

Arabidopsis cDNA microarray, Ara 12K/GSNU의 제작

경상대학교 대학원 응용생명과학부 / 임 채오

1. 서론

인간의 게놈 프로젝트와 함께, 몇몇 모델 생물의 전체 게놈 지도가 완성된 후, 기능 유전체학 분야에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 기능 유전체학 분야에 대한 중요성은 이미 잘 알고 있으며, proteomics, metabolomics, transcriptomics 등 몇 분야로 나누어 진행되고 있다. 본 고에서 언급할 유전자 칩은 유전자 발현 양상을 총체적으로 분석 가능하게 하는 도구로 기능 유전체학의 transcriptomics 분야에 속한다고 할 수 있다. 유전자 칩은 1995년 미국 Stanford 대학의 P. Brown Lab.에서 처음으로 제작된 이후, 지금까지 해결되지 않았던 몇 가지 기술적 장애들이 해결되어가면서 급격히 그 활용도가 증가되고 있다.

표 1에서는 식물 유전자 칩을 사용한 2002년 이후의 연구 논문들을 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 유전자 칩을 사용한 연구 논문들이 급속히 증가되는 것은 유전자 칩이 식물 기능유전체학의 중요한 연구기법으로서 이미 그 가치를 인정 받았다고 판단된다. 지금까지 식물 유전자 칩을 사용한 연구는 주로 벼, Arabidopsis를 대상으로 행해져 왔다. 특히 Arabidopsis 유전자 칩은 Nottingham Arabidopsis Stock

(nasc.nott.ac.uk), Stanford 대학의 Arabidopsis Functional Genomics Consortium (afgc.Stanford.edu)과 예일대의 Keck DNA Microarray Biotechnology Resource (info.med.yale.edu/wmkeck/dna_arrays.htm)에서 개당 100- 170 USD 정도에 Arabidopsis 칩을 외부기관에 제공하고 있다. 고품질의 유전자 칩을 제작·공급하기 위해서는 고가의 장비와 노동 집약적인 연구체계가 요구됨으로 이들 대형 연구 기관들이 자국 내 여러 연구기관에 유전자 칩을 공급해 주는 거점 연구소로서의 역할을 담당하면서 전체적 연구의 효율성을 높이고 있다. 그러나 본 연구진에서는 이들로부터 구입한 Arabidopsis 칩들의 신뢰도를 분석해 보았을 때, 만족할 만한 결과를 얻을 수 없었다. 따라서 지금까지 배추를 통하여 획득한 유전자 칩 제작 기술을 사용하여 보다 높은 신뢰도의 고품질 Arabidopsis 유전자 칩을 제작하고자, 동양에서 유일하게 Arabidopsis 게놈프로젝트에 참여한 일본의 Kazusa 연구소와 협력하여 12,000여개의 Arabidopsis EST를 공급 받아 Ara 12K/GSNU 유전자 칩 제작을 시도하였다. 본 고에서는 Ara 12K/GSNU 제작을 위한 전략과 12K 칩의 신뢰도를 검정한 부분에 대해 논의하고자 한다.

표 1. 식물 유전자 칩 관련 논문 (2002, 2003년도 발표)

순번	연구내용	식물명	발표논문	칩 요소
1	Low-Oxygen response	Arabidopsis	Klok <i>et al.</i> , <i>Plant Cell</i> 14 :2481	EST
2	Auxin response	Arabidopsis	Sawa <i>et al.</i> , <i>Plant J</i> 32 :1011	Oligonucleotide(Affymetrix)
3	Floral fragrance	Rose	Guterman <i>et al.</i> , <i>Plant Cell</i> 14 : 2325	EST
4	Wounding, pathogen, abiotic stress, hormonal responses	Arabidopsis	Cheong <i>et al.</i> , <i>Plant Physiol</i> 129 :661-677	Oligonucleotide
5	Programmed cell death	Arabidopsis	Swidzinski <i>et al.</i> , <i>Plant J</i> 30 : 431-446	EST
6	Programmed cell death	Arabidopsis	Brodersen <i>et al.</i> , <i>Genes & Develop</i> 16 : 490-502	EST
7	Environmental stress	Arabidopsis	Chen <i>et al.</i> , <i>Plant Cell</i> 14 : 559-574	Oligonucleotide
8	RNA viruses infection	Arabidopsis	Whitham <i>et al.</i> , <i>Plant J</i> 33 : 271	Oligonucleotide
9	Floral homeotic gene action	Arabidopsis	Zik and Irish, <i>Plant Cell</i> 15 : 207	EST
10	Grain filling	Rice	Zhu <i>et al.</i> , <i>Plant Biotech J</i> 1 : 59	Oligonucleotide

