

# Arabidopsis DNA chip, 환경호르몬 연구용 DNA chip, DNA chip 관련 시약

IntelliGene™ Arabidopsis CHIP Ver.1.0

TaKaRa Code X0021 1매

IntelliGene™ Human DNA CHIP for endocrine disruption study Ver.1.0

TaKaRa Code X103 2매

TaKaRa는 IntelliGene™ 시리즈에 신제품을 추가하였다. 신발매 제품은 *Arabidopsis*(애기장대)의 cDNA를 정렬·고정화한 *Arabidopsis* CHIP I과 환경호르몬 연구용인 Human DNA CHIP for endocrine disruption study Version 1.0이다. 이 DNA chip을 이용하여 식물과 인간의 환경 호르몬 연구가 가속화될 것으로 기대하며 또 기존의 DNA chip 연구와 관련한 시약을 소개한다.

## ■ Arabidopsis DNA chip

### IntelliGene™ Arabidopsis CHIP I

Kazusa DNA 연구소에서 *Arabidopsis thaliana*로부터 분리 동정한 cDNA 유전자 중 약 2,200 종류의 DNA 단편을 정렬·고정한 것이다. 그림 1에 IntelliGene™ Arabidopsis CHIP I의 hybridization 화상을, 그림 2에 slide glass(1×3 inch) 상에 spot한 DNA 단편의 위치를 나타내었다. 또 control로써 아래의 DNA 단편을 spot하여 signal 강도의 보정과 signal cut off 값을 결정할 때 사용할 수 있다.

*Arabidopsis thaliana* 유래 DNA 단편(housekeeping gene으로)

beta-2 tubulin(APD19c08)	16 spots
alpha-1-tubulin(APZ12d08)	4 spots
actin 2(APD07h09)	4 spots
eukaryotic initiation factor 4A-1(APD06d03)	4 spots
60S ribosomal protein L1(APD10f01)	4 spots
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(APD12a07)	4 spots
ribonuclease(APZ30g03)	4 spots
cellulose synthase(APZ31h04)	4 spots
ubiquitin(APD05g11)	4 spots

다른 생물에서 유래한 DNA 단편(negative control로)

lambda-A	16 spots
pUC18	16 spots

DNA chip상의 spot위치 정보는 당사의 일본 본사 바이오 홈페이지 [DNA chip 관련] (<http://www.takara.co.jp/bio/goods/new/new6/new6-7.htm>)에서 download 할 수 있다.

또 상세한 유전자 정보(clone name 또는 accession number)는 Kazusa DNA 연구소의 database나 다른 database로 검색 가능하다.

