

# DNA microbeads array 기술을 이용한 유전자 발현 해석

TaKaRa는 미국 Lynx Therapeutics사의 DNA microbeads array 기술을 도입하여 이를 이용한 연구 지원 서비스를 개시할 예정이다. 본 고에서는 이에 앞서 기술을 구성하는 Megaclone™과 Megasort™을 중심으로 그 원리와 실험예를 소개한다.

## ■ DNA microbeads array 기술이란?

DNA microbeads array(DMA) 기술은 Megaclone™을 중심으로 이를 응용한 Megasort™, Megatype™, MPSS로 구성된다(그림 1). Megaclone™으로 microbeads에 DNA를 cloning한다. 이 기술로 약 100만 종류의 DNA를 고정된 microbeads를 한 번에 제작할 수 있으며, 한 개의 microbeads에는  $10^4 \sim 10^5$  분자의 같은 서열을 갖고 있는 DNA가 고정된다. 이 과정에서 cloning하고자 하는 DNA에 연결된 약 1,700만 종류의 다양성을 갖는 Tag 서열과, Tag 서열에 상보적인 microbeads에 고정된 Anti-Tag 서열의 hybridization으로 DNA와 microbeads를 대응시킨다.

Megasort™은 Megaclone™기술로 제작한 cDNA microbeads library를 이용하여 두 종류의 세포 또는 조직간에 발현량의 차이를 나타내는 유전자를 선별하는 기술이다. 또한 Megatype™은 SNP(Single Nucleotide Polymorphism)를 발견, 해석하는 기술이며, MPSS는 microbeads 상에 고정된 DNA의 약 20염기의 서열 수십 만개를 한번에 결정하는 기술이다.

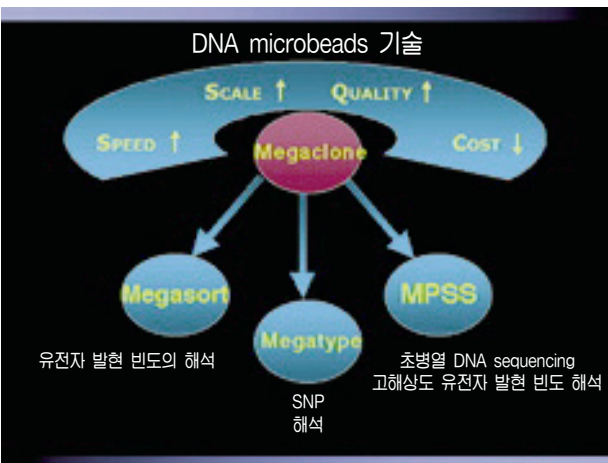


그림 1 DNA microbeads array 기술의 구성

## ■ Megaclone™의 원리

지금까지 유전 공학기술은 mRNA에서 합성한 cDNA를, 대장균 내에서 발현 가능한 vector에 삽입하여 cDNA가 삽입된 vector를 갖고 있는 대장균을 각각 배양하여 cDNA를 cloning 하였다. Megaclone™은 cDNA를 vector에 삽입하여 대장균 library를 제작하는 기존의 방법과는 달리 beads에 각각의 cDNA를 붙여 library를 제작하는 기술이다. 이 기술은 대장균 colony를 하나씩 수작업으로 분리하여 배양하는 번거로움을 줄여 다수 유전자의 cloning을 가능하게 한다.

Megaclone™은 1분자의 mRNA에서 유래하는  $10^4 \sim 10^5$  분자의 cDNA를 한 개의 beads 위에 고정하므로 1분자의 mRNA에서 유래하는 cDNA에 대하여 한 종류의 Tag 서열이 결합하도록 cDNA library를 제작한다(그림 2).

