

# 의미있는 유전자만을 집적한 Functional DNA chip 개발

**DNA chip(DNA Microarray)**은 mRNA 수준에서 대량 또는 동시에 발현, 해석하는 방법으로 정착되고 있다. 사용되고 있는 DNA chip 타입에는 data base 정보를 기반으로 primer를 설계하여 cDNA library에서 유전자를 모아 제작한 망라적(종합적) DNA chip과 기존의 문헌 등을 근거로 관련 유전자를 모아 제작한 기능별 DNA chip 등이 있다. 망라적 DNA chip을 이용하여 해석하는 경우에는 (1)관련없는 유전자의 작용으로 인한 해석의 어려움, (2)최종적으로는 생물학적인 역할을 해석할 때 방대한 노력이 필요, (3)data base를 근거로 하므로 신규유전자의 부재, (4)관계하는 유전자 일부의 누락 가능성 등의 어려움이 있다.

한편, 기능별 DNA chip은 해석하기 쉬운 chip이지만 기존의 문헌에 기재되지 않은 유전자나 기능이 알려지지 않은 유전자를 특정화 하려는 경우, 다시 한 번 유전자를 수집하여야 할 필요가 있다.

이렇듯 효과적인 해석을 위해서는 chip상의 DNA 구성이 매우 중요하다. 여기에서는 Takara가 개발하고 있는 망라적 유전자의 고효율 발현 해석을 위한 functional DNA chip에 대하여 소개한다.

## ■ Functional DNA chip에 대하여

Functional DNA chip은 Megacclone™과 Megasort™기술로 얻어진 cDNA fragment를 spotting하여 제작한 DNA chip이다.

Megacclone™기술은 세포내에서 발현하는 유전자를 방대한 수의 microbeads에 실질적으로 전부 고정화하는 기술이다. 유전자의 서열정보가 필요없으며 아주 발현량이 적은 유전자도 망라적으로 microbeads에 고정화할 수 있다.

한편 Megasort™기술은 Megacclone™에서 얻어진 망라적 발현 유전자에서 시료간에 발현량의 차이를 보이는 유전자를 분리, 취합하는 기술이다.

Functional DNA chip은 연구대상 시료에 대해 Megacclone™과 Megasort™하여 얻은 유전자를 이용하여 제작한 DNA chip으로 chip상에는 그 실험체에 관련된 유전자가 망라되어 있다. 그 때문에 functional DNA chip을 이용하면 적은 노력으로 효율적인 data해석을 할 수 있을 것으로 생각된다.

## ■ 실험에

TPA(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate)는 발암 promoter로 유명하며 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다. 우리는 agaro oligo당이 발암 및 염증을 억제한다고 이미 보고한 바 있으며, 그 활성 본체는 DGE(3,4-dideoxy-glucosone-3-ene)로 생각된다. 여기에서는 TPA 투여에 의해 발현이 변동하는 유전군을 Megacclone™과 Megasort™기술로 단리하여 functional DNA chip을 제작하고 DGE를 투여한 경우의 유전자 발현 profile을 조사한 실험에 대하여 소개한다.

## (1) Functional DNA chip의 제작

1.3% DMSO를 포함하는 RPMI 1640 (10% FCS, 1% 항생물질 함유) 배지에서 7일간 배양한 호중구로 분화시킨 HL-60 세포를 10 cm 사알레 2매에  $1 \times 10^7$ 개/장의 밀도로 뿌리고 다른 쪽의 사알레에는 10 ng/ml(최종농도)의 TPA를 첨가했다. 4시간 후 TPA첨가/무첨가의 세포를 샘플링하여 각각 mRNA를 추출 정제했다. 각각의 mRNA 샘플에서 Megacclone™ microbeads를 제조하고 또한 같은 mRNA 샘플에서 형광표식 probe를 각각 제작하여 앞서 제작한 Megacclone™ microbeads의 혼합물에 대해 competitive hybridization한 후 그 결과를 flowcytometer로 해석했다(그림 1, Megasort™). 그림 1과 같이 각 gate(선으로 묶은 영역)를 설정하여 발현 변동이 인정되는 gate내의 Megacclone™ microbeads(up 및 down gate내의 beads)를 분리, 취합하여 각각 PCR 증폭했다. 얻어진 956종류의 유전자 fragment를 Affymetrix 417™ Arrayer를 사용하여 spot하여 functional DNA chip을 제작했다. 이 DNA chip의 hybridization 화상의 한 예를 그림 2에 나타낸다.

