

J

Stem Cell 연구 · Epigenetics 관련

J-a iPS세포 제작 vector 관련

Human iPS Cell Generation All-in-One Vector	J-2
Human iPS Cell Generation Vector Set	J-3
Retrovirus Packaging Kit	J-4
RetroNectin(Recombinant Human Fibronectin Fragment)	J-5
RetroNectin Dish	J-5
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)	J-6
Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR)	J-6
Anti-Human iPS	J-7

J-b Epigenetics

수식 Histone H3 antibody	J-8
EpiScope MSP Kit	J-9
TaKaRa EpiTaq HS	J-9
CpG 메틸화에 영향을 받는 제한 효소	J-10
MrcBC	J-11
T4- β -glucosyltransferase	J-11
EpiScope Methylated gDNA 시리즈	J-12

iPS세포 제작 vector 관련

iPS 유도에 필요한 유전자가 하나의 vector에 모두!

Human iPS Cell Generation[®] All-in-One Vector

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Human iPS Cell Generation All-in-One Vector	TKR	3671	10 μ g	1,774,000원

■ 내용

pDON-5 OKSLN DNA (0.5 μ g/ μ l) 20 μ l

■ 보존

-20^oc

■ 제품설명

본 제품은 인간 iPS세포 유도용 재조합 레트로바이러스(retrovirus) vector 제작을 위한 plasmid DNA set이다. 고효율, 고발현 유전자도입용 레트로바이러스 vector인 pDON-5 DNA (Code 3658)에 iPS세포 유도 유전자인 *OCT3/4*와 *SOX2*, *KLF4*, *LIN28*과 *NANOG**에 Thosea asigna virus의 2A배열¹⁾을 삽입시켜 1개의 vector에 삽입하였다. 본 vector를 Retrovirus Packaging System과 함께 사용하면 iPS 세포유도용 재조합 레트로바이러스 vector를 제작할 수 있다. 이렇게 제작된 재조합 레트로바이러스는 RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (Code T100A/B)에 대한 친화성이 높기 때문에, 표적 세포에 유전자 도입시 RetroNectin으로 코팅된 cell culture dish나 플레이트(plate)를 이용하면 유전자도입과 iPS 세포유도 효율을 높일 수 있다.

¹⁾ 5개의 유전자는 단일 mRNA로 전사되지만, 번역될 때에 2A배열내의 특징의 위치에서 분리되어 결과적으로 5개의 단백질이 거의 비슷한 수준으로 발현한다고 생각할 수 있다.¹⁻³⁾

Vector는 아래의 유전자 정보에 근거해 구축했다.

유전자명	GenBank Accession No.
<i>OCT4</i>	NM_002701.4
<i>SOX2</i>	NM_003106.2
<i>KLF4</i>	NM_004235.3 ²⁾
<i>LIN28</i>	NM_024674.4
<i>NANOG</i>	NM_024865.2

²⁾ 현재는 NM_004235.4으로 갱신되어 있어 CDS의 5'측에 9아미노산에 상당하는 배열이 추가되었다. 본 제품의 *KLF4*유전자는 N말단의 9아미노산을 포함하지 않지만, iPS 세포 유도에 유효한 것을 확인하였다.

■ 특징

- *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *LIN28*, *NANOG* 유전자가 하나의 vector에 존재
- iPS세포 유도용 재조합 retrovirus를 효율적으로 제작가능
- RetroNectin과 병용하여 iPS 효율 상승

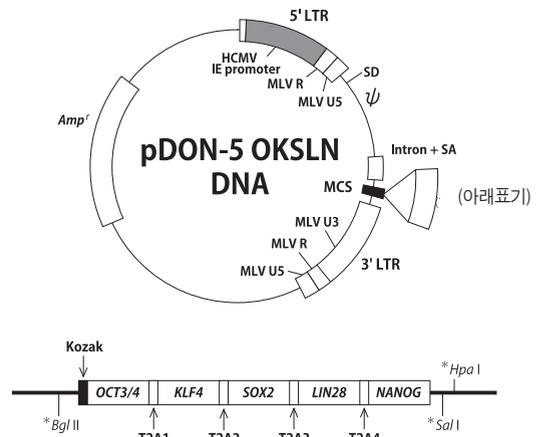
■ 형상

10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA

■ 길이

9,954 bp

■ pDON-5 OKSLN DNA의 구성



※ 제한효소 site는 1곳만 절단됩니다.

■ License Notice : [L21, L44, M71]

J-a

iPS세포 제작 vector 관련

Human iPS Cell Generation® Vector Set

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Human iPS Cell Generation Vector Set	TKR	3670	각 5 µg	1,553,000원

■ 내용

pDON-5 OCT3/4-SOX2 DNA (0,5 µg/µl)	10 µl
pDON-5 KLF4 DNA (0,5 µg/µl)	10 µl
pDON-5 LIN28-NANOG DNA (0,5 µg/µl)	10 µl

■ 보존 -20℃

■ 제품설명

본 제품은 인간 iPS세포 유도용 재조합 retrovirus vector 제작을 위한 plasmid DNA set이다. 고효율, 고발현 유전자도입용 retrovirus vector인 pDON-5 DNA (Code 3658)에 iPS 세포 유도 유전자인 OCT3/4와 SOX2*, KLF4, LIN28과 NANOG*가 삽입되어 있다. 각 vector와 Retrovirus Packaging Kit Amphi (Code 6161)에 포함되는 pGP Vector와 pE-amphi Vector를 이용하여 iPS 세포유도용 재조합 retrovirus vector를 제작할 수 있다. 이렇게 제작된 재조합 retrovirus는 RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (Code T100A/B)에 대한 친화성이 높기 때문에, 표적 세포에 유전자 도입시 RetroNectin으로 코팅된 cell culture dish나 plate를 이용하면 유전자도입과 iPS 세포유도 효율을 높일 수 있다.

