

TaKaRa DNA Chip

IntelliGene™ 시리즈 신제품

IntelliGene™ Mouse CHIP Set I Ver. 1.0	TaKaRa Code X2011	2매
IntelliGene™ Human Cytokine CHIP Ver. 1.0	TaKaRa Code X104	2매
IntelliGene™ Human CHIP 1K Set I Ver. 1.0	TaKaRa Code X1071	2매

TaKaRa는 DNA Chip IntelliGene™ 시리즈에 새롭게 mouse 유전자발현 해석용 Mouse CHIP Set I Ver. 1.0과 human cytokine 연구용 Human Cytokine CHIP Ver. 1.0, 인간유전자 발현 해석용 Human CHIP 1K Set I Ver. 1.0을 신발매하였다. 기존 제품에 유전자 수를 추가하여 version up된 IntelliGene™ Human Cancer CHIP Ver. 2.1 및 Human CHIP을 사용한 hybridization 실험시에 필요한 carrier DNA도 추가되었다. 본 고에서는 IntelliGene™ 시리즈와 관련제품을 소개한다.

▶ Mouse 유전자 DNA chip
IntelliGene™ Mouse CHIP Set I Ver.1.0

Mouse 유래 약 600종류의 기지유전자 DNA단편과 약 300종류의 EST DNA를 slide glass상에 정렬·고정화한 DNA chip이다. 그림 1에 slide glass(1×3 inch)상에 spot한 DNA단편의 위치를 나타내었다. 또 control로써 아래의 DNA 단편을 spot하여 signal 강도의 보정과 signal cut off 값의 결정에 이용할 수 있다.

Mouse 유래 cDNA 단편(housekeeping gene으로 positive control)

Mouse actin beta	24 spots
Mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	8 spots
Mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)	4 spots
Mouse ribosomal protein S18	4 spots
Mouse transferrin receptor(TFR)	4 spots
Mouse transferrin receptor 2(TFR2)	4 spots
Mouse stromal cell derived factor 4(Sdf4) (Ca ²⁺ binding protein : Cab45)	4 spots
Mouse ornithine decarboxylase, structural	4 spots
Mouse myosin 1b	4 spots
Mouse tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide(phospholipase A2)	4 spots

다른 생물에서 유래한 DNA 단편(negative control과 internal control로)

lambda-A	8 spots
lambda-B	4 spots
lambda-C	4 spots
lambda-D	4 spots
lambda-E	4 spots
pUC19	8 spots
<i>E. coli ftsZ</i>	8 spots
<i>Arabidopsis</i> chlorophyll ab binding protein	8 spots

DNA에 대한 상세한 유전자 정보는 당사 홈페이지 [IntelliGene™ Series Download Service]에서 download할 수 있다.

www.takara.co.kr

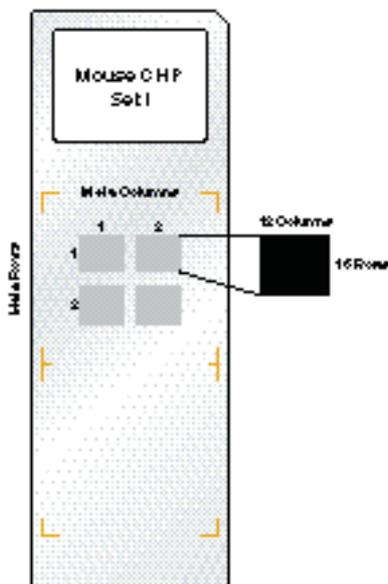


그림 1 IntelliGene™ Mouse CHIP Set I Ver.1.0에 spot한 DNA 단편의 위치

■ 실험예

【방법】

Mouse 뇌 및 간장조직에서 total RNA를 추출·정제하였다. 추출한 20 µg의 RNA를 RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)를 사용하여 Cy3™, Cy5™로 각각 형광표식 하였다. 두 표식 시료를 혼합하여 probe용액을 조제하고 Mouse CHIP Set I에 첨가한 후 65°C에서 하룻밤 hybridization하였다. 세정 후 Affymetrix 418™ Array Scanner 로 각 형광 signal을 scanning하여 얻은 형광 signal을 해석 software ImaGene™으로 해석하였다.

【결과】

Cy3™, Cy5™ 각 scanning data는 global normalization으로 보정하였다. 또 spot signal의 Mean(평균치)이 각 spot의 background signal의 Mean+2×SD(표준 편차치)보다 큰 것을 유효 signal로 normalization 하였다. Hybridization 화상을 그림 2에, ImaGene™에서의 해석결과(Scatter Plot)를 그림 3에 나타내었다.