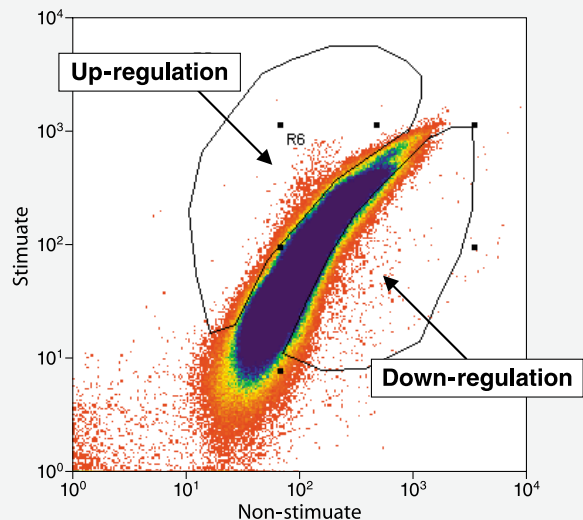


그림 1 TPA 첨가/무첨가 Megasort™  
 X축 : TPA 무첨가의 호중구 분화 HL-60 세포 유래의 mRNA  
 Y축 : TPA 첨가의 호중구 분화 HL-60 세포 유래의 mRNA  
 사용 cell sorter : MoFlo™

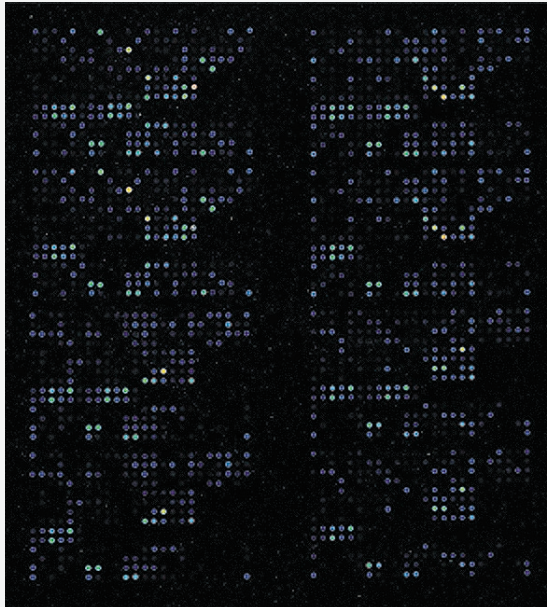


그림 2 Functional DNA chip의 hybridization 화상  
TPA 첨가/무첨가 시료에 유래하는 형광표식 probe를 functional DNA Chip에 hybridize시켰을 때의 화상을 나타낸다. Scanning은 Affymetrix 428<sup>M</sup> Array Scanner를 사용했다.

(2) Functional DNA chip을 이용한 해석

TPA 및 DGE를 여러 조건에서 첨가한 호중구 유래 HL-60 세포에서 mRNA를 조제하여 형광표식 probe를 제작한 다음 functional DNA chip상에서 competitive hybridization하여 software ImaGene<sup>TM</sup>으로 각 spot signal을 정량한다. 그 다음 각 spot signal 비율 data를 이용하여 계층적 clustering하였다. 모든 해석에 있어 Cy3<sup>TM</sup> 또는 Cy5<sup>TM</sup>의 signal 값이 background의 mean 값+2SD보다 큰 것을 유효 spot으로 하여, 적어도 하나의 해석에 있어 signal 비가 2배보다 크거나 1/2보다 작은 spot을 선택하여 clustering했다.

해석에는 GeneSight<sup>TM</sup> Version 2.1을 사용하고 거리계산법에는 euclid 거리법을, 유사도 계산법에는 최장거리법을 이용했다.

그림 3은 계층적 clustering 결과의 일부다. Functional DNA chip에 spot 되어있는 유전자는 956종류 정도이지만 많은 신규 유전자와 기능미지의 유전자가 포함되어 있다. 그 가운데 function unknown 유전자 17종류, putative novel 유전자 4종류에 대해서는 functional DNA chip을 이용한 발현 profiling으로 시료 조건과 clustering를 대응시켜 TPA 자극 호중구 활성화에 있어서 DGE의 작용해석과 기능미지·신규 유전자의 기능을 예측해석 할 수 있다.

