

RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV) - Version up!!

RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver.2.0

TaKaRa Code TX810 10회분

DNA chip(DNA microarray) labeling kit로 호평을 받아온 RNA Fluorescence Labeling Core Kit(M-MLV Version)가 이번에 version up 하였다. 본 제품은 소량의 형광 표식 기질을 이용한 역전사 반응으로 RNA sample로부터 고효율 형광 표식 cDNA probe를 조제하는 kit로 특히 TaKaRa DNA chip IntelliGene series에 사용하기에 최적화 되어 있다. 이번의 version up은 labeling 반응조건을 Cy3™, Cy5™ 각각에 대하여 최적화하여, 해석능력을 향상시켰다. 본 제품은 조작이 간편한 direct-label 법으로서 2단계 반응을 실시하는 post-label법과 비교해 동등한 정밀도와 발현차를 유의 있게 검출할 수 있다. 여기서는 본 제품을 사용한 실험 예를 소개한다.

■ 실험예 1

동일한 RNA sample을 각각 Cy3™, Cy5™로 표식하여 발현차이로 검출 가능한 Cy3™/Cy5™ 비율을 추정하였다.

【방법】

배양세포 HL60 에서 total RNA를 추출하고 *Oligotex™-dT30<super>* mRNA Purification Kit를 이용하여 mRNA를 분리하였다. RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) 구 version과 신 version(ver 2.0)을 이용하여, 확보한 mRNA 1µg 을 Cy3™ 또는 Cy5™ 에 각각 형광 표식한 후 혼합하여 probe 용액을 준비하였다. 또 control은 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H)로 합성한 cDNA를 *Label IT®* Cy3™ Labeling Kit 및 *Label IT®* Cy5™ Labeling kit을 사용하여 형광표식하여 probe를 조제하였다(post-label법). 본 제품을 이용하여 조제한 probe의 경우 65℃에서 overnight 하였으며 post-label법에 의해 조제한 probe에 대해서는 50% formamide를 포함하는 hybridization buffer를 이용하여 42℃에서 overnight 하였다. 그 후 IntelliGene® Human Cancer CHIP Ver.3.0 위에 hybridization 하였다. 세정 후 Affymetrix® 428™ Array Scanner를 이용하여 각 형광물질을 scanning하였으며, 얻어진 scanning 화상을 ImaGene™을 이용하여 수치화하고 data를 해석하였다.

【결과 및 고찰】

ImaGene™에 의한 해석결과(Scatter Plot)를 그림 1에 나타내었다. Cy3™, Cy5™ 간의 signal 강도의 보정은 global normalization에 따른다. Spot signal의 평균치가 각 spot 주변의 background의 평균치+2×표준편차 보다 큰 값을 나타내는 것을 유효 signal이라고 하고 유효한 signal만을 사용하여 normalization하였다.

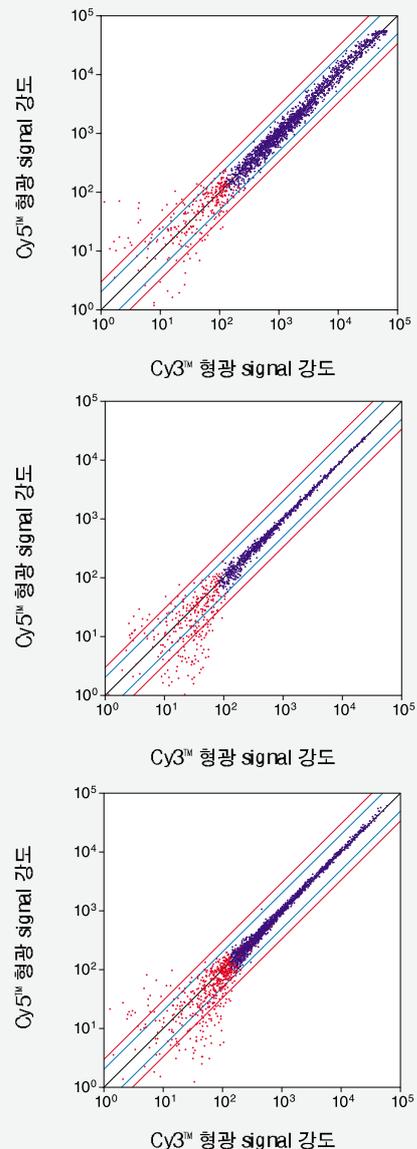


그림 1 각 labeling 방법에 따른 Scatter Plot

X축은 Cy3™ signal의 강도, Y축은 Cy5™ signal의 강도를 나타낸다. Graph의 청색선은 Cy3™와 Cy5™ sample의 signal 비율이 1:2 또는 2:1의 이론상의 line을 표시한 것이며, 적색선은 signal 비율이 1:3 또는 3:1의 이론상의 line을 표시한다. 유효 spot은 청색이며, 무효 spot은 적색으로 plot 되어있다. (A)본제품(구 version), (B)본제품(신 version) (C)Post-label법 (*Label IT®*).

그림 1의 scatter plot에서는 Cy3™과 Cy5™ sample의 signal 비가 1:1(흑색선), 2:1 또는 1:2(청색선), 3:1 또는 1:3 (적색선)의 경우의 이론치가 line으로서 표시되어 있다.

