

DNA chip을 이용한 유전자 발현해석 서비스

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구개발센터 / 김 종욱

DNA chip을 이용한 유전자 발현해석은 유전자 기능분석의 방법의 하나로서 많은 연구자들에 의해 범용성 있는 방법으로 정착하고 있다. 그러나 DNA chip에서 신뢰성 있는 결과를 얻기 위해서는 숙련된 혼성 기술을 필요로 하며, 또한 발현해석 데이터 처리기술 등을 숙지할 필요가 있다. TaKaRa에서는 IntelliGene® 시리즈의 DNA chip과 특별주문 DNA chip을 이용하여 축적된 고도의 DNA chip 해석기술과 숙련된 기술로 목적으로 하는 연구에 최상의 유전자 발현해석 서비스를 제공하고 있다.

1. 해석 가능한 DNA chip 종류

- IntelliGene® 시리즈의 DNA chip

제품명	유전자수	slides
IntelliGene® Rat Toxicology CHIP Version 1.0	395	2
IntelliGene® II Arabidopsis CHIP 1	4,282	2
IntelliGene® II Arabidopsis CHIP 2	4,308	2
IntelliGene® Cyano CHIP Version 2.0	2,954	1
IntelliGene® E.coli CHIP Version 2.0	4,155	1
IntelliGene® Human Cancer CHIP Version 4.0	886	2
IntelliGene® II Mouse CHIP	4,227	2
IntelliGene® Human Hematopoietic Stem Cell CHIP Version 1.0	373	2
IntelliGene® II Human CHIP 1	3,893	2
IntelliGene® TestARRAY Version 4.0	93	2

* 각 DNA chip의 유전자 정보는 당사 홈페이지에서 확인하십시오.

- IntelliGene® Human Select DNA Fragment Set Version 2.0 (약 16,000 유전자/ 4 chip)
- 특별 주문제작 DNA chip

2. 특징

① 고품질의 DNA chip 사용

Clean room 내 제작, 철저한 품질관리를 통한 DNA chip을 사용하고 있으며, 최적의 spot 양상의 DNA chip으로서 높은 평가를 받고 있다.

② 2색 형광법에 의한 competitive hybridization 해석

cDNA의 표식은 형광색소의 차이에 의한 표식을 차이가 적은 것이 특장인 RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver. 2.0

(TaKaRa Code TX810)을 사용하기 때문에 color swap 실험을 필요로 하지 않는다.

③ 높은 재현성

동일 RNA를 이용한 3회 실험에서 발현 비율의 격차를 조사한 결과, CV값은 8.31이었다 [CV=(각 유전자의 발현비율 표준편차/ 각 유전자의 발현비율 평균값)×100]. 이 값은 상당히 재현성이 높다는 것을 나타낸다.

특징
· Clean room 제조 및 packing
· 원핵생물 DNA chip, full length ORF
· 진핵생물은, poly (A) ⁺ up - stream, Alu 배열을 제외한 3' - UTR을 포함하는 영역
· Sequencing 확인, 사이즈 및 농도 보정, 4가지 step의 정확한 Q/C
· 모든 spot에 대한 UniGene ID기재
· 풍부한 control 유전자

3. RNA 시료 준비

유전자 발현을 비교하고자 하는 두 종류의 검체에서 얻은 poly (A)⁺ RNA 1.5 µg, 또는 total RNA 20 µg씩 준비한다. 또한 위의 RNA 양을 확보할 수 없는 경우에는 RNA 증폭을 option으로 사용할 수 있으므로 당사 연구개발센터로 문의 바란다.