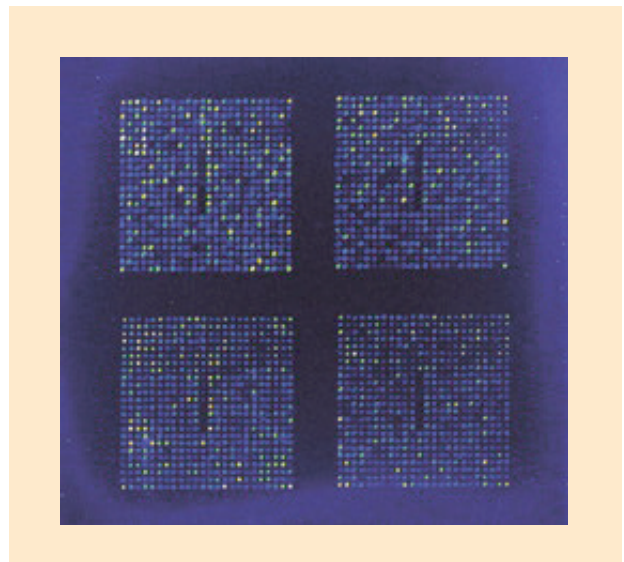


그림 1 IntelliGene™ Arabidopsis CHIP I

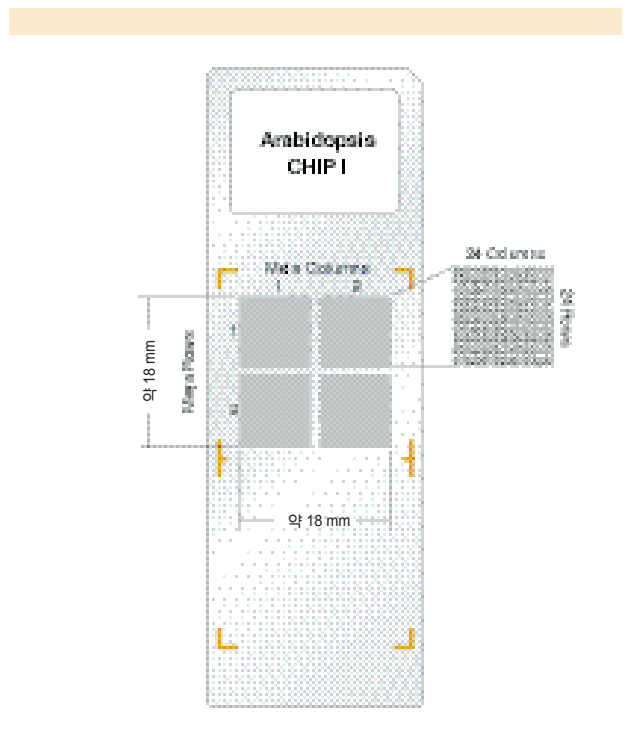


그림 2 IntelliGene™ Arabidopsis CHIP I에 spot한 DNA 단편의 위치

실험예

[방법]

애기 장대 (*Arabidopsis thaliana*, ecotype: Columbia)를 파종 한 후 광조사하여 약 1개월 동안 재배한 후, 하나는 그늘에서 9 시간 재배하고 다른 것은 그대로 연속광 아래에서 9시간 재배하였다. 시료를 채취하여 로젯터 일부분 약 2 g(약 6 개체 상당)을 액체 질소를 넣은 유발안에서 파쇄하고 Trizol(GIBCOBRL사)을 이용하여 total RNA 약 0.8 mg을 추출하였다. 추출한 RNA를 RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)를 사용하여 명조건과 암조건에서 채취한 시료의 total RNA 15  $\mu$ g을 각각 Cy3<sup>TM</sup>, Cy5<sup>TM</sup>로 형광 표식하였다. 두 표식 시료를 혼합하고 Carrier DNA(8  $\mu$ g poly dA+10  $\mu$ g Yeast tRNA)를 첨가한 후, 에탄올로 침전하였다. Pellet를 완전히 건조시킨 후 10  $\mu$ l hybridization buffer(6 $\times$  SSC, 0.2% SDS, 5 $\times$  Denhardt's 용액, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l denatured salmon sperm DNA)를 첨가하여 probe용액으로 조제하였다. 아래의 조건으로 IntelliGene<sup>TM</sup> Arabidopsis CHIP I(TaKaRa Code X0021)상에서 prehybridization, hybridization 및 세정하고 Affymetrix<sup>®</sup> 418 Array Scanner(TaKaRa Code GM205)로 scanning하여, 얻어진 형광 signal을 해석 software ImaGene<sup>TM</sup> (TaKaRa Code BD001)을 사용하여 해석하였다.

- Prehybridization  
Prehybridization buffer(6 $\times$  SSC, 0.2% SDS, 5 $\times$  Denhardt's 용액, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l denatured salmon sperm DNA)를 IntelliGene<sup>TM</sup> Arabidopses CHIP I에 첨가한후 실온에서 2시간 incubation.
- Hybridization  
Hybridization buffer에 용해한 probe 용액 10  $\mu$ l를 prehybridization한 chip에 첨가하고 65 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 incubation.
- 세정  
2 $\times$  SSC/0.2% SDS(55 $^{\circ}$ C)로, 30분간 $\times$  2회, 2 $\times$  SDS/0.2% SDS(65 $^{\circ}$ C)로 5분간, 0.5 $\times$  SSC(실온) 5분간 세정.

[결과]

Cy3<sup>TM</sup>(570 nm : 명조건에서 재배한 시료), Cy5<sup>TM</sup>(660 nm : 암조건에서 재배한 시료) 각각을 scanning하여 얻은 검출 화상을 그림 3에 나타내었다. 그림 4는 각 검출 화상에 녹색과 적색의 유사색을 붙여 중합한 것(False color overlay)이다. 두 검출과장에 있어서 negative control(pUC18)의 형광 signal의 2배 이하의 형광강도를 나타내는 spot은 무효로 판단하여 그들을 제외한 유효 signal의 중간값(median)을 사용하여 두 화상 위의 각 signal강도를 보정하였다. 각 spot의 보정 후 Cy3<sup>TM</sup>, Cy5<sup>TM</sup> 형광 signal값을 Scatter Plotting한 것을 그림 5에 나타내었다. 그림 5의 흑색 실선은 Cy3<sup>TM</sup>와 Cy5<sup>TM</sup>의 signal비가 1:1인 경우의 이론값을 나타내었고, 청색 실선은 비가 2:1 또는 1:2인 경우, 적색 실선은 3:1 또는 1:3인 경우의 이론값을 나타낸 것이다. 또 명조건에서 재배한 시료에서 추출한 total RNA 15  $\mu$ g을