2. 본론

1) Ara 12K/GSNU의 구성

유전자의 수가 지속적으로 증가하고 있기 때문에 한 장의 기관 내에 얼마나 많은 유전자 (probe)를 집적할 수 있는가 하는 것은 유전자 칩의 가치와 연구의 범위를 결정하는 중요한 관건이 된다. 먼저, Ara 12K/GSNU를 구성하는 12,000개의 Arabidopsis EST를 기능별로 분류해 보면 그림 1과 같다. No match나 기능이 알려져 있지 않은 유전자가 50% 이상을 차지하고 있어, Ara 12K/GSNU를 사용하여 얻은 의미 있는 유전자에 대한 추가적 연구가 필요하다. Ara 12K/GSNU에는 12,000개의 EST와 함께, normalization을 위해 필요한 228개의 control을 사용하여 (표 2) 총 12,228개의 probe를 사용하였다. 또한 Ara 12K/GSNU는 한 기관 내에 같은 array를 두 번 집적시킴으로써 기술적인 면에서 발생할 수 있는 실험적 오차를 줄였다. 실제 DNA chip의 개발에 가장 중요한 요소는 고밀도로 DNA를 일정한 공간에 부착시키는 기술이다. 본 연구팀에서는 pin microarray, inkjet, photolithography, electronic array 방법 중 1995년 미국 Stanford 대학이 개발한 pin microarray 방식 (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>)을 사용하였다. 먼저 12,228개의 probe를 집적하기 위하여 16 개의 핀 (SMP3, Telechem)을 사용하였으며, 핀 하나가 집적하는 영역의 유전자 그룹 (핀 유전자 그룹)에 $28 \times 28 = 784$ 의 유전자가 집적되게 하고, 16 블록의 핀 유전자 그룹을 구성하면 총 $784 \times 16 = 12,544$ 개의 유전자를 집적할 수 있는 범위를 설정할 수 있다. 12,544개의 집적 범위는 12,228개의 probe를 충분히 포함할 수 있다.

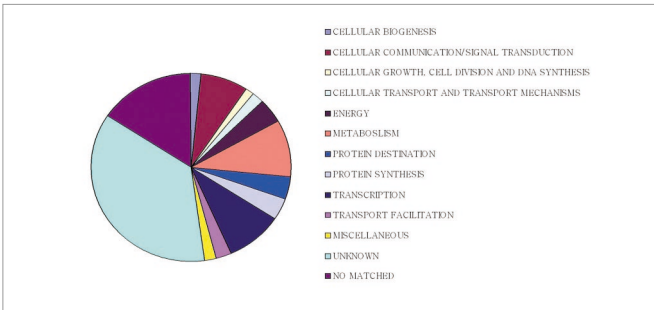


그림 1. Ara 12K/GSNU를 구성하는 Arabidopsis EST의 기능별 분류

표 2. Ara 12K/GSNU에 사용된 대조구

Gene name	GenBank Acc. No.
Phosphinothricin acetyl transferase (BAR)	X17220
β glucuronidase (GUS)	AF485783
Luciferase	M15077
Neomycin phosphotransferase II (NPTII)	AF485783
Nopaline synthase	AF234297
Erythroblast macrophage protein	AF084928
Laminin B2 chain	M55210
λ DNA	AY190304

