

DNA Microbeads Array 기술을 이용한 유전자 발현 해석(2)

TaKaRa는 미국 Lynx Therapeutics사의 DNA microbeads array 기술을 도입하여 연구지원 서비스를 개시하였다(그림 1). 지난 19호에서 소개한 Megaclone™과 Megasort™에 이어 본 고에서는 MPSS®에 대하여 소개한다.

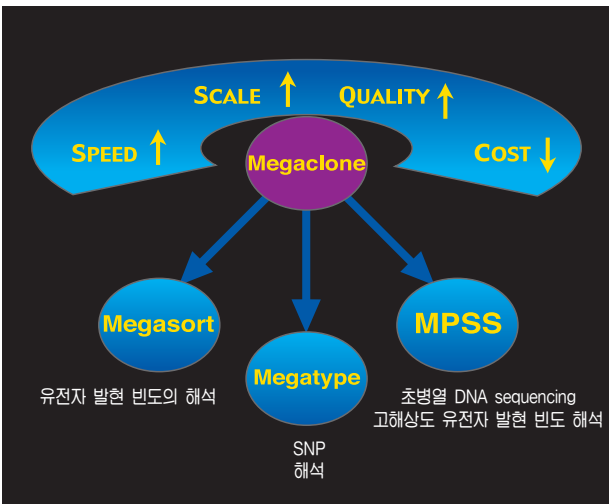


그림 1 DNA microbeads array 기술 구성

■ 서론

MPSS®를 설명하기에 앞서 Megaclone™과 Megasort™에 대해 간단히 언급하고자 한다. Megaclone™은 DNA microbeads array 기술의 핵심으로 미세한 beads 상에 DNA를 고정하여 library를 제작하는 기술이다. Beads상에 anti-tag로 불리는 32염기의 DNA를 combinatorial chemistry방법을 이용하여 합성한다. Anti-tag는 약 1,700만 종류의 서열이 있으며 한 개의 beads에는 한 종류의 anti-tag이 결합한다. Beads에 고정하고자 하는 DNA library의 각 clone에 anti-tag와 상보적인 tag서열을 결합시킨다. 고정하고자 하는 DNA에 결합한 tag와 beads상의 anti-tag를 hybridization하여 약 100만 clone의 DNA 고정화 beads library를 만들 수 있다.

Megasort™는 2개의 생물시료에서 조제한 형광 cDNA probe를 DNA 고정화 beads상에서 competitive hybridization하여 발현량에 차이를 보이는 유전자를 cell sorter를 사용하여 분리하는 기술이다.

■ MPSS®란?

MPSS®는 Massively Parallel Signature Sequencing의 약자로 Megaclone™으로 제작한 beads상의 cDNA서열의 일부(signature : 약 20염기)를 20~30만개까지 한번에 결정할 수 있는 기술이다.

Signature 서열은 cDNA poly(A) 서열에 아주 가까운 GATC서열(DpnII 인식서열)에서 하류까지 약 20염기 서열을 의미한다. 20염기 서열은 $4^{20} \approx 10^{12}$ 의 종류가 될 수 있으며 이는 human genome size의 약 300배에 해당한다. 대부분의 경우 하나의 signature서열은 genome상에 단 한 군데만 존재하므로 signature서열로 한 개의 유전자를 결정할 수 있다.

cDNA microbeads library를 제작하여 MPSS®로 해석할 경우 각 signature 서열의 출현빈도는 각 유전자의 발현량을 반영한다. 이것을 복수의 세포, 조직 등에서 유전자 발현 profile를 비교하여 특이적으로 발현하는 유전자를 선별할 수 있다. 특이적 유전자의 선별에는 EST(Expressed Sequence Tag)해석과 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)가 이용된다. EST 해석에 의한 발현 profiling으로 MPSS®와 같은 능력으로 해석하려면 1 시료 당 20~30만개의 서열을 결정해야 하므로 상당히 많은 비용이 요구된다.

SAGE의 경우 한개의 서열을 결정하면 20~60유전자의 정보를 얻을 수 있어 EST해석 보다 적은 비용이 들지만, 9~14염기 서열 밖에 얻을 수 없어 유전자를 결정할 수 없는 경우가 많다.

■ 원리

MPSS®는 flow cell 중 Megaclone™ beads에 순차적으로 시약을 반응시켜 beads가 내는 형광을 CCD 카메라로 촬영하여 서열을 결정하는 기술이다. Flow cell은 beads 직경(5 μm)보다 조금 넓은 간격으로 겹쳐진 glass 판으로 이루어져 있으며 출구 부근에 beads의 유출을 막는 장치가 있다(그림 2). 여기에 Megaclone™으로 조제한 beads를 평면상으로 충전한다.