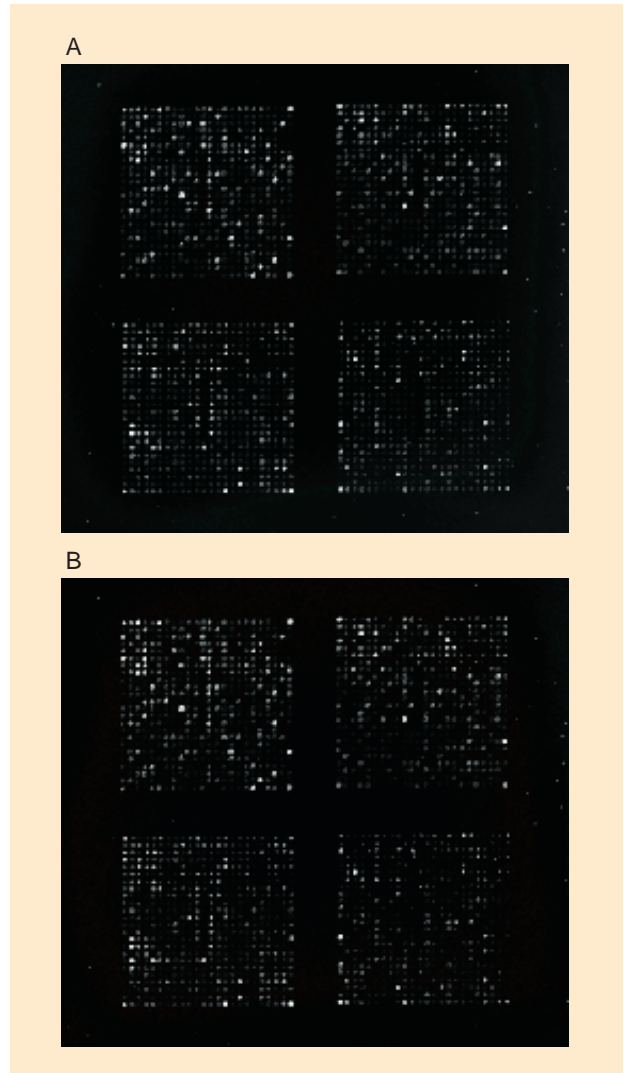


그림 3 Scanning 화상  
A : 명조건에서 재배한 로젯터 앞의 유전자 발현 pattern(Cy3<sup>TM</sup> 표식)  
B : 암조건에서 재배한 로젯터 앞의 유전자 발현 pattern(Cy5<sup>TM</sup> 표식)

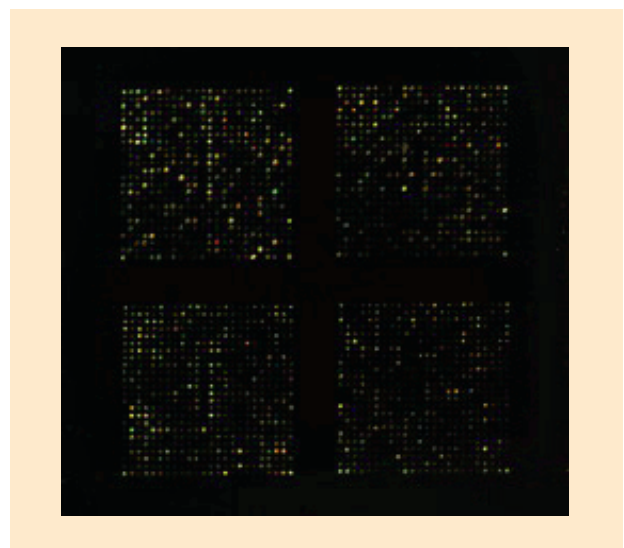


그림 4 2개의 형광화상(그림 3)의 False Color Overlay  
녹색 : 명조건에서 재배한 로젯터 앞에서 유래한 signal  
적색 : 암조건에서 재배한 로젯터 앞에서 유래한 signal

각각 Cy3™, Cy5™로 표식하여 같은 실험을 한 결과를 Scatter Plot로 그림 6에 나타내었다(대조실험). 그림 6에서는 거의 모든 spot signal이 1/2~2배의 범위 내에 들어와 있는데 비해, 그림 5에서는 명조건에서 3배 이상의 발현상승을 나타내는 유전자가 14개 확인되었으며, 암조건에서 3배 이상의 발현상승을 보이는 유전자는 35개였다.

