

MPSS®를 이용한 절대적 유전자 발현 profiling 연구지원서비스

TaKaRa에서는 DNA microbeads를 이용한 Megaclone™/Megasort™ 기술(Life Science & Biotechnology 19, 21호 참조) 및 Pre-made beads를 이용한 발현해석 연구지원서비스(=Quick Sort, Life Science & Biotechnology 24호)를 진행하고 있다. 이번에 새롭게 MPSS® (Massively Parallel Signature Sequencing)를 이용한 유전자 발현 profiling 연구지원서비스를 시작하였다.

MPSS®기술을 사용하면 세포내에서 발현되고 있는 대부분의 유전자 종류와 발현빈도를 알 수 있다. 즉, 절대적 발현 profile을 얻을 수 있다. 또한 각 시료에서 얻은 발현 profile을 비교하여 특정 유전자의 발현량의 차이뿐만 아니라 이것에 관한 전체적인 정보를 얻을 수 있어 신규 유용 유전자검색이나 각 유전자에 새로운 의미를 부여할 수 있다. 이미 많은 나라의 몇몇 연구기관에서는 MPSS®를 도입하여 발현해석에 이용하고 있으며, 데이터를 공개하고 있는 웹사이트도 있다³⁻⁵⁾.

■ MPSS® 기술의 개요

mRNA 시료에서 cDNA를 조제하여 Megaclone™기술로 수 백 만개의 microbeads상에 고정화 하면, beads 1개당 1종류의 cDNA가 결합된 library가 얻어진다. MPSS®는 Massively Parallel Signature Sequencing의 약자로 Megaclone™으로 제작한 beads상의 cDNA서열의

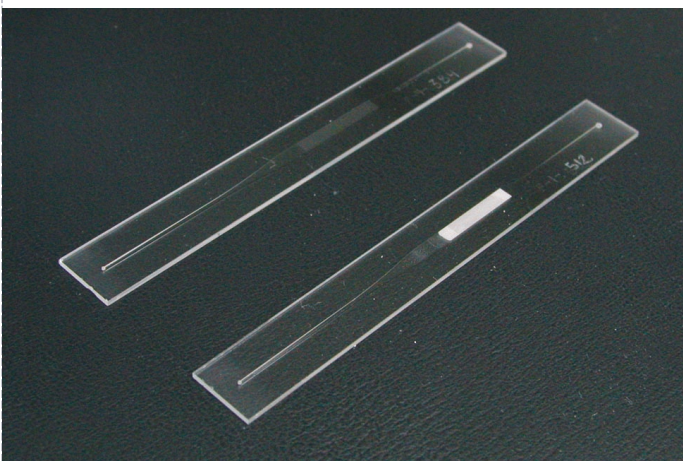


그림 1 Flow cell
앞쪽은 Megaclone™ DNA microbeads를 충전한 flow cell

일부(Signature 서열: 17염기)를 20~30만 개까지 한번에 결정할 수 있는 기술로 다음과 같은 방법으로 진행된다. 우선 cDNA가 고정화된 DNA microbeads를 flow cell 가운데 충전하고 beads를 단층으로 배열한다. 그 후 flow cell내에서 제한 효소처리, 서열인식용 adapter(encoded adapter) ligation과 형광 probe(decoder probe), hybridization 조작을 반복하여 형광을 검출하며, CCD 카메라로 촬영하여 flow cell내 모든 microbeads cDNA를 동시에 17염기 sequencing한다(그림 2: Life Science & Biotechnology 20호 참조).

얻어진 서열을 signature라 부르며, 한번의 MPSS®로 20만~30만개의 signature 서열을 얻을 수 있다. 대부분 한 종류의 signature 서열은 단지만 한 곳의 genome상에만 존재한다고 생각되므로, signature 서열을 database와 비교하여 유전자를 특정화 할 수 있다.

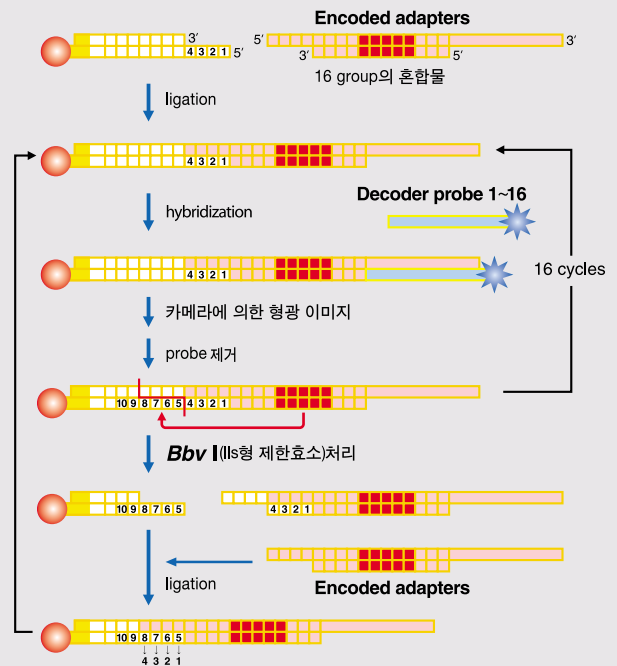


그림 2 MPSS® 원리: sequencing

또한 1개의 microbeads에는 1 copy의 mRNA에서 유래한 cDNA만이 고정화 되어, 동일 cDNA(signature 서열)을 갖는 beads 수는 세포내에서 발현되고 있는 그 mRNA copy 수를 반영하는 것으로, signature 서열의 출현빈도로 부터 각 유전자의 발현빈도를 유추할 수 있다.

