

DNA Chip을 이용한 대량 유전자 발현 해석 및 Smart Cycler[®] System을 사용한 real time RT-PCR

Smart Cycler[®] System (기본 시스템)

TaKaRa Code SC100 1대
Cepheid사 제품입니다.

IntelliGene[™] Human Cancer CHIP Ver. 2.1

TaKaRa Code X102 2매

최근 DNA chip을 이용한 유전자 발현해석의 유용성이 밝혀지고 있다. TaKaRa에서는 IntelliGene[™] 시리즈로 10여 종의 DNA chip을 판매하고 있으며, DNA chip을 이용한 각종 연구로 유전자 발현량에 관한 유용한 결과를 얻고 있다. DNA chip 해석은 수백, 수천의 대량 유전자 발현량을 한번에 검출할 수 있다는 점에서 매우 획기적이나 정확한 정량에는 적당하지 않다.

Smart Cycler[®] System을 이용한 real time RT-PCR에 의한 정량 해석은 한번에 해석할 수 있는 유전자 수에는 한계가 있으나 소량의 mRNA로 한 개의 시료를 분석하는데 약 1시간 정도에 정확한 발현량을 조사할 수 있는 이점이 있다. 따라서 DNA chip을 이용하여 대량으로 유전자의 발현량을 screening하여 발현량에 변화가 있는 유전자를 Smart Cycler[®] System으로 정량해석하여 정확한 결과를 얻을 수 있다. 본 고에서는 DNA chip을 사용한 screening 후 Smart Cycler[®] System로 정량 해석한 실험을 소개한다.

■ 실험예

IntelliGene[™] Human Cancer CHIP를 이용하여 human 암조직과 정상조직 사이에서 발현량의 차이가 있는 유전자를 screening하였다. 발현량에서 차이가 있는 유전자의 PCR 증폭용 primer를 제작하여 Smart Cycler[®] System을 이용하여 암조직과 정상조직에 있어서의 유전자 mRNA의 양을 정량하여 두 조직간 발현비율과 얻은 결과를 비교하였다.

(1) 암조직과 정상조직에서 발현량이 다른 유전자 screening

【방법】

두명의 암환자에서 유래한 human 암조직과 정상조직(#1 : 1-Tumor, 1-Normal ; #2 : 2-Tumor, 2-Normal)에서 각각 total RNA를 추출하고 Oligotex[™]-dT30 <Super> mRNA Purification Kit(From Total RNA)을 이용하여 mRNA를 조제하였다. RNA Fluorescence Labeling Core Kit(TaKaRa Code TX807)을 이용하여 Tumor 유래 mRNA를 Cy5[™]으로 Normal 유래 mRNA를 Cy3[™]으로 형광표식하였다(각 1 μg의 mRNA 사용). 두 표식 시료를 혼합하여 carrier DNA를 첨가한 다음 ethanol로 침전하였다. 침전을 풍건 후 10 μl의 hybridization 완충액을 넣어 probe 용액으로 사용하였다.

첨부한 protocol에 따라 IntelliGene[™] Human Cancer CHIP Ver. 2.1을 prehybridization, hybridization, 세정 후 Affymetrix[®] 418[™]

Array Scanner로 각 형광 signal을 scanning하고 해석 소프트웨어 ImaGene[™]을 이용하여 data를 해석하였다(hybridization 등의 방법에 대해서는 Life Science & Biotechnology 16, 17호 참조).

【결과】

암조직과 정상조직에서 발현량의 차이가 두배 이상인 유전자가 환자 #1에서는 12%, 환자 #2에서는 15%였다. 다른 검체의 해석결과와 종합하여 세 개의 유전자를 얻었다. 두명의 환자에서 유래한 유전자를 probe로 Human Cancer CHIP에 hybridization하여 scanning 화상 일부를 그림 1에 나타내었다. Gene 1, 2, 3은 #1, #2 두 환자 모두 정상조직보다 암조직에서 높게 발현되었다. Human Cancer CHIP에 spot되어 있는 β-actin 유전자를 이용