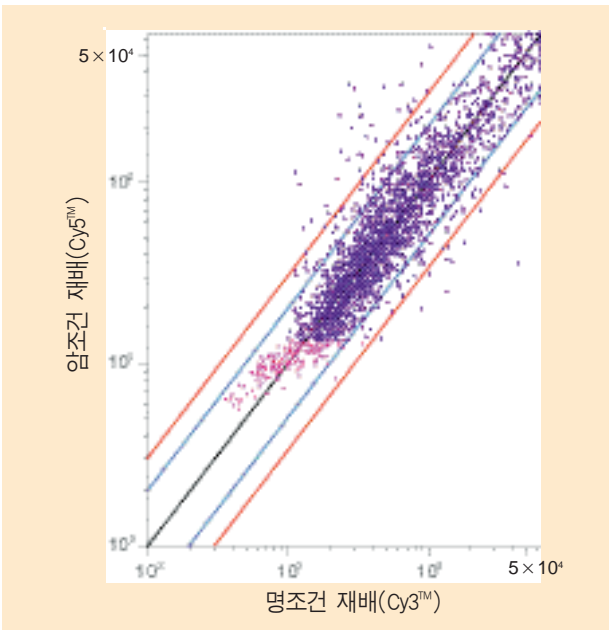


그림 5 Scatter Plot  
X축은 Cy3™ signal(명조건에서 재배한 로젯터 잎), Y축은 Cy5™ signal(암조건에서 재배한 로젯터 잎)을 나타낸다. 그래프 안의 흑색 실선은 Cy3™과 Cy5™의 signal비가 2:1 또는 1:2, 적색 실선은 3:1 또는 1:3인 경우의 이론값을 나타낸다. 유효 signal은 청색으로 plot하였고 유효하지 않은 signal(signal 강도가 negative control signal 값의 2배 이하인 것)은 분홍색으로 plot하였다.

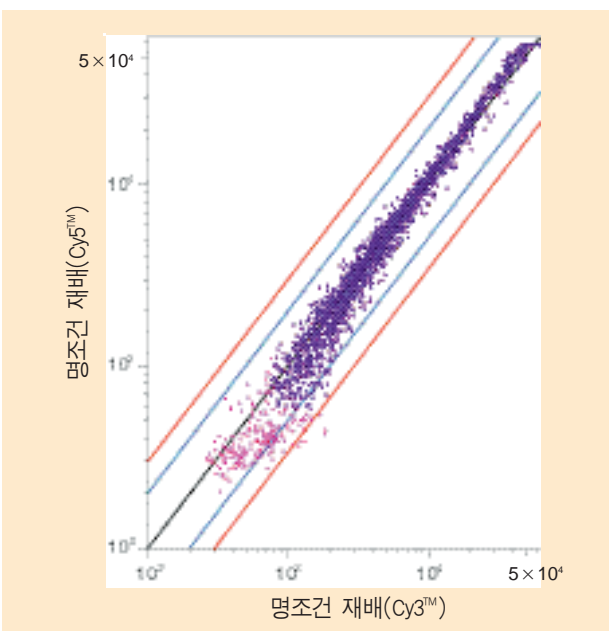


그림 6 동일시료(양지재배 로젯터 잎)의 Scatter Plot

■ 인간환경호르몬 연구용 DNA chip

IntelliGene™ Human DNA CHIP for endocrine disruption study Version 1.0

인간과 야생동물에 대한 내분비교란 화학물질(환경호르몬)의 영향이 사회적으로 문제가 되고 있으며 estrogen과 유사한 작용을 보이는 환경호르몬의 연구가 주목을 받고 있다. 본 제품은 인간유래의 기지 유전자 중 환경호르몬의 작용으로 발현량이 변화하는 유전자 222종류의 DNA단편을 slide glass상에 정렬·고정화한 DNA chip이다.

그림 7에서 hybridization화상을, 그림 8에서는 slide glass(1×3 inch)상의 DNA단편의 위치를 나타내었다. Control로써 다음의 DNA단편을 spot하였다.