* 2개의 유전자는 단일 mRNA로써 전사되고 SOX2 (혹은 NANOG)는 IRES를 통해서 OCT3/4 (혹은 LIN28)와는 독립적으로 번역된다.

IRES : Internal Ribosome Entry Site; mRNA 내부의 ribosome entry site

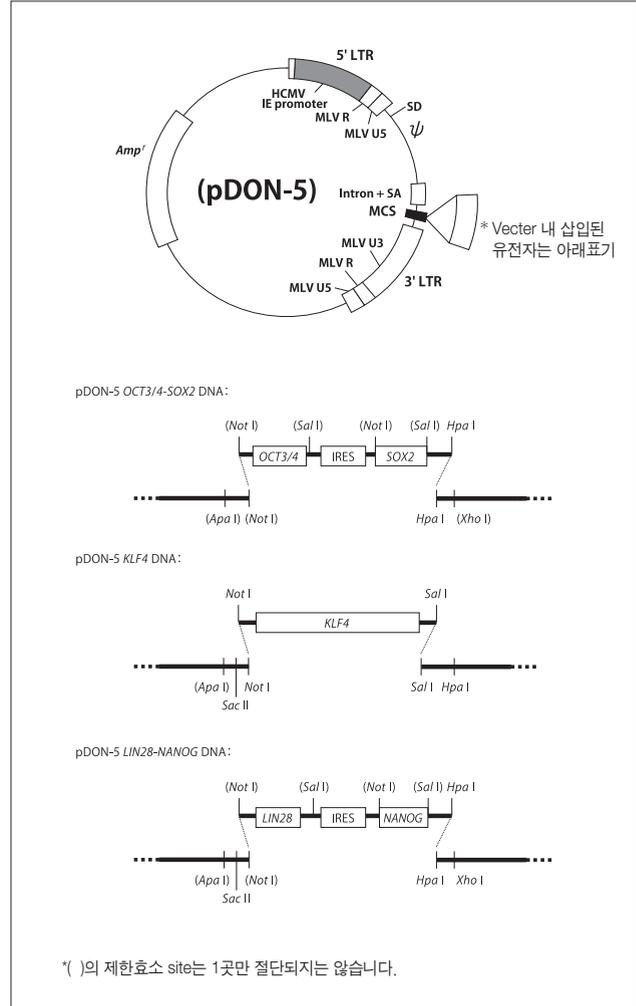
■ 형상

10 mM	Tris-HCl
pH8,0	1 mM EDTA

■ 길이

pDON-5 OCT3/4-SOX2 DNA	: 7,321 bp
pDON-5 KLF4 DNA	: 6,092 bp
pDON-5 LIN28-NANOG DNA	: 6,838 bp

■ 각 vector의 구조



■ License Notice : [L21, L44]

J-a

iPS세포 제작 vector 관련

Retrovirus Packaging Kit

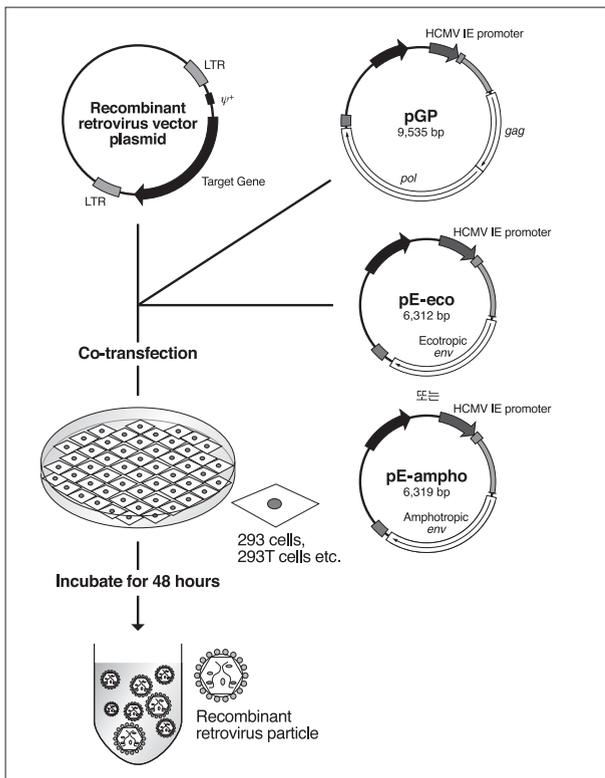
제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Retrovirus Packaging Kit Eco	TKR	6160	10 회	478,000원
Retrovirus Packaging Kit Ampho	TKR	6161	10 회	478,000원

■ 내용

pGP Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	50 μl
pE-eco (또는 ampho) Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	50 μl
Transfection Buffer*	500 $\mu\text{l} \times 10$
2 M CaCl_2^*	620 μl
25 mM Chloroquine*	40 μl

■ 보존 -20°C (단, kit 내용물 중 *는 용해 후 4°C에 보관)

■ 재조합 Retrovirus의 제작 개요



■ 제품설명

본 제품은 목적 유전자를 도입한 재조합 retrovirus vector 2 종류와 packaging vector 제품을 인산 칼슘법에 의해 동시에 세포로 도입하여 고역가 재조합 retrovirus 입자를 생산할 수 있는 kit 이다.