2. 유전자 칩 제작의 조건 확립

유전자 칩 제작에 있어 칩 자체를 만드는 것은 일반적인 기술이기 때문에 어려운 것이 아니다. 문제는 정확도 높은 칩의 제작에 있다고 볼 수 있다. 설정된 probe의 집적 범위 내에서 핀간의 균일성과 기관의 품질 검증을

위하여 먼저, 한 종류의 cloning vector를 증폭한 후, 12,544개의 probe로 spotting하고 Cy3로 검정한 결과, 그림 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 그림 1에서 보는 바와 같이 일정한 크기의 spot과 spot간의 겹침 현상은 볼 수 없었으나, 핀 유전자 그룹간의 간격이 일정하지 않음을 알 수 있었다. 이것은 사용한 microarrayer (MicroGrid II, BioRobotics)의 기계적 정밀도에 따른 것으로 보여지나, 데이터 분석에는 영향을 미치지 않는 부분이다.

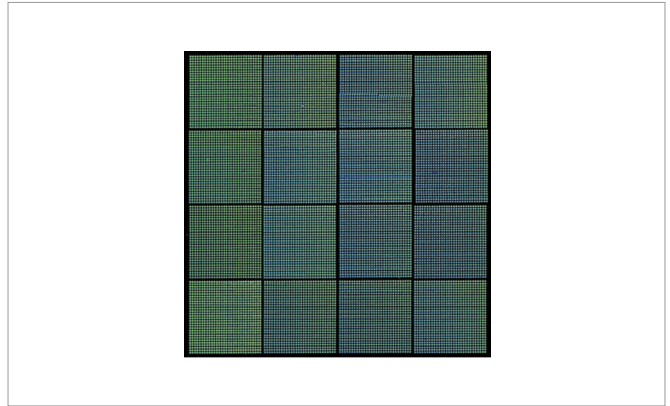


그림 2. 유전자 집적 (12,544 종)과 Cy3 표식에 의한 핀 균일성 검증

유전자의 농도, 점도, buffer, 기관의 종류, spotting 방법 등, 유전자 칩 제작과정에서 고려하여야 할 제반 조건은 매우 많다. 칩 제작에 요구되는 여러 조건 중에서도 온도와 습도는 칩 제작의 신뢰도에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 보인다. 온도와 습도는 모든 칩 제작에 일률적으로 적용받지 않으며, 핀이나 기계장치에 따라 약간의 변동이 필요하다. 그림 3에서 보는 것과 같이 22°C 온도와 50% 정도의 습도가 Ara 12K/GSNU 제작에 대한 최적 조건임을 알 수 있었고, 최적 조건보다 고온, 건조할 때에는 균일한 spotting이 이루어지지 않았으며, 저온 및 습한 조건에서는 spot이 확산되어 겹침 현상이 발생하였다.

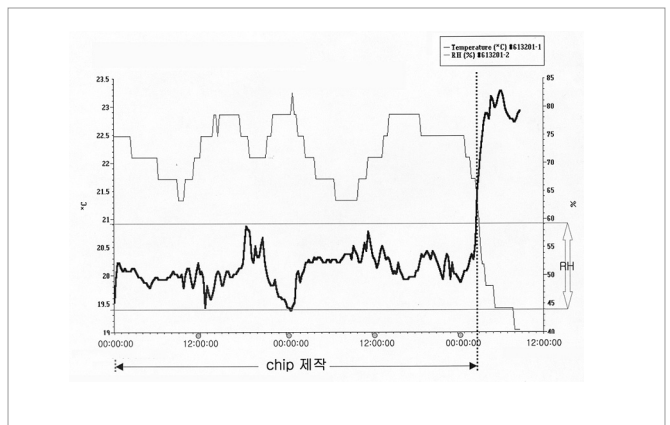


그림 3. 유전자 칩 제작에 요구되는 최적 온도 및 습도 범위

3) Ara 12K/GSNU의 정밀도 검증

Ara 12K/GSNU의 정밀도 검증을 위해 생물학적 반복성 (biological repeats)을 측정하였다. 같은 조건에서 배양된 Arabidopsis 현탁배양 세포로부터 분리한 각각의 다른 total RNA를 주형으로 Cy5와 Cy3로 표식한 cDNA를 합성하고, 합성한 cDNA를 Ara 12K/GSNU와 혼성화 한 후, four-step data mining procedure를 거쳐 생물학적 반복성에 따른 Ara

12K/GSNU의 정밀도와 재현성을 검증하였다. 먼저, 전사체의 발현을 비교해 본 결과, 이들의 99.9%가 log2 값의 범위 1 내에 분포함으로써 생물학적 반복성에 대한 높은 정밀성을 보여주고 있다 (그림 4).