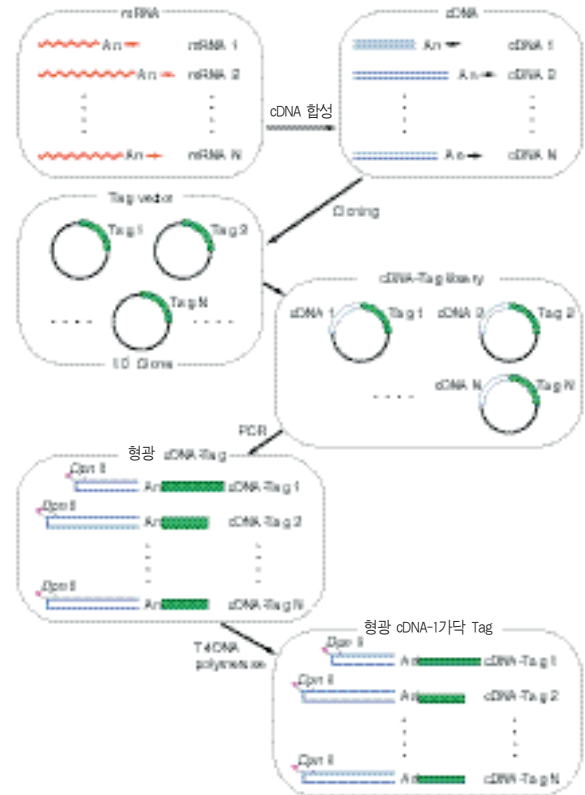


그림 2 Beads에 고정되는 cDNA-single strand Tag library의 제작  
우선 약 1,700만 종류의 Tag를 plasmid에 넣은 Tag library를 제작한다. 이 plasmid 혼합물(Tag vector)에 cDNA를 cloning하여 cDNA-Tag library를 제작한다. 이 library를 주형으로 형광 primer를 이용한 PCR로 형광표식 cDNA-Tag library를 제작한다. dGTP 존재하에서 T4 DNA polymerase Tag부분을 한가닥화 한다(Anti-Tag 서열이 잘리고 Tag 서열이 남는다). 이 형광표식 cDNA-single strand Tag library를 약 100만 종류의 cDNA결합 microbeads 조제에 사용한다.

유전자의 ID번호와 같은 의미를 갖는 Tag 서열은 32개의 염기로 이루어진 합성 DNA로, 그 서열은 내부에 고차구조를 형성하지 않으며 annealing 온도가 일정하도록 설계되어 있다(그림 3).

CATT CTA A TCAT ACTA TACA ATCT TTTC AAAC  
 word 1 word 2 word 3 word 4 word 5 word 6 word 7 word 8

그림 3 Tag과 Anti-Tag

Microbeads에 결합한 Anti-Tag의 구성. cDNA에 결합하는 Tag은 Anti-Tag과 상보적인 서열이다. Tag과 Anti-Tag은 4개의 염기로 된 8종류의 word가 8개 연결된 것으로 모두  $8^8 = 16,777,216$  종류의 다양성을 갖는다. 이들 word는 다음 47자의 특징이 있다. ① 어느 두 개의 word를 비교하여도 3염기가 다르다(mismatch를 포함하는 Tag과 Anti-Tag 사이에는 최저 3염기가 mismatch이다), ② Tm치는 모두 같다, ③ Anti-Tag의 경우 G가 없다, ④ Tag의 경우 C가 없다.

한편, 1분자의 mRNA에서 유래하는 cDNA를 하나의 beads에 결합하도록 Tag 서열에 상보적인 서열(Anti-Tag)이 결합한 beads를 준비한다(그림 4). 이 Anti-Tag 서열(그림 3)은 특정 Tag 서열이 결합한 cDNA만이 들어갈 수 있는 집의 번지와 같은 것으로 Tag 서열과 같은 다양성을 갖고 있으며 하나의 cDNA의 ID번호에 한 집의 번지가 대응하도록 설계되어 있다.