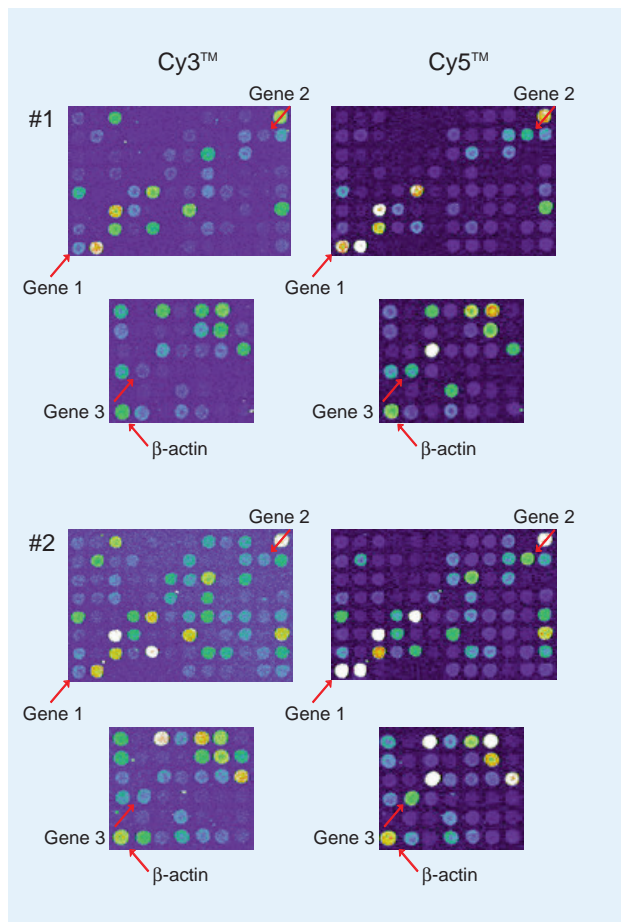


그림 1 Human Cancer CHIP scanning 화상

하여 Cy3™, Cy5™ signal 강도를 normalization하여 각 유전자의 암조직/정상조직의 발현비율을 표 1의 왼쪽에 표시하였다.

(2) Smart Cycler® System의 정량해석

(1)의 screening으로 선택된 Gene 1, 2, 3의 암조직/정상조직에서 발현비율을 정확하게 측정하기 위하여 아래와 같이 실험하였다.

【방법】

Gene 1, 2, 3을 RT-PCR 증폭하기 위하여 array list의 GenBank Accession No.에서 그들의 유전자 서열을 검색하고, primer/probe 해석 소프트웨어 OLIGO™을 이용하여 증폭산물의 크기가 250~500 bp가 되도록 각 유전자의 primer set을 설계하였다. 암조직 유래 mRNA와 정상조직 유래 mRNA는 chip을 이용한 실험과 동일하게 β -actin 유전자로 보정하였다.

먼저, 각 조직에서 각 유전자의 mRNA를 정량하기 위하여, 검량선 작성에 이용할 기지농도 standard 유전자의 cDNA를 다음과 같이 조제하였다. 각 유전자의 mRNA를 RT-PCR로 증폭한 후 agarose에 전기영동하였다. 단일 산물이 증폭되는 것을 확인한 후 증폭단편을 잘라내어 SUPREC™-01(TaKaRa Code 9040)로 정제하고 흡광도를 측정하여 그 농도를 구하였다. 이 증폭단편을 검량선 작성용 standard로 이용하였다.

Smart Cycler® System을 이용한 real time RT-PCR로 검체중 유전자의 발현량(mRNA량)을 정량하는 방법은 Gene 1, 2, 3 및 β -actin 유전자를 이용할 경우 기본적으로 동일하므로 본 고에서는 β -actin mRNA 정량을 설명하였다.

우선 암조직 및 정상조직에 유래하는 각 total RNA를 DNase I으로 처리하여 500 ng을 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)(TaKaRa Code R019A/B)를 이용하여 총 20 μ l로 역전사(RT) 반응하였다. 역전사 반응 후 아래와 같은 반응계(핵산검출 시험으로 SYBR® Green I을 포함)와 온도 cycle조건으로 미지량의 역전사반응 생성물 또는 검량선작성용 기지량의 standard cDNA를 PCR로 증폭하였다. 또한 검량선 작성에는 정제된 증폭단편(standard cDNA)약 20 ng/ μ l를 $10^4 \sim 10^6$ 배 범위에서 희석하여 사용하였다.

