

Megaclone® · Megasort®를 이용한 Rat 당뇨병 유전자의 발현해석과 PubMed 문헌검색

DNA microbeads를 이용한 발현해석 (Megaclone® · Megasort®)은 발현차가 있는 유전자를 모두 얻기 위한 뛰어난 screening 방법이다. Megaclone® 기술에 의해 거의 모든 cDNA를 각 microbeads에 고정화할 수 있으며, Megasort® 기술에 의해 여러 시료 간의 발현비교와 발현차가 있는 EST done을 얻을 수 있다.

Megaclone® 기술로 거의 모든 유전자를 microbeads에 고정화할 수 있으므로 Megasort® 기술로 얻을 수 있는 유전자는 발현차가 있는 유전자로 다량 분포되어 있으며, 신규 유전자를 얻을 수 있는 가능성을 내포하여 새로운 발견을 기대할 수 있다.

또한 Megasort®에서 얻은 유전자를 이용하여 제작한 DNA chip (Functional DNA Chip)은 발현차를 나타내는 유전자가 모두 포함되어 있으므로 발현 변동이 없는 불필요한 유전자가 적고 효율적으로 데이터를 해석할 수 있다.

당사에서는 Megaclone® · Megasort®를 이용한 유전자 발현해석 수탁서비스나 Functional DNA Chip의 제작수탁서비스 등 생명과학 연구자들의 발현해석 연구에 도움이 되는 지원을 하고 있다 (Life Science & Biotechnology 19~24호 참조).

본 고에서는 정상 Rat와 II형 당뇨병에 걸린 Rat로 Megaclone® · Megasort®를 실시하고, 여기서 얻은 유전자에 관해 문헌검색 Web-Ste인 PubMed로부터 얻은 기능정보 결과에 대해 소개하겠다.

실시 예

정상 Rat와 II형 당뇨병에 걸린 Rat의 췌장과 간장에서의 유전자 발현의 차이를 Megaclone® · Megasort® 기술을 이용하여 조사하여 발현차가 나타난 유전자에 대해 sequencing하고, BLAST homology search를 실시한 후 PubMed 문헌검색에 의해 유전자의 기능 정보를 얻은 예를 나타내었다.

(1) Rat 장기에서의 poly (A)⁺ RNA의 조제

- 정상 Rat Jcl: Wistar, 생후 10주, 수컷 5마리
- II형 당뇨병에 걸린 Rat GK/Jcl, 생후 10주, 수컷 5마리

이런 Rat의 생화학적 검사의 데이터를 표 1에 나타내었다. 각 Rat를 24시간 단식시킨 후 diethyl ether로 마취하고, 혈액을 뽑은 후 각 췌장과 간을 채취하였다. 각 장기에서 total RNA를 분리한 후 OligotexTM-dT30(super) mRNA Purification Kit을 이용하여 정제하여 poly (A)⁺ RNA를 얻었다.

표 1 정상 Rat 및 II형 당뇨병에 걸린 Rat의 생화학적 검사 데이터

정상 Rat ID	체중 (g)	혈당값 (mg/dl)	HbA _{1c} (%)	인슐린 (ng/ml)
1	288	95	2.9	한계값 이하
2	283	87	2.7	한계값 이하
3	255	65	2.8	한계값 이하
4	275	70	2.5	0.142
5	276	95	2.8	0.172

II형 당뇨병에 걸린 Rat ID	체중 (g)	혈당값 (mg/dl)	HbA _{1c} (%)	인슐린 (ng/ml)
1	221	172	4.1	한계값 이하
2	210	194	4.3	한계값 이하
3	221	187	3.7	한계값 이하
4	210	180	4.2	한계값 이하
5	210	173	4.0	한계값 이하

각 Rat의 체중, 혈당값, 헤모글로빈A_{1c} 값, 인슐린 값을 나타낸다.

(2) Megaclone®와 Megasort®

우선, 정상 Rat와 II형 당뇨병에 걸린 Rat 각 5마리의 췌장과 간에서 분리해 낸 poly (A)⁺ RNA를 장기별로 같은 양을 혼합하고, cDNA library를 제작한 후 Megaclone®을 실행한다. 그리고 장기마다 정상 Rat의 DNA microbeads와 II형 당뇨병에 걸린 Rat의 microbeads를 각각 제작하였다. 그리고 동일한 장기별 poly (A)⁺ RNA를 동량 혼합하여 형광표식 probe를 제작하였다. 각 장기 모두 정상 Rat의 poly (A)⁺ RNA를 fluorescein으로 표식하고 II형 당뇨병에 걸린 Rat의 poly (A)⁺ RNA를 Cy⁵로 표식하여 Megasort®에 이용하였다. 장기마다 40,000개씩 혼합한 DNA microbeads 상에서 각 표식 probe를 competitive hybrid시키고, 초고속 cell sorter MoFlo™를 이용하여 해석한 후 발현차가 나타난 gate 두 곳을 설정하여 gate 내의 beads를 회수하였다. 그림 1, 2에서는 MoFlo™를 이용한 해석도를 나타내었다.

