BuOH/ AcOH/W, 2/1/2)로 전개하여 Ninhydrin법 및 Orcinol-H₂SO₄법으로 아미노기 및 당을 검출하였다(그림 2). Fetuin 및 ovoalbumin(OVA) 모두 아미노산의 대부분이 세정분획(wash)으로 회수되었다(그림 2a). 한편 당 peptide는 95% 이상이 용출분획(EW)으로 회수되었다(그림 2b). 용출분획에는 약간의 아미노산 및 peptide 성분이 함유되어 있으나 Cellulose Cartridge의 사용으로 당 peptide를 아주 높은 순도로 정제할 수 있었다. 이것은 Cellulose Cartridge가 당질관련 효소의 기질조제나 assay에 유용함을 의미한다.



[HPLC 조건]

Column : PALPAK[®] Type S
Solvent A : CH₃CN/500 mM AcOH-triethylamine (pH7.3), 90/10(v/v)
Solvent B : CH₃CN/500 mM AcOH-triethylamine (pH7.3), H₂O, 50/10/40(v/v/v)
Gradient : 0% Solvent B for 15 min, and 0%-100% Solvent B in 30 min
Flow rate : 1 ml/min
Column Temp. : 40°C
Detection : Fluorescence(Ex.: 310 nm, Em.: 380 nm)

그림 1 Glycopeptidase F 반응액에서 N-glycan의 회수

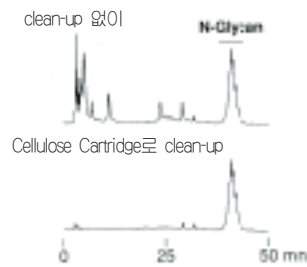


그림 2 Pronase 소화물로부터의 당 peptide의 회수

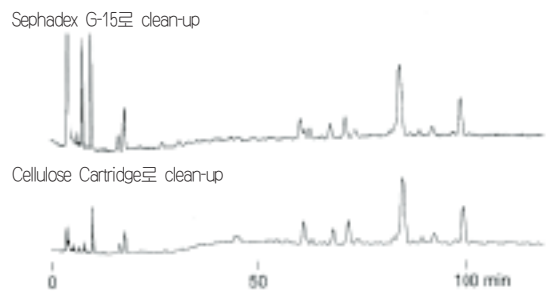
▶ 당쇄의 pyridyl amino(PA)화 후 잔존시약의 제거

GlycoTAG[®]이나 PALSTATION[®]을 이용하여 PA화를 실시하는 경우 여분의 시약의 대부분이 evaporation에 의해 제거되므로 반응 후 순상 HPLC로 직접 분석할 수 있다. 그러나, 역상이나 이온교환 HPLC의 경우에는 잔존시약 유래의 peak가 분석을 방해하므로 확실한 gel 여과나 순상 HPLC 등으로 잔존시약을 완전히 제거해 놓아야 한다. Cellulose Cartridge는 PA화 당쇄도 흡착하므로 PA화 후의 잔존시약을 제거할 때도 이용할 수 있다. 단 pyridyl amino기의 도입으로 당쇄의 성질이 변하므로 통상의 protocol을 약간 변경할 필요가 있다. 그 실험례를 아래에 소개하였다. 소 fetuin의 hydrazine 분해물(5 mg의 단백질에 상당)을 GlycoTAG[®]으로 PA화한 후 반응잔사를 Cellulose Cartridge에 걸고 개량된 kit의 protocol에 따라 세정 및 용출하였다(그림 3). Cellulose Cartridge를 사용함으로써 injection 직후에 보이는 시약 peak를 95% 이상 제거할 수 있었다(그림 3a). 또, Cellulose Cartridge로 정제한 시료의 역상 HPLC profile은 Sephadex G-15를 이용한 gel 투과에 의해 시약을 제거한 시료의 경우와 거의 차이가 없었다(그림 3b).

a. 순상 HPLC



a. 역상 HPLC



[HPLC 조건]

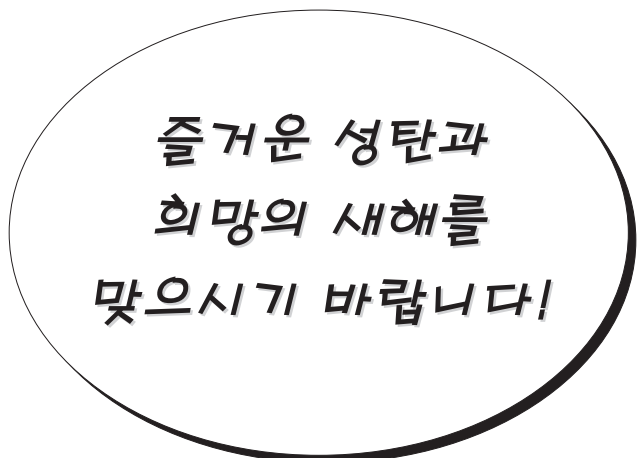
a. 순상 HPLC

Column : PALPAK[®] Type S
 Solvent A : CH₃CN/500 mM AcOH-triethylamine (pH7.3), 90/10(v/v)
 Solvent B : CH₃CN/500 mM AcOH-triethylamine (pH7.3)/H₂O, 50/10/40(v/v/v)
 Gradient : 0% Solvent B for 15 min, and 0%-100% Solvent B in 30 min
 Flow rate : 1 ml/min
 Column Temp. : 40°C
 Detection : Fluorescence(Ex: 310 nm, Em.: 380 nm)

b. 역상 HPLC

Column : PALPAK[®] Type R
 Solvent A : 100 mM AcOH-triethylamine(pH4)
 Solvent B : 0.5% BuOH in Solvent A
 Gradient : 5-65% Solvent B in 120 min
 Flow rate : 1 ml/min
 Column Temp. : 40°C
 Detection : Fluorescence(Ex: 320 nm, Em.: 400 nm)

그림 3 Cellulose Cartridge에 의한 PA화 N-glycan의 clean-up



주요 제한 효소의 Double Digestion용 권장 Universal Buffer

2종류의 제한효소로 동시에 기질 DNA를 절단하는 double digestion은 시간을 절약하는 방법으로서 일반적으로 이용되고 있다. TaKaRa는 Universal Buffer를 공급함과 동시에 각 효소마다 사용하는 Universal Buffer의 상대활성을 표시하고 있지만, 그 중에는 double digestion에 사용하는 Universal Buffer의 선택이 곤란한 조합이 있다. 아래의 도표에 pUC계 plasmid의 cloning site에 절단부위를 가지는 효소를 중심으로 double digestion에 최적인 Universal Buffer 조건을 나타내었다. 도표 내용중 Universal Buffer의 앞에 기재한 [숫자×]는 각 buffer의 최적농도를 의미한다. Universal Buffer는 모두 10× 농도로 공급하므로 0.5×는 20배, 1×는 10배, 2×는 5배로 희석하여 사용해야 한다. 또 BSA도 10× 농도(0.1%)이므로 10배로 희석하여 최종농도가 0.01%가 되도록 사용하여야 한다.

Enzyme	AccI	BamH I	EagI II	Cla I	EcoR I	EcoR V	Hinc II	Hinc III	KpnI	NcoI	NdeI	PstI	PvuI	SacI	SalI	SmaI	SpeI	SphI	XbaI	XhoI
첨부 Buffer	10×M	10×K	10×H	10×M	10×H	10×H	10×M	10×M	10×L	10×K +BSA	10×H	10×H +BSA +100%	10×H	10×K +BSA	10×L	10×H	10×M	10×H	10×M +BSA	10×H
AccI	-	0.5×K	1×H	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×M	1×M +BSA	1×H	0.5×K +BSA	1×M	0.5×K	1×M	1×H	1×M	1×M	1×M	1×M
BamH I	0.5×K	-	1×K	1×K	1×K	1×K	0.5×K	1×K	0.5×K	1×K +BSA	1×K	0.5×K +BSA	1×K	1×K	0.5×K	15×T	1×K	1×K	0.5×K	1×K
EagI	1×T	1×K		1×H	1×H	1×H	2×K	1×K	1×T	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	0.5×K	1×H	1×H	1×H	2×T	1×H
ClaI	1×M	1×K	1×H	-	1×T	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T	1×M	1×H	1×M
FonR I	1×M	1×K	1×R	1×H	-	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T	1×M	1×H	1×M
EcoR V	0.5×K	1×K	1×R	1×H	1×T	-	2×T	1×K	0.5×K	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	0.5×K	1×H	0.5×K +BSA	1×H	1×H	2×T
Hinc II	1×M	0.5×K	2×K	1×M	1×M	2×T	-	1×M	1×M	1×M +BSA	1×T	0.5×K +BSA	1×M	0.5×K	1×M	15×K	1×M	2×T	1×M	1×M
Hinc III	1×M	1×K	1×K	1×M	1×M	1×K	1×M	-	1×M	1×K +BSA	1×K	0.5×K +BSA	1×M	1×K	1×M	10×K	1×M	1×K	1×M	1×M
KpnI	1×M	0.5×K	1×H	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	-	0.5×K +BSA	1×T	0.5×K +BSA	1×M	0.5×K	1×L	15×T	1×M	1×M	1×M	1×M
NcoI	1×M +BSA	1×K +BSA	1×K +BSA	1×K +BSA	1×K +BSA	1×K +BSA	1×M +BSA	1×K +BSA	0.5×K +BSA	1×K +BSA	0.5×K +BSA	1×K +BSA	1×K +BSA	0.5×K +BSA	15×T +BSA	1×T +BSA	1×K +BSA	1×H +BSA	1×M +BSA	1×K +BSA
NdeI	1×T	1×K	1×H	1×H	1×T	1×H	1×T	1×K	1×T	1×K +BSA	-	1×H +BSA	1×H	1×K	1×T	1×H	1×H	1×H	1×T	1×H
NntI	0.5×K +BSA	0.5×K +BSA	1×H +BSA	1×H +BSA	1×T +BSA	1×H +BSA	0.5×K +BSA	0.5×K +BSA	0.5×K +BSA	0.5×K +BSA	1×H +BSA	-	1×H +BSA	2×K +BSA	0.5×K +BSA	1×H +BSA	0.5×K +BSA	1×H +BSA	1×H +BSA	0.5×K +BSA
PstI	1×M	1×K	1×H	1×H	1×T	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	-	1×K	1×M	1×H	0.5×T +BSA	1×H	1×H	1×M
PvuI	0.5×K	1×K	1×K	1×K	1×K	1×K	0.5×K	1×K	0.5×K	1×K +BSA	1×K	2×K +BSA	1×K	-	0.5×K	15×K +BSA	1×K +BSA	1×K	1×K	0.5×K
SacI	1×M	0.5×K	0.5×K	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×L	0.5×K +BSA	1×T	0.5×K +BSA	1×M	0.5×K	-	15×T	1×M	1×M	1×M	1×M
SalI	1.5×T	15×T	1×H	1×H	1×T	1×H	1.5×K	1.5×K	15×T	1.5×T	1×H	1×H +BSA	1×H	1.5×K +BSA	1.5×T +BSA	-	1.5×T +BSA	1×H	1×H	1.5×T
SmaI	1×T +BSA	0.5×T +BSA	1×T +BSA	1×T +BSA	1×T +BSA	0.5×K +BSA	1×T +BSA	1×T +BSA	1×T +BSA	1×T +BSA	1×T +BSA	0.5×T +BSA	1×K +BSA	1×T +BSA	15×T +BSA	1×T +BSA	-	1×T +BSA	0.5×T +BSA	1×T +BSA
SpeI	1×M	1×K	1×H	1×M	1×T	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T +BSA	-	1×H	1×M
SphI	0.5×K	1×K	1×H	1×H	1×T	1×H	2×T	1×K	0.5×K	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	0.5×K	1×H	0.5×T +BSA	1×H	-	2×T
XbaI	1×M	0.5×K	2×T	1×M	1×M	2×T	1×M	1×M	1×M	1×M +BSA	1×T	0.5×K +BSA	1×M	0.5×K	1×M	15×T	1×T +BSA	1×M	2×T	-
XhoI	1×M	1×K	1×H	1×H	1×T	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K +BSA	1×H	1×H +BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T +BSA	1×H	1×H	1×M

- 주 1) 1 μg DNA/50 μl 반응액에 대하여 10 U의 각 효소를 첨가한 후 37°C에서 1시간동안 반응하므로써 완전분해함을 확인하고 있다.
- 주 2) 반응액 중의 glycerol 농도는 Star활성을 가능한 한 억제하기 위해 10% 이하로 사용한다.
- 주 3) DNA의 종류나 고차구조, 인식절단 부위가 근접하는 경우 등은 완전분해할 수 없는 경우도 있다.

NEW

Rat cDNA Library

Plasmid DNA형
재조합 균체형

5 μ g
500 μ l \times 2

Rat cDNA Library 신 발매 !!

발매 이래 호평을 받고 있는 human 및 mouse cDNA library에 이어 Rat cDNA Library를 새로 발매하여 TaKaRa cDNA Library Series의 선택의 폭이 한층 넓어졌다.

▶ 개요

새로 발매하는 Rat cDNA Library는 기존의 cDNA Library와 같이 10종류의 각종 장기 유래의 poly(A)⁺ RNA로부터 Linker-Primer법¹⁾을 기본으로 제작한 것이다(제작법의 개요 및 특징에 대해서는 본지 6호 p.31을 참조).