MPSS®에 사용하는 시약 중 가장 중요한 것은 encoded adapter와 decoder probe이다. Encoded adapter는 일부가 double strand인 합성 DNA로 1~4염기씩 결정용이 각 4 group으로 총 16 group으로 이루어진다(그림 3). 중앙의 double strand 부분은 각 group에 공통적으로 Bbv I (II s형 제한효소) 인식서열 [GCAGC(8/12)]을 포함한다. 그림 3 서열에서 왼쪽 single strand 부분은 group내에 하나의 염기만 고정되어 있으며 다른 3 염기는 네 종류 염기(A,T,G,C)중 하나이다. 따라서 각 group은 $4^3 = 64$ 종류의 서열 혼합물이며 이 부분을 beads 상의 cDNA말단에 ligation한다. 오른쪽의 single strand부분은 각 group의 고유 서열로, 여기에 형광표식한 decoder probe를 hybridization하여 어느 group의 encoded adapter가 ligation되었는지 검출할 수 있다.

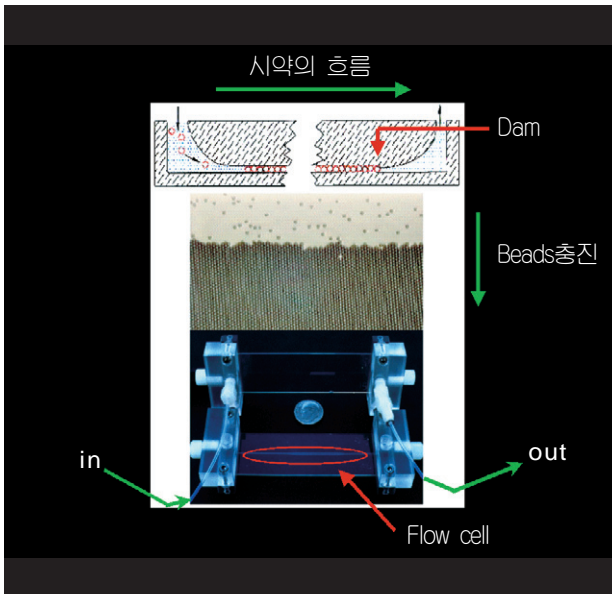


그림 2 Flow cell

Base1	Base3
NNNAcggagctgccaagtccATTTAGCGC tgotcgaacggtccag	NNNAcggagctgccaagtccGAAGAAGTC tgotcgaacggtccag
NNNCacggagctgccaagtccPGAATTACCG tgotcgaacggtccag	NNNCacggagctgccaagtccTGGTCTCTCT tgotcgaacggtccag
NNNAcggagctgccaagtccACCAATACGG tgotcgaacggtccag	NNNAcggagctgccaagtccTAGCGGACTT tgotcgaacggtccag
NNNTacggagctgccaagtccCGCTTTGTAG tgotcgaacggtccag	NNNTacggagctgccaagtccGGCGATAACT tgotcgaacggtccag
Base2	Base4
NNAAcggagctgccaagtccGGAACCTGAA tgotcgaacggtccag	ANNNAcggagctgccaagtccGCATCCACTCT tgotcgaacggtccag
NNCAcggagctgccaagtccTGTGCGTGAT tgotcgaacggtccag	NNNAcggagctgccaagtccCAACTCGTCA tgotcgaacggtccag
NNNAcggagctgccaagtccACCGACATTC tgotcgaacggtccag	NNNAcggagctgccaagtccCACAGCAACA tgotcgaacggtccag
NNITacggagctgccaagtccATTCTCTCTC tgotcgaacggtccag	NNNTacggagctgccaagtccGCCAGTGTTA tgotcgaacggtccag

그림 3 Encoded adapter

Base1: 첫번째 염기 결정용; Base2: 두번째 염기 결정용; Base3: 세번째 염기 결정용; Base4: 네번째 염기 결정용

MPSS®의 반응

Megaclone™으로 제작한 beads상의 cDNA를 *Dpn II* (↓GATC)로 절단한 후 형광표식한 initiating adapter를 ligation한다. Initiating adapter는 *Bbv I* 인식서열을 갖고 있으며 같은 효소로 절단하면 cDNA중 GATC 서열에 인접하는 4염기가 5' 돌출말단이 되도록 설계되어 있다. 수 십만개의 beads를 flow cell에 충전하여 beads가 내는 형광을 CCD 카메라로 촬영하여 각 beads의 위치를 알 수 있다(그림 4).