Kit에는 Packaging vector로 *gag-pol* 발현 vector와 *env* 발현 vector (ecotropic 또는 amphotropic)가 포함되어 있으며, rat, mouse 세포에 감염 가능한 ecotropic virus를 생산하는 Retrovirus Packaging Kit Eco와 다수의 포유동물 세포에 감염 가능한 amphotropic virus를 생산하는 Retrovirus Packaging Kit Ampho 두 종류가 있다. Ψ (packaging signal)와 LTR 서열을 가지는 재조합 retrovirus vector packaging vector와 첨부된 transient 시약을 이용하면 293 세포 등에 함께 도입하여 48 시간 후 transient 고역가 ($10^5 \sim 10^7$ cfu/ml)의 재조합 바이러스 입자를 생산할 수 있다.

Packaging vector는 virus 입자 형성과 복제에 필요한 retrovirus의 구조 유전자인 *gag*, *pol* 및 *env* 외에는 retrovirus 유래의 서열을 전혀 포함하지 않으므로 재조합에 의해 자기복제능력을 가진 retrovirus의 생산 가능성이 매우 낮다.

■ 사용상의 주의

본 제품을 이용한 실험에 있어서는 아래의 사항을 주의하여 주시기 바랍니다.

1. 본 제품은 연구목적 이외에는 사용할 수 없습니다. human, 동물의 치료 및 임상진단에는 사용하지 않도록 주의하여 주시기 바랍니다. (또한, 본 제품에 의해 획득한 생물재료는 제 3 자에게 양도할 수 없습니다.) 또한, 식품, 화장품, 가정용품 등으로 사용할 수 없습니다.
2. 본 제품을 연구목적 이외에 사용하는 경우에는 사전에 당사로 문의하여 주시기 바랍니다.
3. 본 retrovirus로 생성된 바이러스 상층은 삽입 단편에 의한 위험한 바이러스가 함유되어 있으므로 재조합 retrovirus 생산과 취급에는 적절한 처리를 취해야 합니다. 사용시에는 관찰 관청에서 정한 재조합 DNA 실험 지침에 따라 실험하시기 바랍니다.
4. 본 제품의 사용과 관련된 사고, 손해에 대해서 당사에서 책임을 지지 않으므로 주의하여 사용하시기 바랍니다.

J-a

iPS세포 제작 vector 관련

RetroNectin®

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
RetroNectin	TKR	T100A	0.5 mg (0.5 ml)	246,000원
RetroNectin	TKR	T100B	2.5 mg (2.5 ml)	954,000원

■ **형상** 용액품

12.5 mM Sodium Citrate (pH6.2), 1.25% sucrose

■ **농도** 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

■ **분자량** 62,613 (아미노산 서열로부터)

■ **보존** -20°C 이하 (용해 후 동결용해의 반복은 피한다)

■ **순도** SDS capillary 전기영동에서 순도 90% 이상

■ **기원**

E. coli expressing human fibronectin fragment CH-296

■ **제품설명**

RetroNectin, Recombinant Human Fibronectin CH-296은 인간 fibronectin의 세포 부착부위 (Type III repeat, 8, 9, 10), heparin-binding domain II (Type III repeat, 12, 13, 14) 및 CS I 부위 (III-CS의 N말단 25잔기)를 함유하는 분자량 약 63,000 (574 아미노산)의 재조합 단백질이다. Retrovirus vector를 매개로 하여 포유동물세포에 유전자를 도입할 때 배양기의 바닥에 RetroNectin을 coating 하여 그 도입효율을 비약적으로 향상시킬 수 있다. 세포는 주로 각각의 VLA-4 및 VLA-5의 ligand인 CS-I 부위와 세포 부착 부위에 결합하고 virus vector는 heparin-binding domain II에 결합함으로써 RetroNectin 상에 함께 배치된다. 따라서, 국소적으로 양자의 농도가 높아져 유전자의 도입이 촉진된다.

RetroNectin coating법은 바이러스 상층액을 이용하여 감염시킴으로써 통상 50~70%의 효율로 유전자를 도입할 수 있다. 이처럼 RetroNectin을 이용함으로써 producer 세포와의 공배양, polycation의 첨가 및 성장인자나 stroma 세포의 존재 하에서 장기간 배양 (*in vitro*)하지 않고도 유전자를 도입할 수 있다.

■ **Plate의 Coating**

RetroNectin은 25~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 5~20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 가 되도록 plate에 coating한다.

지름 3.5 cm의 petri dish (10 cm^2)인 경우에는 1 well 당 2 μl 의 RetroNectin 용액을 첨가하면 된다. 따라서, 1 vial (0.5 mg protein)로 2~10 petri dish를 coating할 수 있다.

■ **License Notice** : [L9, M69]

RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm ϕ

RetroNectin® Dish

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
RetroNectin Dish	TKR	T110A	10 dishes	490,000원

■ **보존** 4°C

■ **제품설명**

RetroNectin을 35 mm dish에 미리 코팅한 것이다. 그러므로 별도의 coating 과정이 필요없고 일정한 유전자 도입 효율을 얻을 수 있다.