종 류	필요량	권장량(µg)/sample	농 도
동식물 조직	1~75 mg		
포유류배양세포	1×10 ² ~1×10 ⁷ 개의 세포		
그램음성세포	2×10 ⁹ 개의 세포, A ₆₀₀ = 약 2~3의 배양액 1.5 ml~3 ml		
그램양성세포	10 ⁸ ~10 ⁹ 개의 세포, A ₆₀₀ = 약 1~2의 배양액 1.5 ml~3 ml		
효모	1×10 ⁸ 개의 세포, A ₆₀₀ = 약 1~2의 배양액 1.5 ml~3 ml		
virus 입자	약 200 µg 의 RNA를 포함하는 양		
효소반응액	약 5~300 µg 의 RNA		
Total RNA	Gel 상에서 28s 및 16s rRNA의 선명한 band 확인	20~100 µg	3~5 µg/µl
Poly(A) ⁺ RNA	RNA 시료의 순도는 OD _{260/280} = 1.8 ~ 2.0이 필요	2 ~ 5 µg	0.2~0.5 µg/µl

4. 서비스 내용

- ① poly(A)⁺ RNA (또는 total RNA)의 정량
- ② 형광표식 probe의 조제 (두 종류의 형광 기질을 이용한 도입 표식)
- ③ DNA chip을 이용한 경쟁적 hybridization (competitive reaction)
- ④ 형광검출
- ⑤ 화상해석 (BioDiscovery사 제품 데이터 해석 소프트웨어 ImaGene™사용)

〈Option 항목〉

- ⑥ 조직이나 세포에서의 RNA 추출
- ⑦ total RNA에서의 poly (A)⁺ RNA의 정제
- ⑧ RNA 증폭
- ⑨ Clustering 해석 (BioDiscovery사 제품 해석 소프트웨어 GeneSight™사용)

5. 해석 결과

내용	매수
DNA chip 실험 report	1 매
RNA QC report	1 매
송부자료 해설	1 부
DNA CHIP 설명서	1 부
해석 data CD-ROM	1 개
Image sheet (Cy3 + Cy5)	3 매

- 해석화상 : CyTM3, CyTM5 검출화상 각 3종류 (3종류의 감도로 판독, TIFF 형식)
- 유전자 발현해석 파일 (Excel 형식)
- 형광강도 수치화 파일 (CyTM3, CyTM5 scanning data; 2 sheet)
- 발현비율 결과 파일 (비율은 세 종류의 normalization법에 의한 보정값으로 표시; spot의 유의성에 의해 4 sheet으로 분류)
- Scatter Plot 파일 (세 종류의 normalization법에 의한 보정 후의 plot; 3 sheet)

6. 납기

1~2주 (단, 해석 수나 option 항목에 따라 변경될 수 있다.)

본 해석의뢰서는 당사 홈페이지 (<http://md.takara.co.kr>)에서 다운로드할 수 있으며 자세한 사항은 당사 홈페이지를 참고하십시오.

아래에 당사 DNA chip의 해석 정밀도에 대해 검증한 실제 해석 예를 나타내었다.

해석 예

1) DNA chip을 이용한 성인 태아 뇌에서의 유전자 발현의 비교 해석

●방법

유전자 발현을 비교하는 검체로서 성인 (46세, 여성) 전체 뇌 유래의 total RNA (BD Biosciences사 제품)와 생후 6주된 태아 뇌 (3검체) 유래 total RNA (Geno Technology사 제품; TaKaRa 판매)를 이용하고, 또한 해석용 chip으로서 TaKaRa Human 3K CHIP (약 3,000 유전자 spotting)과 비교하기 위하여 X사의 Human게 CHIP (약 30,000 유전자에서 얻은 oligo DNA 단편/3 chip)을 사용하였다.