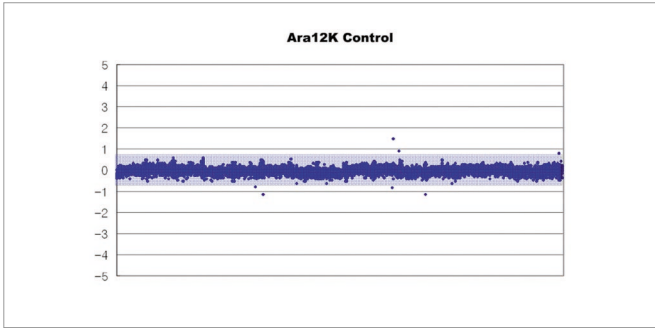


그림 4. 전사체의 발현율 (log2 Cy5/Cy3) 비교.

다음으로, 제작된 Ara 12K/GSNU 유전자 칩의 기술적 반복성 (technical repeats)에 대한 정밀도를 분석하기 위해, 하나의 현탁배양용기에서 분리한 total RNA를 반으로 나누어 Cy3, Cy5를 표식한 cDNA 합성의 주형으로 사용하고 Ara 12K/GSNU와 혼성화하였다. 그림 5에서 하나의 칩 내에 중복되어 집적되어진 유전자들이 한 번의 실험을 통해서 보여주는 변화의 수치를 비교한 그래프로 1:1의 정비례 직선에 가까울수록 반복실험 간의 수치 차가 적음을 보여준다. 그림 5가 보여주는 바와 같이 Ara 12K/GSNU가 기술적 반복 실험에 대해서도 높은 안정성과 재현성을 나타냄으로써, 본 연구팀의 유전자 칩 혼성화 기술과 신뢰도를 동시에 잘 보여주고 있다.

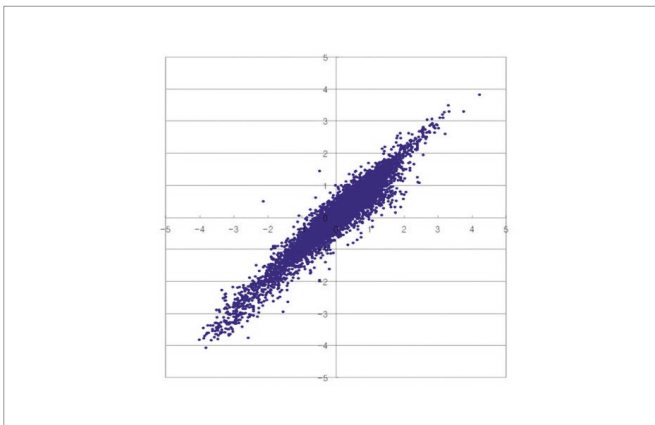


그림 5. 기술적 반복성 실험에 의한 평균 신호값의 분산도

그림 6A는 광 (Cy3)과 암 (Cy5) 상태에서 배양한 각각의 Arabidopsis 현탁 배양세포의 유전자 발현 양상을 비교한 후, 반대로 각기 다른 현탁배양 세포로부터 분리한 RNA를 Cy3(암)과 Cy5(광)로 표지한 후 나타나는 영상 (B)을 나타내었다. 그림 6은 기술적 반복성과 생물학적 반복성에 대한 신뢰도를 동시에 나타내는 것으로, 광 상태에서 암 상태에서 나타나는 발현의 차이가 안정적으로 나타남으로써 Ara 12K/GSNU의 실험적 재현성을 잘 보여주고 있다. 그러나 spot의 중앙부분에 probe가 부착되지 않은 도넛현상이 나타나는 것을 볼 수 있다. 도넛 현상을 제거하기 위하여, 핀

과 기관간의 접촉 시간, 접촉횟수, 접촉강도, probe의 농도, 완충액의 종류 및 농도 등을 조절하고 있다.