■ **License Notice** : [L9]

J-a

iPS세포 제작 vector 관련

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)	TKR	6166	100 회	398,000원

■ 내용 (100 반응 ; 25 µl 반응시)

Forward Titer Primer FRT-1 (10 pmol/µl)	50 µl
Reverse Titer primer RRT-1 (10 pmol/µl)	50 µl
RNA Control Template (5 × 10 ⁸ copies/µl)	10 µl
EASY Dilution (Real Time PCR 용)	1 ml × 2
DNase I (RNase Free) (5 U/µl)	40 µl
10 × DNase I Buffer	50 µl
RNase Inhibitor (porcine liver) (40 U/µl)	10 µl

*Real Time RT-PCR 100 회, DNase I 처리 20회임.

■ 보존 - 20 °C

RNA Control Template는 반복적인 동결 용해에 의한 분해를 막기 위하여 소량 분주 후 Deep freezer (-70 ~ -80°C)에서 저장하는 것을 추천합니다.

■ 제품설명

본 제품은 Real Time RT-PCR법으로 MLV (murine leukemia virus) 유래 retrovirus vector의 RNA genome 량을 측정하여 역가 (RNA titer)를 산출하는 제품이다.

본 제품을 One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code RR066A/RR086A)과 함께 사용하여 바이러스 상등액에서 직접 RNA 역가를 측정할 수 있고, 약 4 시간 안에 결과를 얻을 수 있다. 또한, MLV의 packaging signal부분을 증폭하기 때문에 거의 모든 MLV 유래 retrovirus의 역가 (RNA titer)를 측정할 수 있다. 일반적으로 Retrovirus의 감염역가를 측정할 때에는 retrovirus를 감염시키고 형광이나 약제내성 등을 이용하여 감염효율을 측정해 역가 (생물학적 titer)를 산출하는 방법이 이용된다. 이 방법

은 수일이 소요되며, 마커 유전자나 약제 내성유전자가 포함되지 않은 retrovirus vector에는 적용할 수 없다. 또한, 생물학적 titer를 기준으로 MOI (multiplicity of infection)를 측정해 세포에 감염시킬 경우, 역가 측정에 며칠이 소요되므로 일단 바이러스 상등액을 동결 보존할 필요가 있다. 이런 경우, 동결 용해에 의해 바이러스 역가가 저하될 가능성이 있으므로 초기 측정값과는 다른 MOI의 바이러스가 실험에 이용될 수 있다.

본 제품은 retrovirus의 RNA genome양을 측정하기 때문에 마커유전자나 약제내성 유전자와는 관계없이 역가를 측정할 수 있다. 또한 약 4시간 만에 측정 결과를 얻을 수 있으므로 바이러스 상등액을 동결하지 않고 원하는 MOI로 감염시킬 수 있다. 함께 사용하는 One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 은 SYBR Green I 검출에 의한 1 step Real Time RT-PCR kit이다. 신장성이 뛰어나 단시간에 효율적으로 cDNA 합성이 가능한 역전자 효소 PrimeScript와 다카라의 대표적인 PCR 효소인 TaKaRa Ex Taq HS를 이용하여 안정적으로 one step Real Time RT-PCR을 실시할 수 있다.

■ 이 외에 필요한 시약

One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code RR066A) 또는 One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code RR086A)

J-a

iPS세포 제작 vector 관련

Cycling probe로 신속하게 provirus copy 수를 측정

Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR)

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR)	TKR	6167	100 회	321,000원

■ 내용 (100 회, 25 µl 반응시)

Retrovirus Primer Mix for Provirus (각 10 pmol/µl)	50 µl
Retrovirus Probe for Provirus (10 pmol/µl)*	50 µl
hiFNg Primer Mix for Provirus, Human (각 10 pmol/µl)	50 µl
hiFNg Probe for Provirus, Human (10 pmol/µl)*	50 µl
DNA Control Template for Provirus, Human (200 pg/µl)	15 µl
EASY Dilution (Real Time PCR 용)	1 ml × 4

*형광 표식 probe (FAM)는 차광한다.

■ 보존 - 20 °C

■ 제품설명

Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR) 은 MLV (murine leukemia virus) 유래의 retrovirus vector를 매개로 Human cell에 유전자를 도입할 때, Real Time PCR법으로 provirus copy 수를 측정하는 제품이다. Provirus는 retrovirus genome이 숙주세포의 유전자에 삽입된 상태의 virus이다.

본 제품은 CycleavePCR Core Kit (Code CY501)와 함께 사용하여 유전자가 도입된 Human cell에 genome DNA로부터 provirus copy 수를 측정할 수 있다. 또한 MLV의 packaging signal 부분을 증폭 대상으로 하고 있어 거의 모든 MLV 유래의 retrovirus vector의 provirus copy 수를 측정할 수 있

다.

Provirus copy 수를 측정하는 방법으로 유전자 도입한 세포에서 Southern blotting으로 평균 provirus copy 수를 산출하는 방법이 있지만, 평균 provirus copy 수를 산출하기 위해서는 다수 clone으로 Southern blotting을 해야하기 때문에 많은 노력과 시간이 필요하다. 본 제품을 사용하면 세포를 복제화하지 않고 편리하게 평균 provirus copy 수를 산출할 수 있다. 함께 사용하는 CycleavePCR Core Kit는 특이성이 높은 cycling probe를 위한 Real Time PCR kit이며 genome DNA의 background를 억제하여 타겟을 정확하게 간편하게 정량할 수 있다.