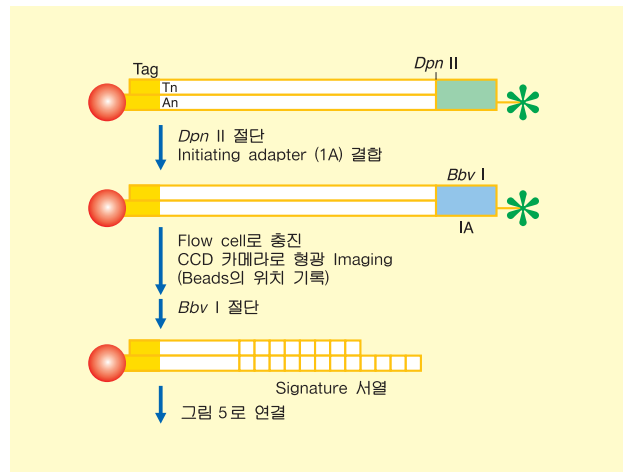


그림 4 MPSS®의 원리 : 시료조제

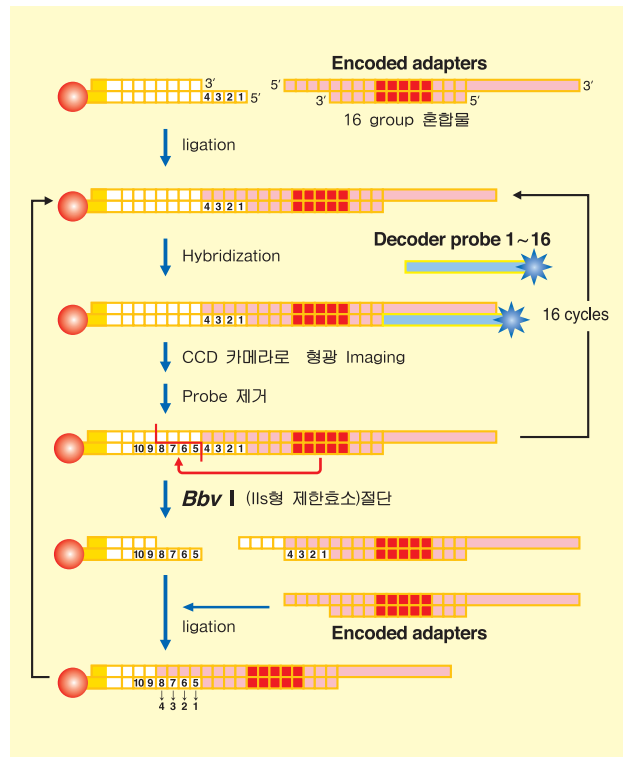


그림 5 MPSS®의 원리 : Sequencing

Flow cell에 *Bbv I*을 통과시켜 beads상의 cDNA와 반응하면 cDNA의 GATC에 인접한 4염기가 5' 돌출말단이 된다(그림 4). 16 group의 encoded adapter 혼합물(64×16 = 1,024종류의 서열)을 ligation한다(그림 5). 이때 cDNA 말단서열에 상보적인 서열을 갖는 encoded adapter만 ligation된다. 어느 encoded adapter가 ligation되었는지 검출하기 위하여 16 group의 encoded adapter의 우측 single strand 부분에 각각 상보적인 16 종류의 형광표식 decoder probe를 1종류씩 flow cell에 순차적으로 통과시켜 hybridization한다. 이 때 한 종류의 decoder probe를 통과시킬 때마다 CCD카메라로 형광을 기록하여 화상 데이터를 컴퓨터에 입력한 뒤 온도를 올려 decoder probe를 제거한다.

BbvI 으로 절단하여 말단서열이 5'-CCAG인 cDNA를 예로 들면 좌측 single strand 부분의 서열이 5'-CTGG인 encoded adapter(그림 3)만 ligation된다. 이 서열을 갖는 encoded adapter는 첫번째 염기 결정용 5'-NNNG group, 두번째 염기 결정용 5'-NNGN group, 세번째 염기 결정용 5'-NTNN group 및 네번째 염기 결정용 5'-CINN group에 포함되어 있다. 따라서 이들 group에 hybridize하는 형광표식 decoder probe를 flow cell에 통과되면 beads가 형광을 나타낸다.

Encoded adapter를 ligation한 후 decoder probe로 hybridization, CCD 카메라로 형광 검출 및 기록, decoder probe의 제거로 이루어지는 cycle을 16번 반복하면 최초 4염기의 서열을 결정할 수 있다.

위와 같은 일련의 실험을 한 후, BbvI으로 절단하면 서열이 결정된 최초 4염기에 인접한 네개 염기가 5' 돌출말단이 된다(그림 5). 이와 같은 일련의 4염기 서열 결정실험을 네 번 반복하면 20염기의 signature 서열 모두를 결정할 수 있다. 이것으로 개개의 beads에 그림 6과 같은 데이터가 축적되고 모호한 서열이 포함된 부분을 제거하면 보통 20~30만개의 beads상의 signature서열을 읽을 수 있다.