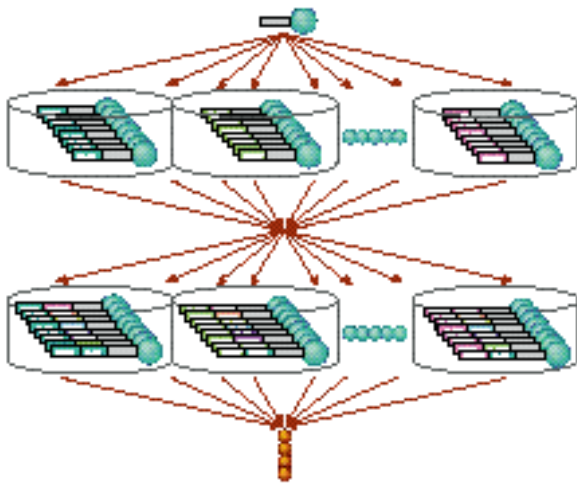


그림 4 Anti-Tag을 고상화한 microbeads의 제작

Anti-Tag은 "mix and divide"법으로 microbeads 상에 합성한다. 즉, microbeads를 8등분하여 각 word에 해당하는 4염기를 부가한 후 혼합한다. 이것을 다시 8등분하고 그 각각의 word에 해당하는 4염기를 부가하여 혼합한다. 이 분할, 합성, 혼합 사이클을 8회 반복하여 32개의 염기로 이루어진 Anti-Tag이 고상화된 약 1,700만 종류의 microbeads(각 beads는 1 종류의 특이적인 Anti-Tag을 갖는다)을 제작할 수 있다.

즉, 1분자의 mRNA에서 합성한 특정 Tag 서열을 갖는 cDNA가 그 Tag 서열에 상보적인 Anti-Tag 서열을 갖는 beads에만 결합하도록 되어 있다.

마지막으로 Tag을 갖는 cDNA와 Anti-Tag을 갖는 beads를 hybridization하여 결합시키므로써(그림 5) 약 100만 종류의 cDNA 결합 beads로 이루어진 library를 얻을 수 있다.

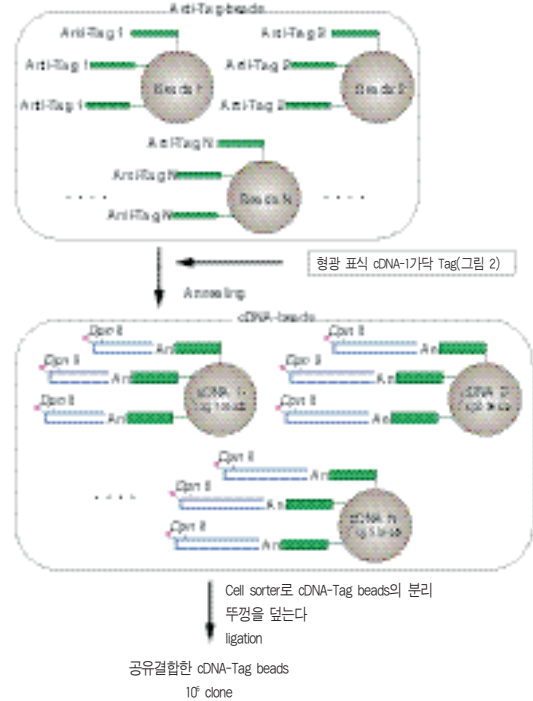


그림 5 cDNA-Tag beads의 제조

형광표식한 cDNA-single strand Tag(그림 2)와 microbeads에 고정된 Anti-Tag(그림 4)를 hybridization하여 cDNA가 결합된 microbeads를 cell sorter로 분리한다. cDNA가 결합된 약  $10^6$  종류의 microbeads(1개의 beads에는  $10^4 \sim 10^5$  분자의 같은 서열 cDNA가 고상화되어 있다)로 이루어진 library가 얻어진다.

■ Megasort™의 원리

Megasort™은 두 종류의 세포 또는 조직에서 추출한 mRNA를 각각 다른 형광색소로 표식한 probe를 조제하고, Megacolon™ 기술을 이용하여 같은 mRNA로 제작한 beads library 상에서 competitive hybridization한 다음 발현량이 다른 유전자를 cell sorter로 선별하는 기술이다(그림 6).

우선 비교하고자 하는 두개의 시료(예를 들면 병변세포와 정상 세포 또는 약제로 처리한 세포와 미처리 세포 등)의 mRNA에서 cDNA를 독립적으로 조제하여 각각의 개별 cDNA beads library를 제작한다. 다음으로 이들 beads library의 beads에 결합한 cDNA 말단에 PCR primer에 annealing할 수 있는 서열을 갖고 있는 adapter를 결합시킨 후 alkali 변성하여 beads상의 cDNA를 한가닥으로 만든다.