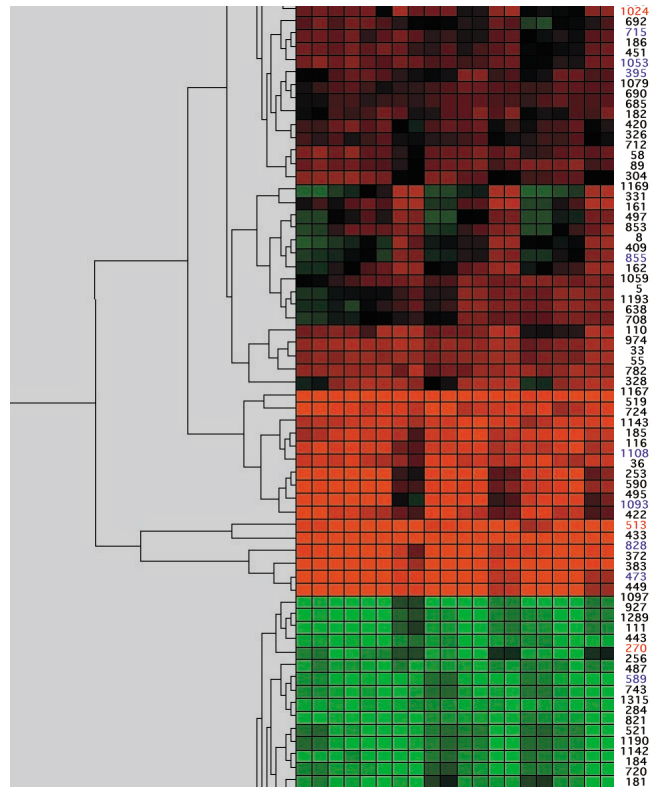


그림 3 여러 조건에서 TPA 및 DGE를 첨가한 호중구 유래 HL-60의 발현 profile을 functional DNA chip으로 해석하여 계층적 clustering한 결과 red column은 발현이 상승을 보인 유전자, green column은 발현의 감소를 보인 유전자. 우측의 숫자는 유전자 ID를, blue 숫자는 function unknown 유전자를, red 숫자는 putative novel 유전자를 나타낸다. 사용해석 software : GeneSight<sup>TM</sup> Version 2.1

■ Functional DNA chip 개발

Takara에서는 Megaclone<sup>TM</sup>과 Megasort<sup>TM</sup>기술을 이용하여 functional DNA chip을 개발하고 있다. 여기에서는 두개의 chip 개발과정을 소개한다.

(1) Human brain, 부위별 functional DNA chip

인간의 소뇌, 해마 및 소뇌편도 유래의 mRNA를 이용하여 Megaclone<sup>TM</sup> microbeads를 제작하고 각각의 조합으로 Megasort<sup>TM</sup> 하여 각 조합에 있어 발현차를 보이는 유전자를 취득하여 서열을 해석했다. 각 공정의 개략적 내용은 다음과 같다.

① Megaclone<sup>TM</sup>

Human PolyA<sup>+</sup> RNA를 사용

각 시료에 대한 상세내역은 아래와 같음

- Human 소뇌 : Normal brain tissue pooled from 24 male/female caucasians, ages : 16-70, cause of death : sudden death
- Human 해마 : Normal brain tissue pooled from 19 male/female caucasians, ages : 16-70, cause of death : sudden death
- Human 소뇌편도 : Normal brain tissue pooled from 70 male/female caucasians, ages : 17-76, cause of death : trauma

각 시료 2.0 μg에서 cDNA를 조제하여 Megaclone<sup>TM</sup> microbeads를 제작했다.

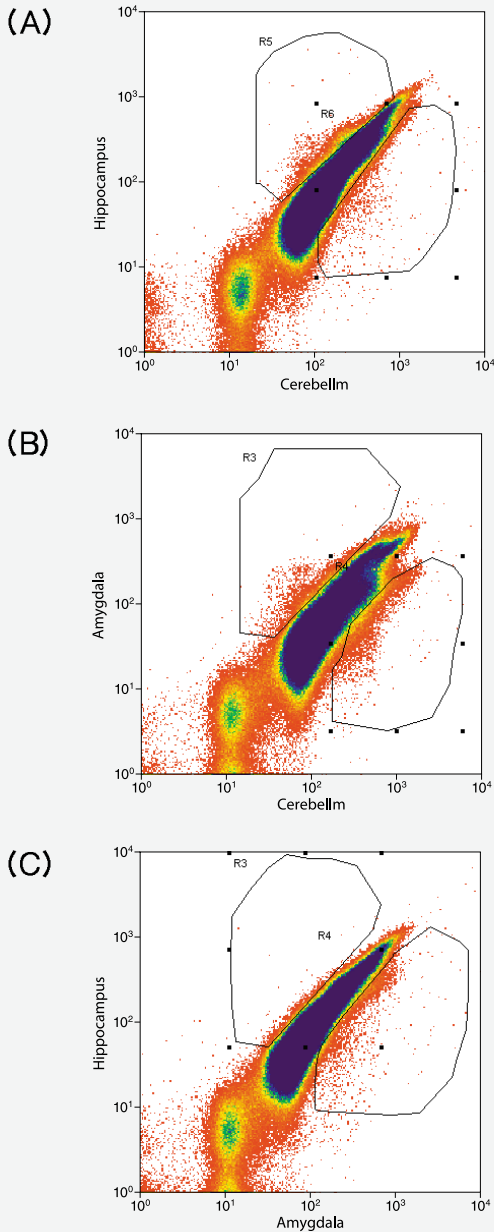


그림 4 human 뇌, 부위별 Megasort™  
 (A) X축 : human 소뇌 mRNA ; Y축 : human 해마 mRNA  
 (B) X축 : human 소뇌 mRNA ; Y축 : human 소뇌편도 mRNA  
 (C) X축 : human 소뇌편도 mRNA ; Y축 : human 해마 mRNA  
 사용 cell sorter : MoFlo™