■ 이 외에 필요한 시약

CycleavePCR Core Kit (Code CY501)

[주의]

본 set는 유전자가 도입된 human 세포용으로 다른 세포에는 사용할 수 없습니다. 또한, 정상세포와 같이 상염색체가 이배체인 세포에만 적용 가능합니다.

■ License Notice : [L4, M46]

Anti-Human iPS

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Anti-Human Oct4, Monoclonal	TKR	M221	0.1 mg	444,000원
Anti-Human Lin28, Monoclonal	TKR	M222	0.1 mg	444,000원
Anti-Human Sox2, Monoclonal	TKR	M223	0.1 mg	444,000원

■ 내용

단일 클론 항체 (동결 건조 제품) 0.1 mg

■ 보존 4 °C

항체를 녹인 후 (2.0 mg/ml) 필요에 따라 분주하여, -20 °C 보관시 1 년, 4 °C 에서 보관시 6 개월 이내에 사용

동결 용해의 반복은 피해주시오, 그리고 희석 후의 보관은 가급적 피해 주시기 바랍니다.

■ 제품설명

유전자 재조합으로 제작한 human Oct4 전체 단백질, human Lin28 전체 단백질 및 human Sox2 부분 펩타이드 (219-236) GSPTYSMSYSQQGTPGMA] - KLH 복합체를 각각 항원으로 얻은 mouse monoclonal antibody

■ 제작 방법

컬럼 크로마토그래피로 면역 글로블린 (IgG)을 정제한 후 1.0 % bovine serum albumin을 혼합하여 10 mM PBS (pH7.4)에 용해하여 동결 건조

■ 항체 복원

dH₂O 50 μl 에 용해한다. (2.0 mg/ml 이 된다.) 사용 시에 희석이 필요한 경우는 아래와 같은 희석액을 이용한다.

■ 희석액

10 mM PBS (pH7.4)
1.0 % bovine serum albumin
0.1 % sodium azide

■ 용도

Oct4

- 환원 조건에서 western blot (1 ~ 5 μg/ml : 발색법)
- 면역 세포 염색 (0.2 ~ 1 μg/ml : 형광법)

Lin28

- 환원 조건에서 western blot (1 ~ 5 μg/ml : 발색법)
- 면역 세포 염색 (0.2 ~ 1 μg/ml : 형광법)

Sox2

- 환원 조건에서 western blot (1 ~ 5 μg/ml : 발색법)
- 면역 세포 염색 (0.2 ~ 1 μg/ml : 형광법)

J-a

iPS세포 제작 vector 관련

Epigenetics

ChIP grade의 수식 Histone Monoclonal Antibody

수식 Histone H3 antibody

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Anti-Histone H3, mouse monoclonal antibody	MAB	MA301B	100 μ l	390,000원
Anti-monomethyl Histone H3(Lys4), mouse monoclonal antibody	MAB	MA302B	100 μ l	390,000원
Anti-dimethyl Histone H3(Lys4), mouse monoclonal antibody	MAB	MA303B	100 μ l	390,000원
Anti-trimethyl Histone H3(Lys4), mouse monoclonal antibody	MAB	MA304B	100 μ l	390,000원
Anti-acetyl Histone H3(Lys9), mouse monoclonal antibody	MAB	MA305B	100 μ l	390,000원
Anti-monomethyl Histone H3(Lys9), mouse monoclonal antibody	MAB	MA306B	100 μ l	390,000원
Anti-dimethyl Histone H3(Lys9), mouse monoclonal antibody	MAB	MA307B	100 μ l	390,000원
Anti-trimethyl Histone H3(Lys9), mouse monoclonal antibody	MAB	MA308B	100 μ l	390,000원
Anti-acetyl Histone H3(Lys27), mouse monoclonal antibody	MAB	MA309B	100 μ l	390,000원
Anti-acetyl Histone H3(Lys9/27), mouse monoclonal antibody	MAB	MA310B	100 μ l	390,000원
Anti-phospho Histone H3(Ser10), mouse monoclonal antibody	MAB	MA312B	100 μ l	390,000원
Anti-monomethyl Hist,H3(Lys27)	MAB	MA321B	100 μ l	390,000원
Anti-trimethyl Hist,H3(Lys27)	MAB	MA323B	100 μ l	390,000원
Anti-monomethyl Hist,H3(Lys36)	MAB	MA331B	100 μ l	390,000원
Anti-dimethyl Hist,H3(Lys36)	MAB	MA332B	100 μ l	390,000원
Anti-trimethyl Hist,H3(Lys36)	MAB	MA333B	100 μ l	390,000원
Anti-phospho Hist,H2B(Ser14)	MAB	MA251B	100 μ l	390,000원

■ 농도 1 mg/ml

■ 보존 -20℃

3개월 정도의 단기간은 4℃ 보존 가능.

동결 용해의 반복 및 희석 후의 보존은 가능한 한 피한다.

■ 형상

PBS + 0.05% sodium azid

■ 유래

Human Histone H3,1의 합성 peptide를 항원으로 얻은 세포

■ 제품설명

본 제품군은 MBA Institute Inc.의 human 수식 histone H3에 대한 mouse monoclonal antibody이다. 크로마틴 면역침강 (ChIP: chromatin immunoprecipitation) 법을 이용한 수식 histone의 genome 재해석은 epigenetics 연구를 진행시키는데 있어서 없어서는 안 될 꼭 필요한 해석법이 되고 있다. 지금까지 널리 이용된 polyclonal antibody를 이용한 크로마틴 면역 침강에서는 polyclonal antibody의 lot 차이로 인해 재현성이 높은 결과를 얻기 어려운 문제점이 있었다. 높은 특이성을 가지는 anti human 수식 histone mouse monoclonal antibody는 ChIP해석에 사용 가능할 뿐만 아니라, western blotting, 면역 염색에도 이용 가능하다.