■ MPSS® 해석 예

1) MPSS®의 재현성

MPSS®의 재현성을 확인하기 위하여 human 배양세포 BT20 유래의 동일 mRNA 시료에서 Megaclone™기술로 DNA microbeads를 별도로 제작하고 각각을 MPSS®하여 signature 서열을 얻었다. 그림 3은 signature 서열의 출현빈도를 scatter plot한 결과이다. 상관계수(R²)는 0.996로 재현성은 양호하였다.

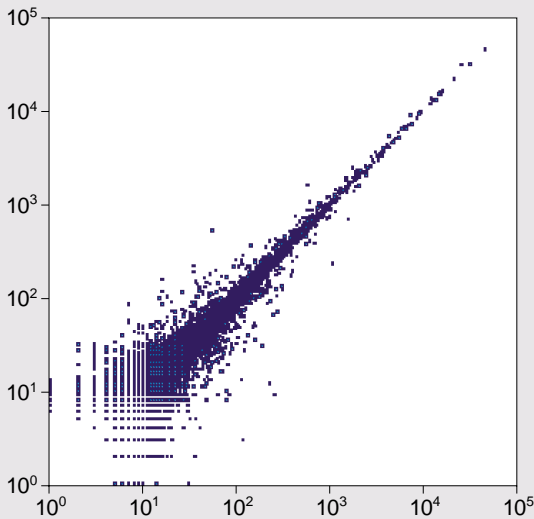


그림 3 MPSS® 재현성
각 signature 출현빈도는 100만개 단위로 normalize해서 비교하였다.

2) 다른 시료의 MPSS® data 비교

다음과 같이 다른 시료에서 유래한 mRNA를 MPSS®로 얻은 발현 profile을 비교하였다. 우선 DMSO로 호중구(neutrophile)로 분화시킨 HL-60 세포를 TPA(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 첨가 또는 무첨가 조건에서 4시간 배양한 후, mRNA를 추출, 정제하였다. Megaclone™ 기술로 mRNA에서 cDNA를 고정화 한 microbeads를 제작하여 MPSS®로 각 시료의 signature 서열을 얻었다.

그림 4는 각 MPSS®로 얻어진 signature 서열의 출현빈도로, 많은 유전자의 발현양이 변화한다는 것을 확인하였다.

■ MPSS® 연구지원서비스

MPSS®를 이용한 발현 profile 제작 서비스의 flow chart이다.

- ① 의뢰자로부터 시료(poly A⁺ RNA)접수
- ② Agilent 2100 bioanalyzer로 시료의 순도 확인
- ③ Megaclone™으로 mRNA(cDNA)를 microbeads에 고정화

- ④ 제작한 Megaclone™ DNA microbeads를 flow cell에 충전
- ⑤ MPSS®하여 signature 서열 데이터 획득
- ⑥ 해석작업 보고서 및 MPSS®데이터 송부

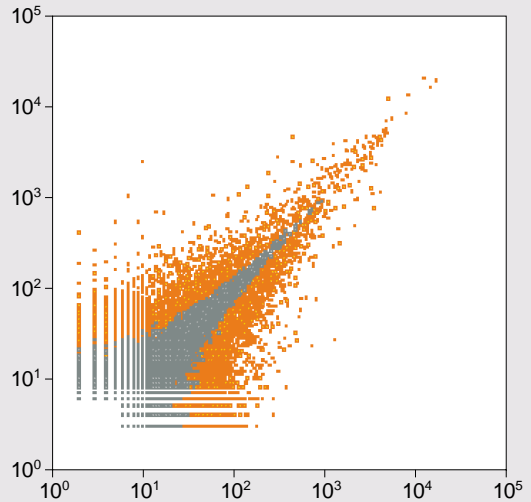


그림 4 다른 시료의 발현 profile 비교
X 축: TPA 무첨가 시료의 signature 출현빈도
Y 축: TPA 첨가 시료의 signature 출현빈도
각 signature 출현빈도는 100만개 단위로 normalize하여 비교한다.
오렌지색 plot은 99%의 기대치로 유의한 수준의 발현양 차이를 나타내는 유전자의 signature를 나타낸다.

■ 맺음말

MPSS®로 얻은 데이터는 절대적으로 발현되는 profile로 복수 시료에서 MPSS®하여 발현 profile을 비교하면 각 생물 시료에서 특이적으로 발현되고 있는 유전자를 알 수 있다. SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)도 동일한 목적이지만, SAGE로 얻어진 Tag 서열(부분서열)은 10염기로 특정유전자로 판단하기 어려운 단점이 있다. MPSS®는 특이성이 높으며 전체 mRNA를 대상으로 하기 때문에 한번의 MPSS®로 거의 완전한 발현 profile을 얻을 수 있다.

【참고문헌】

- 1) Brenner, S., et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 1665-1670.
- 2) Brenner, S., et al. (2000) *Nature Biotechnol.* **18**, 630-634.
- 3) Dhugga, KS. (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 488-493.
- 4) Stein, EL., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5460-5465.
- 5) <http://mpss.ucdavis.edu/nonjava.html>