유효 signal이 얻어진 spot수는 569개로 그 중 간장조직에 비해 뇌 조직에서 3배 이상의 발현을 보이는 유전자가 70개, 뇌 조직에 비해 간장조직에서 3배 이상의 발현을 보이는 유전자가 77개였다.

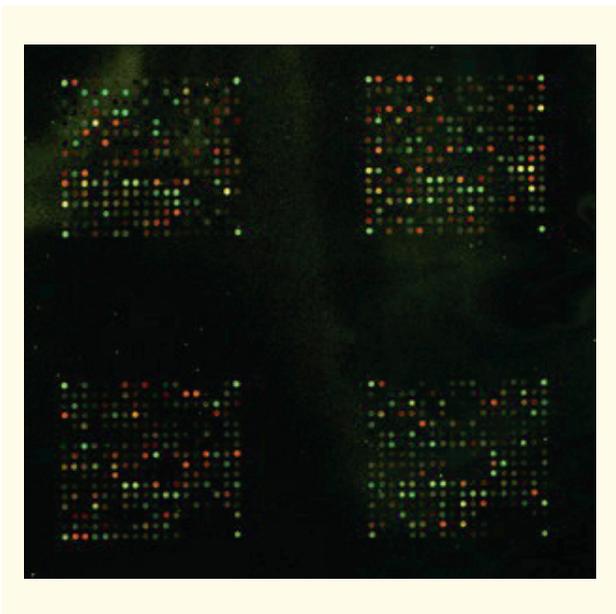


그림 2 IntelliGene™ Mouse CHIP Set I Ver.1.0의 hybridization화상
 녹색 : Mouse 뇌조직에서 유래한 signal
 적색 : Mouse 간장조직에서 유래한 signal

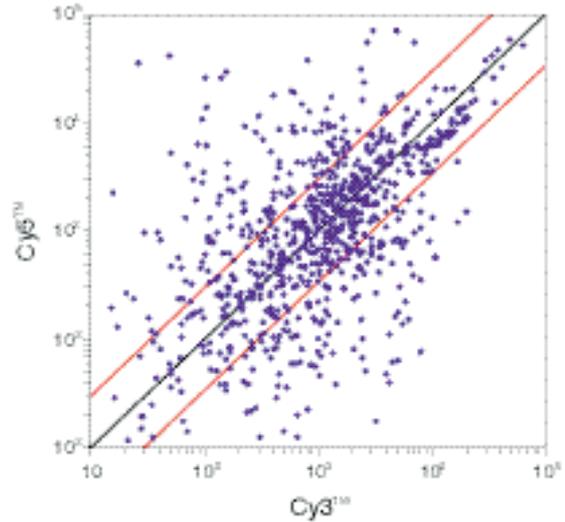


그림 3 Scatter Plot

X축은 Cy3™ signal(mouse 뇌조직), Y축은 Cy5™ signal(mouse 간장조직)을 나타낸다. 그래프 상의 흑색 실선은 Cy3™과 Cy5™의 signal비가 1:1인 경우의 이론값을 나타내며 적색 실선은 3:1 혹은 1:3인 경우의 이론값을 나타낸다.

▶ Human Cytokine 연구용 DNA Chip
IntelliGene™ Human Cytokine CHIP Ver. 1.0

Human 유래의 기지유전자 중 cytokine에 관련하는 유전자 221종류의 DNA 단편을 slide glass상에 정렬·고정화한 DNA chip이다. Slide glass(1×3 inch)상에 spot한 DNA 단편의 위치를 그림 4에 나타내었다.

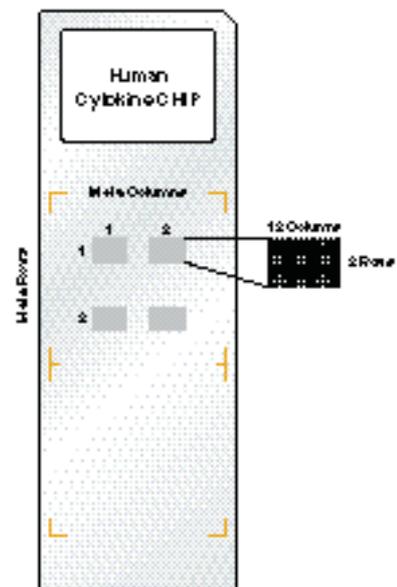


그림 4 IntelliGene™ Human Cytokine CHIP Ver.1.0에 spot한 DNA단편의 위치

IntelliGene™ Series 신제품

또 control로써 다음의 DNA단편이 spot되어 있다.