■ 용도 (참고 사용 농도)

- Immunoprecipitation: 1~5 μ g/5 μ l Sepharose
- Immunostaining: 0.5~1 μ g/ml
- Immunoblot: 0.5~1 μ g/ml

J-b

Epigenetics

EpiScope® MSP Kit

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
EpiScope MSP Kit	TKR	R100A	200 회	629,000 원
EpiScope MSP Kit	TKR	R100B	400 회	1,195,000 원

■ 내용 (200 회, 50 µl 반응시)

2×MSP Buffer (Mg ²⁺ plus, dNTP plus) ¹⁾	1 ml×5개
MSP Enzyme	240 µl
100×SYBR Green I	100 µl
ROX Reference Dye (50× conc.) ²⁾	200 µl
ROX Reference Dye II (50× conc.) ²⁾	200 µl

¹⁾ Mg²⁺ 농도는 4 mM(2×), dNTP 농도는 400 µM(2×).

²⁾ Applied Biosystem PCR 장치 등 well 간의 형광 시그널의 보정이 필요한 장치로 검출하는 경우에 사용한다. Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System에는 ROX Reference Dye, 7500 및 7500 Fast Real-Time PCR System에는 ROX Reference Dye II를 이용한다. Thermal Cycler Dice Real Time System II(Code TP900)등의 Real Time PCR 장치나 전기 영동에 의한 해석을 실시하는 통상의 PCR 장치를 사용하는 경우는 필요없다.

■ 보존 -20℃

100×SYBR Green I, ROX Reference Dye, Dye II는 반드시 차광 해 주세요.

■ 제품설명

EpiScope MSP Kit는 MSP (Methylation Specific PCR) 전용 PCR 시약이다. MSP에서는 bisulfite를 처리함으로써 CpG 배열의 메틸화에 따라 배열이 바뀌는 염기 부위에 메틸화 DNA 검출용 프라이머 (M Primer)와 비메틸화 DNA 검출용 프라이머(UM Primer)를 디자인하여 PCR을 실시한다. 본 제품은 bisulfite 처리된 uracil을 포함한 DNA를 주형으로 고효율 증폭이 가능한 전용 효소와 최적화된 버퍼에 의해 높은 효율로 증폭이 가능하므로, 종래의 PCR 시약과 비교해 명확한 DNA 메틸화/비메틸화 배열 구분이 가능한 MSP 해석을 실시할 수 있다. 적절한 농도의 SYBR Green I을 포함하여 반응이 최적화 되어 있어 Real Time PCR 검출 및 end-point 검출 모두를 동일한 반응 조건으로 검출할 수 있다.

■ 특징

- Methylation Specific PCR을 위한 전용 시약
- 명확한 DNA 메틸화/비메틸화 배열의 구분 가능
- Real Time PCR 검출 및 일반 PCR 검출 모두 적용 가능

■ 비교

Real Time PCR 검출 및 end-point 검출은 같은 반응액 조성과 PCR 조건으로 반응을 진행한다. end-point 검출의 경우에도 반드시 100×SYBR Green I를 첨가한다.

■ 사용상의 주의

SYBR Green I는 핵산과 결합하는 성질상, 돌연변이의 가능성이 있습니다. 또, DMSO 용액을 포함하고 있으므로, 조직 중에 색소가 침투할 우려가 있기 때문에 사용시 반드시 장갑을 착용해 주세요.

Bisulfite 처리한 DNA 증폭에 최적

TaKaRa EpiTaq HS

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA)	TKR	R110A	250 U	281,000 원
TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA)	TKR	R110B	1000 U	1,011,600 원

■ 내용 (200 회, 50 µl 반응시)

TaKaRa EpiTaq HS (5 U/µl)	250 U
10×EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1 ml
dNTP Mixture (각 2.5 mM)	1.2 ml
25 mM MgCl ₂	1.2 ml

■ 보존 -20℃

■ 특징

- Uracil(U)을 많이 포함한 DNA 증폭에 최적
- Anti-Taq antibody를 이용한 hot-start PCR 효소로 비특이적 증폭 억제
- GC-rich target, AT-rich target 모두 효율적으로 증폭 가능
- 증폭 산물의 3' 말단에 A가 부가되므로 그대로 TA 클로닝에 사용 가능

■ 제품설명

TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA)는 bisulfite 처리 후 Uracil을 많이 포함한 DNA를 주형으로 bisulfite sequencing이나 COBRA법 등의 분석을 위한 PCR 증폭시 최적인 PCR 효소이다. Bisulfite 처리한 DNA는 PCR 반응성에 변화가 있을 수 있지만, 본 효소는 Mg 농도나 dNTP 농도를 조정하여 증폭 효율과 반응 특이성을 조절할 수 있기 때문에, 지금까지 증폭이 어려웠던 타겟을 증폭할 수 있다.