▶ 각종 Rat cDNA Library의 품질

각종 Rat cDNA Library의 품질에 대하여 표 1에 나타내었다. 모든 library에 대해서 insert DNA를 확인하고 있다. 또한 각 cDNA Library의 재조합균체 1 μ l 및 plasmid DNA 10 ng을 주형으로 하는 PCR에 의해 아래의 세 종류의 cDNA를 증폭하여 검출한다.

- 1) β -actin(발현량 high level)
- 2) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
(발현량 moderate level)
- 3) Transferrin receptor(발현량 low level)

▶ 제품내용

A. Plasmid DNA형:

용량 : 5 μ g

형상 : 10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA

B. 재조합 균체형:

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

Host strain : XL1-Blue MRF⁷

형상 : SOB-20% glycerol

cDNA library의 제작을 위한 연구지원서비스도 실시하고 있습니다.
당사로 문의해 주시기 바랍니다.

Tel. 02-577-2002

Fax. 02-577-3691

▶ 참고문헌

- 1) H. Nozima 등 (1994) 실험의학별권 바이오매뉴얼시리즈 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* 3, 459-475.

표 1 각종 Rat cDNA Library의 품질

cDNA Library	TaKaRa Code		poly(A) ⁺ RNA Source	Primary Library Size (Independent Clone)	Amplified Library Titer(cfu/ml)	Cloning후 Average Insert Size(kbp)
	Plasmid DNA형	재조합균체형				
Rat Brain	9539	9639	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, adult	3.3×10^6	3.6×10^6	1.6
Rat Heart	9540	9640	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks	4.9×10^6	5.2×10^6	1.4
Rat Kidney	9541	9641	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 8-12 weeks	6.0×10^6	1.7×10^6	1.3
Rat Liver	9542	9642	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks	6.1×10^6	2.6×10^6	1.2
Rat Lung	9543	9643	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks	7.2×10^6	9.7×10^7	1.4
Rat Retina	9544	9644	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks Tissue: Eye	5.3×10^6	2.1×10^6	1.4
Rat Skeletal Muscle	9545	9645	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks	5.1×10^6	1.9×10^6	1.1
Rat Smooth Muscle	9546	9646	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks Tissue: Small Intestine	6.5×10^6	1.7×10^6	1.0
Rat Spleen	9547	9647	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks	5.2×10^6	2.2×10^6	1.2
Rat Testis	9548	9648	pooled from 100 Sprague-Dawley outbred males, ages 10-11 weeks	5.6×10^6	3.5×10^6	1.1

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) Cloning후의 Average Insert Size : 무작위로 선별한 15개 colony의 insert size의 평균치

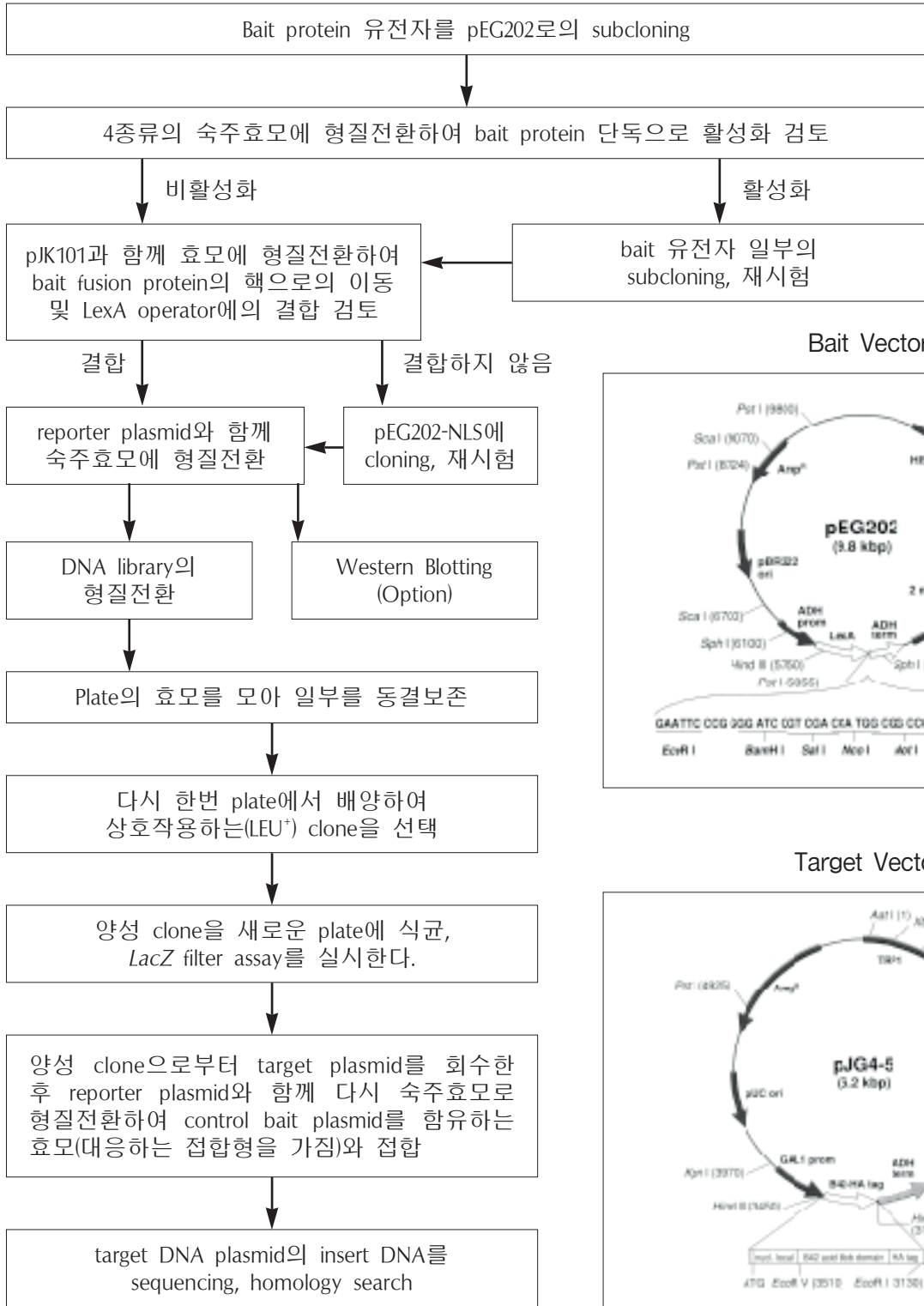


DupLEX-A™ Yeast Two-Hybrid System

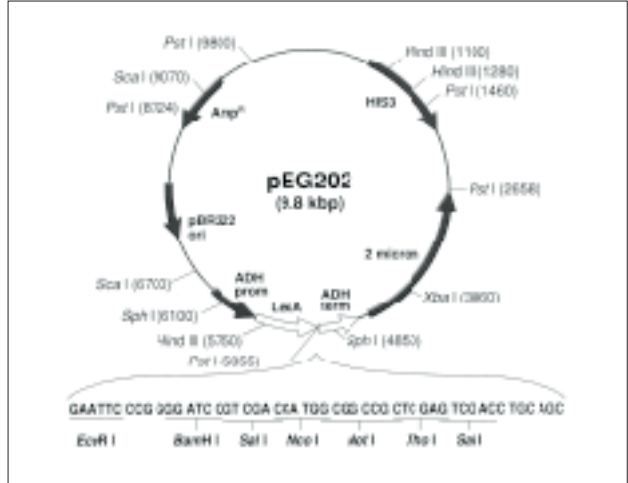
OriGene Technologies사의 제품입니다.

“DupLEX-A™” system은 LexA를 이용한 Yeast Two-Hybrid System이다. 본 시스템은 종래의 system보다 사용범위가 넓고, 보다 정확하며 또 target protein의 발현조절이나 결합조절이 가능하다는 점 등 많은 잇점이 있다.

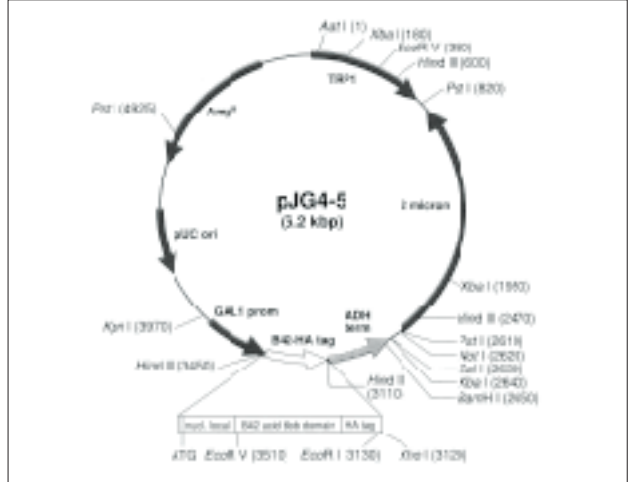
▶ “DupLEX-A™” Yeast Two-Hybrid System을 이용한 각종 실험의 flow-chart



Bait Vector



Target Vector



▶ 제품일람

제품명	Description	TaKaRa Code	포장량
DupLEX-A™ Complete kit	Contains all items listed below	GN001	1 kit
Carrier DNA	Required for high efficiency yeast transformation	GN003	50 mg
5' bait primer	Primer for sequencing vector-insert junction in pEG202	GN004	10 µg
5' target primer	Primer for PCR and sequencing in pJG4-5	GN005	10 µg
3' target primer	Primer for PCR and sequencing in pJG4-5	GN006	10 µg
숙주균	EGY48(<i>S. cerevisiae</i>)	GN010	1 ml
	EGY194(<i>S. cerevisiae</i>)	GN011	1 ml
	EGY188(<i>S. cerevisiae</i>)	GN012	1 ml
	EGY40(<i>S. cerevisiae</i>)	GN013	1 ml
	RFY206(<i>S. cerevisiae</i>)	GN014	1 ml
	KC8(<i>E. coli</i>)	GN015	1 ml
plasmid	pEG202	GN020	10 µg
	pEG202-NLS	GN021	10 µg
	pJG4-5	GN022	10 µg
	pJG4-6	GN023	10 µg
	pSH18-34	GN024	10 µg
	pJK103	GN025	10 µg
	pRB1840	GN026	10 µg
	pJK101	GN027	10 µg
	pSH17-4	GN028	10 µg
	pRHF1	GN029	10 µg
	pLexA-Max	GN030	10 µg
	pNLexA	GN031	10 µg
	pBAIT	GN032	10 µg
	pTARGET	GN033	10 µg
	pGilda*	GN034	50 µg

*의 제품은 DupLEX-A™ Complete kit(TaKaRa Code GN001)에 포함되어 있지 않다.

▶ Target Gene cDNA Library

	RNA Source	TaKaRa Code	
HUMAN	Human Liver Adult	GN100	
	Human Fetal Brain* ¹ 22 week, Frontal Cortex	GN101	
	Human Lung Fibroblast* ¹ WI-38 Cell Line Serum-starved	GN102	
	HeLa Cell* ¹	GN103	
	Human PBL(Peripheral Blood Leukocyte)	GN104	
	Human Fetal Liver	GN105	
	Human Fetal Kidney	GN106	
	Jurkat T-cell	GN115	
	Human Ovary Adult	GN114	
	SKOV3 cell Ovarian Cancer Cell line	GN111	
	Human MG63 cell(osteosarcoma)	GN118	
	MOUSE	Mouse Brain Adult	GN119
		Mouse Spleen Adult	GN120
		Mouse Liver Adult	GN121
Mouse Ovary Adult		GN122	
Mouse Embryo Whole(Day 19)		GN128	
RAT	Rat Thymus Adult	GN129	
	Rat Testis Adult	GN130	
	Rat Brain Adult	GN131	
	Rat Adipocyte 9 week old Zucker rat	GN132	
OTHER	<i>C. elegans</i> Adult	GN133	
	<i>D. melanogaster</i> Adult	GN134	
	MDBK Cell Bovine Kidney	GN135	
	<i>S. cerevisiae</i> * ³ Genomic	GN136	
PROSTATE-SPECIFIC	Human Prostate, Normal Pooled from 8 adults	GN107	
	Human Prostate, Tumor Pooled from 8 adults	GN108	
	LNCaP Cell Untreated	GN109	
	LNCaP Cell Treated with 30 nM R1881(synthetic androgen)	GN110	
	Mouse Prostate, Normal	GN123	
BREAST-SPECIFIC	MCF7 Cell Estrogen-Depleted	GN112	
	MCF7 Cell Serum-grown	GN117	
	MCF7 Cell Estrogen-treated	GN113	
	SKBR3 Cell Estrogen-receptor negative	GN116	
	Mouse Breast, Normal Virgin	GN126	
	Mouse Breast, Normal Pregnant(Day 12)	GN127	
	Mouse Breast, Normal Lactating	GN124	
	Mouse Breast, Normal Involuting	GN125	

*1 The libraries have been amplified an additional time, and DNA has been purified from the re-amplified cells.

*2 The size range of the inserts is calculated by performing restriction digests of plasmid DNA from 48 colonies for each library.

*3 The *S. cerevisiae* library is from strain S288C, with inserts cloned into *Eco*R I site of the pJG4-5 vector. Please note that smaller inserts are more informative than larger inserts in the yeast two-hybrid system screen. Even so, there are larger inserts present in these libraries.

사용 vector : pJG4-5

포장량 : 100 µg (Plasmid DNA) ; 1 ml (재조합균체)

▶ 참고문헌

- 1) Gyuris, J., Golemis, E. A., Chertkov, H. and Brent, R. (1993) *Cell* **75**, 791-803.
- 2) I. Kato 감역 (1997) [DNA cloning 2] (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) p175
- 3) Bartel, P. L., and Fields, S., eds. (1997) *The Yeast Two-Hybrid System*. Oxford University Press.