그림 7 IntelliGene™ Human DNA CHIP for endocrine disruption study Version 1.0

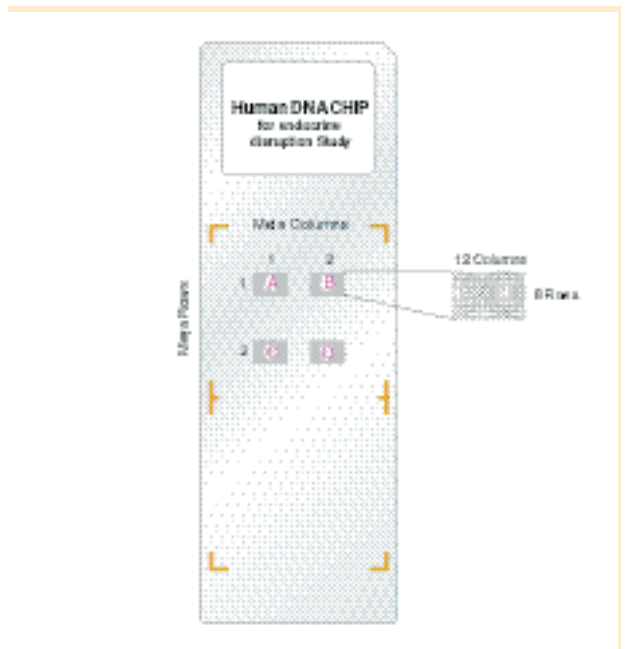


그림 8 IntelliGene™ Human DNA CHIP for endocrine disruption study Version 1.0에 spot된 DNA단편의 위치

인간 유래 DNA 단편 (housekeeping gene으로)

beta-actin	8 spots
tubulin, alpha2	8 spots
GAPD	8 spots
hexokinase 1	8 spots
transferrin receptor	8 spots
ribosomal protein S5	4 spots
general transcription factor IIB	4 spots
phospholipase A2, groupV	4 spots
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F <sub>0</sub> complex, subunit b, isoform 1	4 spots

다른 생물에서 유래하는 DNA 단편 영역 (negative control 과 internal control 로)

lambda-A	4 spots
lambda-B	4 spots
lambda-C	4 spots
pUC19	12 spots
Arabidopsis chlorophyll ab binding protein	8 spots
E. coli ompA (약간 cross hybrid 한다.)	8 spots

DNA chip상의 spot위치 정보는 당사의 일본 본사 바이오 홈페이지 [DNA chip 관련] (<http://www.takara.co.jp/bio/goods/new/new6/new6-7.htm>)에서 download 할 수 있다.

배양세포에 최종농도 1 nM의 DES(diethylstilbestrol ; 용매로서 DMSO를 최종농도로 0.1% 포함)를 첨가하고 5일간 배양한 후 세포를 회수하여 RNeasy Mini Kit(QIAGEN사)로 total RNA를 추출하였다. RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)를 사용하여 DES 첨가 시료 및 무첨가 시료(DMSO를 최종농도로 0.1% 포함)에서 추출한 total RNA 15 µg을 각각 Cy3<sup>TM</sup>, Cy5<sup>TM</sup> 로 형광표식하였다. 표식한 두 시료를 혼합하고 Carrier DNA(15 µg Human CotI DNA, 8 µg poly dA+ 10 µg Yeast tRNA)를 첨가한 다음, 에탄올로 침전시켰다. Pellet을 완전히 건조한 후 10 µl의 hybridization buffer에 용해하여 probe로 사용하였다.

Arabidopsis와 같은 방법(실험에 [방법]에 기술)으로 pre-hybridization, hybridization, 세정 및 scanning하여 얻은 형광 signal을 해석 software ImaGene<sup>TM</sup>으로 해석하였다.

**[결과]**

Cy3<sup>TM</sup>(570 nm : DES 무첨가 시료), Cy5<sup>TM</sup>(660 nm : DES 첨가 시료)의 각각의 검출파장으로 scanning한 화상의 False Color Overlay를 그림 9에 나타내었다. Arabidopsis의 경우와 같이 유효 signal의 강도를 보정하였다. 보정 후 각 spot에 있어서 Cy3<sup>TM</sup>, Cy5<sup>TM</sup>의 형광 signal 강도를 Scatter Plotting 으로 그림 10에 나타내었다. 그래프상의 흑색 실선은 Cy3<sup>TM</sup>과 Cy5<sup>TM</sup> signal의 비가 1:1인 경우의 이론값을 나타내었고, 청색 실선은 signal의 비가 2:1 또는 1:2인 경우의 이론값을 나타낸 것이다. 그 결과 DES의 첨가로 유전자 발현양에 2배 이상 차이가 나는 유전자는 15개였다.

