

# DNA Microbeads Array

## 기술을 이용한 유전자 발현 해석 서비스

TaKaRa는 다양한 유전공학관련 연구지원 서비스를 통하여 많은 호응을 받고 있으며,

이번에 미국 Lynx Therapeutics사의 DNA Microbeads Array 기술을 도입하여 새로운 수탁 서비스를 개시하였다.

### ■ DNA Microbeads Array와 유전자 발현 해석

DNA Microbeads Array 기술은 Megaclone™, Megasort™(Life Science & Biotechnology 19호 참조), MPSS®(Life Science & Biotechnology 20호 참조)로 구성되어 있다. 이번에 개시한 연구지원 서비스는 Megaclone™과 Megasort™로, Megaclone™은 DNA Microbeads Array 기술의 핵심으로, 생체 시료 중 발현하는 거의 모든 mRNA-(poly(A)RNA) 유래 cDNA를 microbeads에 고정화하여 library를 제작한다. 이 방법으로 microbeads 하나에 대하여 한 종류의 cDNA 단편(mRNA의 3' 말단 부근에서 유래한다)을 고정화하여 약 100만 종류의 cDNA 결합 microbeads를 제작할 수 있다.

Megasort™는 두 종류의 생체 시료에서 발현양에 차이가 있는 유전자(differentially expressed gene)를 결합한 microbeads를 cell sorter로 분리하는 기술이다. 두 종류의 시료를 다른 두 가지색으로 형광 표식한 cDNA probe를 조제한 후, 그 혼합물을 microbeads상의 cDNA에 경합적으로 혼합한다. 이 microbeads를 cell sorter로 sorting하여 원하는 발현 양상을 보이는 유전자가 결합한 microbeads를 얻을 수 있다. 이 방법으로 분리된 cDNA의 염기서열을 결정하여 시료간에 발현양의 차이가 있는 유전자를 동정할 수 있다.

### ■ 준비할 시료

유전자의 발현양을 비교하고자 하는 두 종류의 생체 시료에서 유래한 poly(A)RNA를 2.5 µg씩 준비한다. 조직, 세포, total RNA 등에서 poly(A)RNA 조제 서비스도 실시하고 있다.

### ■ Megaclone™과 Megasort™ 작업

Takara 바이오연구소에서, 의뢰 받은 poly(A)RNA를 사용하여 Megaclone™과 Megasort™실험을 한다. 이 중 Megasort™의 sorting시 어떤 gate를 설정하는가, 즉 어떤 발현 변화를 보이는 유전자를 sorting 하는가는 의뢰자와 상담 후 결정한다.

Megasort™로 얻은 microbeads를 200개씩 나누어, 각각을 주형으로 PCR하여 cDNA를 증폭한다(이 과정까지 Megasort™ 수탁). 이 cDNA를 plasmid vector에 cloning하면 일반적인 방법으로 염기서열 해석이 가능하며 염기 서열 분석 서비스도 실시하고 있다.

### ■ cDNA 서열 해석

Megasort™로 sorting한 유전자를 동정하기 위해서는 염기서열 해석이 반드시 필요하다. 보통 한 번의 Megasort™ 마다 2,000~10,000개 서열을 결정 해야 한다. Takara의 자회사인 Dragon Genomics Co., Ltd에서

는 대량 cDNA clone 염기서열 결정 및 clustering, homology 검색 등 서열해석서비스를 실시하고 있으며, Megasort™ 후 Dragon Genomics Co., Ltd에서 염기 서열 분석을 한다.

### ■ 납품하는 데이터 및 시료

1) 직접 염기 서열 분석을 하는 경우:

Megasort™ 후 PCR 산물 또는 이것을 plasmid vector에 ligation한 반응액을 납품한다.

2) Dragon Genomics Co., Ltd에서 염기 서열 분석을 할 경우:

① 서열, ② 서열+clustering, ③ 서열+clustering+homology 검색 등의 데이터를 납품한다. 염기서열 결정에 이용한 plasmid clone도 분양하고 있다.

### ■ 염기 서열 해석 데이터

Dragon Genomics Co., Ltd에서 homology 검색까지 실시한 경우, 데이터는 검색 화면상태로 납품한다. 검색 화면은 해석한 서열 수나 clustering의 개요를 나타내는 초기 화면이 표시된다(그림 1). 「up」와 「down」은 Megasort™ 2개의 gate를 의미한다.