• β -actin cDNA 증폭용 Primer

Forward : 5' -AGGCACCAGGGCGTGATGGT-3'
Reverse : 5' -GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'

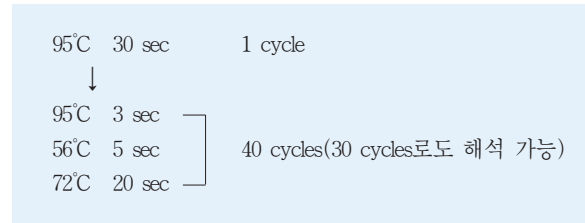
• 증폭산물의 크기 264 bp

• PCR 반응계

• 10× Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ free)	2.5 μ l
• 25 mM MgCl ₂	3.5 μ l
• 20 μ M β -actin Forward Primer	0.38 μ l
• 20 μ M β -actin Reverse Primer	0.38 μ l
• SYBR® Green I(diluted*)	2.5 μ l
• 2.5 mM dNTP Mixture	2 μ l
• TaKaRa Ex Taq™(5 U/ μ l)	0.25 μ l
• Standard cDNA 또는 RT solution	2 μ l
• dH ₂ O	11.49 μ l
Total	25 μl

* : SYBR® Green I 제품원액을 3,000배 희석하여 사용하였다.

• Cycle 조건



• 증폭산물의 단일성 확인

PCR 반응 종료 후 60~95°C까지 0.2°C/sec 속도로 온도를 상승시켜 용해곡선을 분석하고 용해온도를 산출하여 특이적인 증폭산물 여부를 확인하였다.

• 정량

Standard cDNA 증폭곡선을 바탕으로 검량선을 작성한다.

미지농도 시료의 증폭곡선에서 Ct값을 정하고 이 값과 검량선에서 목적 유전자 발현량(cDN)을 구한다.

【결과】

기지량의 β -actin standard cDNA와 각 시료중에 함유되어 있는 미지의 β -actin mRNA(cDNA)의 증폭곡선 및 검량선을 그림 2, 3에 각각 나타내었다. 이 값을 기준으로 산출한 β -actin mRNA의 정량결과는 그림 4와 같다(그림 내의 Ch1 Std/Res 값은 상대값으로 표시). 암조직과 정상조직에서 β -actin 유전자의 발현비율(암조직/정상조직)은 환자 #1에서는 0.598(270.36/452.06), 환자 #2에서는 0.504(336.15/667.17)였다.

Gene 1, 2, 3도 β -actin 유전자의 경우와 같은 방법으로 해석하였다. 예로 Gene 1의 증폭곡선, 검량선 및 정량해석 결과를 그림 5, 6, 7에 나타내었다(그림 5는 환자 #2에 관한 data).

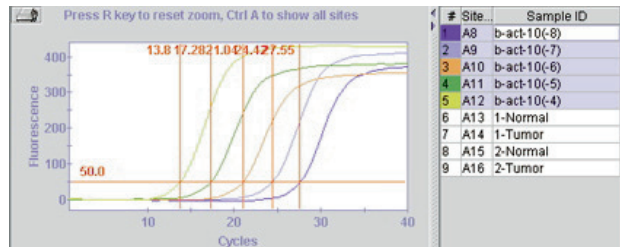


그림 2 SYBR® Green I을 이용한 β -actin의 증폭곡선

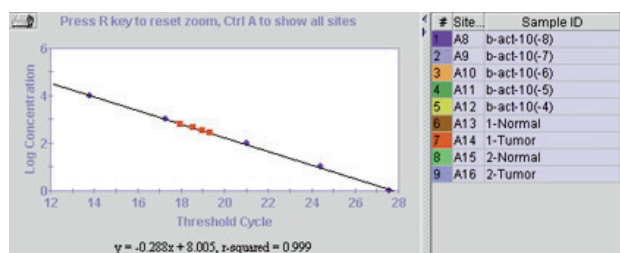


그림 3 β -actin 검량선

#	Site ID	Sample ID	Sample Type	Status	Ch1 Std/Res	Ch1 Ct	Melt Peak1
1	A8	b-act-10(-8)	STD	OK	1.0	27.55	91.95
2	A9	b-act-10(-7)	STD	OK	10.0	24.42	91.75
3	A10	b-act-10(-6)	STD	OK	100.0	21.04	91.54
4	A11	b-act-10(-5)	STD	OK	1000.0	17.28	91.22
5	A12	b-act-10(-4)	STD	OK	10000.0	13.8	91.33
6	A13	1-Normal	UNKN	OK	452.06	18.54	92.14
7	A14	1-Tumor	UNKN	OK	270.36	19.32	91.48
8	A15	2-Normal	UNKN	OK	667.17	17.96	91.54
9	A16	2-Tumor	UNKN	OK	336.15	18.99	91.43

