

Pre-made DNA Microbeads를 이용한 종합적 유전자 발현해석

-Megasort™ 해석이 훨씬 용이해 졌습니다!!

TaKaRa에서는 Megaclone™, Megasort™, MPSS® 기술을 이용한 DNA microbeads로 종합적 유전자 발현해석서비스를 실시하고 있다 (Life Science & Biotechnology 19~23호 참조).

Megaclone™은 세포내에서 발현하고 있는 mRNA를 cDNA로 변환하여 microbeads에 고정하는 기술로, 한개의 bead로 1copy의 mRNA에서 유래하는 10⁴~10⁵분자의 cDNA를 고정할 수 있으며, 세포내에서 mRNA의 존재비율에 따라 제작된다. 그러므로 database가 없는 생물 종일 지라도 전체 mRNA를 고정할 수 있다.

Megasort™은 2종류의 시료간에 발현차가 있는 유전자를 DNA Microbeads로 선별하는 기술이다. 비교하고자 하는 2종류의 시료에서 유래하는 mRNA를 각각 다른 형광물질로 표식하고 동량 혼합한 후 DNA Microbeads상에서 competitive hybridization을 하여 cell sorter로 해석한다. 형광강도의 차이가 있는 곳에 gate를 설정하고, 그 gate내에 포함되는 beads를 모두 분리함으로써 발현량에 차이가 있는 유전자 beads를 선별 할 수 있다.

MPSS®는 flow cell로 불리는 cell의 양극에 몇 십만개의 DNA Microbeads를 단층으로 배열하고 초고밀도 beadsarray를 제작하여 전체 beads상의 17개의 cDNA 염기서열(signature 서열)을 동시에 분석하는 기술이다. Signature 서열로 유전자를 특정화 할 수 있으며, signature 서열의 출현 빈도는 각 유전자의 발현량을 반영하므로 절대적으로 발현되는 유전자의 profile을 얻을 수 있다.

■ Pre-made DNA Microbeads

기존의 Megasort™ 해석 수탁은 의뢰자가 제공한 시료로 Megaclone™ DNA Microbeads를 제작한 후 Megasort™ 하여 진행하였다(보통 의뢰자가 제공한 시료는 유전자의 발현량을 비교하고자 하는 두 종류이다). 각각의 시료에서 Megaclone™ DNA Microbeads를 제작하므로 발현량이 적은 유전자라도 Microbeads상에 고정할 수 있어 발현차가 있는 유전자를 선별 할 수 있다. 본 실험은 각각의 시료에서 Megaclone™을 하므로 3개월 정도가 소요된다.

금번 TaKaRa에서는 미리 제작된 Megaclone™ Microbeads(pre-made Microbeads)를 사용한 유전자 해석서비스항목을 추가하였으며, 의뢰자가 제공한 2종류의 RNA를 probe로 하여 pre-made DNA Microbeads로 Megasort™ 한다.

Pre-made DNA Microbeads를 이용한 해석은 특수한 경우에만 발현되는 발현량이 아주 적은 유전자일 경우는 유의성이 낮지만, 납기를 단축하며 비용절감의 효과가 있어, 훨씬 용이하게 Megasort™ 해석을 이용할 수 있다. 현재 당사에서는 다음 시료에서 유래하는 pre-made DNA Microbeads를 준비하고 있다.

● Rat 조직별 pre-made DNA Microbeads

유래: Wister rat, 10주령, 수컷 5마리(CLEA Japan, Inc.)