초기화면의 「cluster」를 클릭하면 clustering의 결과가 그래프로 표시된다(그림 2). 가로축은 cluster ID를, 세로축은 각 cluster에 속하는 서열 수를 나타내고, 청색과 적색 바는 Megasort™의 각 gate(Up-regulated, Down-regulated)에 유래하는 서열의 개수를 나타낸다. 그림 2에서 cluster ID순으로 표시되어 있지만, 모든 gate에 유래하는 서열의 개수 순서나 2개 gate에 유래하는 서열 개수의 차이 순서로 표시할 수 있다. 그래프 바를 클릭하면 homology 검색 결과가 표시되어 유전자 동정이 가능하다(그림 3).

초기화면(그림 1) 또는 그래프 표시(그림 2)의 「table view」를 클릭하면 cluster가 테이블 형태로 표시된다(그림 4).

이 표에는 cluster마다 cluster ID, 각 gate에 유래하는 서열 수, homology 검색에서 히트한 최상위 서열명, BLAST score, E-value 및 consensus 서열의 길이가 표시된다.

테이블 표시의「homology search result」를 클릭하면, 그림 3의 homology 검색 결과가 표시된다. 또 「consensus length」란의 숫자를 클릭하면, 그 cluster에 속하는 서열이 표시되며 서열의 신뢰성이 Phred score에 따라 색깔로 분리된다(그림 5).

초기 화면의 「singlet」밑의 「up」, 「down」을 클릭하면, cluster에 속하지 않는 서열이 테이블 형태로 표시된다. 표시되는 항목은 그림 4의 cluster table과 거의 동일하다.