Human 유래 DNA단편(housekeeping gene으로 positive control)

Human actin beta	8 spots
Human tubulin, alpha 2	8 spots
Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	8 spots
Human hexokinase 1	8 spots
Human transferrin receptor	8 spots
Human ribosomal protein S5	4 spots
Human general transcription factor IIB	4 spots
Human phospholipase A2, groupV	4 spots
Human ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F ₀ complex, subunit b, isoform 1	4 spots

다른 생물에서 유래한 DNA 단편(negative control과 internal control로)

lambda-A	4 spots
lambda-B	4 spots
lambda-C	4 spots
pUC19	12 spots
<i>Arabidopsis</i> chlorophyll ab binding protein	8 spots
<i>E. coli ampA</i> (약간 cross hybrid한다)	8 spots

DNA에 대한 상세한 유전자 정보는 당사 홈페이지 [IntelliGene™ Series Download Service]에서 download할 수 있다.

■ 실험예

【방법】

1.3% DMSO 함유 RPMI 1640(10% FCS, 1% antibiotics 함유) 배지에서 7일 동안 배양하여 분화한 HL-60세포를 2개의 10 cm plate에 1×10⁷개/plate 정도로 seeding하고 한 plate는 최종 농도가 100 ng/ml이 되도록 TPA(12-*o*-tetra-decanoylphorbol 13-acetate)를 첨가하였다. 4시간 후에 TPA첨가/무첨가한 배지에서 세포를 회수하여 mRNA(polyA⁺ RNA)를 추출·정제하였다. RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)를 사용하여 TPA첨가/무첨가 시료에서 추출한 mRNA 0.5 μg을 각각 Cy5™, Cy3™로 표식하였다. 표식한 두 시료를 혼합하여 probe용액을 조제하였다. Probe를 Human Cytokine CHIP Ver. 1.0에 첨가하여 65°C에서 하룻밤 hybridization하고 세정 후 Affymetrix 418™ Array Scanner로 scanning하여 얻은 형광 signal을 해석 software ImaGene™으로 data를 해석하였다.

【결과】

Cy3™, Cy5™ 각 scanning data는 housekeeping gene으로 보정하였다. 또 spot signal의 Mean이 각 spot의 background signal의 Mean+2×SD의 값보다 큰 것을 유효 signal로 선택하였다. Hybridization화상을 그림 5에, ImaGene™에서의 해석결과

(Scatter Plot)를 그림 6에 나타내었다. TPA 첨가로 발현량이 크게 증가한 유전자군에는 IL-1β나 small inducible cytokine A3, A4 등의 유전자가 포함되어 있었다.

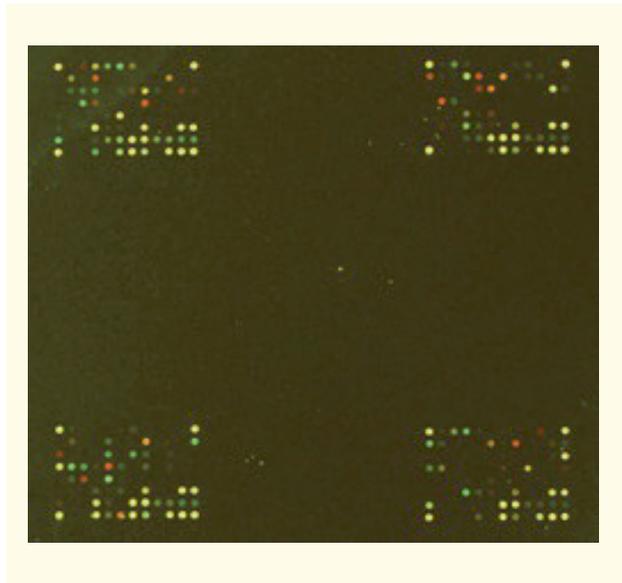


그림 5 IntelliGene™ Human Cytokine CHIP Ver. 1.0의 hybridization 화상
 녹색 : TPA무첨가 HL-60세포에서 유래하는 signal
 적색 : TPA첨가 HL-60세포에서 유래하는 signal