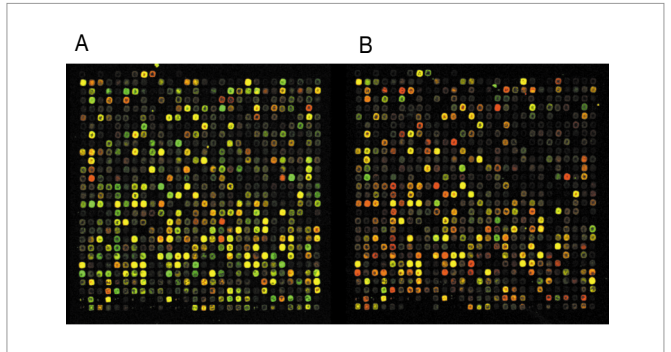


그림 6. Cy3, Cy5의 swapping hybridization에 의한 중복도

Ara 12K/GSNU에 집적된 probe 전체의 균일성과 안정성을 검증한 결과는 그림 7에 나타내었다. 총 12,228개의 probe에 고른 혼성화 반응이 일어났고, 특히 각각의 핀 유전자 그룹에 존재하는 대조구들의 안정적인 혼성화는 Ara 12K/GSNU의 높은 안정성을 잘 보여주고 있다.

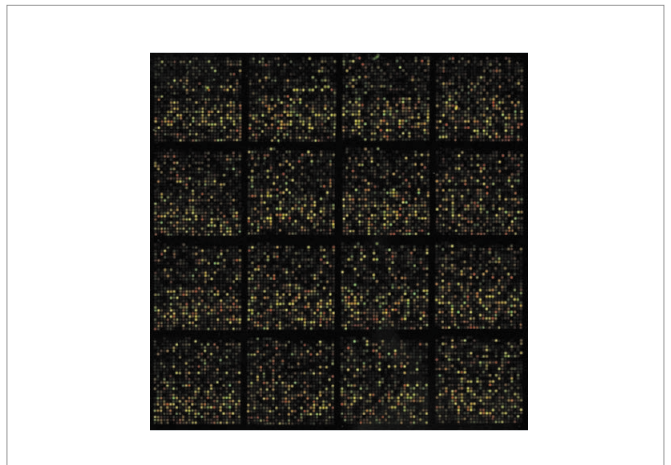


그림 7. Ara 12K/GSNU 전체 probe들의 발현양상

결론

모든 유전자 칩 실험은 반복이 요구된다. 그러나 고가의 Arabidopsis 칩을 무한정 구입할 수는 없는 일이다. 그렇다고 모든 연구실에서 칩 제작 장비와 분석기기를 구입하고 각각의 유전자 칩을 제작하여 사용하기에는 경제적, 시간적 제약이 크다. 또한 다량의 다양한 유전자 샘플을 확보하기 위해서는 관련업체와 연구소간의 공조체제에 의해 유전자를 수집하는 것이 효과적인데 이럴 경우, 제작된 유전자 칩은 실제 상용화에는 거리가 있다. Kazusa와의 공조체제에 의해 제작된 Ara 12K/GSNU의 경우도 역시, 상업적 목적으로는 판매될 수 없는 한계를 가지고 있다. 그러나 미국의 예일대, 스탠포드대, 영국의 노팅햄대와 같이 몇몇 거점 연구소에서 국내외의 연구자들에게 학술적 목적으로 손쉽게 유전자 칩을 제공함으로써, 연구의 효율성을 높이고 있다. 지속적인 기술축적을 통해 보다 향상된 칩을 개발하고, 연구의 효율성을 높이기 위한 학술적 목적의 지원이 요구된다.