그림 4 β -actin 정량 결과

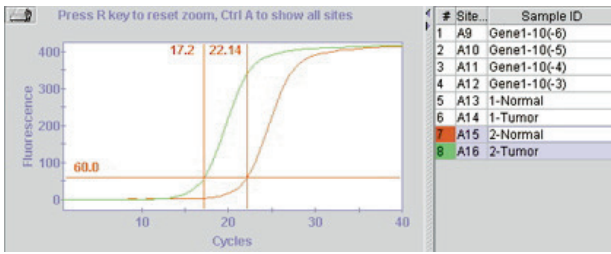


그림 5 Gene 1의 증폭곡선

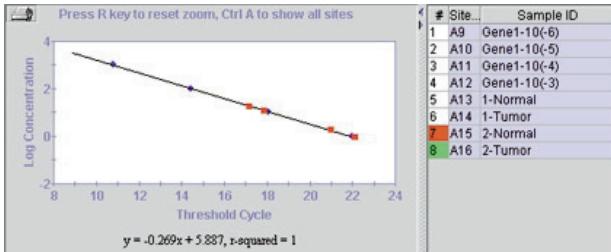


그림 6 Gene 1의 검량선

#	Site ID	Sample ID	Sample Type	Status	Ch1 Std/Res	Ch1 Ct	Melt Peak1
1	A9	Gene1-10(-6)	STD	OK	1.0	22.01	86.86
2	A10	Gene1-10(-5)	STD	OK	10.0	18.06	86.62
3	A11	Gene1-10(-4)	STD	OK	100.0	14.42	86.39
4	A12	Gene1-10(-3)	STD	OK	1000.0	10.82	86.44
5	A13	1-Normal	UNKN	OK	1.77	20.99	87.05
6	A14	1-Tumor	UNKN	OK	12.12	17.88	86.58
7	A15	2-Normal	UNKN	OK	0.86	22.14	86.63
8	A16	2-Tumor	UNKN	OK	18.39	17.2	86.67

그림 7 Gene 1의 발현해석 결과

■ TaKaRa DNA chip IntelliGene™ 및 관련제품

IntelliGene™ 시리즈

제품명	TaKaRa Code	포장량
CyanoCHIP Version 1.2 Ver. up	X001	10매
Human Apoptosis CHIP Version 1.1	X101	20매
Human Cancer CHIP Version 2.1	X102	20매
E. coli CHIP Version 1.0 Ver. up	X003	10매
Human DNA CHIP for Endocrine Disruption Study Version 1.0	X103	20매
Arabidopsis CHIP I Version 1.0	X0021	10매
Human Cytokine CHIP Version 1.0	X104	20매
Human CHIP 1K Set I Version 1.0	X1071	20매
Mouse CHIP Set I Version 1.0	X2011	10매
TestARRAY Version 3.0	X000	20매

그 외 DNA chip 관련제품

제품명	TaKaRa Code	포장량
RNA Fluorescence Labeling Core Kit	TX807	10회
λ Control Template & Primer Set-A	TX803	50 PCR 반응용
λ polyA ⁺ RNA-A	TX802	10 μl
5× Competitor I (Human)	TX808	20 μl
Solution T	TX001	50 ml
TaKaRa Slide Glass	TX704	25개
DNA chip용 cover glass		
TaKaRa Spaced Cover Glass S	TX702	25개
TaKaRa Spaced Cover Glass L	TX703	25개

그림 7의 결과에서 환자 #1 및 #2의 암조직과 정상조직의 각 유전자 발현량의 비율을 구하고 β-actin 유전자의 발현비율로 나누어 그 값을 보정하였다. 결과는 표 1의 오른쪽과 같다. Human Cancer CHIP과 Smart Cycler® System (real time RT-PCR)으로 각각 해석한 결과를 비교하면 chip을 사용한 경우가 조금 높은 값을 보이지만 전체적인 경향과 결과는 매우 비슷하였다.