**실험에**

**[방법]**

배양세포 MCF7 을 2×10<sup>6</sup> cells/plate가 되도록 조제하고, 5% DC-FCS 함유 DMEM 배지로 24시간 배양하였다.

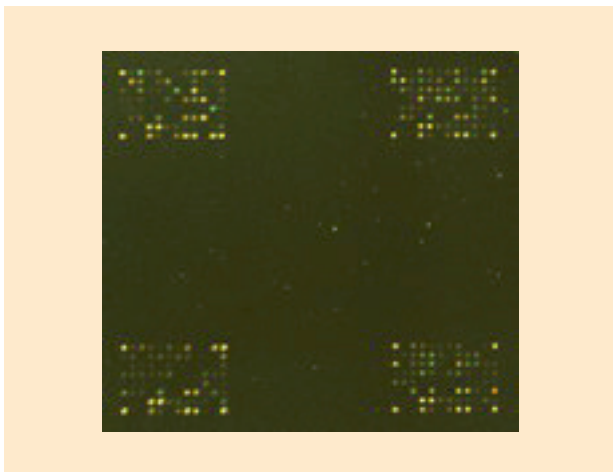


그림 9 DES무첨가 및 첨가 배양세포 scanning 화상의 False Color Overlay

녹색 : DES 무첨가 배양세포에서 유래하는 signal  
적색 : DES 첨가 배양세포에서 유래하는 signal

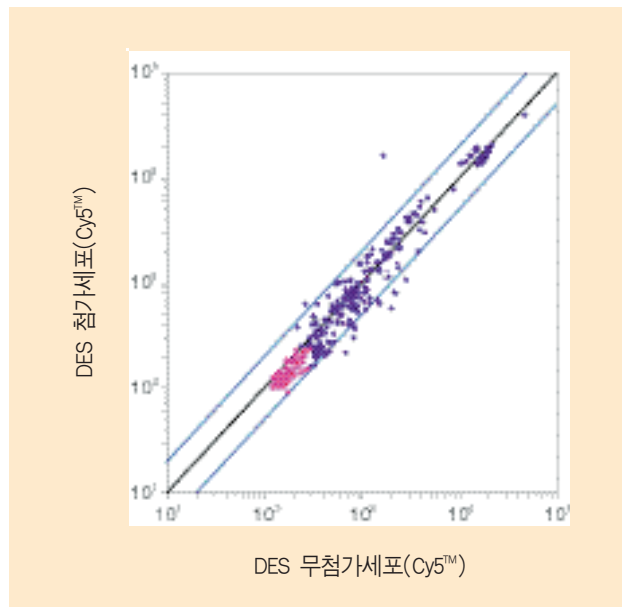


그림 10 Scatter Plot

X축은 Cy3<sup>TM</sup> signal(DES 무첨가 배양세포), Y축은 Cy5<sup>TM</sup> signal(DES 첨가 배양세포)를 나타낸다. 그래프상의 흑색 실선은, Cy3<sup>TM</sup>과 Cy5<sup>TM</sup> signal비가 1:1인 경우의 이론값을 나타낸 것이고, 청색 실선은 비가 2:1 또는 1:2인 경우의 이론값을 나타낸 것이다. 유효 signal은 청색으로 plot하였고, 무효 signal(signal 강도가 negative control signal값의 2배 이하인 것)은 분홍색으로 plot하였다.

■ DNA chip version up

(1) IntelliGene™ Human Apoptosis CHIP Version 1.1 (TaKaRa Code X101)

Version 1.0보다 control spot을 늘려 데이터 해석이 훨씬 용이해졌다.

인간 Apoptosis 관련 유전자 : 164종류

인간 유래 DNA 단편(housekeeping gene) : 4종류

beta-actin	9 spots
Uba80 mRNA for ubiquitin	4 spots
tubulin, alpha2	4 spots
GAPD	4 spots

다른 생물에서 유래하는 DNA 단편영역(negative control)

: 3종류

lambda-A	4 spots
pUC19	8 spots
<i>E. coli</i> ompA(약간 cross hybrid 한다)	4 spots

(2) IntelliGene™ Human Apoptosis CHIP Version 2.0 (TaKaRa Code X102)

Version 1.0보다 인간 Cancer 관련 유전자를 추가하고 control spot군도 늘려 총 425종의 유전자가 정렬·고정화되어 있으므로 데이터 해석이 용이해졌다(그림 11).