조직: 뇌, 간장, 췌장, 신장, 비장, 심장, 소장, 폐, 정소, 골격근(대퇴부 외 측광근)

장기채취조건: 24시간 금식, diethylether 흡입 마취 후 방혈

■ Pre-made DNA Microbeads를 이용한 Megasort™ 해석 서비스 내용

- 1) 발현량을 비교하고자 하는 2종류의 RNA 시료(기본적으로는 poly(A)RNA이지만, total RNA를 제공받아 poly(A)RNA를 정제하는 수탁항목도 있다)를 의뢰자로부터 제공받는다. Agilent 2100 bioanalyzer로 RNA 순도를 확인한다. 본 실험은 고순도의 RNA가 필요하고 두 시료의 순도가 거의 비슷해야한다.
- 2) 순도를 확인한 후, RNA를 fluorescein과 Cy5™로 각각 표식 한다.
- 3) 두 종류의 형광표식 RNA(cDNA)를 혼합하여 probe로 사용하고 의뢰자가 지정한 pre-made DNA Microbeads 40만개에 competitive hybridization을 한다.
- 4) 일차적으로 4만개 정도의 hybridization이 끝난 DNA Microbeads를 cell sorter로 해석하고 의뢰자와 상의하여 beads를 회수하는 영역(gate)을 결정한다*1.
- 5) 모든 hybridization이 끝난 DNA Microbeads를 cell sorter로 해석하고, 결정된 gate내에 포함되는 모든 beads를 회수한다.
- 6) Beads 200개를 하나의 단위로 하여 96 well microtiter plate의 각 well에 분주*2(10,000개의 beads라면 50 well에 분주)하고 DNA 단편을 회수한다.
- 7) 하나의 gate당 한 개의 well을 임의로 선택한 후 그 well 내의 DNA 단편을 cloning하고, 192개의 single colony를 onepass sequencing하여 결과를 확인한다*3.