Active EGF receptor EIA Kit(Precoated)

TaKaRa Code MK119

96회

EGF receptor의 기능해석, signal 동태의 연구에 !!

EGF receptor(상피 증식인자 수용체)는 생체내에서의 신호전달에 중요한 역할을 담당하며, EGF가 결합함으로써 자기인산화가 촉진되면 표적단백질을 연속적으로 인산화하면서 신호를 전달하는 것으로 추정하고 있다. Active EGF receptor EIA Kit은 인산화된 EGF receptor를 ELISA법에 의해 특이적으로 정량하는 kit으로서 인산화 신호의 수식화를 가능하게 할 뿐만 아니라 EGF receptor에 특이적인 inhibitor의 screening에도 유용하다.

▶ Kit의 내용 (96회)

Anti-human EGF receptor monoclonal Ab(B4G7)를 고정화시킨 96 well 분리형 microtiter plate	8 well × 12
POD 표식-anti-phosphotyrosine Ab(PY20)(동결건조품)	11 ml용 × 1
천연 human EGF receptor 함유 표준품(동결건조품)	1 ml용 × 1
시료희석액	11 ml × 2
발색시약(TMBZ)	12 ml × 1
반응정지액(1 N H ₂ SO ₄)	12 ml × 1
receptor 추출용 완충액	11 ml × 1

▶ EGF receptor에 대하여

EGF receptor(상피 증식인자 수용체)는 분자량 130 kDa의 단백질(1186개의 아미노산으로 구성)에 분자량 40 kDa의 당쇄가 부가된 당단백질로서 EGF 및 TGF α 의 결합부위가 존재하는 extracellular domain(당쇄가 부가된 domain), transmembrane domain 그리고 세포내에 위치하는 tyrosine kinase domain(암유전자 *v-erbB*의 산물과 상동성을 가지는 것으로 알려져 있다) 및 그 C말단의 자기인산화 부위로 구성되어 있다¹⁾.

EGF가 세포막의 EGF receptor에 결합하면 몇 시간후에 염색체 DNA의 복제가 개시되어 세포분열이 일어난다. 이 과정에서 세포막에서는 rackling, EGF receptor의 인산화 및 internalization 등이 일어나고 세포내에서는 이온이나 pH의 급속한 변동, 다양한 생화학적 반응을 매개하는 효소의 활성화 및 actin filament의 재구성, *c-fos*, *c-myc* 등의 proto oncogene의 발현 유도 등이 일어난다. 이러한 일련의 반응이 receptor의 자극에 의해 일어나는 것인지는 현재까지 명확하게 규명되지는 않았지만 EGF의 결합자극에 의해 EGF receptor의 자기인산화가 촉진되면 표적단백질의 인산화를 유도하여 인산화 cascade 반응이 개시되는 것으로 추정되고 있다^{2, 3)}.

막의 EGF receptor는 약 20시간의 반감기로 대사회전을 하고 있지만 EGF와 결합하여 internalization을 받으면 수 배의 속도(약 5시간)로 분해되는 것으로 알려져 있다⁴⁾. EGF receptor의 연구에 널리 이용되고 있는 상피암 유래의 세포

주 A431은 통상의 세포보다 5~10배 더 많은 receptor(2~3 × 10⁶개/세포)를 갖는다.

▶ 측정원리

Anti-EGF receptor antibody로 검체 중의 EGF receptor를 활성화시킨 후 표식한 anti-phosphotyrosine antibody로 receptor내의 phosphotyrosine 잔기를 검출한다.

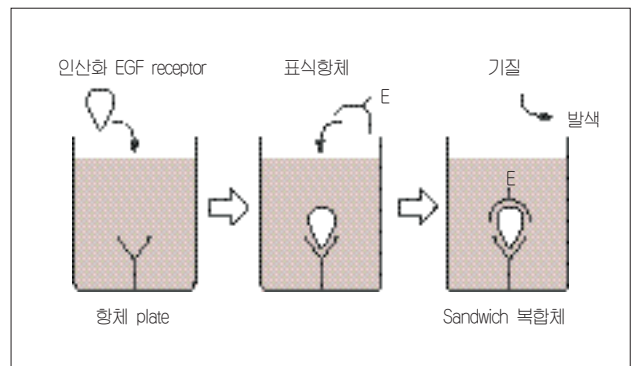


그림 1 Anti-EGF receptor antibody를 이용한 측정원리

▶ 항체의 특이성

1차항체(Anti-EGF receptor antibody B4G7; TaKaRa Code M059)

B4G7 항체⁵⁾는 human EGF receptor 내 EGF-binding domain의 polypeptide를 인식한다. 생세포의 EGF receptor에는 고친화성(high-affinity)과 저친화성(low-affinity)의 receptor가 존재하는 것으로 알려져 있으나 이 항체는 저친화성 형태의 receptor와 반응한다. 그러나, 막 표품이나 가용화 분획은 양쪽 모두에 반응한다. 또 생세포의 저친화성 형태의 receptor에 대한 EGF의 결합을 저해하지만 DNA의 합성촉진 또는 저해작용은 없다. A431 세포추출물을 본 항체로 immunoprecipitation한 실험에서 분자량 170 kDa과 160 kDa의 receptor 단백질이 특이적으로 침전함을 확인하였다.

2차항체-효소표식물(anti-phosphotyrosine antibody PY20-HRP ; TaKaRa Code M141)

PY20항체는 phosphotyrosine에만 특이적으로 반응하고 phosphoserine 및 phosphothreonine과는 교차반응을 일으키지

않는다⁶⁾. 또 동물중에 관계없이 phosphotyrosine에 특이적으로 반응하고 탈인산화된 tyrosine에 대해서는 반응하지 않음을 확인하였다. 그리고 A431 세포추출물의 B4G7항체에 의한 면역침강물에 대한 반응실험에서 PY20항체는 170 kDa의 phosphotyrosine receptor만을 인식한다는 결과를 얻었다. 160 kDa의 receptor는 170 kDa receptor의 protease 분해물이라 생각한다⁵⁾.

▶ EGF receptor의 구조와 인산화된 아미노산의 종류 및 위치

EGF receptor에 있어서 인산화된 아미노산(T, S, Y)의 존재 위치는 그림 2에서처럼 자기 인산화 부위에 집중되어 있다. receptor가 EGF를 수용하면 receptor의 자기 인산화가 촉진되고 이것으로부터 표적단백질의 인산화가 진행되면서 연쇄적인 인산화 반응이 일어나 신호가 전달되는 것으로 추정한다. Shimizu 등은 EGF receptor를 다량발현하는 NA세포를 EGF와 H₂O₂로 각각 자극한 후 receptor내의 인산화된 아미노산의 위치를 인산화 peptide mapping 법으로 상세히 분석하였다⁷⁾. 이에 따르면 무자극의 NA세포에서는 T⁶⁶⁹, S¹⁰⁴⁶, S¹⁰⁴⁷에서, EGF로 자극한 NA세포에서는 S⁶⁷¹, T⁶⁶⁹, S¹⁰⁴⁶, S¹⁰⁴⁷, Y¹¹⁷³에서, 그리고 H₂O₂로 자극한 경우는 T⁶⁵⁴, T⁶⁶⁹, Y¹¹⁷³과 기타 세 개의 Y아미노산에서 인산화가 일어났다. 이처럼 EGF 자극에 의한 EGF receptor 내의 자기인산화 부위 중 tyrosine 잔기에서의 인산화가 특히 많이 일어남을 알 수 있었다.

▶ 검체의 조제방법

접착세포 A431을 검체로 하는 경우

- (1) A431세포를 직경 90 mm의 사알레에서 포화상태(평균 세포수 : 1×10^7 cells)까지 배양한다.
- (2) 배양상청을 제거한 후 1 ml의 receptor 추출용 완충액을 첨가하여 세포를 rubber policeman으로 긁어 모아 1.5 ml 원심튜브에 회수한다.

- (3) 탁상원심분리기를 이용하여 4°C, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포불용물을 침전시킨다.
- (4) 추출상청을 모아서 검체로 사용한다.

A431세포는 EGF receptor를 많이 발현하고 있으므로 이 검체의 경우 10~50배 정도 희석해 줄 필요가 있다. 기타 다수의 세포들은 이 방법으로 조제한 검체를 희석하지 않고 그대로 사용할 수 있는 경우가 많다.

▶ 부유세포의 경우

- (1) 배양한 부유세포를 원심분리하여 모은다.
- (2) 침전세포에 receptor 추출용 완충액을 적당량 첨가하여 현탁한 후 탁상원심분리기로 4°C, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포불용물을 침전시킨다.
- (3) 추출상청을 모아서 검체로 사용한다.

검체는 측정시에 조제하도록 한다. 계속 보존을 해야하는 경우는 -80°C에서 동결보존한다.

사람의 혈청 및 혈장검체는 검체를 그대로 또는 2배 희석하여 사용하는 것이 적당하다.

▶ 측정성능

EGF receptor가 EGF 이외의 미지의 자극을 받는 경우에는 receptor상의 복수의 위치에서 tyrosine이 인산화될 가능성이 있다(EGF 자극시에는 Y1173만 인산화된다). 따라서 표준품의 단위는 EGF receptor 자체의 mol 농도가 아니라 EGF receptor 내의 phosphotyrosine의 mol 농도로서 표시한다.

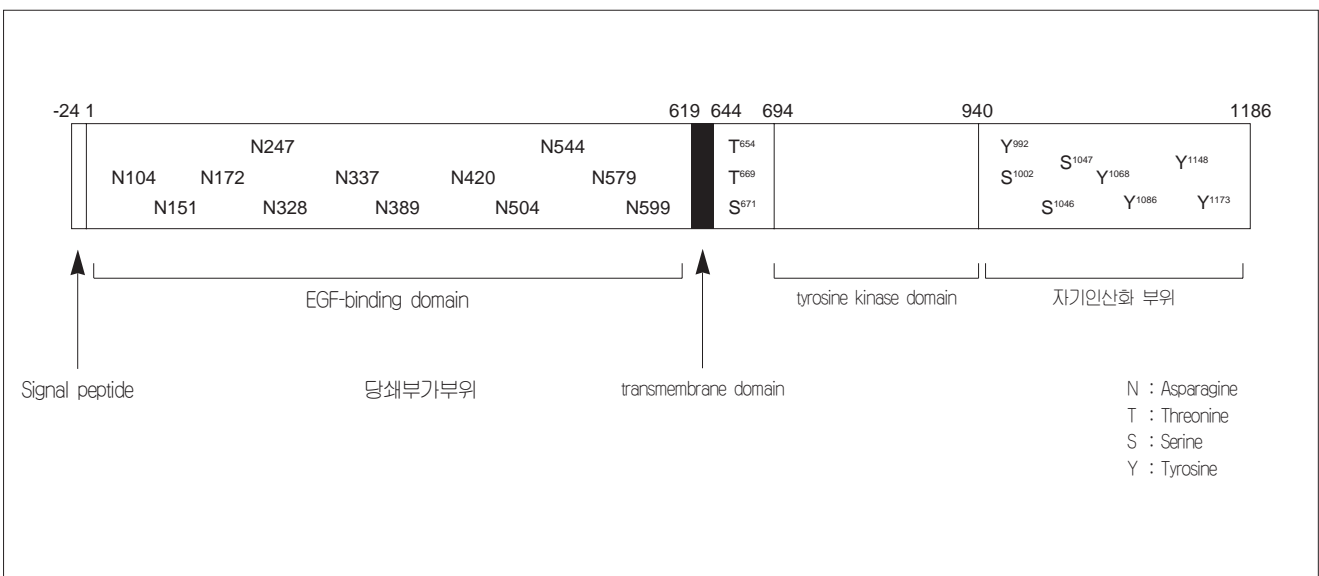
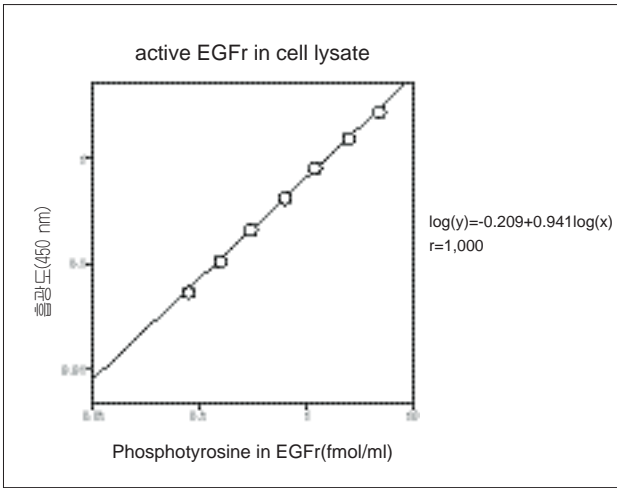


표 2 인산화되는 아미노산의 종류와 위치

(1) 표준곡선

대표적인 예를 아래에 나타냈지만 측정별로 표준곡선을 작성해야 한다.