인용문헌

Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J (2002) Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes & Develop* **16**: 490-502.

Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H-S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zhu G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Masuch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangle JL, Wang X, Zhu T (2002) Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *Plant Cell* **14**: 559-574.

Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S (2002) Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 661-677.

Guterman I, Shalit M, Menda N, Piestun D, dafny-Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, Weiss D (2002) Rose Scent: Genomics Approach to Discovering Novel Floral Fragrance-Related Genes. *Plant Cell* **14**: 2325-2338.

Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R, Dennis ES (2002) Expression Profile Analysis of the Low-Oxygen Response in Arabidopsis Root Cultures. *Plant Cell* **14**: 2481-2494.

Sawa S, Ohgishi M, Goda H, Higuchi K, Shimada Y, Yoshida S, Koshiba T (2002) The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 1011-1022.

Swidzinski JA, Sweetlove LJ, Leaver CJ (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **30**:431-446.

Zhu T, Budworth P, Chen W, Provart N, Chang H-S, Guimil S, Su W, Estes B, Zou G, Wang X (2003) Transcriptional control of nutrient partitioning during rice grain filling. *Plant Biotech J* **1**:59-70.



임채오(colim@nongae.gsnu.ac.kr)

조교수

경상대학교 대학원 응용생명과학부

1992 ~ 1995 경상대학교 생화학과 (이학박사)

1995 ~ 1998 The Scripps Research Institute,
Division of Plant Biology (Post-doc.)

1998 ~ 2000 경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작연구소 (조교수)

2000 ~ 현재 경상대학교 대학원 응용생명과학부 (부교수)

“TaKaRa DNA Chip 연구지원서비스”

Takara R&D center가 DNA Chip 실험을 성공적으로 이끌어 드립니다.

-----[DNA Chip 수탁 서비스 내용]-----

- DNA Chip 생산 및 판매
(IntelliGene™ series)
- DNA Chip 제작 및 실험 대행
- DNA Chip 해석 및 기술 지원 서비스
- DNA Chip 기술의 교육, 연수
- 기타 일반 실험 Technical service



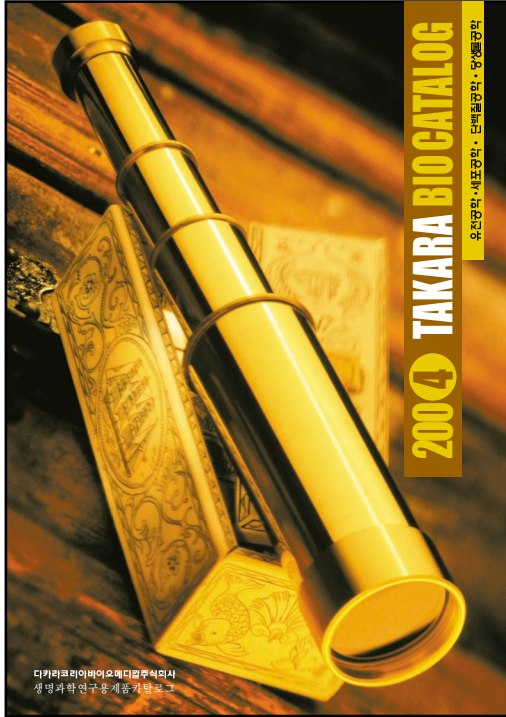
● DNA Chip 해석서비스 ●

고감도 Affymetrix® 428 Array Scanner를
이용한 scanning, image 처리로
완벽한 데이터 제공

문의처 : <연구개발센터> 031-456-6969 (직통: 031-459-6969)
E-mail : r&d@takara.co.kr



2004 TAKARA BIO CATALOG



고품격

생명과학의 리소스!
이것하나쯤
갖고 있자!

2004 Takara On-line Catalog



오프라인에는 없는
방대한 자료!
2004 다카라 온라인
카타로그에서
찾으세요~~

다양한 검색 환경, 방대한 자료 (Protocol, Application)
신속한 업데이트, 쇼핑몰과의 연동
온라인 통해 제품 구매시 마일리지 혜택