그림 1 Viewer: 초기화면

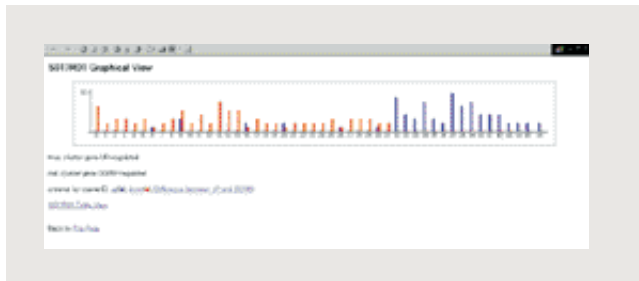


그림 2 Viewer: 그래프 표시

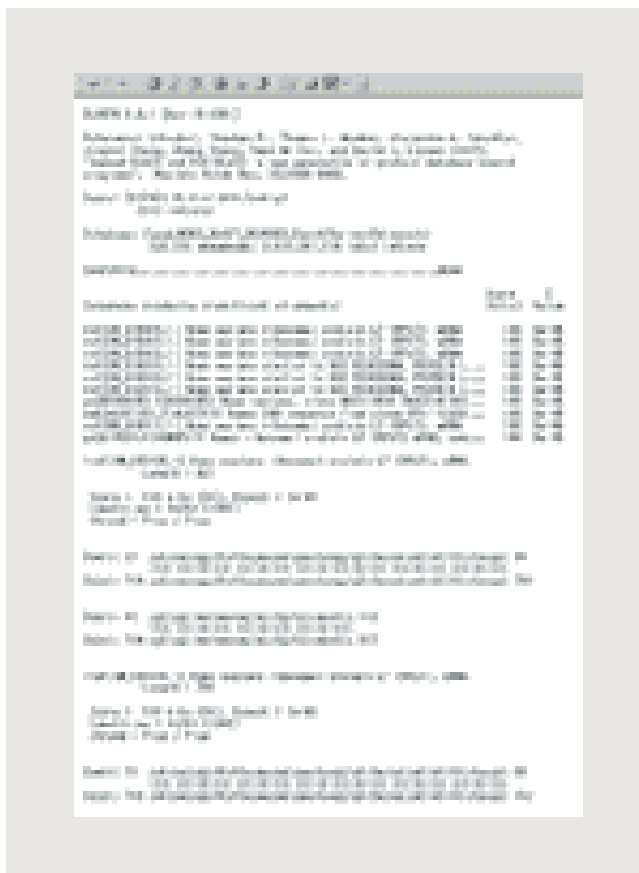


그림 3 Viewer: Homology 검색 결과

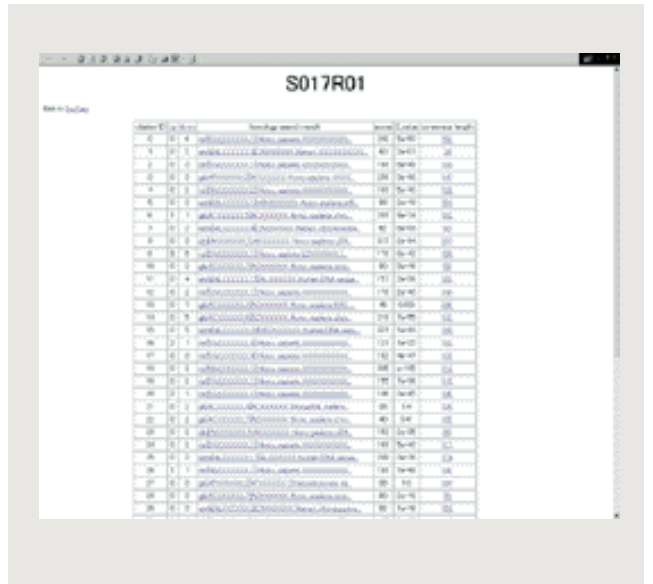


그림 4 Viewer: 테이블 표시



그림 5 Viewer: Cluster에 속하는 서열 표시

■ 지적소유권의 귀속

해석한 유전자 발현 해석의 모든 결과는 의뢰자에게 귀속된다.

■ Megasort™을 이용한 실험예: 약물에 의한 유전자 발현 변화

Rat 간장 조직에  $\beta$ -naphthoflavone(BNF)을 투여한 후 유전자 발현량의 변화를 Megasort™로 해석하였다. BNF를 투여한 경우와 투여하지 않은 rat 간 mRNA를 추출하며, Megaclone™으로 cDNA 결합 microbeads를 제작하였다. 이 beads 혼합물에 각 mRNA에서 조제한 형광 표식 probe를 hybridization한 후 flowcytometer로 분석하였다 (Megasort™기술). 그림 6 (A)는 BNF를 투여하지 않은 rat 간 mRNA로 조제한 FITC 표식 probe와 Cy5™ 표식 probe를 같은 양으로 혼합하여 microbeads 상의 cDNA와 hybridization한 비교 실험 결과이다. 그림 6(B)는 BNF를 투여하지 않은 rat 간 유래의 FITC 표식 probe와 BNF를 투여한 rat 간 유래의 Cy5™ 표식 probe를 같은 양 혼합하여 hybridization 한 결과 대조 실험에 비해 시그널 분포가 넓어져, BNF에 의해 유도된 유전자와 억제된 유전자를 알 수 있었다. 특히 BNF에 의해 강하게 유도된 유전자가 많았다.