최소검출농도 0.1 fmol/ml



Phosphotyrosine in EGFR(fmol/ml)	0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.50	5.00
흡광도(450 nm)	0.054	0.106	0.215	0.404	0.779	1.443	2.727

(2) 재현성

동시재현성 : 3농도로 n=16에서 실시할 때 CV 4.8~5.9%

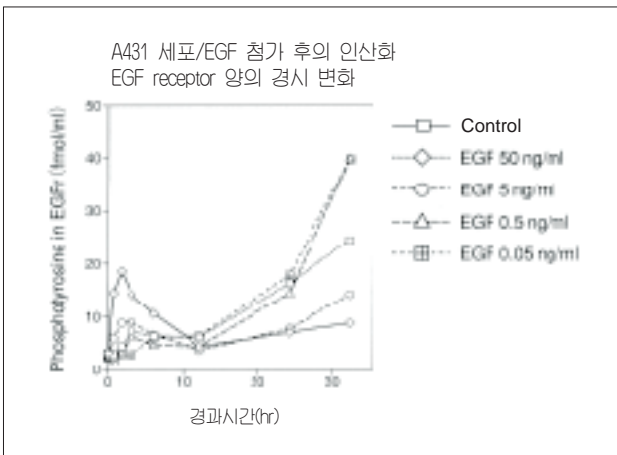
일차재현성 : 3농도로 3일간 측정할 때 CV 3.4~5.0%

(3) 첨가회수율

94.5~109.1%

▶ 측정례 1

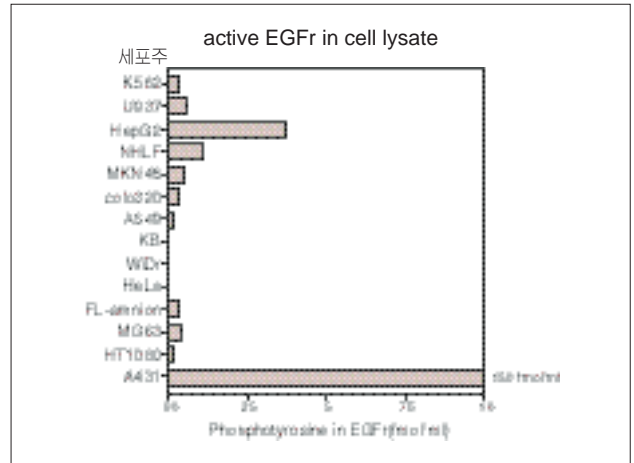
A431세포(EGF receptor 고발현세포)에 다양한 농도의 EGF를 첨가하여 경시적으로 세포를 회수한 후 그 세포추출액을 조제하여 인산화 EGF receptor를 정량하였다. receptor를 과잉생산하는 세포주에 EGF를 특정 농도 이상 첨가하면 세포 증식이 역으로 저해된다는 보고^{8,9)}가 있지만 인산화된 EGF receptor의 양적 변화에도 그러한 경향을 나타내는 것 같다.



▶ 측정례 2

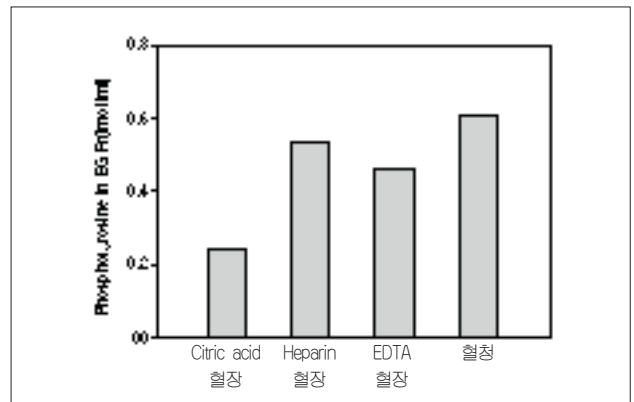
각종 배양 세포주에서 세포추출액을 조제하여 인산화 EGF receptor의 양을 측정하였다. 모든 경우에서 10⁶개의 세포를 1 ml의 receptor 추출용 완충액으로 용해하여 그 상청액 100

μl를 정량에 사용하였다. EGF receptor를 다량으로 발현하는 A431세포의 추출액에서는 다른 세포주들과 비교할 수 없을 정도로 많은 인산화 EGF receptor가 검출되었다. 또 표에는 나타나지 않았지만 A431세포의 배양상청액에서는 인산화 EGF receptor가 전혀 검출되지 않았다.



▶ 측정례 3

사람의 혈액시료로 인산화 EGF receptor를 정량할 수도 있다. 보존조건(항응고제의 유무와 종류)이 다른 동일한 사람의 혈액시료를 각각 검체로서 이용한 경우의 정량값을 비교한 예를 아래에 나타내었다. Citrate를 처리한 혈장에서의 값이 가장 낮게 나타났다. 복수의 검체를 모아서 측정하는 경우는 혈청원액을 검체로서 이용하면 된다.



▶ 참고문헌

- Hunter, T. (1984) *Nature* **311** (4), 414-416.
- N. Shimizu (1993) *일본임상* **50**, 193-200.
- Shimizu, N. (1992) *Implications for Diagnosis and Treatment*. New York. Marcel Dekker, p. 137-158.
- Gamou, S., Shimagaki, M., Minoshima, S., Kobayashi, M. and Shimizu, N. (1989) *Cell Res.* **183**, 197-206.
- Behzadian, M. A. and Shimizu, N. (1985) *Cell Structure and Function* **10**, 219-232.
- Glenney, J. et al. (1988) *J. Immunol. Methods* **109**, 277-285.
- Gamou, S. and Shimizu, N. (1995) *FEBS Lett.* **357**, 161-164.
- Barnes, D. (1982) *J. Cell Biol.* **93**, 1-4.
- Hirai, M., Gamou, S., Minoshima, S. and Shimizu, N. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 791-799.

NEW

세포 동결 보존용 배지 Cellvation™

TaKaRa Code CL001

60 ml

Celox laboratories사의 제품입니다.

DMSO, 혈청을 함유하지 않는 세포동결 보존용 배지

종래 동물세포의 동결보존에는 cryoprotectant(동결보존제)로서 DMSO나 glycerol 등의 세포내 동해방지제 또는 hydroxyl starch(HES)와 같은 세포외 동해방지제가 사용되어 왔었다. 그러나 DMSO나 혈청을 사용하는 방법은 많은 단점을 가진다. 특히 호평을 받고 있는 Celox사의 Cellvation은 혈청이나 DMSO를 함유하지 않으므로 세포독성 등에 대한 염려없이 세포를 보존할 수 있는 새로운 형태의 동결보존용 배지이다. 또 용해 후 세포의 세정조작이 필요 없으므로 귀중한 연구시간도 절약할 수 있다. 본 고에서는 Cellvation™으로 동결보존에 성공한 세포의 예를 소개한다.

▶ 특징

- 혈청 및 DMSO를 함유하지 않는다.
- Program freezer가 필요 없다.
- Ready-to-use 형태
- 양호한 생존율
- 용해 후의 세포세정이 필요 없다.
- 세포표면 수용체나 항원단백질의 발현에 영향이 없다.
- 세포분화 및 apoptosis에 영향이 적다.
- 용해 후 세포가 기질에 빨리 정착한다.

▶ Cellvation™을 사용하여 동결보존에 성공한 세포의 예

아래의 표에 나타난 것처럼 다양한 세포에서 Cellvation™의 유효성이 확인되었다.

그 외에도 조혈모세포나 이식세포, CTL 세포, 유전자 도입 세포등의 보존에도 적용할 수 있을 것이다.

표 Cellvation™을 사용하여 동결보존에 성공한 세포의 예

Cell Type	Description
293	Transformed Primary Embryonal Kidney, Human
3T3	Embryonic Fibroblast, Mouse
6LBLN	Lymph node, Ca., Bovine
A-375	Malignant Melanoma, Human
A549	Lung Carcinoma, Human
B16BL6	Melanoma, Mouse
B16F10	Melanoma, Mouse
C2C12	Muscle, Mouse
C3H-10T1/2	Embryonic Fibroblast, Mouse
CB	Aorta Endothelial, Bovine (primary)
CHO-K1	Ovary, Chinese Hamster
CPA-47	Pulmonary Artery, Bovine
CPAE	Pulmonary Artery Endothelium, Bovine
CRFK	Kidney, Feline
D283 Med	Medulloblastoma, Human
Daoy	Medulloblastoma, Human
DU 145	Carcinoma, Prostate, Metastasis to Brain, Human
EBTr	Embryonic Trachea, Bovine
EJG	Capillary Endothelium, Bovine
EL4	Lymphoma, Mouse
HCT116	Colon, Carcinoma, Human
HeLa	Epitheloid Carcinoma, Cervix, Human
HEp-2	Epidermoid Carcinoma, Larynx, Human
Hu355	Hybridoma, Human
IC-21	Macrophage, Mouse
JB6 C1 30-7b	Epidermis Tumor, Mouse
JB6 C1 41-5a	Epidermis Tumor, Mouse
L8	Muscle, Rat
LB9.K	Kidney, Normal, Bovine
LLC-PK1	Kidney, Pig
LNCaP	Metastatic Prostate Adenocarcinoma, Human

Cell Type	Description
LS180	Colon, Adenocarcinoma, Human
MCF 10	Mammary Gland, Human
MDBK	Kidney, Bovine
MDCK	Kidney, Canine
MRC-5	Embryonal Lung, Diploid, Male, Human
NCI-H69	Small Cell Lung, Carcinoma, Human
NSC-34	Neuroblastoma, Mouse
NSO	Myeloma, Mouse
NRK	Myeloma, Mouse
P3/NSI/1-Ag4-1	Non-secreting Myeloma, Mouse(NS-1)
P388D1	Monocyte-Macrophage, Mouse
PC-3	Prostate Adenocarcinoma, Human
PC12	Adrenal Pheochromocytoma, Rat
Primary	Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cells, Human
Primary	Lymphocytes, Human
PU5-1.8(PU5-1R)	Monocyte-Macrophage, Mouse
QM7	Muscle, Quail
QT6	Fibrosarcoma, Quail
Raji	Burkitt Lymphoma, Human
Rat2	Embryo, Thymidine Kinase Mutant, Rat
RAW 264.7	Monocyte-Macrophage, Mouse
RMO	Myoblast, Rat
RPC5.4	Secreting Myeloma, Mouse
RT 101	Epidermis Tumor, Mouse
SF	Foreskin, Human
Sp2/0-Ag14	Hybridoma, Non-secreting, Mouse
ST	Fetal Testis, Porcine(primary)
ST486	Burkitt's Lymphoma, Human
U-937	Histiocytic Lymphoma, Human
Vero	Kidney, African Green Monkey
ZF4	Embryonic Fibroblastic Cells, Zebra Fish

NEW

CTL 유도실험용 종양관련 항원 Peptide

MAGE1.135 (9) (HLA-A24)
MAGE3.195 (9) (HLA-A24)
CEA.652 (9) (HLA-A24)

TaKaRa Code SP201 0.5 mg
TaKaRa Code SP202 0.5 mg
TaKaRa Code SP203 0.5 mg

최근 Killer T-세포(CTL)에 인식되는 종양관련 항원 단백질이나 바이러스 단백질 유래의 항원 peptide가 계속해서 동정되고 있다. 게다가 일본인의 60% 이상이 가지는 HLA-A24에 제시되는 항원 peptide에 대해서도 몇 가지 보고되었다. 이러한 항원 peptide에 대한 CTL을 유도하고 분석실험을 하기 위해서는 고순도의 peptide를 안정되게 입수할 수 있는지의 여부가 중요하다. 금번 TaKaRa는 종양관련 항원 peptide에 대한 CTL유도실험을 보다 많은 연구자 여러분께서 실시할 수 있도록 CTL 유도실험용의 고순도로서 endotoxin-free(0.05 ng/vial)의 HLA-A24 결합성 항원 peptide [MAGE1.135 (9), MAGE3.195 (9), CEA.652 (9)]를 발매하였다. 이들은 최근 항원 peptide로서 학회지 및 과학지에 보고된 것이므로 CTL의 유도 및 해석실험에 적절히 사용할 수 있다.

▶ 서론

CTL은 MHC class I 분자에 결합한 9~10 mer의 peptide를 인식하여 그 세포 상해성을 발휘한다. 최근, 종양세포에는 각종의 종양항원 단백질들이 발현되고 있는 것으로 밝혀졌다. 게다가 CTL이 인식하는 종양관련 항원유래의 항원 peptide도 다수 동정되었다. 지금까지의 항원 peptide에 관한 보고는 주로 구미인에게서 높은 빈도로 발견되는 HLA-A1과 HLA-A2에 관한 것이었다. 그러나, 최근 일본인의 60% 이상이 가지는 HLA-A24에 결합하는 항원 peptide의 동정례가 보고되면서부터¹⁻³⁾ 이 HLA-A24 결합성 항원 peptide를 이용한 항원특이적 CTL 유도실험 및 CTL 해석실험에 대한 관심이 고조되고 있다. 금후 기초실험 뿐만 아니라 항원 peptide를 이용한 면역요법으로의 응용을 생각하는 경우 HLA-A24 결합성의 항원 peptide를 이용하는 연구는 중요한 비중을 차지하게 될 것이다.

이번에 TaKaRa는 지금까지 CTL 유도례가 보고된 HLA-A24 결합성의 항원 peptide 중에서 일본인에게서 많이 발병하는 위암, 대장암 등 소화기계통의 암조직에서 과잉발현하는 암태아성 항원(CEA) 유래 항원 peptide[CEA.652 (9)]와 종양거절항원으로서 최초로 발견된 MAGE family 중 다수의 종양조직에서 높은 발현빈도를 보이는 것으로 알려진 MAGE-1 및 MAGE-3 유래의 항원 peptide[MAGE1.135 (9), MAGE3.195 (9)] 등 모두 3종류를 준비하였다.