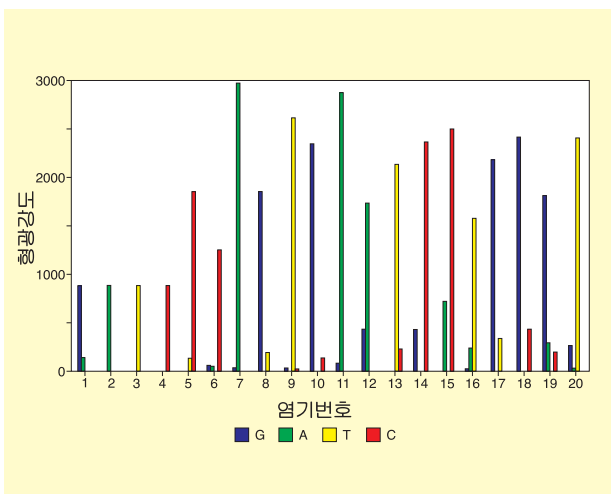


그림 6 MPSS® Sequence data 예

■ MPSS® 응용예

Phorbolsters와 lipopolysaccharide로 유도한 단핵구세포 THP-1에서 발현된 유전자의 발현량을 MPSS®와 EST sequence로 해석하여 다음과 같은 결과를 얻었다(그림 7).

MPSS®로 25만개, EST sequence로 1,839개의 서열을 해석하여, 그림상의 발현비율 1%는 EST해석의 18개 염기서열, MPSS®의 2500서열에 대응된다. 따라서 MPSS®는 EST해석 보다 훨씬 높은 분해능을 갖는다. 또한 그림 7에는 표시되어 있지 않지만 MPSS®로는 다수의 서열을 해석할 수 있어 EST해석으로 얻을 수 없는 발현량이 낮은 유전자를 검출할 수 있다.

MPSS®로 확인된 THP-1 세포의 발현유전자서열과 human 22번 염색체 서열을 비교하였다(표 1).

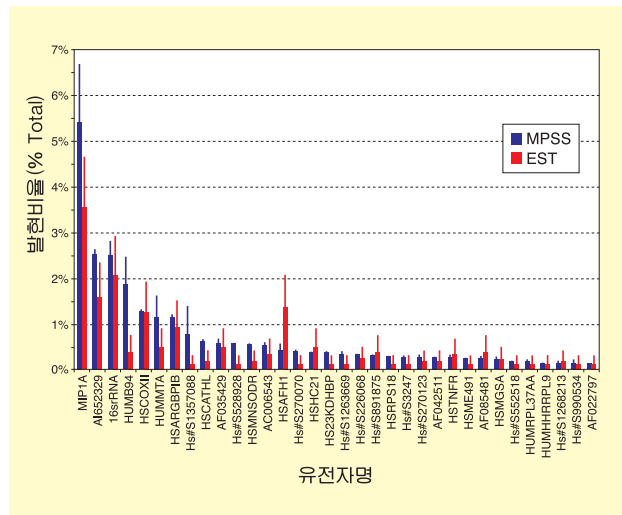


그림 7 MPSS®와 EST sequence로 해석비교

표 1 MPSS®로 발현이 확인된 human 22번 염색체상의 유전자

Category	유전자수	GATC배열을 포함하는 유전자 수	MPSS®로 확인된 서열
기지유전자	247	230	52%
관련유전자	150	127	24%
Pseudogenes	134	110	28%
기능미지유전자	150	113	30%

그 결과 기지 유전자의 53%와 그 외 유전자 20~30%가 발현됨을 확인하였다. 표 2는 MPSS®를 이용한 human과 옥수수 유전자의 발현해석 결과를 나타낸다.

표 2 MPSS®에 의한 유전자 발현해석 예

	Human	옥수수
결정한 signature 수	> 3,000,000	> 500,000
MPSS®장치(대)	4	2
소요시간(주)	6	3
유전자수	> 50,000	> 50,000
신규유전자수	> 3,000	대부분

Human 유전자수는 3만 여개로 알려져 있지만 MPSS®로 5만 개 이상의 유전자 발현이 확인되었다. 이것은 3' 말단 부위의 선택적 splicing에 의한 것으로 생각된다.

이와 같이 MPSS®로 해석하며 각 장기마다 특이적인 splicing pattern의 발현 및 해석 등이 가능하다.

<DNA Microbeads Array 연구지원 서비스 문의>
다카라코리아바이오테크놀로지 기술지원팀
 Tel : 02-577-2002
 E-mail : support@takara.co.kr