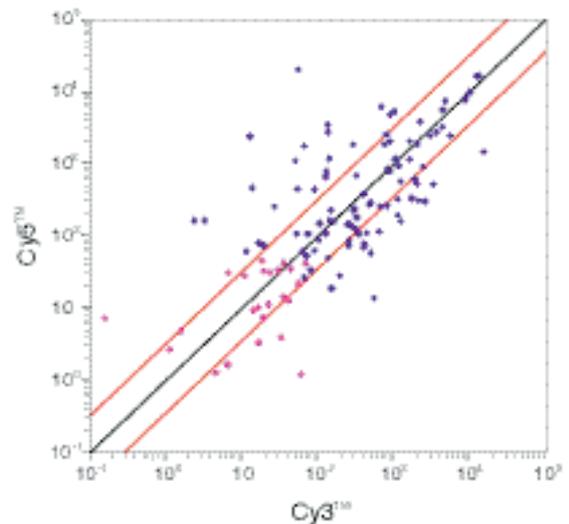


그림 6 Scatter Plot
 X축은 Cy3™ signal(TPA 무첨가 HL-60세포), Y축은 Cy5™ signal(TPA 첨가 HL-60세포)를 나타낸다. 그래프상의 흑색 실선은 Cy3™와 Cy5™ signal의 비가 1:1인 경우의 이론값을 나타내며 적색 실선은 3:1 혹은 1:3인 경우의 이론값을 나타낸다.

▶ Human 유전자 DNA Chip

IntelliGene™ Human CHIP 1K Set I Ver.1.0

Human 유래의 기지유전자 약 1,000종류의 DNA 단편을 slide glass상에 정렬·고정화한 DNA chip이다. Slide glass(1×3 inch)상에 spot한 DNA 단편의 위치를 그림 7에 나타내었다.

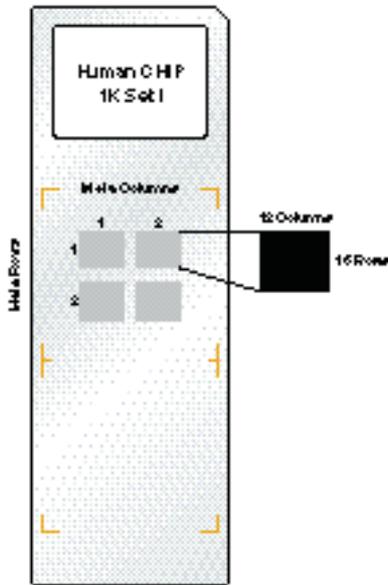


그림 7 IntelliGene™ Human CHIP 1K Set I Ver. 1.0에 spot한 DNA 단편의 위치

또 control로써 다음의 DNA 단편을 spot하여 signal 강도의 보정과 signal cut off 값의 결정에 이용할 수 있다.

Human 유래 DNA 단편(housekeeping gene으로 positive control)

Human actin beta	24 spots
Human Uba80 mRNA for ubiquitin	4 spots
Human phospholipase A2, groupV	4 spots
Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4 spots
Human tubulin, alpha 2	4 spots
Human major histocompatibility complex, class I, A	4 spots
Human glucose-6-phosphate dehydrogenase	4 spots
Human ribosomal protein S5	4 spots
Human general transcription factor IIB	4 spots
Human hexokinase 1	4 spots
Human H2B histone family, member Q	4 spots
Human ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F ₀ complex, subunit b, isoform 1	4 spots

그 외의 생물유래 DNA단편(negative control과 internal control로)

lambda-A	4 spots
lambda-B	4 spots
lambda-C	8 spots
lambda-D	4 spots
lambda-E	4 spots
pUC19	8 spots
<i>E. coli ompA</i> (약간 cross hybrid한다)	4 spots
<i>E. coli ftsZ</i>	4 spots
<i>Arabidopsis chlorophyll ab binding protein</i>	4 spots

DNA에 대한 상세한 유전자 정보는 당사 홈페이지 [IntelliGene™ Series Download Service]에서 download할 수 있다.

■ 실험에

【방법】

DMSO를 함유한 배지에서 배양한 HL-60세포와 DMSO를 함유하지 않은 배지에서 배양하여 분화시킨 HL-60세포에서 각각 total RNA를 추출하고 *Oligotex™-dT30(Super)* mRNA Purification Kit(TaKaRa Code 9086)을 사용하여 mRNA를 조제하였다. RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)로 DMSO 처리/미처리 HL-60세포에서 추출한 mRNA 1 µg를 각각 Cy3™, Cy5™로 형광표식 하였다. 두 표식 시료를 혼합하여 probe 용액을 조제하고 Human CHIP 1K set I에 첨가한 후 65°C에서 하룻밤 hybridization하였다. 세정 후 Affymetrix 418™ Array Scanner로 scanning하여 얻은 형광 signal을 해석 software ImaGene™으로 해석하였다.