▶ 항원 peptide를 이용한 CTL 유도례

지금까지 항원 peptide를 이용하여 Native T cell로부터 CTL을 유도하는 각종 primary CTL 유도법이 보고되었다. 본 지에서도 SAC-I의 존재하에서 배양한 말초혈 단핵구(PBMC)를 항원제시세포(APC)로서 사용하는 방법(Life Science & Biotechnology 8호, 24-25 페이지)을 소개한 바 있다. 이번에는 3종류의 항원 peptide를 이용하여 PBMC를 Keyhole lympet hemocyanin(KLH) 및 IL-7의 존재하에서 배양하여 CTL을 유도한 예를 소개한다.

HLA-A24 결합성 항원 peptide를 이용한 건강인 PBMC로부터의 CTL 유도에

[방법]

Plebanski 등과 Fujie 등의 방법^{4,5)}에 따라 CTL을 유도하였다.
[Day 0]

HLA-A24를 발현하는 건강인 PBMC(5×10^7 cells)를 반씩 나누어 한쪽에는 항원 peptide($40 \mu\text{g/ml}$)와 β_2 -microglobulin($3 \mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 37°C 에서 2시간 동안 처리한 후, 나머지 반은 $3 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml이 되도록 세포를 조제하였다. 이것에 IL-7(25 ng/ml)과 KLH($5 \mu\text{g/ml}$)를 첨가하고 24 well plate에 분주(1.0 ml/well)하여 배양한 후 responder cell로 사용하였다.

[Day 4]

IL-2(40 U/ml)를 함유하는 배지를 각 well에 1 ml 씩 첨가하였다.

[Day 7]

동일한 donor의 PBMC에 항원 peptide($40 \mu\text{g/ml}$)와 β_2 -microglobulin($3 \mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 37°C 에서 2시간 동안 처리하였다. Peptide 처리 후 X선(5000 rad)을 조사하였다. 이 세포를 APC로서 responder cell과 혼합하고 24 well plate에 옮겨 배양하였다. 이 때 APC와 responder cell의 비율은 2:1 정도로 조제하였다.

[Day 8]

IL-2(40 U/ml)를 함유하는 배지를 각 well당 1 ml 씩 첨가하였다.

[Day 10]

배지를 절반량씩 제거한 후 IL-2(40 U/ml)를 함유하는 배지를 각 well에 1 ml 씩 첨가하였다.

[Day 14 이후]

약 1주일 간격으로 자기 APC(Day 7에 기재한 것과 동일)로 자극을 반복하였다. 또, 2~3일 간격으로 IL-2를 첨가하였다.

[4회 재자극 후(Day 35)]

유도에 이용한 항원 peptide로 처리한 HLA-A24 발현세포(TISI) 및 암세포주를 표적세포로 하여 CTL의 세포상해성을 ^{51}Cr 방출법으로 측정하였다.

[결과]

CEA.652 (9)로 CTL을 유도한 결과를 그림 1-A에, MAGE 1.135 (9)로 유도한 결과를 그림 1-B에, MAGE3.195 (9)로 유도한 결과를 그림 1-C, D에 각각 나타내었다[MAGE3.195 (9)의 결과는 참고문헌(1)에 소개]. 어떠한 항원 peptide일지라도 KLH 및 IL-7을 이용한 방법으로 특이적인 CTL을 유도할 수 있음을 밝혔다. 이러한 CTL은 peptide를 처리한 TISI 뿐만 아니라 각각의 종양관련항원을 발현하는 종양세포주에 대해서도 세포상해성을 나타내었다.

▶ 결론

상기의 peptide를 포함하여 HLA-A24에 제시되는 CTL의 항원 peptide가 몇 가지 보고되었지만 다른 HLA allele에 비하면 아직 충분히 동정되었다고는 말할 수 없다. TaKaRa는 이번에 소개한 CTL 유도능이 확인된 항원 peptide 이외에도 신규의 HLA-A24 결합성 항원 peptide를 동정하기 위한 set[CTL epitope 동정용 peptide set MAGE-3 (HLA-A24), CEA(HLA-A24), HER2/neu(HLA-A24)]도 발매하였다. 이러한 set에 함유된 peptide는 신규 항원 peptide의 동정에 이용할 수 있다. CTL 유도실험에서는 peptide 뿐만 아니라 사용하는 PBMC도 동시에 매우 중요하다.

특히 사람의 PBMC에서는 개인적인 차가 있기 때문에 복수의 donor의 PBMC를 시험해 봄으로써 좋은 결과를 획득하는 경우가 종종 있다. 또 사용하는 배지나 혈청에도 세심한 주의를 기울일 필요가 있다. 특히 혈청은 실험의 성패를 결정할 수 있는 중요한 요소이다. TaKaRa는 상기의 CTL 유도에 이용한 배지나 혈청외에 세포배양용 시약류도 발매하고 있다(관련제품 참고). 이처럼 CTL 유도실험을 간편하고 높은 재현성으로 할 수 있다면 암이나 바이러스 감염증 등에 대한 면역요법의 실현이 곧 현실로 다가올 수 있을 것이다. 금후 가능한 한 많은 연구자들이 이 방면의 연구에 참여해 주기를 기대한다.

▶ 참고문헌

- 1) Tanaka F. *et al.* (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4465.
- 2) Nukaya I. *et al.* (1998) *Int. J. Cancer*, in press.
- 3) K. Tahara *et al.* (1998) 면역외과연구회 총회기사 p61.
- 4) Plebanski M *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1783.
- 5) Fujie T. *et al.* (1997) *Biotherapy Today*, **4**, 79.

▶ 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
CTL epitope 동정용 peptide set		
종양항원 MAGE3(HLA-A24)	SP101	9종(각 1 mg)
종양항원 CEA(HLA-A24)	SP102	10종(각 1 mg)
종양항원 HER2/neu(HLA-A24)	SP103	10종(각 1 mg)
X-VIVO 10™	B4380	1 l
X-VIVO 15™	B4418	1 l
X-VIVO 20™	B4448	1 l
L-Glutamine(200 mM)	B76051~4	20~50 ml

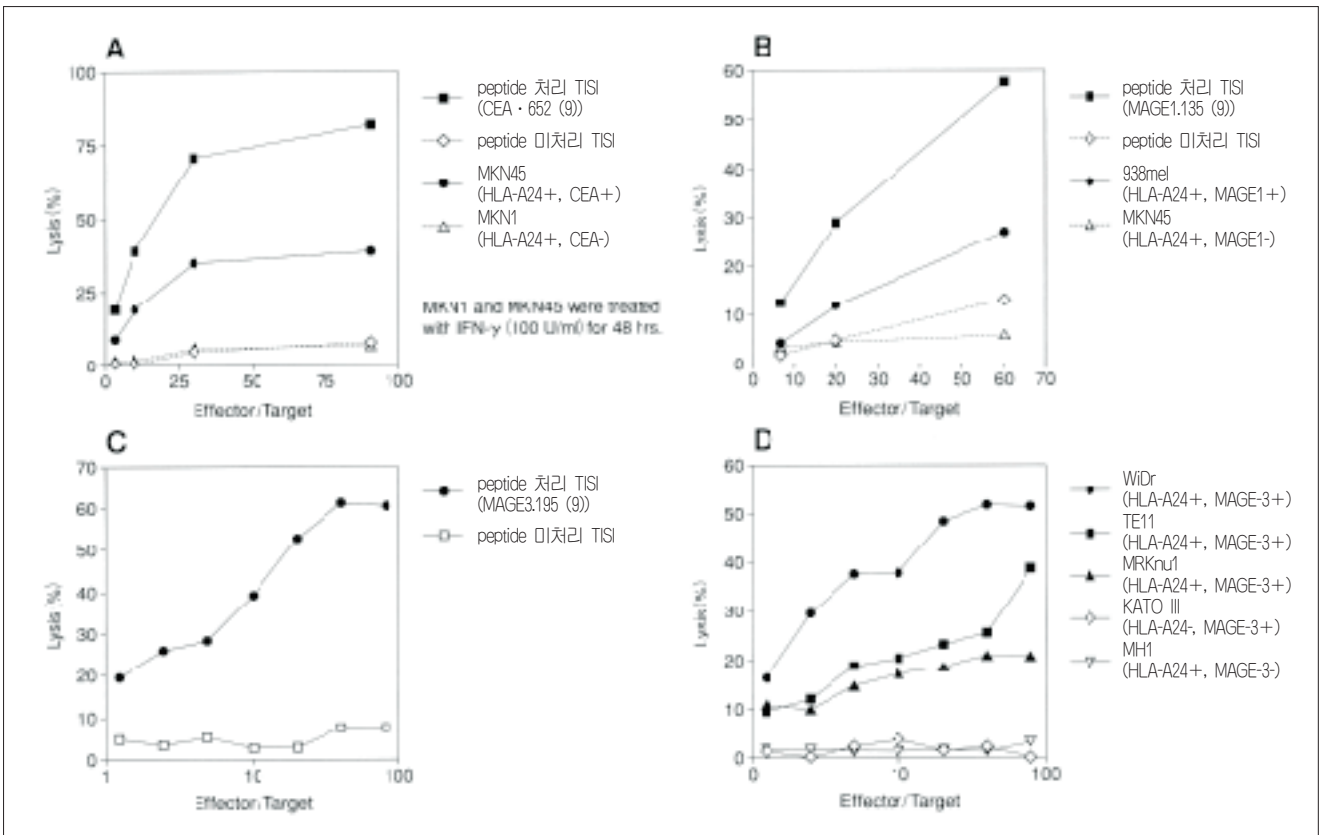


그림 1 각종 항원 peptide를 이용한 CTL 유도례

처음으로 면역 조직 화학적 염색을 실시하는 분들에게 면역 조직 화학적 염색법의 기초

▶ 서론

세포의 면역염색은 세포수준에서의 항원의 국재를 검출할 수 있는 방법이다. 또 이 방법을 통해 세포대사와 관련된 많은 정보를 얻을 수 있으므로 근래에는 세포진단법으로 도입되어 치료방침을 결정하는 수단중의 하나로써 활용하고 있다.

본 고에서는 실험실 수준에서의 세포염색을 손쉽게 해주고 기능해석에도 자주 사용되고 있으며, 반복적으로 검토할 수 있는 배양세포(접착 및 부유세포)를 이용한 염색 방법을 소개한다. 효소항체법을 이용한 조직절편의 염색 방법에 대해서는 지난 호에 소개하였으므로 이번 호에는 형광항체법을 이용한 세포의 염색방법에 대하여 설명하기로 한다.

형광항체법은 면역염색법 중에서 최초로 개발된 기술로 광학현미경으로 관찰하므로서 효소항체법보다 더욱 섬세하게 관찰할 수 있다. 반면에 비교적 단시간 내에 형광이 소광되어 버리므로 소광되기 전에 사진을 찍거나 또는 컴퓨터에 데이터를 입력할 필요가 있었다. 최근에는 peroxidase-labeled anti-FITC antibody를 2차항체로서 이용함에 따라 반영구적으로 보존할 수 있게 되었다. 형광항체법에는 직접법(형광표식한 1차항체를 이용한다), 간접법(1차항체를 반응시킨 후 형광표식한 2차항체를 결합시킨다), 그리고 avidin-biotin법(직접법이나 간접법보다 감도가 좋다) 등이 있으나 항원의 검출이 가능하다면 간단한 방법을 선택하는 것이 좋다.

▶ 필요한 시약

- 증류수
- 세정 완충액 (PBS[TaKaRa Code T900] 또는 TBS [TaKaRa Code T903])
- 고정액(acetone, 95% ethanol, 4% paraformaldehyde/PBS, 또는 10% 중성 완충 formalin 등)
- 침투화 완충액(TaKaRa Code MK505 또는 IntraStain : TaKaRa Code H1101)
- 항체 (1차항체, 표식 2차항체)
- 항체 희석액 (blockase[대일본제약], BSA 등)
- mount medium (봉입제)
(SlowFade™ Light Antifade Kit [Molecular Probes] 등 소퇴광 방지제 함유 봉입제)

▶ 필요한 기구 및 기기

- Slide staining bed
- Micropipette
- Microtube
- 습윤상
- Cover slip
- Cover glass
- 핀셋
- 형광현미경
- 기타 기구

[접착세포의 경우]

- i) 샤알레를 이용하는 방법
접착세포용 코팅 샤알레(gelatin 또는 collagen 등으로 코팅한 것)
- ii) Cover glass를 이용하는 방법
건열로 멸균된 cover glass 및 무균 코팅 cover glass (collagen 또는 poly-L-Lysine으로 코팅한 것) (IWAKI)
- iii) Slide glass를 이용하는 방법
Lab-Tek® ChamberSlide™ (NUNC)

[부유세포]

- i) Cyto spin을 이용하는 방법
부유세포 수집 바켓트(TOMY) 등
- ii) 도말 방법
MonoPrep2™ (MonoGen) 등

▶ 세포의 고정방법

항원의 국재성과 세포형태의 보존을 위해 염색전에 세포를 고정할 필요가 있다. 검출하고자 하는 항원에 따라서 고정조건을 검토할 필요가 있지만, 일반적으로

- acetone
- 95% ethanol
- 4% paraformaldehyde/PBS (pH7.4)
- 10% 중성 완충 formalin

등이 널리 사용되고 있다. 세포막내의 항원 국재성을 검출하고자 하는 경우는 세포막의 투과성이 뛰어나야 하므로 고정 후 0.04~0.4% Triton X-100™ 또는 0.01~0.1% Saponin등의 계면활성제를 처리해 줄 필요가 있다.

본지 제 7호를 통하여 면역조직화학적 염색법의 기초(1)로서 조직절편의 염색법에 대하여 소개한 바 있다.

이번에는 기초(2)편으로 세포의 면역조직화학적 염색법에서 대하여 설명한다.