RNA 시료 표식은 RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver. 2.0을 사용하였고, 성인에게서 얻은 시료를 CyTM3으로, 태아에서 얻

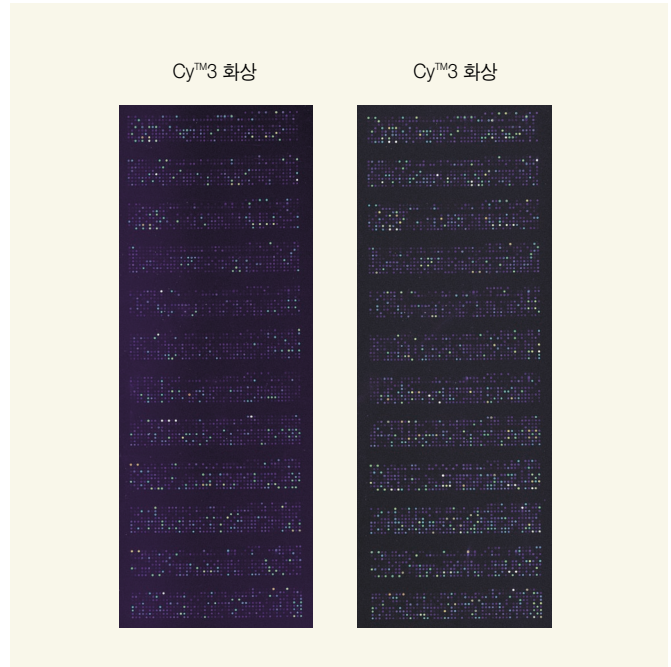


그림 1 TaKaRa Human 3K chip의 판독 화상

은 시료를 CyTM5로 표식하여 (각 15 μ g/ 반응 \times 4 반응분을 조제) probe로 하였다. 각각을 같은 양으로 혼합하고, 각 사에서 권장하는 hybridization buffer 25 μ l에 용해하여 probe 혼합액으로 하였다.

Probe 혼합액을 TaKaRa와 X사의 DNA chip에 추가하여 각사의 표준 protocol에 따라 hybridization, 세척, 건조를 실시한 후, DNA chip 해석 장치 Affymetrix[®] 428 Array Scanner로 화상을 판독하고, 발현해석 소프트웨어 ImaGene[™]으로 signal을 수치화하였다.

수치화한 데이터에서 각 spot의 강도를 구하고, 각각에 유의성 판정과 세 종류의 normalization (Global normalization, Housekeeping normalization, Internal-control normalization)을 실시하여 유전자 발현 비율을 구하였다. 또한 보정 후의 signal 강도를 이용하여 세 종류의 scatter plot을 나타내었다.

●결과

TaKaRa Human 3K CHIP의 판독 화상을 그림 1에 나타내었다. 또한 TaKaRa와 X사의 chip을 이용하였을 경우의 global normalization에 의한 보정 후의 scatter plot을 그림 2에 나타내었다.

그래프의 검은 실선은 CyTM3과 CyTM5의 signal 비가 1:1, 푸른 실선은 1:2 또는 2:1, 붉은 실선은 1:1.5 또는 1.5:1의 경우의 이론값을 나타낸다.

TaKaRa chip에서는 상당히 많은 유전자에서 발현차가 나타나며, CyTM3, CyTM5 모두 유효한 signal 강도를 지닌 유전자의 37% (약 1,100 유전자)로 두 배 이상의 발현차를 나타내었다 (그림 2-A).

반면 X사의 chip에서는 발현차를 나타내는 유전자는 적게 나타났으며, 두 배 이상의 발현차를 나타내는 유전자는 CyTM3, CyTM5 모두 유효한 signal 강도를 지닌 유전자 중 20% (약 602 유전자)에 지나지 않았다. 또한 두 chip에 공통적인 유전자의 발현차를 비교한 결과 양쪽에 거의 상관이 없었다.