표 1 Chip 해석결과와 Smart Cycler System 정량결과의 비교

Gene	chip 발현 해석		real time PCR	
	암조직/정상조직	암조직/정상조직	암조직/정상조직	암조직/정상조직
1	16.3	71.4	11.5	41.5
2	7.0	12.8	2.5	9.3
3	6.3	8.3	3.3	5.9

■ 결론

위 실험으로 chip을 이용한 해석결과의 신뢰성이 확인되었으며, 또한 Smart Cycler® System을 같이 사용함으로써 조직에서 유전자 발현량의 차이를 정확하게 확인할 수 있다.

Candida albicans 유래 정제항원을 이용한 정상인 혈청중의 IgG 항체값 측정

세포벽 type A mannan	TaKaRa Code	MG001	5 mg
분비성 산성 protease(SAP2)	TaKaRa Code	MG002	0.2 mg
Superoxide dismutase(MnSOD)	TaKaRa Code	MG003	0.1 mg
Enolase	TaKaRa Code	MG004	0.2 mg

Candida albicans는 사람의 구강, 소화관 등에 상존하는 구균으로 대부분의 사람은 균 유래의 세포성분(특히 세포벽 다당 mannan, glucan)에 대한 면역 응답을 하는 것으로 알려져 있다.

TaKaRa에서는 C. albicans 유래 정제항원으로 세포벽 type A mannan, 분비성산성 protease(SAP2), Mn형 superoxide dismutase(MnSOD) 및 enolase를 판매하고 있다.

본 고에서는 이들 항원을 이용하여 정상인 혈청 중에 함유되어 있는 각 항원에 대한 IgG 항체값을 ELISA법으로 측정하는 방법을 소개한다.

■ 방법

각 항원 0.5 μ g을 96 well plate에 coating하여 1% BSA-PBS용액으로 blocking하였다. 100배로 희석한 정상인 혈청(N=13)을 50 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 0.1% Tween 20을 포함한 PBS로 세정한 후, 표식 anti human IgG 항체를 첨가하고 37°C에서 1시간 정치하였다. 0.1% Tween 20을 포함하는 PBS로 세정한 후, 0.27% ABTS(2, 2'-azino-bis 3'-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)를 함유하는 인산-구연산 용액을 각 well에 50 μ l 첨가하여 발색하였다. 50 mM oxalic acid를 50 μ l 첨가하여 발색을 정지시킨 후 405 nm의 흡광도를 측정하였다.

■ 결과

정상인 혈청중 C. albicans 유래의 각 정제항원에 대한 IgG 항체

값을 검토한 결과, 실험한 13인의 시료에서 IgG 항체가 존재하며 특히 세포벽 성분인 mannan에 대해서 가장 높은 항원값이 나타내었다(표 1).

최근 MnSOD의 allergen 활성에 관한 연구가 보고되고 있지만¹⁾ 조사한 단백질 항원 중에는 MnSOD에 대한 IgG 항체값이 매우 높은 한편 병원성 인자 및 allergen²⁾으로 알려져 있는 SAP2에 대한 IgG 항체값은 낮은 것으로 나타났다. 또한 각항원에 대한 IgG 항체값의 상관관계를 조사한 결과, 세포벽 성분인 mannan과 단백질 항원간의 상관관계는 낮은 반면 단백질 항원간에는 높은 상관관계를 나타내었다(그림 1).

표 1 각 항원에 대한 IgG 항체값

항원	A ₄₀₅ 측정값(Average±SD)
Mannan	1.698±0.538
SAP2	0.148±0.039
MnSOD	0.234±0.061
Enolase	0.197±0.068
-(Saline)	0.089

【참고문헌】

- 1) Saito Akemi et al (2000) 일본의구균학회총회요지집, 102
- 2) Akiyama, K. et al (1996) Allergy, 51, 887-892.