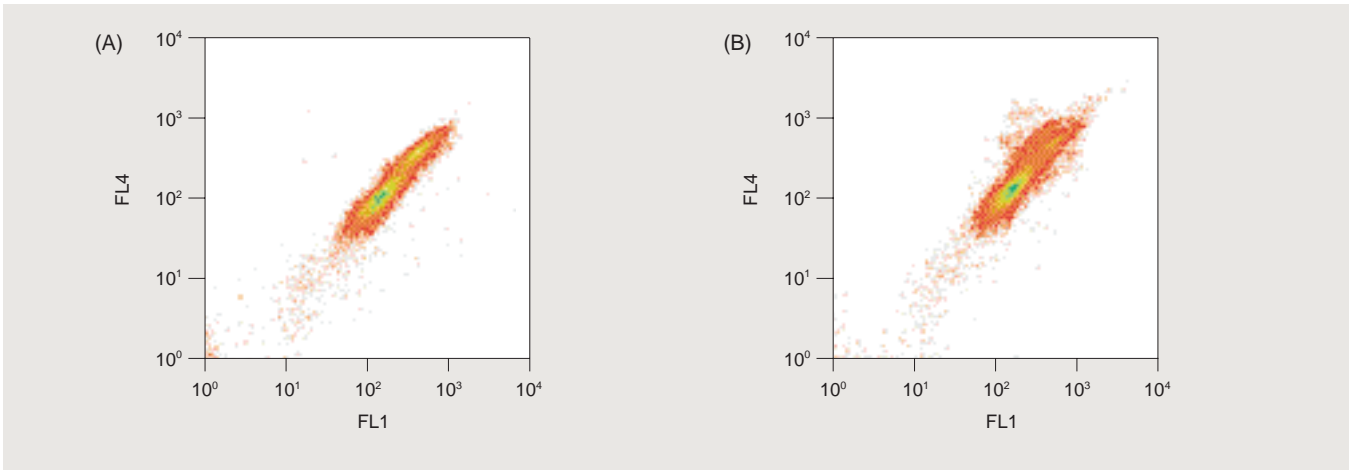


그림 6 BNF처리에 따른 rat 간장 조직에서 유전자 발현량의 변화

■ Megasort™ 결과의 이용

Megasort™을 이용한 신규 약물 표적 유전자 결정 과정을 그림 7에 나타내었다. Megasort™로 질병 조직과 정상 조직 사이에서 발현양이 다른 유전자를 선택한다. 이런 유전자 전체를 상세히 해석 하는 것은 많은 시간과 노력이 필요하므로 DNA chip을 제작하면 효율적으로 이용할 수 있다. Megasort™에서 얻은 유전자를 고정화한 DNA chip을 functional DNA chip이라고 하며, functional DNA chip을 이용하여 여러 검체의 유전자 발현을 해석하여, 질환과 밀접한 유전자를 찾아낼 수 있다. 당사에서는 functional DNA chip 제작 서비스도 실시 하고 있다.

이런 스크리닝 과정을 통하여 선택한 소수의 유전자를 이용하여 full length cDNA cloning, 고차구조나 기능의 예측 및 해석, transgenic 동물 제작 등 상세한 해석을 통하여 계놈 신규 약물 목적 유전자를 효과적으로 결정할 수 있다.

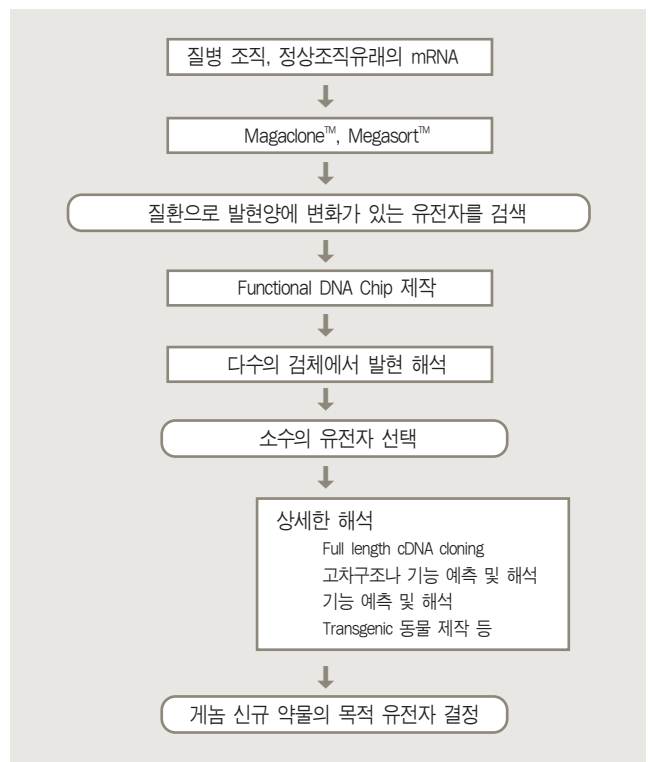


그림 7 Megasort™를 이용한 실험예

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 생물체는 signature 서열로 유전자를 동정할 수 있으며, signature 서열의 빈도로 유전자 발현 profile을 추정할 수 있다.

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



# Takara's DNA Chip

## *IntelliGene*<sup>TM</sup>

DNA Microarray Series

- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Human Apoptosis CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Human Cancer CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Human Cytokine CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Human DNA CHIP  
for endocrine disruption study
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Human CHIP 1K SET I
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Mouse CHIP SET I
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Cyano CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Arabidopsis CHIP I
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> *E. coli* CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Rat Toxicology CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> Human Stem Cell CHIP
- ▶ IntelliGene<sup>TM</sup> TestARRAY

Takara

135-066 서울 강남구 도곡동 451-3  
TEL 02-677-2002 FAX 02-677-0891  
URL [www.takara.co.kr](http://www.takara.co.kr)