2) Real Time RT-PCR에 의한 각 유전자의 발현차 확인

앞서 설명한 실험에서는 TaKaRa와 X사 chip에서의 해석 결과에 거의 상

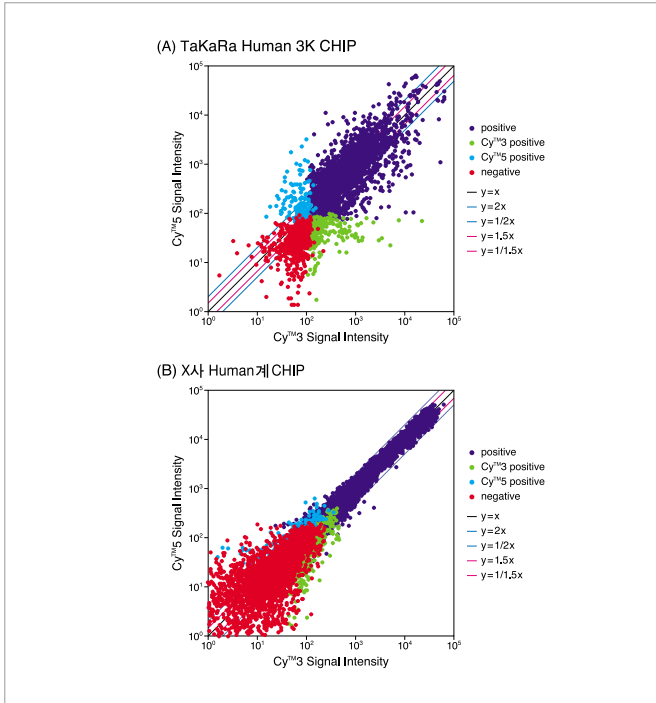


그림 2 Global normalization 후의 scatter plot
 X 축은 CyTM3 signal (성인 뇌), Y 축은 CyTM5 signal (태아 뇌)를 나타낸다.
 청색 spot: CyTM3와 CyTM5의 유효 signal 강도를 나타내는 spot
 녹색 spot: CyTM3의 유효 signal 강도를 나타내는 spot
 물색 spot: CyTM5의 유효 signal 강도를 나타내는 spot
 적색 spot: 두 signal과 무효인 spot
 *유효 signal 강도: [Signal_Mean] > [Background_Mean] + 2 × [Background_StDev]

관성이 나타나지 않았기 때문에 어느 결과가 올바른가를 확인하기 위하여 두 회사의 chip에서 공통으로 spot되어 있는 유전자에서 임의로 96 유전자를 선택한 후 여기에 대해 Smart Cycler[®] System에 의한 Real Time RT-PCR 해석을 실시하고, 성인 뇌와 태아 뇌에서의 각 유전자 발현차를 확인하였다.

● 방법

성인과 태아의 뇌에서 얻은 total RNA (앞서 설명한 해석 예와 동일한 시료)를 DNase 1에서 처리한 후, Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻) (TaKaRa Code 2640A/B)를 이용하여 역전사 반응하고 (RNA 1 μg / 20 μl의 반응에서 합계 6반응), Real Time PCR의 주형으로 사용하였다.

증폭 primer는 증폭산물이 대상 유전자의 3' 끝에서 1.5 kb 이내로, 크기가 150~200 bp가 되도록 설계하였다.

또한 두 종류의 뇌에서 얻은 RNA 시료량을 보정하기 위한 유전자로서 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 선택하였다. GAPDH standard 주형은 GAPDH의 RT-PCR 산물을 정제하여 조제하였다.

GAPDH에 의한 RNA 양의 보정은 GAPDH standard (1.6~1,000 pg)와 앞에서 설명한 시료의 역전사 반응액 (0.5 μl)을 각각 주형으로 하고, GAPDH 증폭 primer로 Real Time PCR을 수행하여 검량선을 작성하는 것으로 실시하였다 (그림 3). 또한 증폭 검출에는 SYBR[®] Green I을 사용하였다. 선택한 96 유전자의 발현해석은 앞에 설명한 역전사 반응 시료 (1.0 μl)를 주형으로 하고, 각각 특이적인 primer를 사용하며, SYBR[®] Green 1 존재 하에서 Real Time PCR을 실시하여 Ct값을 구하였다. 증폭산물의 용해곡선 분석에 의해 증폭산물의 특이성을 조사하고, 또한 아가로스 전기영동에 의해 증폭산물의 유무와 증폭 크기를 확인하였다.