본 효소는 anti-Taq antibody를 포함한 hot-start PCR 효소이며, 고온 가열할 때까지는 anti-Taq antibody가 효소에 결합해 polymerase 활성을 억제하고 있기 때문에, PCR cycle 시작 전의 mispriming이나 primer dimer에서 유래되는 비특이적 증폭을 막을 수 있다. Anti-Taq antibody는 PCR 초기 DNA 변성 과정 (initial denaturation)에서 변성되어 분리되므로, 별도의 변성 단계를 설정할 필요가 없다.

[주의] Bisulfite를 처리한 DNA를 이용하여, 메틸화 특이적 PCR(Methylation Specific PCR: MSP) 분석을 할 경우에는 EpiScope MSP Kit(Code R100A/B)을 추천한다.

DNA 메틸화 해석에 이용 가능한 CpG 메틸화에 영향을 받는 제한 효소

제한 효소에는 그 DNA 인식 배열 중의 염기가 메틸화되면, 메틸화된 염기의 종류 및 위치에 의해서 DNA를 절단할 수 없게 되는 것이 있다. 이러한 메틸화에 영향을 받는 제한 효소와 PCR 혹은 Real Time PCR 등의 유전자 검출 방법을 조합하여, epigenetics 해석의 하나인 포유류 계통의 DNA 메틸화 해석을 비교적 용이하게 할 수 있게 되었다.

아래 표에는 포유류 계통의 DNA 메틸화 해석에 이용 가능한 CpG 메틸화에 영향을 받는 제한 효소, 즉, CpG methylase (^{5m}CpG)에 의한 메틸화의 영향에 의해 DNA 절단을 할 수 없게 되는 제한 효소를 정리하였다.

- CpG methylase (^{5m}CpG)에 의한 메틸화 영향을 받는 제한 효소
- ◆ 배열 조건에 의해 CpG methylase (^{5m}CpG)에 의한 메틸화 영향을 받는 제한 효소

대장균 유래의 methylase의 영향도 표기하였다.

- ◆ dam methylase (G^{3m}ATC)에 의한 메틸화의 영향을 받는 제한 효소
- ◆ dcm methylase (C^{3m}CWGG)에 의한 메틸화의 영향을 받는 제한 효소

CpG methylase의 영향을 받는 제한 효소

제한효소	인식서열	절단되지 않는 서열 ²⁾	CpG	dam	dcm	절단되지 않는 서열 ²⁾
<i>Aat</i> II	GACGT/C	GA ^{5m} CGTC GACGT ^{5m} C(G)	■			
<i>Acc</i> II	CG/CG	^{5m} CG ^{5m} CG ^{5m} CGCG	■			
<i>Aor</i> 13H I	T/CCGGA	TC ^{5m} CGGA	■			
<i>Aor</i> 51H I	AGC/GCT	AG ^{5m} CGCT	■			
<i>Apa</i> I	GGGCC/C	GGGCC ^{5m} C(G)	■		◆	GGGCC ^{5m} C(WGG)
<i>Bmg</i> T120 I	G/GNCC	GGNC ^{5m} C(G)	■		◆	GGNC ^{5m} C(WGG)
<i>Bsp</i> T104 I	TT/CGAA	TT ^{5m} CGAA	■			
<i>Bss</i> H II	G/CGCGC	G ^{5m} CG ^{5m} CGC G ^{5m} CGCGC	■			
<i>Cfr</i> 10 I	R/CCGGY	RC ^{5m} CGGY	■			
<i>Cla</i> I	AT/CGAT	AT ^{5m} CGAT	■	◆		(G) ^{5m} ATCGAT ATCG ^{5m} AT(C)
<i>Cpo</i> I	CG/GWCCG	^{5m} CGGWC ^{5m} CG	■			
<i>Eae</i> I	Y/GGCCR	YGGC ^{5m} CG	■		◆	YGGC ^{5m} CA(GG)
<i>Eco</i> 52 I	C/GGCCG	^{5m} CGGC ^{5m} CG ^{5m} CGGCCG CGGC ^{5m} CG	■			
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	GATAT ^{5m} C(G)	■			
<i>Hae</i> II	RGCGC/Y	RG ^{5m} CGCY	■			
<i>Hap</i> II ¹⁾	C/CGG	C ^{5m} CGG	■			
<i>Hha</i> I	GCG/C	G ^{5m} CGC GCG ^{5m} C(G)	■			
<i>Mlu</i> I	A/CGCGT	A ^{5m} CG ^{5m} CGT	■			
<i>Nae</i> I	GCC/GGC	GC ^{5m} CGGC GCCG ^{5m} C(G)	■			
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	G ^{5m} CGGC ^{5m} CGC	■			
<i>Nru</i> I	TCG/CGA	T ^{5m} CG ^{5m} CGA T ^{5m} CGCGA	■	◆		TCGCG ^{5m} A(TC)
<i>Nsb</i> I	TGC/GCA	TG ^{5m} CGCA	■			
<i>Pma</i> C I	CAC/GTG	CA ^{5m} CGTG	■			
<i>Psp</i> 1406 I	AA/CGTT	AA ^{5m} CGTT	■			
<i>Pvu</i> I	CGAT/CG	^{5m} CGAT ^{5m} CG	■			
<i>Sac</i> II	CCGG/GG	C ^{5m} CG ^{5m} CGG C ^{5m} CGCGG	■			
<i>Sal</i> I	G/TCGAC	GT ^{5m} CGAC	■			
<i>Sau</i> 8A I	GATC	GAT ^{5m} C(G)	■			
<i>Sma</i> I	CCC/GGG	CC ^{5m} CGGG	■			
<i>Sna</i> B I	TAC/GTA	TA ^{5m} CGTA	■			