한편, cDNA beads library 제작에 이용한 두 시료에서 추출한 mRNA로 각각 다른 형광색소(예를 들면 blue나 red)를 표식한 한가닥 cDNA probe를 조제한다. 그리고 먼저 조제한 한가닥 cDNA 결합 beads library 혼합물에 이 probe를 동량 첨가하여 competitive hybridization 한다. Competitive hybridization한 beads를 cell sorter에 넣어 두 종류의 형광색소 signal 강도가 다른 beads를 하나씩 선택한다. 이 방법으로 비교하고자 하는 두개의 시료에서 발현량이 다른 유전자의 일부가 결합된 beads를 분리할 수 있다.

DNA microbeads array 기술을 이용한 유전자 발현 해석

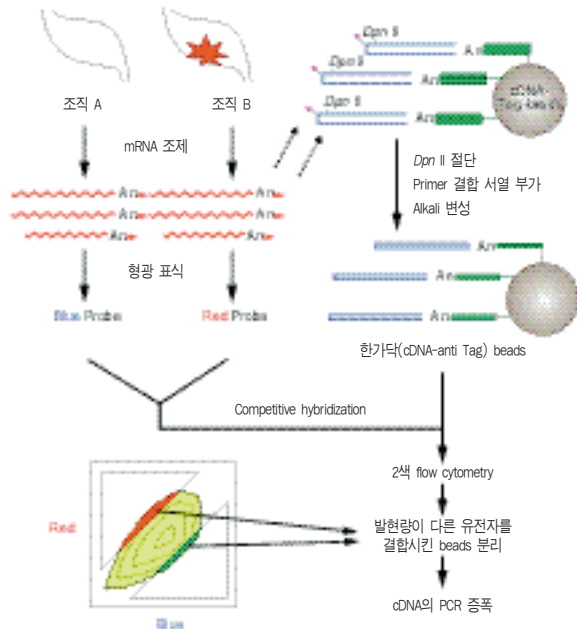


그림 6 Megasort™ 원리

이 beads를 주형으로 PCR하면 두 시료에서 발현량이 다른 유전자의 cDNA 일부를 얻을 수 있다. 이 방법은 cDNA의 염기서열 결정, full length cDNA나 genome DNA의 cloning, DNA chip 제작 등에 이용할 수 있다.

Megasort™을 이용한 실험예를 그림 7에 나타내었다.

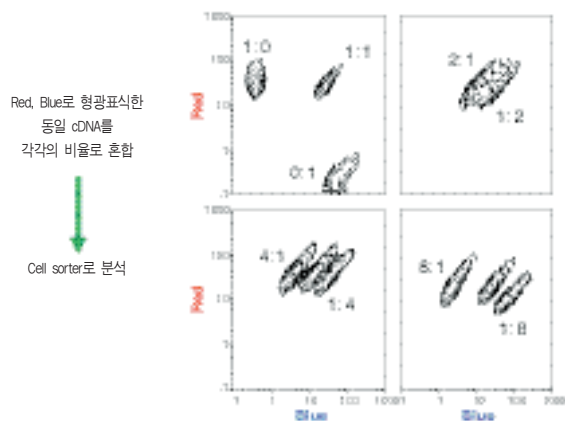


그림 7 Megasort™ model 실험

청색과 적색의 probe를 0:1, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 또는 1:0의 비율로 혼합하여 microbeads에 hybridization한 후 cell sorter로 분석한 결과를 나타낸다. 형광강도의 차이가 4배이면 완전히 분리할 수 있으며, 2배 차이에서도 검출이 가능하다.

■ 실험예

(1) Megasort™로 유전자 발현 차이 해석

Phytohemagglutinin(PHA) 처리한 T세포와 처리하지 않은 T세포의 유전자 발현 차이를 Megasort™로 해석하였다.

【방법 및 결과】

두 세포집단에서 각각의 mRNA를 조제하였다. Megasort™ 기술로 각 mRNA에서 한가닥 cDNA beads library를 제작하고 각 mRNA에서 다른 형광색으로 표식한 한가닥 cDNA probe를 조제하였다. 이 cDNA probe 혼합액을 두 개의 beads library 혼합물에 hybridization한 후 cell sorter로 분석하였다. 또한 큰 발현량의 차이(발현의 증가나 감소)를 나타내는 상위 각 1% microbeads를 포함하는 gate를 각각 설정하고 그 영역에 포함되는 beads를 sorting하여 분석한 결과는 그림 8과 같다.