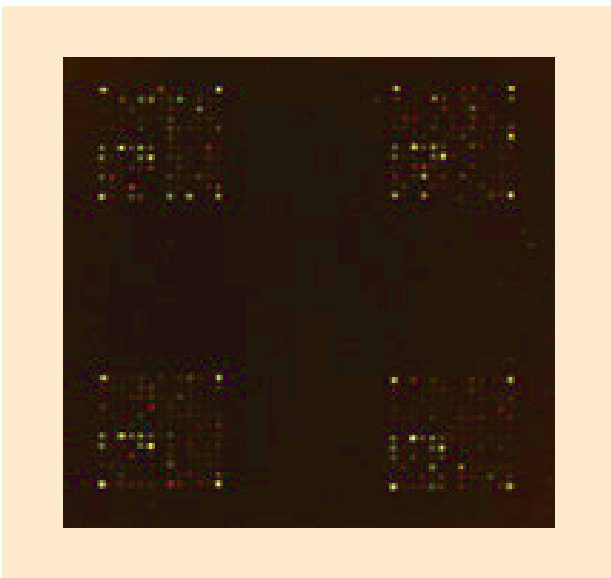


그림 11 IntelliGene™ Human Cancer CHIP Version 2.0

인간 Cancer 관련유전자 : 425종류

인간 유래 DNA 단편 (housekeeping gene) : 11종류

beta-actin	4 spots
Uba80 mRNA for ubiquitin	4 spots
phospholipase A2, groupV	4 spots
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4 spots
tubulin, alpha2	4 spots
major histocompatibility complex, class I, A	4 spots
ribosomal protein S5	4 spots
general transcription factor IIB	4 spots
hexokinase 1	4 spots
H2B histone family, member Q	4 spots
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F <sub>0</sub> complex, subunit b, isoform 1	4 spots

다른 생물에서 유래하는 DNA 단편영역

(negative control과 internal control 로서) : 10종류

lambda-A	4 spots
lambda-B	4 spots
lambda-C	4 spots
lambda-D	4 spots
lambda-E	4 spots
pUC19	8 spots
<i>E. coli</i> ompA(약간 cross hybrid 한다)	4 spots
<i>E. coli</i> cycS	4 spots
<i>Arabidopsis</i> cellulose synthase	4 spots
<i>Arabidopsis</i> chlorophyll ab binding protein	4 spots

(3) IntelliGene™ TestARRAY Version 2.0 (TaKaRa Code X000)

인간과 남조류 유전자에 대장균과 *Arabidopsis*의 유전자를 추가한 연습용 DNA chip이다(그림 12).

인간유래유전자 : 18종류

*Arabidopsis thaliana* 유래 유전자 : 15종류

*E. coli* 유래 유전자 : 15종류

남조류 유래 유전자 : 15종류

기타 : 4종류

주) Version up됨에 따라 구 version에 spot되어 있는 유전자 일부를 신 version에서 제외한 경우가 있으니 구입전에 반드시 유전자 list를 download하여 확인하기 바랍니다.