【결과】

Cy3™, Cy5™의 각 scanning data는 global normalization으로 보정하였다. 또 spot signal의 Mean이 각 spot의 background signal의 Mean+2×SD의 값보다 큰 것을 유효 signal로 하였다. Hybridization 화상을 그림 8에, ImaGene™에서의 해석결과(Scatter Plot)를 그림 9에 나타내었다.

유효 signal이 얻어진 spot의 수는 676개로 그 중 DMSO처리로 3배 이상의 발현량이 감소한 유전자가 18개였다.

IntelliGene™ Series 신제품



그림 8 IntelliGene™ Human CHIP 1K Set I Ver. 1.0의 hybridization 화상
 녹색 : DMSO 미처리 HL-60세포에서 유래하는 signal
 적색 : DMSO 처리 HL-60세포에서 유래하는 signal

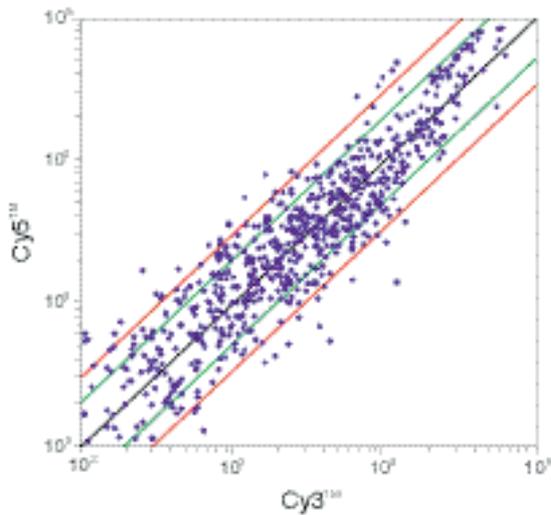


그림 9 Scatter Plot
 X축은 Cy3[™] signal(DMSO 미처리 HL-60세포), Y축은 Cy5[™] signal(DMSO 처리 HL-60세포)을 나타낸다. 그래프 상의 흑색 실선은 Cy3[™]과 Cy5[™]의 signal비가 1:1인 경우의 이론값을 나타내며 녹색 실선은 이를 비가 2:1 혹은 1:2, 적색 실선은 3:1 혹은 1:3인 경우의 이론값을 나타낸다.

■ Human 암 유전자 DNA Chip의 version up

(1) IntelliGene™ Human Cancer CHIP Ver. 2.1(TaKaRa Code X102 2매)

IntelliGene™ Human Cancer CHIP에 새로운 암 관련 유전자와 control 유전자로 Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)를 추가하였다.

Version 2.1은 암에 관련된 DNA단편 557종류가 포함되어 있다. Hybridization화상의 예를 그림 10에 나타내었다.

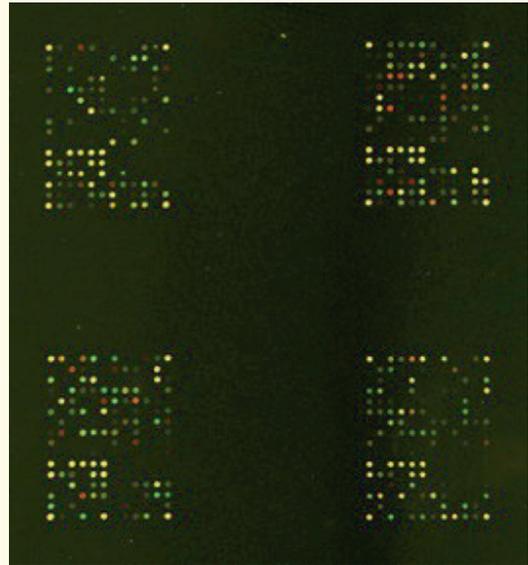


그림 10 IntelliGene™ Human Cancer CHIP Ver. 2.1의 hybridization화상
 IntelliGene™ Human Cytokine CHIP Ver. 1.0의 실험예(그림 5)에서 사용한 시료(probe 용액)는 동일하다.

(2) Human DNA Chip용 Carrier DNA

5× Competitor I (Human) (TaKaRa Code TX808 20 μl)

Human DNA chip(DNA microarray)을 hybridization 할 때 hybridization buffer에 carrier DNA를 첨가하면 비특이적인 hybridization을 감소시킬 수 있다.

본 제품은 비특이적인 hybridization을 감소시키기 위한 Human DNA chip용 carrier DNA이다. Hybridization buffer에 사용하는 최종농도의 5배 농도 competitor를 포함한다.

【용액조성】

- | | |
|-------------------|-----------|
| ① Human Cot I DNA | 7.5 μg/μl |
| ② Poly dA | 4 μg/μl |
| ③ Yeast tRNA | 5 μg/μl |