● 결과

그림 3에 GAPDH의 증폭곡선 (A)와 검량선 (B)을 나타내었다. 이 검량선을 이용하여 두 개의 뇌에서 얻은 시료에서의 GAPDH 발현량을 구한 결과, 양쪽이 거의 비슷하고, 발현비는 거의 1이었다.

96 유전자에 대해 Real Time RT-PCR을 수행한 실험에서는 9개의 유전자가 증폭 불량이고, 5개의 유전자가 primer dimer와 같은 부산물 때문에 정량이 되지 않았다. 그래서 96 유전자 중 82 유전자를 평가 대상으로 하였다.

표 1에 TaKaRa와 X사의 DNA chip에서 얻은 각 유전자의 CyTM5/CyTM3 비율 (태아 뇌/성인 뇌), 각 시료의 Real Time RT-PCR의 Ct값 및 Ct값에서 유추되는 각 유전자의 발현 증감 (태아 뇌/ 성인 뇌)을 각각 나타내었다. 유전자의 발현 양이 많을수록 증폭이 빠르고 Ct값이 작아지므로 Ct값의 비교에 의해 발현 증감을 유추하였다. 표 1에서는 성인 뇌보다도 태아 뇌에서 발현량이 높은 것을 ↑로, 낮은 것을 ↓로, 그리고 차이가 없는 것을 ±로 표시하였다.

82 유전자 중, 77 유전자에서 TaKaRa의 chip과 Real Time RT-PCR에서 얻은 발현차의 데이터에서 + 상관이 확인되었다. 또한 1.5 ~ 2배 범위의 작은 발현차도 TaKaRa chip 시스템에서는 검출할 수 있는 가능성을 볼 수 있었다. 그러나 일부 유전자 (5 유전자)에서는 두 회사의 결과가 달라 이것에 대해서는 현재 그 원인을 분석 중이다.

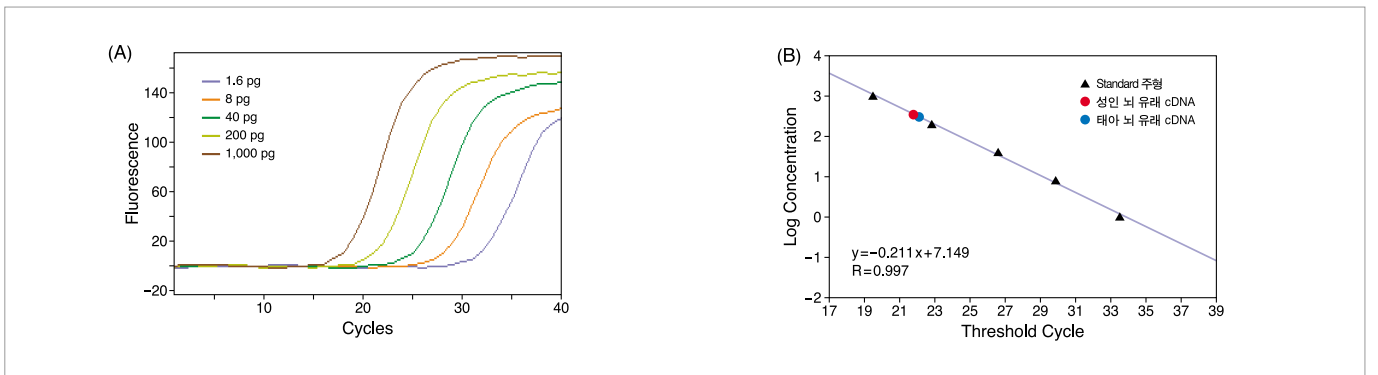


그림 3 Real Time PCR에 의한 GAPDH의 정량 분석
 (A) GAPDH의 증폭 곡선: GAPDH standard 주형을 정량 (1.6~1,000 pg) 첨가하여 Real Time PCR을 수행 하였다.
 (B) GAPDH 정량을 위한 검량선