▶ 염색표본의 제작방법의 예

(1) 접착세포의 경우

1. 세포배양
Cover glass(건열처리)를 사알레에 넣은 후 세포가 단층으로 정착할 때까지 배양한다.
배지를 제거한 후 PBS로 세정한다. 3회
2. 고정
4% paraformaldehyde/PBS(실온)속에서 고정한다. 10~30분
PBS로 세정한다. 5분 × 3회
3. 침투화 (세포막내 항원 또는 핵내 항원을 검출하는 경우)
침투화 완충액을 얼음위에서 작용시킨다. 2~5분 정도
PBS로 세정한다. 5분 × 3회
4. Blocking (필요할 경우)
Blockase 원액 또는 1% BSA/PBS를 첨가한다. 5~15분
PBS로 세정한다. 1회
5. 1차 항체 반응
1차 항체(5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한다. 30분
(항체희석액 : 25% blockase/PBS 또는 1% BSA/PBS)
PBS로 세정한다. 5분 × 3회
6. FITC 표식 2차 항체의 반응
FITC 표식 2차 항체를 첨가한다. 30분 암실
PBS로 세정한다. 5분 × 3회
7. 봉입
세포가 정착하고 있는 면을 아래로 하여 cover glass를 cover slide 위에 얹고 mount medium으로 봉입한다.
8. 형광현미경으로 관찰한다.

(2) 부유세포의 경우

1. 세포배양
사알레에 세포를 배양한 후 배양액을 튜브에 넣고 원심분리하여 세포를 모은 후 다시 PBS로 원심 세정한다(1검체당 1~2 × 10⁷개/ml 정도의 50 μl 의 세포현탁액을 준비하는 것이 좋다).
1,500 rpm × 5분 × 3회
2. 고정
4% paraformaldehyde/PBS (실온) 속에서 고정한다. 10~30분
PBS로 원심세정한다. 1,500 rpm × 5분 × 3회
3. 침투화 (세포막내 항원 또는 핵내 항원을 검출하는 경우)
침투화 완충액을 얼음위에서 작용시킨다. 2~5분 정도
PBS로 원심세정한다. 1,500 rpm × 5분 × 3회

4. Blocking (필요할 경우)

Blockase 원액 또는 1% BSA/PBS를 첨가한다. 5~15분
PBS로 원심세정한다. 1,500 rpm × 5분 × 3회

5. FITC 표식 1차항체의 반응

50 μl 의 1차 항체(5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한다. 30분 암실
(항체 희석액 : 25% blockase/PBS 또는 1% BSA/PBS)
PBS로 원심세정한다. 1,500 rpm × 5분 × 3회

6. 봉입

50 μl 의 mount medium에 세포를 현탁한다. 세포 현탁액을 slide glass 위에 한방울 떨어뜨린 후 cover glass를 부착시킨다.

7. 형광현미경으로 관찰한다.

염색표본을 반영구적으로 보존하고자 할 때

8. HRP-labeled anti-FITC antibody (2차항체) 반응
2차 항체를 항체 희석액(25% blockase/PBS 또는 1% BSA/PBS)으로 적절히 희석한 후 FITC 표식 1차 항체로 처리한 시료에 이것을 첨가하여 반응시킨다. 30분
PBS로 원심세정한다. 1,500 rpm × 5분 × 3회
9. Peroxidase에 의한 발색반응
사용시 조제한 DAB 기질용액을 첨가하여 발색시킨다.
(자색으로 변함) 5~10분
중류수로 원심세정한다. 1,500 rpm × 5분 × 3회
10. Slide 위에 얹은 후 mount medium으로 봉입한다.

▶ 주의점

- 비특이적인 항체반응이 일어나지 않는지 즉 염색조작이 정상적으로 실시되고 있는지를 확인하기 위해 처음에는 반드시 검체와 동시에 control(음성·양성)도 염색할 필요가 있다.
- 반응액이 시료와 균일하게 혼합되도록 한다.
- 모든 반응은 저온에서 실시한다.
- 부유세포의 세정은 1,500 rpm × 5분 × 3회 대신에 10,000 rpm × 수 초 × 3회로 실시해도 무방하다.
- 부유세포를 slide 위에서 봉입할 때 세포현탁액을 너무 많이 얹으면 현미경 관찰시 세포가 부유되어 보일 수 있다. 많은 양을 얹었을 때는 여분의 수분을 여지 등으로 흡수하여 빼내는 것이 좋다.
- 염색한 부유세포는 flow cytometry로 분석하는 것도 가능하다. 단 세포의 세정 및 현탁에 이용하는 PBS는 0.22 μm 의 filter로 여과한 것을 사용한다.

Single Tube Protein™ System 3(STP3)

DNA template로부터 단백질을 높은 효율로 합성할 수 있는 *in vitro* 전사·번역 시스템

Single Tube Protein™ System 3, T7	
TaKaRa Code NV712	50회용
Single Tube Protein™ System 3, SP6	
TaKaRa Code NV713	50회용

STP3 Transcription Mix	5 × 80 μl
STP3 Translation Mix	5 × 300 μl
625 μM Methionine	100 μl
Nuclease-free Water	1.5 ml
STP3 Control DNA	5 μg

Single Tube Protein™ System 3, T7	
TaKaRa Code NV712I	10회용
Single Tube Protein™ System 3, SP6	
TaKaRa Code NV713I	10회용

STP3 Transcription Mix	80 μl
STP3 Translation Mix	300 μl
625 μM Methionine	100 μl
Nuclease-free Water	1.5 ml
STP3 Control DNA	5 μg

▶ 서론

Single Tube Protein™ System 3(STP3)은 supercoil 또는 linear 형태의 DNA template로부터 *in vitro*에서 직접 단백질을 높은 효율로 생성할 수 있도록 고안된 전사·번역 시스템이다.

이 시스템은 T7 RNA Polymerase(또는 SP6 RNA Polymerase)를 이용하여 template DNA의 전사반응을 실시하고 이어서 토끼의 망상적혈구 lysate 내에서 번역을 실시하는 것이다. 적당한 DNA template(plasmid, PCR산물 등)를 첨가하는 것만으로 T7 또는 SP6 promoter의 하류에 삽입된 배열을 간편하고 신속하게 발현시킬 수 있다. DNA로부터 정제 RNA template를 일단 조제한 후에 번역을 실시해야 하는 종래의 방법에서는 제한효소 절단, linear 형태의

plasmid DNA의 정제 및 RNA의 정제 등의 복잡한 조작이 필요하였으나 이 시스템은 그러한 조작이 필요 없으므로 매우 간편하다. STP3법에서는 적절히 고안된 primer를 이용하여 증폭한 PCR 산물로부터 직접 단백질을 합성할 수 있다. 번역효율을 향상시켜 주는 배열을 갖고 있는 pCITE나 pT7Blue-2 Vector를 이용하면 보다 효과적이다.

표준적인 STP3반응에서는 transcription mix에 DNA template(plasmid 0.5 μg 또는 증폭산물 2 μl)를 첨가하여 30°C에서 15분간 전사반응을 실시하고 이어서 translation mix를 첨가하여 60분간 번역반응을 실시한다. 필요한 모든 시약이 premix 형태로 되어 있으므로 template, H₂O, 그리고 methionine(또는 ³⁵S-methionine)만 첨가해 주면 된다. *E. coli* β-galactosidase 유전자를 함유하는 positive control DNA가 kit 내에 첨부되어 있으므로 조작이 정확하게 진행되었는지를 확인할 수 있다. 이 대조반응의 번역산물은 isotope incorporation assay나 S·Tag system을 이용한 assay, S·Tag Western Blot 그리고 β-galactosidase 활성의 fluorescent assay 등으로 확인할 수 있다.

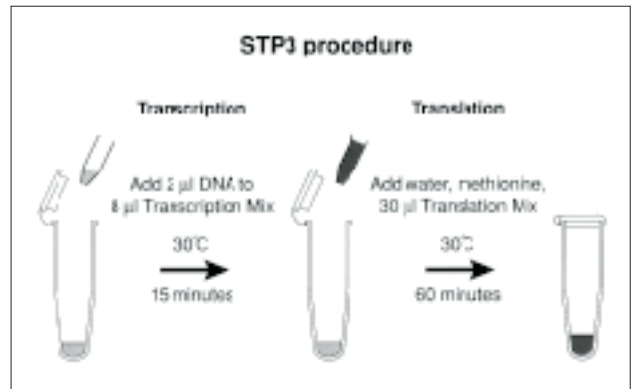


그림 1 STP3법의 개요

▶ 용도

- pET, pBAC vector 등을 이용한 expression vector construct의 신속한 확인
- 유전자/단백질의 기능특성 연구
- 단백질-단백질, 단백질-핵산, 단백질-ligand의 상호작용 연구
- open reading frame의 동정
- nonsense mutation이나 frame-shift mutation의 screening 또는 protein truncation testing
- colony screening, ligation PCR, RT-PCR, exon PCR의 각 PCR 시료 유래의 단백질 확인

▶ STP3 PCR template의 조제법

STP3를 이용하면 신속하게 단백질을 해석할 수 있다. 적절히 디자인한 primer를 사용하므로써 bacteria의 colony, plasmid 또는 다양한 vector를 이용한 ligation 반응액으로부터 PCR로 직접 STP3의 DNA template를 조제할 수 있다.

또 T7 또는 SP6 promoter, upstream spacer 및 translation signal(필요한 경우)을 부가한 5' primer를 이용하여 PCR을 한다면, 발현용이 아닌 vector나 genome DNA의 exon 부분, 세포 mRNA(이 경우는 RT-PCR) 등으로도 STP3용의 DNA template를 조제할 수 있다.

표 1 STP3의 DNA template의 조제가 가능한 primer 조합

Circular DNA (colonies, plasmid preps)							
Vector	5' primer	TaKaRa Code	(Novagen Code)	3' primer ¹⁾	TaKaRa Code	(Novagen Code)	STP3 System
pET ¹⁾	pET upstream	NV440	(69241-3)	T7 terminator ²⁾	NV432	(69337-3)	T7
pSCREEN TM -1b (+)	S · Tag primer	NV460	(69945-3)	T7 terminator	NV432	(69337-3)	SP6 ⁴⁾
pBAC TM -series ⁵⁾	T7/polh	NV391	(70046-3)	1629DWN	NV386	(70011-3)	T7
pBACsurf-1	T7/polh	NV391	(70046-3)	ASgp64	NV387	(70062-3)	T7
pCITE [®] -4a-c (+)	U-19mer	NV436	(69819-3)	T7 terminator	NV432	(69337-3)	T7
pCITE [®] -2a-c (+)	U-19mer	NV436	(69819-3)	R-20mer	NV439	(69835-3)	T7
pT7Blue series	R-20mer	NV439	(69835-3)	U-19mer	NV436	(69819-3)	T7 or SP6 ⁶⁾
pSTBlue-1	R-20mer	NV439	(69835-3)	U-19mer	NV436	(69819-3)	T7 or SP6 ⁶⁾
pOCUS TM -2	POCUSUP	NV441	(69527-3)	POCUSDOWN	NV442	(69528-3)	T7

Blunt Vectors and LIC Vectors for ligation PCR

Vector	5' primer	TaKaRa Code	(Novagen Code)	3' primer	STP3 System
pT7Blue series Blunt Vectors	R-20mer	NV439	(69835-3)	insert-specific	T7
pSTBlue-1 Blunt Vector	R-20mer	NV439	(69835-3)	insert-specific	T7
pT7Blue-2 Ek/LIC Vector	R-20mer	NV439	(69835-3)	insert-specific	T7
pET LIC Vectors	pET upstream	NV440	(69214-3)	insert-specific	T7
pBAC TM LIC Vectors	T7/polh	NV391	(70046-3)	insert-specific	T7
pCITE [®] -5b (+) Ek/LIC Vector	U-19mer	NV436	(69819-3)	insert-specific	T7

주 :

- 1) pET17b, 17xb, 20b(+), 23(+), 23a-d(+))는 제외.
- 2) Vector에 특이적인 3' primer를 이용하면 양방향의 insert가 증폭된다(unidirectional cloning이 아닌 경우).
- 3) pET5 series는 제외. pET5의 경우는 pBR322 *EcoR* I *ow* primer를 사용한다.
- 4) SP6 RNA Polymerase는 pSCREEN 및 pT7 Blue-2에서 상류의 fusion sequence를 갖지 않는 전사산물을 생성한다. 번역은 insert 유래의 AUG부터 개시되므로, insert는 반드시 SP6 promoter의 하류에 cloning한다.
- 5) T7/polh primer는 polh promoter를 함유하는 모든 pBAC transfer plasmid에 이용할 수 있다(pBAC4x-1, pBACgus4x-1은 제외).
- 6) pSTBlue-1으로부터 STP3, SP6의 template를 조제하는 경우는 5' 과 3' primer가 역방향이다.