③ DNA 서열 해석

우선 각 gate(6개의 gate)에 포함되는 각 beads에 유래하는 PCR 증폭산물을 작은 scale(96 well plate 2장씩, 합계 12장)로 sequencing하여 서열을 확인했다. 그 결과 493종류의 유전자를 얻었으며 그 중 185종류가 기능미지의 유전자였다.

현재 large scale의 서열해석을 하고 있으며 또한 많은 유전자를 탑재한 functional DNA chip을 개발중에 있다.

(2) Rat Toxicology Functional DNA chip

약물대사효소 Cytochrome P450의 유도약제로 알려져 있는 β-naftofraben (BNF)를 투여한 rat와 투여하지 않은 rat의 간에서 조제한 mRNA를 이용

하여 Megacalone™microbeads를 제작하고 BNF 투여에 의한 발현량이 변동하는 유전자를 Megasort™로 얻어내 서열을 해석했다. 각 공정의 개략적 내용은 아래와 같다.

① Megacalone™

6령 숫컷 SD rat에 cornoil로 현탁한 BNF를 복강내에 1일 1회 100 mg/kg, 4일간 연속적으로 투여했다. 또한 대조군 rat에게는 cornoil을 투여했다. 투여 2시간 후 각 rat의 간을 적출하여 total RNA를 추출했다. 각 total RNA에서 mRNA를 정제하여 mRNA 2.0 μg으로부터 cDNA를 조제한다. 이 cDNA 시료를 이용하여 Megacalone™ microbeads를 제작했다.

② Megasort™

대조군(BNF 비투여)과 BNF 투여 시료 유래의 mRNA로 형광표식 probe를 제작하여 Megacalone™ microbeads의 혼합물에 대하여 competitive hybridization하여 flowcytometer로 해석한 결과를 그림 5에 나타냈다. 그림 5와 같이 각 gate(Up 1, Up 2 및 Down gate)를 설정하여 gate내의 Megacalone™ microbeads를 분취한 후 PCR 증폭, cloning, 염기서열을 해석하였다.

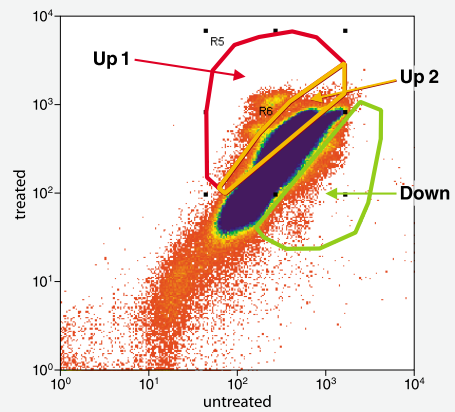


그림 5

③ DNA 서열 해석

우선 각 gate(3개의 gate)에 유래하는 PCR 증폭산물을 small scale(96 well plate 4장씩, 합계 12장)로 염기서열을 확인했다. 그 결과 259종의 유전자가 얻어졌으며, 그 중 88종은 기능이 알려지지 않은 유전자였다.

또한 기능 미지의 171 유전자에 대하여 시판되고 있는 타사의 rat toxicological array 유전자 list와 비교해 본 결과 그 중 140종류는 list에는 존재하지 않아 Megasort™의 망라성이 시사되었다.

현재 large scale의 염기서열을 해석하고 있으며 많은 유전자를 탑재한 functional DNA chip을 개발중에 있다.

■ 맺음말

이상과 같이 Megacalone™/Megasort™ 기술을 이용하면 기존의 DNA chip에는 탑재되어 있지 않은 유전자를 포함한 functional DNA chip을 제작할 수 있는 가능성을 시사하였다. Functional DNA chip에 탑재된 유전자는 이미 기능에 따라 screening된 의미 있는 유전자이므로 결과해석처리가 원활하여 보다 신속하게 새로운 정보를 얻을 수 있다.

이처럼 functional DNA chip은 의미있는 유전자를 망라적으로 탑재한 DNA chip이라 할 수 있다.

# 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

135-855 서울 강남구 도곡2동 451-3  
TEL 02-577-2002 FAX 02-577-3691  
URL [www.takara.co.kr](http://www.takara.co.kr)