표 1 유전자발현해석 데이터 일람표

Gene ID	TaKaRa CHIP fetal/adult	X 사 CHIP fetal/adult	RT-PCR*1 Adult Ct	RT-PCR*1 fetal Ct	RT-PCR fetal/adult Expression
1	3.70	0.94	27.56	25.28	↑
2	0.20	ND*2	22.72	Non-amplify*3	
3	0.31	1.45	26.19	28.26	↓
4	0.07	ND	25.63	28.63	↓
5	0.02	ND	17.78	24.62	↓
6	0.26	ND	24.40	26.91	↓
7	0.30	ND	23.39	25.79	↓
8	0.01	ND	21.48	28.82	↓
9	0.38	0.45	23.58	25.93	↓
10	0.21	ND	21.90	22.91	↓
11	2.17	1.11	19.1	17.99	↑
12	0.08	ND	21.60	25.24	↓
13	0.28	ND	19.60	23.19	↓
14	3.33	1.18	27.91	26.49	↑
15	2.63	1.23	22.14	21.33	↑
16	0.51	0.90	24.34	26.93	↓
17	0.20	1.18	24.25	25.97	↓
18	0.27	ND	23.57	25.84	↓
19	0.15	ND	22.77	23.13	↓~±
20	0.50	ND	27.08	26.48	±~↑
21	0.57	ND	21.93	22.98	↓
22	0.35	0.63	26.26	28.55	↓
23	1.23	0.89	20.1	19.54	±~↑
24	0.14	ND	22.60	26.17	↓
25	0.23	ND	No band*4	No band	
26	2.08	0.97	24.98	24.18	↑
27	0.24	ND	27.27	29.11	↓
28	0.36	0.93	Non-amplify	Non-amplify	
29	1.85	0.28	26.76	26.41	±~↑
30	0.19	ND	27.82	29.78	↓
31	0.23	ND	22.59	25.67	↓
32	2.33	0.87	26.5	25.54	↑
33	0.32	ND	22.56	24.92	↓
34	0.02	ND	19.42	31.88	↓
35	0.19	ND	29.94	No band	
36	0.25	ND	29.25	30.83	↓
37	0.43	ND	22.23	24.84	↓
38	0.63	0.97	24.62	25.50	↓
39	5.00	1.08	22.47	19.81	↑
40	0.32	0.64	22.82	25.76	↓
41	0.85	0.82	29.18	29.18	±
42	0.27	ND	22.74	25.25	↓
43	0.21	ND	21.11	24.17	↓
44	0.10	ND	27.71	33.00	↓
45	0.12	ND	22.15	25.66	↓
46	0.05	0.93	19.94	24.38	↓
47	0.06	0.78	20.99	26.10	↓
48	0.06	1.39	23.68	28.13	↓
49	2.44	1.25	31.22	28.12	↑
50	3.70	1.41	29.15	27.7	↑
51	0.23	1.01	23.91	27.09	↓