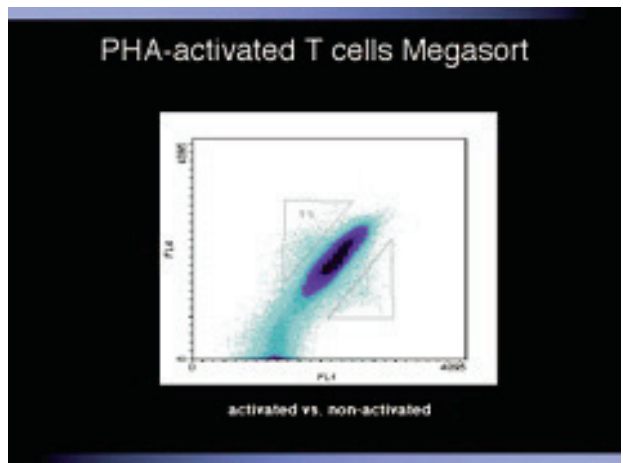


그림 8 Cell sorter 분석

(2) 발현량의 변동이 확인된 유전자의 서열 결정

【방법 및 결과】

실험 1의 sorting에서 얻어진 microbeads를 주형으로 beads상의 cDNA를 PCR증폭하여 증폭산물을 cloning한 후 각각의 서열을 결정하였다.

발현증가와 감소의 차이가 커 보이는 약 2,000개의 서열을 결정하고, 중복되는 것을 제거하여 각각 400여개의 서열을 결정하였으며 그 중 각 30개 전후가 신규유전자였다(그림 9).

즉, 3,510개 서열을 결정하여 PHA로 활성화되는 유전자는 895개이며 그 중 63개는 신규유전자였다. 또한 유도된 서열 중에는 T세포가 활성화될 때 함께 유도된다고 알려진 35개 유전자의 서열도 포함되어 있었다.



그림 9 발현변동이 확인된 유전자의 서열해석

### (3) 발현량 변동이 확인된 유전자의 DNA chip 제작과 이를 이용한 발현 해석

#### 【방법 및 결과】

실험 2에서 분리된 PHA에 의한 활성화현상에 관여하는 유전자를 고정한 DNA chip을 제작하였다. 다음으로 실험 1에서 조제한 cDNA probe 혼합액을 이 DNA chip에 hybridization하여 발현 해석하여 그 결과는 그림 10과 같다.

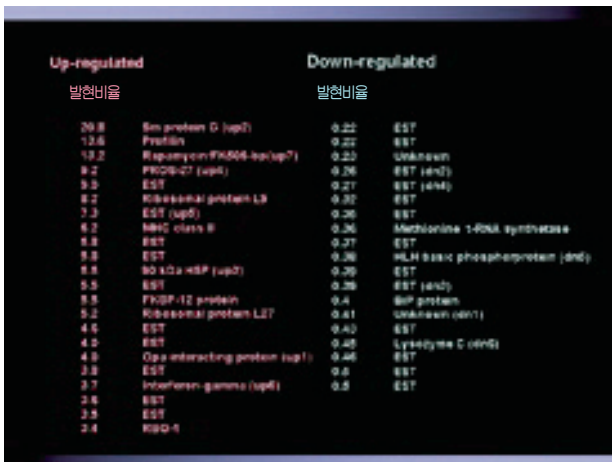


그림 10 DNA chip에 의한 발현해석

DNA chip으로 해석한 결과는 Megasort™으로 얻어진 결과와 정합성을 갖고 있다.

#### ■ Megasort™과 다른 관련 기술의 비교

실험예에 나타난 바와 같이 Megasort™를 이용하면 두 종류의 세포 또는 조직에서 발현량에 차이를 보이는 다수의 유전자를 얻을 수 있다. 발현량에 차이를 보이는 유전자를 찾아내는 다른 방법으로 subtraction법과 differential display법이 자주 이용된다 (그림 11).