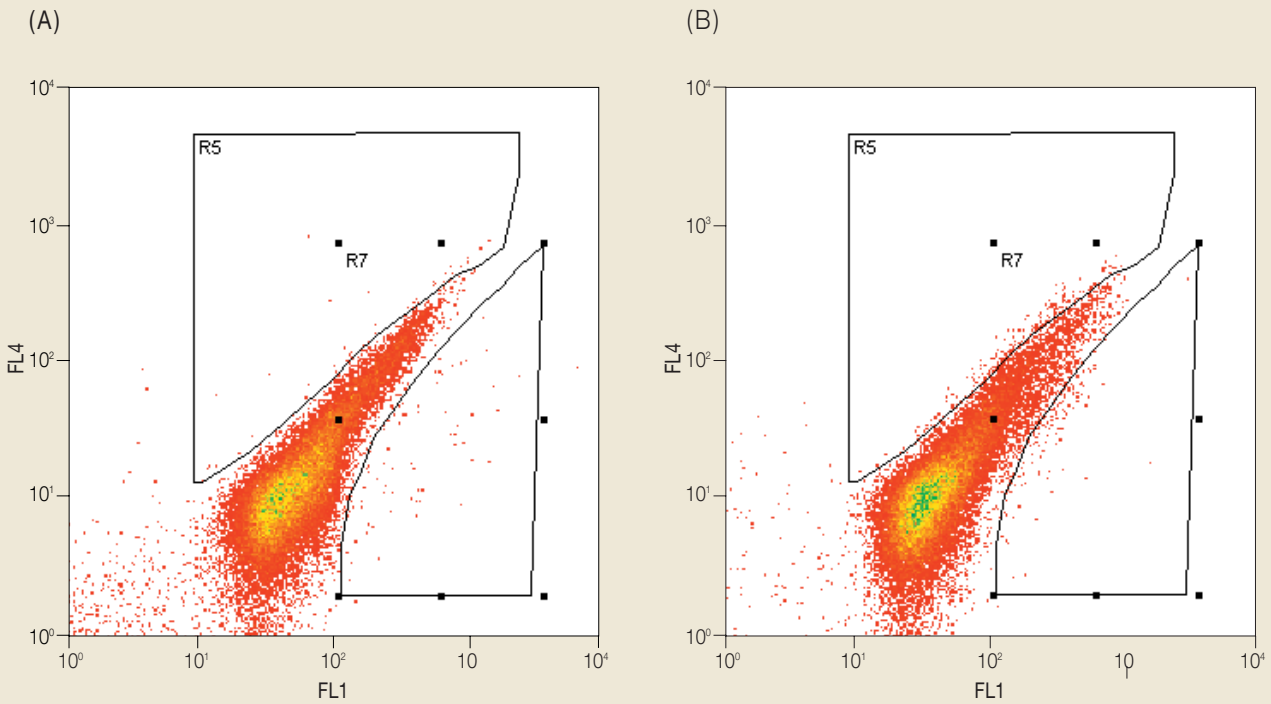


그림 1 Pre-made DNA Microbeads를 이용한 해석 예

(A) 사용한 beads: Rat 뇌조직의 pre-made DNA Microbeads; 시료: X축-Wister rat 뇌 유래 poly(A)RNA, Y축-GK rat 뇌 유래 poly(A) RNA,
 (B) 사용한 beads: Rat 신장조직의 pre-made DNA Microbeads; 시료: X축-Wister rat 신장유래 poly(A)RNA, Y축-GK rat 신장유래 poly(A)RNA.

8) DNA 단편을 포함하는 96 well microtiter plate와 임의로 선택한 well(각 gate당 하나의 well)의 clone을 onepass sequencing하여 해석 data*4를 의뢰자에게 제공한다*5.

- *1: 기본 메뉴는 2 개의 gate이다. 2 개의 gate를 추가하는(총 4개 gate) 옵션도 있다.
- *2: 기본 메뉴는 1 gate당 1매의 96 well microtiter plate(200 × 96=19,200개의 beads)이다(2 gate 당 2매). 1 gate당 1매를 넘을 때는 옵션가격이 부가된다.
- *3: 각 well의 대량 sequencing은 별도 문의한다.
- *4: Onepass sequencing은 phred 값이 15이상으로, 300염기 이상이 70%(192 clone × 70%=135 clone)이면 가능하다.
- *5: 납기는 약 1개월이다. 그러나 시료의 순도가 낮다고 판단될 경우에는 시료를 다시 조제해야 하므로 납기가 연장된다. 또 pre-made DNA Microbeads의 재고가 없는 경우는 보다 많은 시간이 소요된다.

Pre-made DNA Microbeads를 이용한 Megasort™ 해석서비스의뢰 방법

사용하고자 하는 pre-made DNA Microbeads를 선택(예를 들면, rat 간장조직의 pre-made DNA Microbeads 등)하여 의뢰한다. 당사에서 확인 후 의뢰자로부터 시료(2종류의 RNA)를 제공 받는다. 가격, 옵션해석, 납기 등에 관한 상세한 설명은 당사 기술지원팀으로 문의한다.

< Microbeads Array 해석 서비스 문의 >

다카라코리아바이오메디칼주식회사 <기술지원팀>
 제품정보/기술지원: 02-575-7409, 연구지원서비스: 02-575-7793
 E-mail : support@takara.co.kr

Pre-made DNA Microbeads를 이용한 Megasort™ 해석 예

Pre-made DNA Microbeads를 이용하여 인슐린 비의존성 당뇨병 모델 rat인 GK rat과 정상 rat인 Wister rat의 뇌 및 신장 유전자의 발현량을 비교 해석한 실험결과이다.

● 시료(각 rat 5마리 사용)

- GK rat: 10주, 수컷
 혈당치: 172~194 mg/dl
 혈중 HbA1c: 3.7~4.3%
 혈청중 인슐린: 검출한계 이하
- Wister rat: 10주, 수컷
 혈당치: 65~95 mg/dl
 혈중 HbA1c: 2.5~2.9%
 혈청중 인슐린: 검출한계 이하~0.172 ng/ml

각 5마리의 rat에서 뇌와 신장을 채취하여 total RNA를 검출한 후, 계통 및 조직별로 각 total RNA를 동량 혼합하여 polyA RNA를 정제하였다.