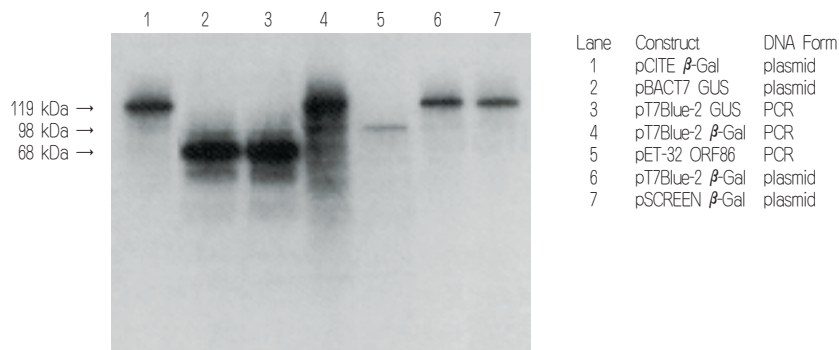


그림 2 각종 template를 이용한 STP3에서의 단백질 합성

³⁵S-methionine의 존재하에서 표준조건으로 전사/번역을 실시한 예를 나타내었다. 반응산물을 4~20%의 SDS-PAGE에 이은 fluorography(2시간 노광)로 검출하였다. PCR template의 경우 T7 promoter의 상류에 결합하는 primer와 code sequence의 하류에 결합하는 primer를 사용하여 증폭하였다. 반응산물을 동량의 chloroform으로 추출하여 2 μl의 수축을 STP3의 transcription용 반응액에 직접 첨가하였다. Sample 1-6은 STP3, T7으로, sample 7은 STP3, SP6로 반응한 것이다.



보한 안내

추계학술대회 전시회 참가!

당사는 추계학술대회 시즌을 맞이하여 유관학회의 학술대회의 기기전시회에 참가하였습니다. 이번 추계학회 전시회에는 금번에 새로 발매하는 신제품을 소개하고, 고객의 실험에 관한 상담이나 불편사항 등의 소리를 듣는데 중점을 두어 고객에 보다 가까이 갈 수 있도록 기획하였습니다. 특히 연구자 여러분들이 관심을 끈 것은 최근에 화제가 되고 있는 DNA Chip 제작 및 해석 시스템, PCR 반응을 기존에 비하여 5배 정도 빠르게 실시할 수 있는 Z-Taq 등의 신제품이었습니다. 전시회 참가회비는 아래와 같습니다.

한국생화학회	10월 15일~16일	한국과학기술원
한국분자생물학회	10월 22일~24일	서울대학교
대한생화학·분자생물학회	10월 29일~30일	과학기술회관
한국원예학회	10월 30일~31일	농촌진흥청(대리점 참가)
펩타이드연구소	11월 13일	충북대학교(대리점 참가)

'98 TaKaRa Symposium 성대히 마쳐...

금년으로 세번째를 맞이하는 '98 TaKaRa Symposium이 지난 10월 23일 오후 서울대학교 문화관에서 개최되었습니다. 한국분자생물학회 추계학술대회의 공식행사의 일환으로 개최된 이번 행사에는 생명공학연구소 박 승환 박사의 genome project의 최근 동향, TaKaRa Biotechnology 연구소 Kato 박사의 gene therapy 연구의 최근 동향, 생명공학연구소 김 승목 박사의 생물정보학(bioinformatics)의 역할, TaKaRa Biotechnology 연구소의 Asada 박사의 식물 세포벽 matrix의 비대와 재구축을 담당하는 Endo형 Xyloglucan Transferase의 분자생물학 및 품종개량에의 응용이라는 최근에 화제가 되고 있는 연제의 발표와 토론이 있었습니다. TaKaRa Symposium은 최근에 화제가 되고 있는 주요 Topic에 관하여 알기 쉽게 정리하셔서 대학원생이나 관련학문을 연구하는 분들에게 최신의 동향을 이해하는데 커다란 도움이 되도록 하고자 기획하여, 금년에도 300여명이 참석하여 강당을 가득 메웠습니다. 당사는 내년에도 본 행사를 보다 알차게 기획하여 유익한 symposium이 되도록 할 것입니다.

한국분자생물학회 추계학술대회 공식후원!!

당사는 관련 학문의 발전에 기여하고자 유관학회를 직간접적으로 후원하여 오고 있습니다. 지난 10월 22일부터 3일간 서울대학교에서 개최된 한국분자생물학회(회장 최우천) 추계학술대회를 공식후원하여 TaKaRa Symposium을 공식행사로 개최한 바 있으며, 대회기간중 학회회원 들에게 99년도 학회 달력을 특별제작하여 배포하였습니다. 99년 학회 달력은 당사의 이제현(사장)씨가 기획하여 제작을 맡고, 전문사진작가 김완모(서울문화사 사진부장)씨의 사진과 프라임 디자인뱅크 박성오(편집디자인)씨의 디자인과 편집으로 학회의 관련운영위원과 여러분의 의논을 거쳐 독자의 디자인으로 제작하였습니다.

대한생화학·분자생물학회로부터 감사패 받아 ...

당사는 금년으로 학회창립 50주년을 맞이한 대한생화학·분자생물학회(회장 곽춘식)로부터 학회발전에 기여한 공로로 감사패를 수여 받았습니다. 대한생화학·분자생물학회는 주로 의학과 관련된 생화학, 분자생물학의 연구자들이 학문을 토론하는 학회로서 관련학문의 학회로는 최고의 역사를 갖고 있습니다. 1995년 학회 명칭의 변경과 회원 가입자격을 광범위하게 확대하셔서 현재는 900여명의 회원을 갖는 대규모의 학회로 발전하여, Experimental Molecular Medicine이라는 영문학술잡지와 학회 소식지를 발간하고 있으며, 정기학술대회, 국제심포지움 등의 학술활동을 활발히 하고 있어, 금년에는 대한의학회로부터 100여개 의화학회중 최우수 기초의학회상을 수상하였습니다. 당사는 관련학문의 발전에 기여한다는 기본이념에 따라 창사이래 대한생화학·분자생물학회를 지원학회로 선정하여 정기간행물의 광고제제, 학회기간중의 기기전시회 등에 적극적으로 참여해왔습니다.

DNA Chip 사업 본격 기사 !

당사는 최근에 화제가 되고 있는 DNA Chip(Bio Chip)사업을 본격적으로 전개합니다. 지난 8월 미국의 Genetic Micro System(GMS)사와 TaKaRa 본사가 사업협력 계약을 체결함으로써 당사는 한국에 있어서 독점적으로 GMS사의 DNA Arrayer(Spotter), DNA Chip Scanner, 해석 software를 공급하게 되었습니다.

DNA Chip은 post genome project의 functional genomics에 결정적으로 기여할 대량 해석의 필수기술로 자리잡을 것으로, 유전자의 발현해석, 유전자 진단, 유전자의 돌연변이나 다형 해석, 의약품의 스크리닝 등에 폭넓게 응용될 것으로 예상되어 여러 회사가 개발을 서두르고 있습니다(본지 기획특집 참조).

GMS사의 DNA Chip system은 새로운 ring & pin 방식을 채용하고 있어, 고밀도로, 정량적으로 DNA를 spotting할 수 있으며 재현성이 뛰어나 다른 arrayer보다 월등한 성능을 갖고 있는 것으로 평가되고 있습니다.

당사는 DNA Chip System을 공급함과 아울러 다양한 생물의 chip을 공급하고 고객의 요청에 따라 chip을 제작하거나 해석을 수행하는 custom service를 실시하여 종합적으로 DNA Chip을 활용할 수 있도록 하나갈 계획입니다.

창사 3주년 기념행사 가져 ...

당사는 지난 11월 1일로 창사 3주년을 맞이 하였습니다. 창사 기념일을 맞아 전임직원이 참여하는 기념행사를 지난 10월 31일(토) 서울 관악산에서 개최하였습니다. 지난 3년간 고객 여러분께 고품질의 제품을 보다 저렴한 가격에 빠르고 안전하게 공급한다는 기본이념으로 새로운 서비스를 제공하고자 노력하여 왔습니다. 우리말 종합카다로그의 제작, 종합 기술정보지 Life Science & Biotechnology 정기발간, Internet Home Page에 의한 최신의 정보제공, TaKaRa Symposium 개최, 관련 유관학회의 지원 등의 활동으로 짧은 연륜에 비하여 여러 연구자의 신뢰를 받는 기업으로 성장하고 있습니다. IMF 관리체제라는 어려운 경제 위기하에서도 안정적이고 빠르게 매출이 신장하여 고객여러분의 신뢰를 받고 있음을 알 수 있었습니다. 저희 임직원 일동은 앞으로도 변함없이 고객을 우선으로 하는 최고의 제품과 저렴한 가격 그리고 알찬 서비스를 제공하고자 다짐합니다. 많은 성원과 격려에 깊은 감사를 드립니다.

창사 3주년 기념 감사 대할인 판매 실시 !!

당사는 창사 3주년을 기념하는 감사의 큰 잔치를 실시하고 있습니다. 금년 연말까지 계속되는 이번 행사는 고객의 사용 빈도가 많은 시약, 키트를 엄선하여 특별할인 판매를 실시하므로써 실제적으로 도움이 되도록 하였습니다. 최근 엔고 등으로 가격인상 요인이 재발하였음에도 가격을 인상하지 않았을 뿐만 아니라 여러분의 성원에 보답하는 할인판매를 실시합니다. 금번 행사는 한국의 고객을 중시하는 TaKaRa 본사의 특별 지원과 당사와 전문대리점의 협력으로 파격적으로 실시하는 것이므로 많은 이용을 기대합니다(본지 안표지, 28~29페이지 참조)

BRIC 기업포럼 [생물과 산업] 후원업체 참여 !!

당사는 포항공대의 생물학 전문 연구정보센터(BRIC)가 운영하는 「생물과 산업」을 공식으로 후원 합니다. 「생물과 산업」은 생물산업 관련업체의 소식, 동향은 물론 생명과학 연구 지원 업체의 신제품, 신기술을 체계적이고 효과적으로 제공하고자 11월에 개설된 전문 homepage 입니다. 당사는 공식 후원업체로서 당사제품에 관한 신속한 정보제공은 물론이고 Q & A를 통해 연구자 여러분의 의문사항이나 실험상의 문제점 등을 토론할 수 있도록 하겠습니다. 모쪼록 「생물과 산업」이 유용하고 유익한 정보를 제공하여 연구자와 산업체를 연결할 수 있는 매체로 자리 잡을 수 있도록 여러분의 많은 이용을 기대합니다.

URL www.bric.postech.ac.kr/market



애완견과 사육자의 관계를 기록한 DNA 상품 BIO Humal 시리즈 신발매!

TaKaRa Biomedical Group은 애완견과 주인과의 관계 등을 기록한 2종의 DNA 상품을 발매합니다.

DNA 상품 「BioHumal」 시리즈는 애완견의 고유의 DNA 배열 패턴을 Bar Code와 같이 표시한 세계에 하나밖에 없는 애완견의 original goods입니다. 또한 애견의 original 사진을 프린트 할 뿐만 아니라 주소, 소유주의 생년월일, 혈액 등도 표시할 수 있으며 카드와 기념패 형태의 두가지가 있습니다.

DNA 분석에 필요한 시료는 소유주가 애견의 입천장의 안쪽을 면

봉으로 닦아내는 것으로 채혈의 필요없이 간단히 준비할 수 있습니다. DNA 분석은 법의학이나 미군에서도 채용하고 있는 개체식별의 marker의 하나인 mitochondria DNA를 해석합니다. 또 시료에서 추출한 DNA는 -20°C에서 5년간 회사가 보존하며, DNA 정보와 개인정보를 회사가 책임을 지고 비밀을 엄수합니다.

앞으로 애완견 뿐만 아니라 애완동물의 개체식별의 수용에도 대응할 수 있는 기술개발을 계속하여 새로운 상품을 공급해 나갈 예정입니다.

DNA Chip 제작장치와 해석장치 판매 개시

TaKaRa Biomedical Group은 지난 8월 19일부로 미국 Genetic Micro Systems사의 DNA Chip 제작장치와 DNA Chip 해석장치의 아시아(한국, 일본, 타이완, 중국)에서의 독점 판매권과 이들 장치를 이용

하여 제조한 DNA Chip의 전세계에의 제조판매권에 관한 최종계약을 체결하였습니다. 일본에서의 희망 판매가격은 두장치를 포함하는 시스템으로 4,700만엔으로 예정하고 있습니다.

해조류 유래의 황산화 다당류를 분해하는 2종류의 공업용 효소의 발견과 클로닝

TaKaRa Biomedical Group은 오랜 옛날부터 식용으로 이용하고 있는 다시마, 미역 등 해조에 함유되어 있는 점액성분의 하나인 Fucoidan을 특이적으로 분해하는 효소를 발견하였으며 이들 효소를 이용하여 Fucoidan의 화학구조를 세계 최초로 밝혀내었습니다.

TaKaRa의 바이오연구소는 Fucoidan 에는 F-Fucoidan과 U-Fucoidan의 2종류가 존재하며 U-Fucoidan은 암세포에 대하여 apoptosis 작용을 가짐을 이미 보고하였습니다. Fucoidan은 암세포의 혈관신생억제 작용이나 암전이 억제작용을 하는 사실도 보고되어 있으나 그 화학구조가 밝혀져 있지 않기 때문에 구조와 기능의 상관관계가 아직 밝혀져 있지 않고 있습니다.

따라서 Fucoidan의 화학구조를 밝혀내기 위하여 Fucoidan을 특이적

으로 분해하는 해양세균을 탐색하여 U-Fucoidan과 F-Fucoidan을 각각 특이적으로 분해하는 효소를 발견하였습니다. 이 해양세균으로부터 Fucose 황산 함유 다당류 즉 Fucoidan를 분해하는 두종류의 새로운 효소를 분리정제하여 각각을 Fucoidanase(분자량 약100,000)과 황산화 Fucoglucornomannarinase(분자량 약 70,000)이라 명명하였습니다. 이들 두종류의 효소를 구사하여 U-Fucoidan과 F-Fucoidan의 화학구조를 세계 최초로 결정하였습니다.