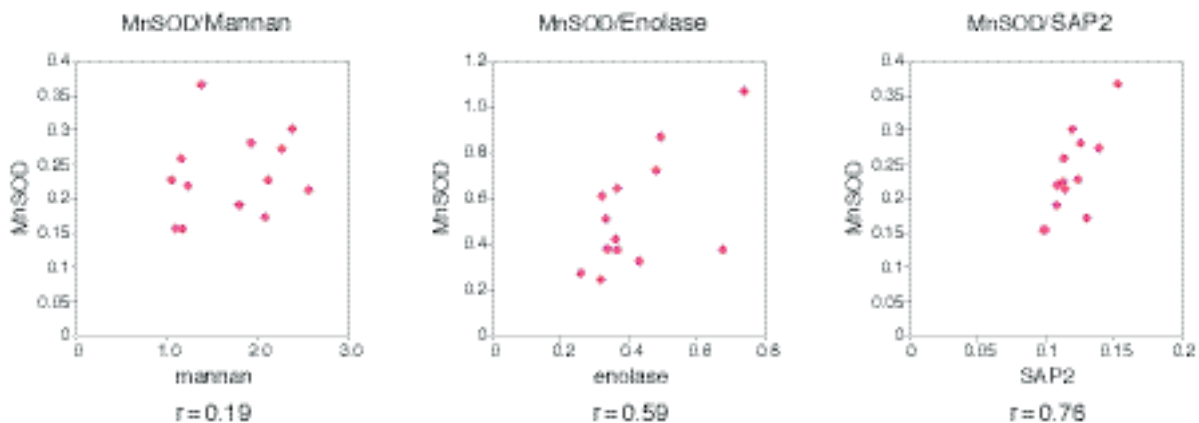


그림 1 각 항원에 대한 IgG 항체값의 상관

세균의 Molecular Typing - RiboPrinter[®]와 PFGE법 비교

RiboPrinter[®] System

TaKaRa Code

DP100

1대

Qualicon사 제품입니다.

최근 식중독이나 병원내 감염 등, 병원성 세균에 의한 오염이 문제시되고 있다. 세균오염을 감시하기 위하여 신속하고 정밀한 세균의 동정은 의료, 식품제조, 공중위생현장에 있어서 매우 중요하다. 종래의 세균동정에는 형태와 영양요구성, 효소활성 등을 지표로 한 방법을 이용하였으나 최근에는 균의 genome DNA 서열을 기본으로 한 분류·동정법 즉 molecular typing이 보다 안정하고 정밀한 방법으로 주목받고 있다.

현재 PFGE(pulse field gel electrophoresis)를 이용한 molecular typing법이 특히 공중위생현장에서 널리 이용되고 있다.

본 고에서는 PFGE를 이용한 typing과 당사가 판매하고 있는 전자동 세균검사장치 RiboPrinter[®] System을 이용한 RiboTyping을 비교하여 소개한다(RiboPrinter[®] System의 상세 정보는 Life Science & Biotechnology 15호, 16호 참조)

■ RiboPrinter와 PFGE의 비교

PFGE와 RiboPrinter[®]는 genome DNA를 제한효소 절단한 후 전기영동으로 그 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) pattern을 검출한다는 공통점을 갖고 있다. 그러나 PFGE는 전체 genome을 대상으로 RFLP분석을 하며 RiboPrinter[®]는 southern blot으로 ribosome RNA를 코딩하는 영역을 RFLP 분석한다. 전자는 manual법인데 반해 후자는 전용기계(RiboPrinter[®] system)를 사용한 완전 자동방법이다. 표 1에 두 가지 방법을 비교·정리하였다.

표 1 PFGE와 Riboprinter

	PFGE	RiboPrinter [®]
검출대상	전체 genome DNA	ribosome RNA code 영역
제한효소 절단	○	○
전기영동	○	○
Blotting	×	○
검출	EtBr	화학발광
밴드수	많음	적음
Data form	사진	표준화된 digital data
자동화	×	○

PFGE와 RiboPrinter[®]로 얻는 data 형식은 다르며, image data 비교를 그림 1에 나타내었다(주의: lane은 대응하지 않음). PFGE는 EtBr로 비특이적으로 검출하기 때문에 재현성이 떨어지는 결점이 있다. 또한 전체 genome을 분석대상으로 하므로 밴드수가 RiboPrinter[®]에 비해 많아 data를 표준화하기 어렵다.