본 실험에서는 동일한 sample을 각각 Cy3™과 Cy5™ 로 표시 하였기 때문에 spot이 이론적으로는 1:1의 line 상에 분포되어야 한다. 그러나 실제는 어느정도 흩어짐이 생겨서 유의한 차이로 검출 가능한 발현차에는 한계가 있다. 이 발현차의 검출한계를 각각 labeling법으로 비교하기 위해 Cy3™/ Cy5™ signal 비의 평균치와 표준편차로부터 유효 spot의 99%가 분포한다고 추정되는 범위를 산출하였다.

이 결과 version up 한 본 제품은 유효 spot의 99%가 1.38:1 또는 1:1.38의 line 내측의 영역에 분포하고 있다. 다시 말하면 1.38배의 발현차가 99%의 신뢰도내에서 유의한 발현차로써 검출 가능하다는 것을 뜻한다.

이 결과로부터 본제품은 구 version(동 1.75배)보다도 신뢰성이 향상되었고, post label법으로 표시 한 경우(동 1.44배)와 동등한 정도 혹은 그 이상의 신뢰성이 있다.

■ 실험에 2

mRNA에 external control RNA를 1:2, 1:5, 1:10의 비율로 각각 첨가하고 Cy3™/ Cy5™ 비율의 유의성을 검토하였다.

【방법】

실험 1과 같은 방법으로 mRNA를 조제하여 mRNA 각 1 µg 에 external control RNA를 첨가하였다. External control로서는 *in vitro* transcription에 의해 합성한 3종의 RNA(polyA⁺λ-A RNA, polyA⁺λ-B RNA, polyA⁺λ-C RNA)를 이용하고, polyA⁺λ-A RNA는 1:2로 polyA⁺λ-B RNA는 1:5로 그리고 polyA⁺λ-C RNA는 1:10의 비율로 각각 첨가하였다. 본 제품을 사용하여 이 RNA 혼합액을 Cy3™ 혹은 Cy5™로 각각 형광표식한 후 혼합하여 probe 용액으로 사용하였다. 이 probe 용액을 Intelligene Human Cancer CHIP Ver.3.0을 사용하여 65℃ 에서 overnight hybridization하여 세정한 후 Affymetrix® 428™ Array Scanner를 이용하여 각 형광물질을 scanning 하였다. 얻어진 scanning 화상은 ImaGene을 이용하여 수치화하고 data를 해석하였다.

【결과 및 고찰】

ImaGene™에 의한 해석결과(Scatter Plot)를 그림 2에 나타내었다. Cy3™, Cy5™간의 signal 강도의 보정은 실험 1과 동일한 방법으로 global normalization으로 이루어졌다.

그림 2의 Scatter Plot 에는 Cy3™ 와 Cy5™ sample의 signal 비가 1:1(흑색선), 2:1 또는 1:2 (청색선), 5:1 또는 1:5(녹색선), 10:1또는 1:10(적색선)의 경우에 대한 이론치가 line으로서 표시되어 있다. 첨가한 polyA⁺λ-A, B, C RNA signal 강도는 각각 청색, 녹색, 적색의 plot으로 표시하였으므로 각각 동일 계열색의 line 상에서 plot 되는 것이 기대된다. 그 외 spot signal 강도에 대해서는 흑색으로 plot하였다. 이 Scatter Plot으로부터 본 제품을 이용하여 표시한 polyA⁺λ RNA의 첨가비가 DNA chip을 통해 정확히 검출되었다. 또한 첨가한 polyA⁺λ RNA의 양에 비례하여 signal의 강도가 증가하였다.

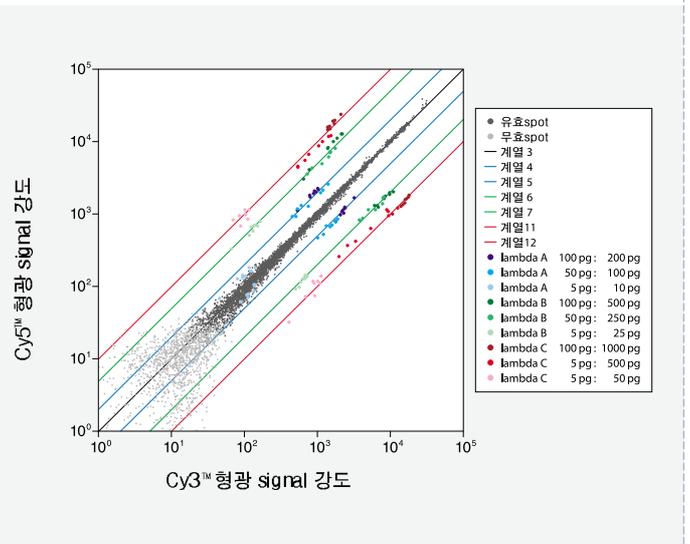


그림 2 External control RNA 첨가 실험의 ScatterPlot

X축은 Cy3™ signal의 강도, Y축은 Cy5™ signal의 강도를 나타낸다. Graph 중의 청색선은 Cy3™과 Cy5™ sample 의 signal 비율이 1:2 또는 2:1의 이론상의 line을 표시한것이며, 녹색선은 signal 비율이 1:5 또는 5:1, 그리고 적색선은 sinal 비율이 1:10 또는 10:1의 이론상의 line을 표시하였다. 각각 첨가된 RNA의 spot signal은 반응하는 색으로 plot되어 그 이상의 spot signal은 흑색으로 plot되었다.

■ 결론

이번에 소개한 바와 같이 DNA chip의 실험에서는 labeling 방법과 DNA chip의 종류에 따라 검출할 수 있는 유의한 발현 차이가 다르며 얻어진 date를 올바르게 해석하기 위해서는 실험 date의 유의성에 대한 정보가 필수 요소이다.