Gene ID	TaKaRa CHIP fetal/adult	X 사 CHIP fetal/adult	RT-PCR*1 Adult Ct	RT-PCR*1 fetal Ct	RT-PCR fetal/adult Expression
52	0.18	0.89	26.32	29.92	↓
53	9.09	1.33	Extra band*5	Extra band	
54	0.39	ND	27.80	30.17	↓
55	0.05	ND	20.28	27.21	↓
56	0.28	ND	22.45	25.07	↓
57	0.04	1.02	21.60	28.28	↓
58	0.18	ND	21.62	24.26	↓
59	2.27	ND	Extra band	27.4	
60	0.15	ND	25.71	28.24	↓
61	0.27	ND	20.52	23.69	↓
62	2.70	1.14	Non-amplify	28.23	
63	0.36	ND	25.20	27.16	↓
64	0.43	0.79	17.95	19.88	↓
65	0.33	ND	26.47	Extra band	
66	0.25	ND	26.89	28.73	↓
67	0.41	ND	Extra band	Extra band	
68	0.06	0.64	22.11	26.43	↓
69	0.44	ND	No band	30.44	
70	0.25	1.08	28.73	No band	
71	0.52	0.84	23.32	24.98	↓
72	0.37	0.98	21.31	23.53	↓
73	0.13	ND	24.47	27.56	↓
74	0.50	ND	25.91	32.91	↓
75	0.68	ND	28.77	27.25	↑
76	0.91	ND	23.11	27.14	↓
77	0.26	ND	25.10	26.70	↓
78	2.56	ND	27.36	30.34	↓
79	0.25	ND	24.06	25.71	↓
80	0.12	ND	27.88	29.31	↓
81	0.34	0.88	25.73	23.92	↑
82	7.14	0.74	No band	No band	
83	0.07	ND	29.96	Extra band	
84	0.17	1.33	21.75	24.92	↓
85	0.11	ND	25.21	29.13	↓
86	0.21	ND	25.31	26.81	↓
87	1.39	ND	23.61	23.61	±
88	0.33	ND	20.43	22.09	↓
89	0.10	ND	21.95	25.55	↓
90	10.00	ND	29.45	23.93	↑
91	0.07	ND	26.29	30.15	↓
92	0.55	0.99	No band	No band	
93	0.17	ND	25.54	28.10	↓
94	0.17	ND	24.22	27.63	↓
95	0.22	ND	22.91	26.42	↓
96	2.22	0.33	29.58	27.52	↑

*1 GAPDH에 의한 RNA 양 보정 후의 데이터

*2 ND: Not Detected (DNA chip 해석에서 유효한 signal 강도를 나타내지 않았다)

*3 Non-amplify: 증폭 불량

*4 No band: 전기영동으로 증폭 band 검출 불가

*5 Extra band: primer-dimer 등의 extra band가 존재

맺음말

당사에서는 신뢰성이 높은 고감도의 DNA chip을 이용한 유전자 발현해석 서비스를 제공하고 있다.

또한 DNA microbeads array를 이용한 기능적 유전자 발현해석 (Megaclone®, Megasort®, MPSS®) 수탁 서비스도 실시하고 있다(Life Science & Biotechnology 19, 20호 참조).

그리고 염기서열 해석이나 DNA chip 제작의 수탁 서비스도 실시하고 있으며, 이와 같은 서비스를 함께 제공함으로써 각 연구자의 요구사항에 대응한 유전자 기능해석 연구를 지원한다.

수탁서비스 메뉴는 당사 홈페이지(<http://www.rnd.takara.co.kr/>)의 특별 주문 서비스를 참고하기 바란다.

Microarray Training Program (MTP)

▶MTP 과정의 목표

소수 인원 1인 1chip의 실습을 통한 DNA chip 실험의 조기 실현

▶MTP 과정의 특징

1. TaKaRa IntelliGene® Human Cytokine CHIP Ver 1.0 (30만원 상당)과 RNA sample 및 Chip 관련시약 모두 제공
2. 원하시는 TaKaRa IntelliGene® CHIP 선택가능 (연수비 50% & Chip 20% off)
3. 본인이 준비한 RNA sample로 직접 실험 및 해석가능
4. Takara만의 Technical Tip과 연수 전 과정의 동영상 CD 제공
5. Microarray system 견학 및 troubleshooting
6. 실습위주의 연수과정

(부가세 별도)

제품명	유전자수	slides	DNA chip 기존 가격	DNA chip MTP 참석가	연수비
IntelliGene® Rat Toxicology CHIP Version 1.0	395	2	887,000	709,600	연수비 50% 19만원 (부가세별도)
IntelliGene® II Arabidopsis CHIP 1	4,282	2	1,030,000	824,000	
IntelliGene® II Arabidopsis CHIP 2	4,308	2	1,030,000	824,000	
IntelliGene® Cyano CHIP Version 2.0	2,954	1	1,459,000	1,167,200	
IntelliGene® E.coli CHIP Version 2.0	4,155	1	1,544,000	1,235,200	
IntelliGene® Human Cancer CHIP Version 4.0	886	2	944,000	755,200	
IntelliGene® II Mouse CHIP	4,227	2	1,459,000	1,167,200	
IntelliGene® Human Hematopoietic Stem Cell CHIP Version 1.0	373	2	858,000	686,400	
IntelliGene® II Human CHIP 1	3,893	2	1,459,000	1,167,200	
IntelliGene® TestARRAY Version 4.0	93	2	343,000	308,700(10%)	