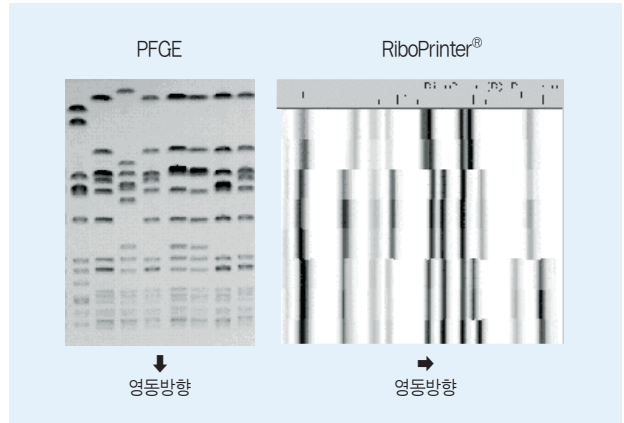


그림 1 PFGE와 RiboPrinter[®]의 image data 비교

반면 RiboPrinter[®]는 southern blotting으로 특이적으로 검출하므로 signal 강도는 길이에 의존하지 않는다. 또한 시료와 동시에 전기영동한 marker의 이동도를 바탕으로 자동보정된 data를 얻는다. 때문에 data가 표준화되고 다른 기관간 data의 공유나 상호 이용이 가능하며 이는 RiboPrinter[®]의 큰 이점이다. 실제로 미국에서는 전미 각지의 대학병원을 연결하는 network가 구축되어 data를 공유하고 있다(그림 2). 반면 PFGE에서는 동시 재현성이나 일차 재현성이 낮아 data 해석이 곤란한 경우가 있다(그림 3).



그림 2 미국 data network의 예

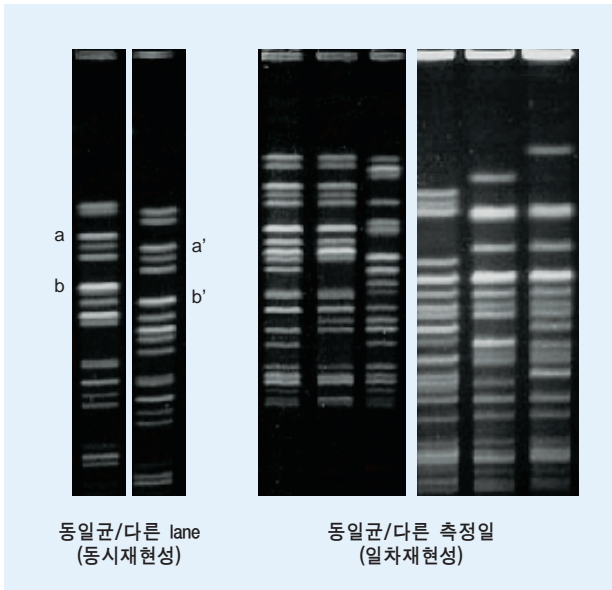


그림 3 PFGE data의 불안정성(Qualicon사 data)

■ 실험예 : 병원내 감염에 관여하는 세균의 Typing
- RiboPrinter®와 PFGE와의 비교

전미 32곳의 의료시설에서 분리된 균주를 RiboPrinter® system과 PFGE를 이용하여 typing하여 결과를 비교하였다(표 2). 그 결과 *E. coli*, *Staphylococcus aureus* 등 17종의 균이 검출되어 균주 cluster는 두 data 사이에 상관관계가 있었다. 반면 RiboPrinter®에서는 모든 균주의 typing이 가능하였으나 PFGE에서는 11주의 typing이 불가능하였다.

■ 결론

위와 같이 RiboPrinter®는 세균의 molecular typing의 새로운 방법으로 매우 유용한 수단이다. RiboPrinter®는 종래 molecular typing의 주된 방법인 PFGE 동일 data를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 해석 data를 표준화할 수 있으며 network을 이용한 data 공유가 가능하다는 이점을 갖고 있다. Data 공유에 의한 장점이 큰 현장(병원이나 보건소 등)에서의 RiboPrinter® system 사용은 매우 효과적이라 할 수 있다.

【참고문헌】

- 1) Hollis, R. J. et al. (1999) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**, 263-268.
- 2) Pfaller, M. A. et al. (1996) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **25**, 1-8.

표 2 RiboPrinter와 PFGE의 data 비교

균종	n	Ribo group수	PFGE type수	Typing 불가능한 주의 수	
				RiboPrinter®	PFGE
<i>Bacillus sp.</i>	7	5	2	0	2
<i>Citrobacter freundii</i>	25	24	23	0	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12	9	11	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	43	42	38	0	3
<i>Enterobacter sakazaki</i>	1	1	1	0	0
<i>Enterobacter faecium</i>	17	8	14	0	0
<i>Escherichia coli</i>	97	38	72	0	3
<i>Hafnia alvei</i>	2	2	2	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	7	8	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	53	42	50	0	1
<i>Morganella morganii</i>	3	3	3	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	9	8	1	0	0
<i>Providencia rettgeri</i>	4	4	3	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	5	4	2	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	4	18	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	13	6	8	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	57	30	28	0	0
총수	376	237	284	0	11