¹⁾ *Hap* II의 isoschizomer인 *Msp* I은 CpG methylase의 영향을 받지 않는다

²⁾ () 안의 서열은 제한 효소 인식 서열 이외의 서열을 나타낸다

M : A or C Y : C or T H : A or C or T
 N : A or C or G or T W : A or T D : A or G or T
 R : A or G S : C or G K : G or T

MrcBC

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
MrcBC	TKR	1234A	200 U	129,000 원

■ 제품 설명

Purine nucleotide (Pu : A 또는 G)와 methylcytosine (mC : 5-hydroxymethylcytosine, 5-methylcytosine, 4-methylcytosine)으로 구성된 nucleotide(PumC)를 포함한 DNA를 인식하여 절단한다. DNA 절단은 40-2,000 bp까지 가능하며, 양 끝에 PumC가 적어도 2개 필요하다.

5' ...Pu^mC(N_n)Pu^mC...3'

*Pu: A or G

*C: 5-hydroxymethylcytosine, 5-methylcytosine, 4-methylcytosine
n=40-2,000

■ 보존 - 20℃

■ 농도 1 U/μl

■ 내용

10×McrBC Buffer	500 μl
0.1% BSA	1 ml
100 mM GTP(100×)	50 μl

■ 반응 온도 37℃

■ 활성 측정 기질

pBR322(1개 McrBC 인식 사이트를 가지고 있다.)

■ 기원

Recombinant proteins expressed in *E. coli*

■ 용도

- DNA 메틸화 해석 (qAMP: quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR)
- 비메틸화 DNA 농축 (CHARM: Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation, Genome Res, 2008 May;18(5):780-790. Epub 2008 Mar 3.)

T4-β-glucosyltransferase

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
T4-β -glucosyltransferase	TKR	2350A	500 U	111,000 원
T4-β -glucosyltransferase	TKR	2350B	1500 U	313,500 원

■ 보존 - 20℃

■ 제품 설명

T4-β -glucosyltransferase는 5-hydroxymethylcytosine 잔기의 5 - hydroxyl methyl기에 UDP-Glucose (uridine diphosphoglucose)의 glucose일부를 전이 하는 효소이다.

■ 용도

- 포유류나 식물의 게놈 DNA에 존재하는 5-hydroxymethylcytosine의 glycosylation
- 5-hydroxymethylcytosine sensitive enzyme과의 조합에 의해 5-hydroxymethylcytosine 검출

J-b

Epigenetics

EpiScope Methylated gDNA 시리즈

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
EpiScope Methylated HeLa gDNA	TKR	3520	15 μ g	332,000원
EpiScope Unmethylated HCT116 DKO gDNA	TKR	3521	10 ug	222,000원
EpiScope Methylated HCT116 gDNA	TKR	3522	10 ug	222,000원

- 각종 DNA 메틸화 해석시 각각 positive/negative control DNA로 사용
- 제품에 따라 Methylated DNA는 CpG methylase를 이용하여 메틸화한 HeLa세포 유래 게놈DNA 또는 고도로 메틸화된 HCT116 gDNA이다.
- 메틸기 전이효소를 Knockdown 시킨 세포주에서 조제한 Unmethylated DNA는 지극히 낮은 메틸화 레벨을 보임

■ 제품설명

DNA의 메틸화 해석은 epigenetic 해석의 일부 영역으로 동물에서는 CpG서열의 cytosine이 메틸화 되는 것으로 알려져 있다. 특히 유전자 프로모터 영역의 CpG island는 메틸화 상태가 유전자 발현 제어에 관여하고 있는 것으로 알려져 있어 주요 해석의 대상이 되고 있다. 해석에는 bisulfate sequencing 등 여러 분석법이 이용되고 있다.

EpiScope Methylated HeLa gDNA (Code 3520)는 HeLa세포 유래의 게놈DNA를 CpG methylase를 이용해 고도로 메틸화한 것으로 다양한 DNA메틸화 해석의 positive control로 사용 가능하다.

EpiScope Methylated HCT116 gDNA (Code 3522)는 HCT116 세포(Human colon cancer cell line) 유래의 게놈 DNA를 CpG methylase를 이용해 고도로 메틸화한 것으로 여러 DNA 메틸화 해석 방법에 사용 가능하고, positive control(고메틸화 DNA)로 사용할 수 있다.

EpiScope Unmethylated HCT116 DKO gDNA (Code 3521)는 DNMT1(DNA methyltransferase1)과 DNMT3B(DNA methyltransferase 3B)를 Double knockout시킨 HCT116 세포 유래의 게놈 DNA이며, wild type HCT116 세포 유래의 게놈 DNA와 비교해 메틸화 레벨이 매우 낮다(5%미만)*. 본 DNA는 다양한 DNA 메틸화 해석의 negative control(비메틸, 저메틸화 DNA)로 사용할 수 있다.

* 본 제품은 유전자를 변형한 HCT116 세포주에서 조제한 게놈 DNA이므로 DNA 메틸화 상태 등 자세한 것은 제품 lot마다 다를 수 있다.

■ 용도

각종 메틸화 DNA 분석의 positive control 또는 negative control로 사용 가능하다.

Bisulfate sequencing

Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

Methylated CpG Island Recovery Assay (MIRA)