* 연간 주기적 Microarray Training Program (MTP) 운영 시스템

* 세부 교육 일정 및 관련 정보는 아래를 click 하세요.

www.rnd.takara.co.kr.

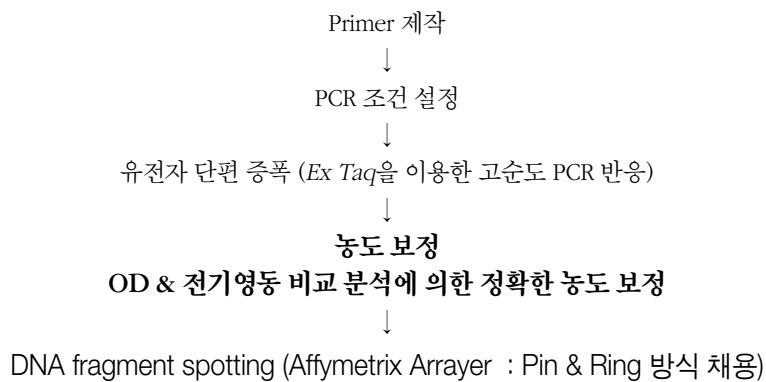
DNA chip 제작!

이제는 완벽한 재료로 시작하자...

이제! DNA chip, 가격 승부는 이제 끝.

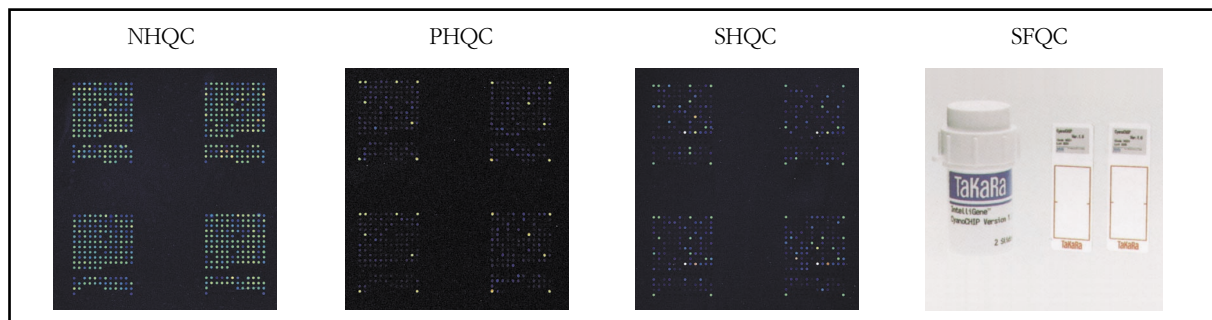
사이즈별 정확한 농도 보정, 철저한 품질관리를 통한 완벽한 제작.

Pin & Ring 방식에 의한 spot 의 재현성



- 고속 spotting 으로 빠른 납기 가능
- Ring으로 시료를 채취, 한번에 42장의 slide glass에 연속적 spotting
 - 높은 재현성
- Ring 포획으로 증발에 의한 miss-spot 없으며, 일정량의 시료 spotting
 - 고밀도 Array 제작
- 정확한 위치에 spotting하므로 고밀도 Array 제작
 - Membrane filter spotting
- pin 부분 스프링 장착에 의한 충격흡수로 cover glass, membrane filter spotting

↓
QC (Quality Check)



↓
DNA chip products 완성

↓
DNA chip 해석 서비스