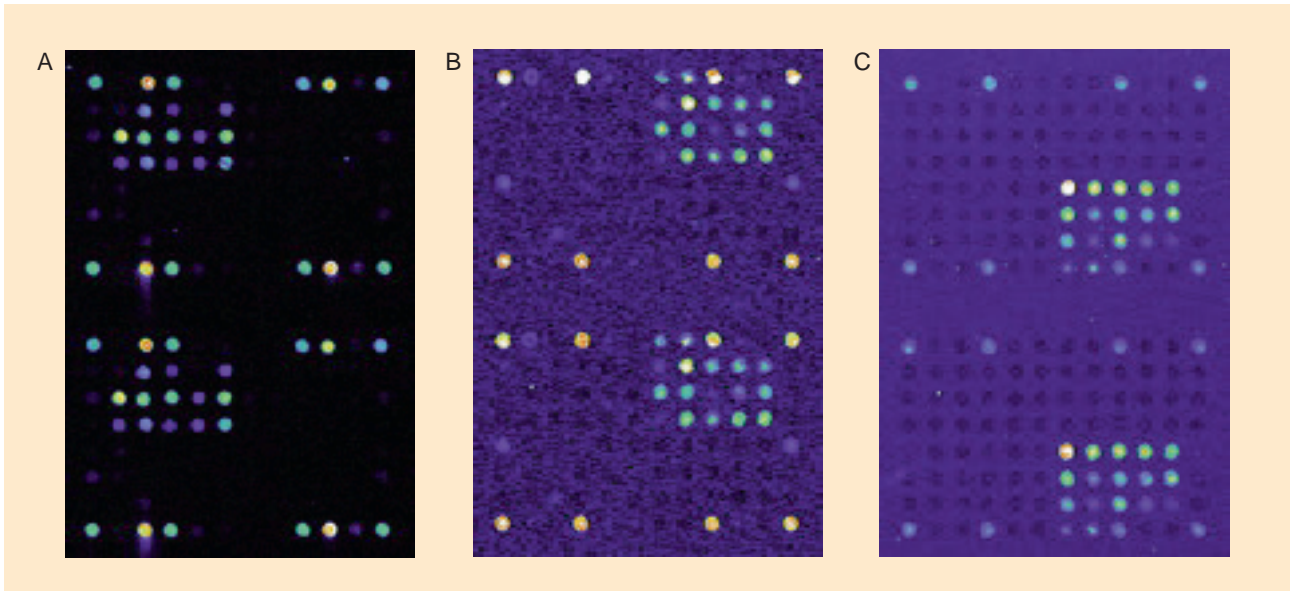


그림 12 IntelliGene™ TestARRAY Version 2.0  
 A : 인간 mRNA를 hybridization    B : 대장균 total RNA를 hybridization    C : 납조류 total RNA를 hybridization

■ DNA chip 관련 시약

(1) RNA Fluorescence Labeling Core Kit  
 (TaKaRa Code TX807)

DNA chip(DNA microarray)을 이용한 발현 해석이나 형광 probe를 이용한 핵산 검출실험에서 RNA를 고효율로 형광표식하여 cDNA probe를 제작하는 kit이다.

[내용] 10회용

- |   |        |
|---|--------|
| ① AMV Reverse Transcriptase XL(25 U/μl) | 20 μl  |
| ② 5× reaction buffer                    | 1 ml   |
| ③ 10× dNTP Mixture                      | 20 μl  |
| ④ Oligo dT(18) primer(300 pmol/μl)      | 10 μl  |
| ⑤ Random hexamer(300 pmol/μl)           | 10 μl  |
| ⑥ RNase Inhibitor(40 U/μl)              | 10 μl  |
| ⑦ DEPC-treated water                    | 400 μl |
| ⑧ 정제 칼럼                                 | 10개    |
| ⑨ 2.0 ml tube                           | 10개    |
| ⑩ 1.5 ml tube                           | 10개    |

주) Cy3™-dUTP와 Cy5™-dUTP(Amersham Pharmacia Biotech사)가 별도로 필요 하다.

(2) λ poly A<sup>+</sup> RNA-A(TaKaRa Code TX802)

λ DNA를 주형으로 *in vitro* transcription으로 합성한 polyA가 포함된 약 1.0 kb의 RNA단편이다.

TaKaRa IntelliGene™ 시리즈에 spot되어 있는 λ DNA 단편 (lambda-A)과 상보적인 서열을 가지고 있다.

[내용]

- |                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| λ polyA <sup>+</sup> RNA-A(10 ng/μl) | 10 μl |
| DEPC treated water                   | 1 ml  |

(3) λ Control Template & Primer Set-A  
 (TaKaRa Code TX803)

약 1,000 bp의 λ DNA단편-A(lambda-A)를 PCR로 제작이 가능하도록 template와 primer를 포함한 set이다.

TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code RR001A/B/C)등 각종 Taq DNA polymerase 와 본 set를 사용하여 조제한 DNA단편은 λ polyA<sup>+</sup> RNA-A(TaKaRa Code TX802)와 상보적인 서열을 가진다. 또 DNA chip을 제작할 때 본 set를 이용하여 조제한 DNA단편을 spotting하여 λ polyA<sup>+</sup> RNA-A를 internal control 로 사용할 수 있다.

[내용]

- |   |       |
|---|-------|
| λ Template DNA(10ng/μl)                           | 50 μl |
| λ Primer Mixture-A(forward+reverse, 각 20 pmol/μl) | 50 μl |

동시 발매 !!

Cytokine 연구용  
**IntelliGene™**  
**Human Cytokine CHIP Ver.1.0**

TaKaRa Code X104 2매

Human Cytokine 유전자 221종류의 DNA단편을 slide glass상에 정렬 · 고정화한 DNA chip입니다.