또한 2종의 효소의 클로닝에 성공하여 전염기서열을 발표하였습니다. 이들 효소는 분자량이 10만 이상인 2종류의 황산화 다당의 화학구조를 밝히는 것 뿐만아니라 생성한 Fucoidan 소분자와 황산화 다당류의 공업적 이용에의 길을 열었다고 할 수 있습니다.

Biotechnology 시대를 이끌 새로운 초고속 PCR 증폭용 시스템의 개발

TaKaRa Biomedical Group은 초고속 DNA 증폭기술의 개발에 성공하였습니다. 1 kb의 DNA의 증폭은 약 20분, 10 kb의 DNA라도 약 50분에 증폭할 수 있어 혁명적인 증폭법이라 할 수 있습니다.

DNA 증폭법은 PCR(Polymerase Chain Reaction)이라 불려 미량의 DNA를 수백만배까지 증폭할 수 있으므로 의학, 농학을 비롯한 여러 가지 연구, 검사, 임상 분야에 응용되어 특히 암이나 에이즈 같은 감염증의 진단 등에 위력을 발휘하고 있습니다. 한편 시민생활에 있어서도 범죄자나 친자의 확인 또는 식품중의 유해균의 검출이나 유전자 조작 식품의 검출 등 응용분야는 넓습니다. 신속한 결과가 필요한 식품검사나 대량의 반응을 필요로 하는 임상검사에 있어서는 PCR 반응 시간을 단축하는 것이 중요한 과제입니다. 지금까지 PCR 반응기의 성능을 개량하여 신속한 PCR 반응을 확립하고자 하였으나 복잡한 조작이 필요하여 일반화되지 못하였습니다. TaKaRa는 초고속 PCR에 사용할 수 있는 효소(TaKaRa Z-Taq) 그 자체를 개발함으로써 문제점을 해결 할 수 있었습니다.

한편 새로운 생명과학기술의 하나인 DNA chip과 같이 대량의 PCR 조작이 필요한 기술의 개발, 제조에도 Z-Taq은 유용합니다. DNA chip은 손가락 크기의 유리 chip에 10만개 이상의 DNA를 정렬화하여 고정된 것으로 이를 제조하기 위해서는 spot에 필요한 DNA를 PCR로 증폭해야 하므로 PCR 조작이 방대하게 됩니다. 예를 들어 이와 같은 DNA chip을 10000개 제조하기 위해서는 종래의 PCR법으로 약 3.5개월 소요되나 Z-Taq을 사용하므로써 3주간에 마칠 수 있습니다.

이 효소의 이름을 Z-Taq이라고 명명한 것은 PCR용 효소로서 이 이상의 성능을 갖는 효소가 없다는 의미를 갖고 있기 때문입니다. Z-Taq으로 PCR을 실시하는 경우는 특수한 장치를 필요로 하지 않고 종래의 장치를 사용할 수 있습니다.

또 Z-Taq은 반응성이 우수하여 human genome DNA의 17.5 kb 단편이나 대장균 genome DNA 약 20 kb 단편, 그리고 λDNA 약 20 kb 단편을 각각 용이하게 증폭할 수 있습니다.

NEW PRODUCTS

NEW

지금보다 5배의 빠른 속도로 PCR을 실현 !!

TaKaRa Z-Taq™

(본지 12페이지 참조)

TaKaRa Code R006A	200 U
TaKaRa Code R006B (A × 4)	800 U

NEW

근일발매

전기영동이 필요 없는

O-157 One Shot PCR Screening and Detection Kit

TaKaRa Code RR121A	24회
--------------------	-----

NEW

Rat cDNA Library

(본지 33페이지 참조)

Plasmid DNA형	5 µg
재조합 균체형	500 µl × 2

NEW

변이 DNA의 신속, 고감도의 검출에 !! 변이 DNA 검출용 제품 (MutationFinder™ Kit)

BRCA 1 exon 11 Kit	
TaKaRa Code F50572	1 kit
p53 cDNA Kit	
TaKaRa Code F50573	1 kit
p53 genomic Kit	
TaKaRa Code F50574	1 kit

본 kit은 BRCA 1 exon 11 유전자, p53 cDNA 및 p53 유전자를 검출하기 위한 primer set이다.

본 kit과 Mutation Finder™ Kit(TaKaRa Code F50570) 을 이용함으로써 BRCA 1 exon 11 유전자 또는 p53 유전자 내에 발생한 변이를 신속하게 고감도로 검출할 수 있다. 이 kit에는 각각 최초 PCR반응을 위한 primer와 phage promoter site를 함유하는 nested PCR용 primer 그리고 control plasmid로 구성되어 있다.

NEW

Quick-Type™ HLA Typing Kits

각 1 Kit(100회, Taq 포함)

HLA-A Typing Kit (Low Resolution : 28)	TaKaRa Code LC101
HLA-A Typing Kit (High Resolution : 52)	TaKaRa Code LC102
HLA-B Typing Kit (Low Resolution : 38)	TaKaRa Code LC103
HLA-B Typing Kit (High Resolution : 59)	TaKaRa Code LC104
HLA-C Typing Kit (Low Resolution : 22)	TaKaRa Code LC105
HLA-C Typing Kit (High Resolution : 38)	TaKaRa Code LC106
DRβ Typing Kit (NMDP Set : 31)	TaKaRa Code LC107
DRβ Typing Kit (Low Resolution : 22)	TaKaRa Code LC108
DRβ Typing Kit (Medium Resolution : 37)	TaKaRa Code LC109
DRβ Typing Kit (High Resolution : 62)	TaKaRa Code LC110
DR1 Typing Kit (Group Specific : 6)	TaKaRa Code LC111
DR2 Typing Kit (Group Specific : 17)	TaKaRa Code LC112
DR4 Typing Kit (Group Specific : 27)	TaKaRa Code LC113
DR52 Typing Kit (Group Specific : 43)	TaKaRa Code LC114
DQβ Typing Kit (21)	TaKaRa Code LC115
DQβ Typing Kit (28)	TaKaRa Code LC116

PCR로 증폭한 HLA allele DNA를 SSOP(Sequence Specific Oligonucleotide Probe)를 이용한 dot hybridization을 통해 typing하는 kit이다. probe는 Alkaline Phosphatase로 표식되어 있어 non-RI(발광)에 의해 검출할 수 있다.

NEW

pGeneGrip™ Vector

Gene Therapy Systems사의 제품입니다.

NEW

BEACON® 관련제품

BEACON® 2000 One-Step (FP) Standardization Kit

TaKaRa Code VP2581 1 Kit

(BEACON® 2000 Fluorescein Polarization Sample Kit(TaKaRa Code VP2201)의 대체품입니다)

BEACON® 2000 전용감열 롤러지

TaKaRa Code VP2285 10개

NEW

“DupLEX-A™” Yeast Two-Hybrid System

(본지 34페이지 참조)

OriGene Technologies사의 제품입니다.

NEW

Drug Metabolism 연구용 시약

NEW

Active EGF receptor EIA Kit (Precoated)

(본지 36페이지 참조)

TaKaRa Code MK119 96회

BACULOSOMES™

Cytochrome P450 3A5, rHuman

TaKaRa Code V2512 0.5 nmol

RECO™ System

Cytochrome P450 1A2, rHuman

TaKaRa Code V2304 50~100회

Cytochrome P450 2E1, rHuman

TaKaRa Code V2306 50~100회

Cytochrome P450 2C9, rHuman

TaKaRa Code V2362 50~100회

NEW

Anti-Human L1-CAM Monoclonal Antibody

TaKaRa Code MK114 0.1 mg

NEW

CTL 유도실험용 종양관련 항원 peptide

(본지 40페이지 참조)

MAGE1.135 (9) (HLA-A24)

TaKaRa Code SP201 0.5 mg

MAGE3.195 (9) (HLA-A24)

TaKaRa Code SP202 0.5 mg

CEA.652 (9) (HLA-A24)

TaKaRa Code SP203 0.5 mg

NEW

Full-Range BEACON® 2000을 이용한 환경호르몬 연구에 !! FP Screen-for-Competitors Kit, ER-α, high sensitivity

TaKaRa Code VP2577 1 Kit

반응에 필요한 시약이 미리 혼합되어 있으므로 번잡한 조작이 필요 없다.

또 control로서 17β-Estradiol의 단계희석 용액이 포함되어 있다.



초내열성 protease의 등장 !!
Pfu Protease S

TaKaRa Code 7339 500 U



PA-Sugar Chain 시리즈

PA-Sugar Chain 057

TaKaRa Code 4157 500 pmol

PA-Sugar Chain 058

TaKaRa Code 4158 500 pmol



Novagen사 신제품

Single Tube Protein™ System 3 (본지 44페이지 참조)

제품명	TaKaRa Code	포장량
Single Tube Protein™ System 3, T7	NV712	50회
Introductory Single Tube Protein™ System 3, T7	NV7121	10회
Single Tube Protein™ System 3, SP6	NV713	50회
Introductory Single Tube Protein™ System 3, SP6	NV7131	10회

Perfectly Blunt™ Cloning Kits

본 제품은 PCR산물의 blunt-end cloning을 보다 좋은 효율로 실시하기 위한 kit이다. PCR산물 말단의 blunting 및 인산화공정을 최적화하여 탈인산화한 vector로 간편하게 cloning할 수 있다. 또 연구목적에 따라 다양한 형태의 vector를 준비하였다.

제품명	TaKaRa Code	포장량
pT7Blue Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV7523	40회
pT7Blue-2 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV7533	40회
pT7Blue-3 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV7543	40회
M13mp18 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV715	40회
pSTBlue-1 Perfectly Blunt™ Cloning Kit	NV717	40회

이외에 10회용, 20회용도 있습니다.

Human Hybrid-Ready Tissues

본 제품은 사람의 정상 및 다양한 질환조직에 대한 paraffin-embedding tissue slice의 slide이다. 이러한 slide는 탈파라핀 후 *in situ* hybridization 등에 사용할 수 있다.

제품명	TaKaRa Code	포장량
Normal Adult Human Multi-Tissue Sets (10 types) (8종의 tissue slice에 대한 slide set입니다.)	NH150	8 section(각 5 slides)
Normal and Disease Adult Human Multi-Tissue Sets (약 200종류의 조직이 있습니다. 상세한 것은 1998-99 Novagen사의 카탈로그를 참조해 주시기 바랍니다.)		5 slides

Novagen사의 제품은 별도의 카탈로그가 준비되어 있습니다.

필요하신 분은 당사나 전문대리점으로 연락하여 주시기 바랍니다.

TaKaRa RNA PCR Kit 은 다양하게 선택할 수 있습니다.

	TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)*	TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV)Ver. 1.1	TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1	BcaBEST™ RNA PCR Kit	mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1
가능한 RNA	전 반				
역전사 효소	AMV Reverse Transcriptase XL (42~60°C에서 역전사 가능)			BcaBEST Polymerase (65°C 최적온도)	AMV Reverse Transcriptase XL (42~60°C에서 역전사 가능)
역전사 길이	12.2 kb 이상			7.5 kb 미만	12.2 kb 이상
DNA Polymerase	AMV-Optimized Taq	TaKaRa LA Taq	TaKaRa Taq	Bca-Optimized Taq	AMV-Optimized Taq
증폭 길이	적어도 5.6 kbp까지 가능	적어도 12.2 kbp까지 가능	적어도 5 kbp까지 가능	적어도 5 kbp까지 가능	적어도 2 kbp까지 가능
1st strand cDNA 합성용 Primer	특이적 primer	Random 9 mers Oligo dT-Adaptor Primer 특이적 하류 PCR Primer		Random 9 mers Oligo dT Primer 특이적 하류 PCR Primer	특이적 primer
3' RACE법 Component	불가능	역전사 반응시에 Oligo dT-Adaptor Primer를, PCR 반응시에 M13 Primer M4를 사용함으로써 3' RACE법이 가능		불가능	불가능
조 작	1개 튜브에서 반응가능하다. 열처리에 의해 역전사 효소활성을 실행시킨 후 PCR반응을 시행한다.				
특 징	역전사와 PCR을 연속으로 1개의 튜브에서 가능한 RT-PCR system	적어도 12.2kbp까지 증폭 가능한 긴 단편용 RT-PCR System	TaKaRa에서 가장 표준적인 RT-PCR System	역전사 반응시 반응 최적온도가 높기때문에(65°C) 복잡한 이차구조를 가진 RNA로부터 RT-PCR에 유호하다.	Genome DNA가 혼재해 있어도 RNA 유래의 cDNA만을 증폭
Code	RR024A 50회 RR024B 50회×2	RR012 50회	R019A 50회 R019B 50회×2	RR023A 50회 RR023B 50회×2	RR025A 50회 RR025B 50회×2

- 반응 조건을 최적화 하였습니다.
- 조작 단계를 줄였습니다.
- 실험 목적에 맞게 다양하게 선택할 수 있습니다.

NEW

mRNA 유래의 cDNA를
선택적으로 증폭하는

mRNA Selective PCR Kit Ver. 1.1

RR025A(50회) RR025B(50회×2)

RT-PCR용 RNA 추출에

Catrimox-14™ RNA Isolation Kit RIK 2.11

WA005 50회분

Straight A' s™ mRNA Isolation System

NV424

판매원



LS사업팀 Tel. 02-3471-7437(직) 581-0131(대)
Fax. 581-0136/7
대전 Tel. 042-823-6957 Fax. 832-0821
광주 Tel. 062-525-1155 Fax. 527-0821



(주)코아바이오테크놀로지

Tel. 02-841-7530
Fax. 02-841-7531
수원 0331-284-8592
대전 042-622-2726