● 사용한 pre-made DNA Microbeads

Rat의 뇌 및 rat 신장유래의 beads(각각 40만개의 beads 사용)

● Megasort™

Wister rat 유래의 poly(A)RNA를 fluorescein으로, GK rat 유래의 poly(A)RNA를 Cy5™으로 표식하고 조직별로 두개를 혼합하여 pre-

made DNA Microbeads상에서 competitive hybridization을 한 후, MoFlo™ cell sorter(Cytomation사 제품)로 해석하고, 발현차이를 보이는 gate 2곳을 설정하여 gate 내의 beads를 회수하였다. 그림 1은 MoFlo™에 의한 해석결과를 나타낸다.

각 gate에 포함되는 beads 200개를 하나의 단위로 하여 96 well microtiter plate의 각 well에 분주하여 DNA단편을 회수한 후, 각 gate 당 하나의 well을 선택하여 cloning 하였다. 그 well(각 gate 당 하나의 well)에 유래하는 192 clone을 sequencing하여 발현량의 차이가 있는 201종의 유전자를 얻었다(표 1).

표 1 Pre-made DNA Microbeads를 이용한 Megasort™ 해석으로 얻은 유전자의 종류

	유전자의 종류
당뇨병 rat의 뇌에서만 높은 발현	20
당뇨병 rat의 신장에서만 높은 발현	25
당뇨병 rat의 뇌 및 신장에서 높은 발현	6
당뇨병 rat의 뇌에서만 낮은 발현	82
당뇨병 rat의 신장에서만 낮은 발현	63
당뇨병 rat의 뇌 및 신장에서 낮은 발현	2
당뇨병 rat의 뇌에서 높은 발현, 신장에서 낮은 발현	3
당뇨병 rat의 신장에서 높은 발현, 뇌에서 낮은 발현	0
Total	201

【관련제품】

TaKaRa DNA Chip IntelliGene® 시리즈

제품명	TaKaRa Code	포장량
IntelliGene® TestARRAY Ver. 3,0	TaKaRa Code X000	2매
IntelliGene® CyanoCHIP Ver. 1,2	TaKaRa Code X001	1매
IntelliGene® Arabidopsis CHIP I Ver. 1,0	TaKaRa Code X0021	1매
IntelliGene® E. coli CHIP Ver. 1,0	TaKaRa Code X003	1매
IntelliGene® Human Apoptosis CHIP Ver. 1,1	TaKaRa Code X101	2매
IntelliGene® Human Cancer CHIP Ver. 3,0	TaKaRa Code X102	2매
IntelliGene® Human DNA CHIP for endocrine disruption study Ver. 1,1	TaKaRa Code X103	2매
IntelliGene® Human Cytokine CHIP Ver. 2,0	TaKaRa Code X104	2매
IntelliGene® Human CHIP 1K Set I Ver. 1,0	TaKaRa Code X1071	2매
IntelliGene® Mouse CHIP Set I Ver. 1,0	TaKaRa Code X2011	2매
IntelliGene® Human Stem Cell CHIP Ver. 1,0	TaKaRa Code X105	2매
IntelliGene® Rat Toxicology CHIP Ver. 1,0	TaKaRa Code X301	2매

■ 결론

Pre-made DNA Microbeads를 사용함으로써 납기를 단축할 수 있으며, 비용절감의 효과가 있어 훨씬 용이하게 Megasort™해석을 이용할 수 있게 되었다. TaKaRa에서는 이 외에도 보유하고 있는 clone을 이용한 functional DNA chip(Life Science & Biotechnology 23호 참조) 제작이나 functional DNA chip을 이용한 발현해석수탁도 하고 있다. 보다 자세한 사항은 당사 기술지원팀 또는 연구개발센터로 문의하기 바란다.

〈DNA chip 제작 · 해석 문의〉

다카라코리아바이오메디칼주식회사 <연구개발센터>

전화번호 : 031-456-6969 (직통: 031-459-6969)

E-mail : r&d@takara.co.kr