#### Subtraction법

특정조건에서 발현하는 유전자의 분리

- 특별한 장치가 필요 없다.
- 재현성이 좋지 않다.
- Cloning이 필요하다.
- False positive가 많다.
- 정량할 수 없다.

#### Megasort™

- 정량적으로 목적유전자를 결정할 수 있다.
- Cloning이 필요가 없다.
- 많은 종류의 유전자를 동시에 분리할 수 있다.
- Cell sorter가 필요하다.
- Megacolon™의 제작이 필요하다.

#### Differential Display법

유전자 발현량의 차이를 gel 상의 band로 확인할 수 있다.

- 재현성이 좋지 않다.
- Gel 해상도에 영향을 받는다.
- False positive가 나올 가능성이 크다.
- Cloning이 필요하다.
- 많은 종류의 유전자를 동시에 분리할 수 없다.
- 정량할 수 없다.

그림 11 Megasort™와 다른 관련 기술의 비교

Subtraction법은 특별한 장치를 필요로 하지 않는 이점이 있으나 (a)재현성이 낮고 (b>false positive이 많으며 (c)한번에 많은 clone을 얻을 수 없다는 문제가 있다. Differential display법은 (a)소량의 RNA로 가능하며 (b)gel 전기영동 pattern을 눈으로 확인할 수 있다는 이점이 있으나 (a)재현성이 낮고 (b>false positive가 많으며 (c)같은 유전자에서 유래하는 band가 많이 나타날 수 있고 (d)조작이 번거롭다는 문제점이 있다.

이들 방법에 비해 Megasort™은 두종류의 세포 또는 조직사이에서 유전자 발현량의 차이를 정량적으로 비교할 수 있다. 또한 어느 정도 발현량의 차이를 나타내는 유전자를 선택할 것인지는 cell sorter의 gate를 설정하여 자유롭게 결정할 수 있다.

#### ■ Megasort™과 DNA chip

여러 시료간의 유전자 발현차이를 해석하는 데는 DNA chip이 매우 중요한 수단이다. DNA chip을 spot하는 DNA에 따라 분류하면 다음과 같다.

- ① 모든 genome 서열이 밝혀진 생물을 대상으로 그 모든 genome, 전 open reading frame, 총 전사산물 등을 포함한 것.
- ② cDNA library, genome DNA library 등에서 DNA를 random으로 선택하여 spot한 것.
- ③ 문헌 등의 정보를 토대로 자신의 연구목적에 맞는 유전자를 택하여 spot한 것
- ④ 발현량의 차이를 보이는 유전자를 Megasort™으로 선택하여 spot한 것

DNA microbeads array 기술을 이용한 유전자 발현 해석

- ①은 특정 생물의 유전자 전체를 연구하기에 좋은 방법이지만 (a)모든 genome의 서열정보가 필요하고 (b)DNA 수가 많아져 매우 고가인 DNA chip이 되어 버리는 문제점이 있다.
- ②는 DNA 수를 자유롭게 결정할 수 있지만, 통상 많은 DNA가 비교 대상간에 발현량에 차이가 없는 유전자가 있어 그런 DNA chip에서 얻은 정보는 양이 많지 않다.
- ③은 적은 DNA 수에 비하여 많은 정보를 얻을 수 있지만 spot 하는 DNA는 서열이나 기능이 이미 알려진 것에 한정된다. 따라서 신규 유전자의 발견은 불가능하다.
- ④는 발현량에 차이가 있는 유전자를 미리 Megasort™로 선택하므로 DNA chip으로 해석한 경우에도 많은 DNA에서 유전자 발현차를 볼 수 있다. Megasort™은 유전자 서열정보나 기능정보가 필요 없으며 DNA chip으로 신규유전자를 찾아낼 수 있다 (그림 12).

■ Megasort™의 이점

Megasort™은 비교하고자 하는 조직이나 세포에서 조제한 mRNA만 필요하여 생물종, DNA 염기서열 등의 정보는 필요하지 않다(그림 13). Megasort™로 선별된 microbeads는 그대로 PCR의 주형이 되며 증폭한 DNA는 염기서열 결정이나 full length cDNA 또는 genome DNA의 cloning, probe 조제, DNA chip제작에 이용할 수 있다. 유도된 유전자와 억제되는 유전자를 Megasort™을 이용하여 각 1%씩 얻어서 각 종마다 해석할 경우, library에서 clone을 random하게 얻어 해석할 경우에 비하여 시간과 비용이 1/50이 되어 시간과 비용을 절약함과 동시에 고효율로 실험할 수 있다. 즉 같은 시간과 비용을 들인다면 Megasort™로 실험할 경우 성공확률이 50배 상승한다는 것이다.

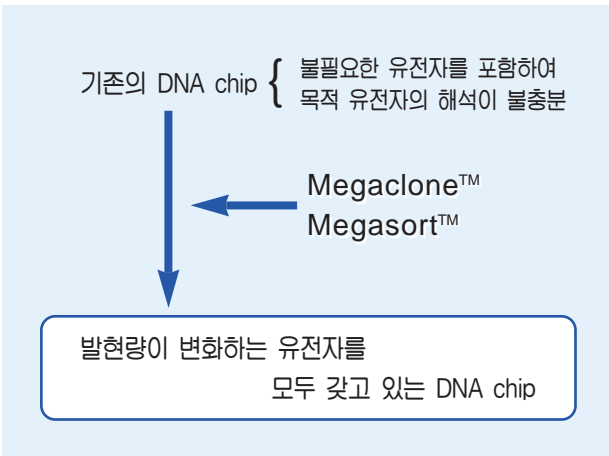


그림 12 Megaclone™, Megasort™을 응용한 기능별 DNA chip

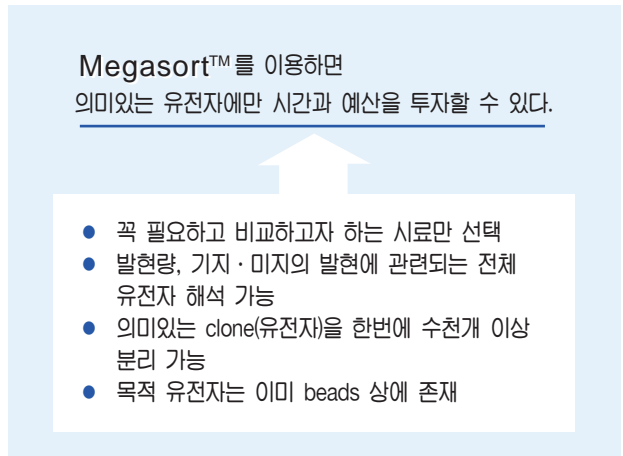


그림 13 Megasort™의 이점

차세대형 DNA array

DNA microbeads array 연구 지원 서비스

TaKaRa에서는 DNA microbeads array 기술을 이용한 연구 지원 서비스를 실시하고 있습니다. 자세한 사항은 당사 기술지원팀으로 문의하시기 바랍니다

◆ DNA microbeads array 연구 지원 서비스 내용

1. 특이적 발현 유전자의 탐색

각각의 조직이나 세포에서 특이적으로 발현량에 차이가 있는 유전자가 결합한 microbeads를 Megasort™으로 선별하고, 결합한 DNA를 주형으로 증폭하여 제공한다. 증폭한 DNA는 vector에 cloning하거나 염기 서열 결정 등 일반 분자 생물학적 방법으로 해석할 수 있다.

2. 특이적 발현 유전자의 염기 서열 결정

1.에서 증폭한 DNA의 염기 서열을 결정할 수 있다. 수천~수만 개 이상의 clone에서 염기 서열 결정, clustering, homology 비교 등을 해석한다.

3. 유전자 발현 profile 해석

약 25만개의 cDNA서열(signature 서열, 약 20개 염기)을 Massively Parallel Signature Sequencing(MPSS)으로 일정하게 해석할 수 있다. 대량 genome, EST정보가 있는 생물은 signature 서열로 유전자를 동정할 수 있으며, signature 서열의 빈도로 유전자 발현 profile을 추정할 수 있다.

◆ 다카라코리아바이오테크놀로지(주) 기술지원팀 Tel. 02-577-2002 e-mail support@takara.co.kr