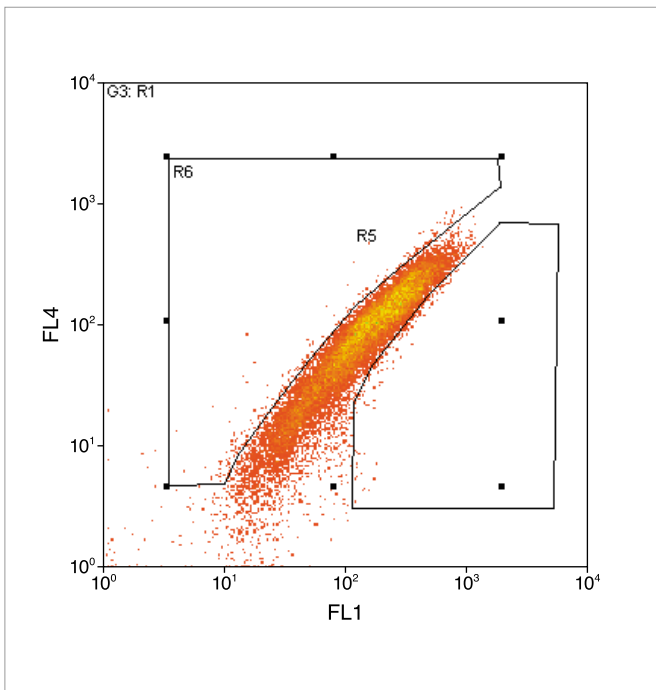


그림 1 Rat 췌장 조직 유래 시료를 이용한 Megasort®
 [사용 beads] 정상 Rat 췌장 및 II형 당뇨병에 걸린 Rat 췌장 유래 DNA microbeads (각 40,000개의 동량 혼합, 합계 80,000개). 단, 그림은 20,000개 해석 후 cell sorter 그림을 나타내었다.
 [시료] X 축: 정상 Rat 췌장 유래 poly (A)⁺ RNA
 Y 축: II형 당뇨병에 걸린 Rat 췌장 유래 poly (A)⁺ RNA.

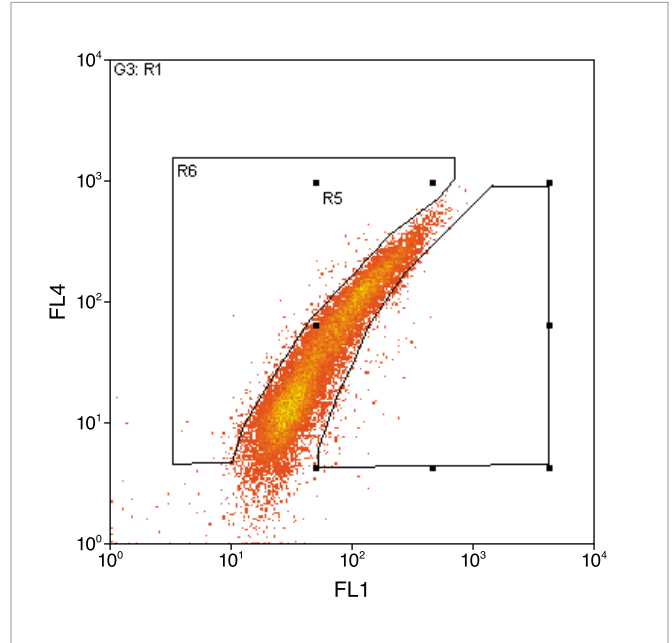


그림 2 Rat 간조직 유래 시료를 이용한 Megasort®
 [사용 beads] 정상 Rat 간 및 II형 당뇨병에 걸린 Rat 간유래 DNA microbeads (각 40,000개의 동량 혼합, 합계 80,000개). 단, 그림은 20,000개 해석 후 cell sorter 그림을 나타내었다.
 [시료] X 축: 정상 Rat 간유래 poly (A)⁺ RNA
 Y 축: II형 당뇨병에 걸린 Rat 간유래 poly (A)⁺ RNA.

(3) 서열해석

그림 1, 2에서 나타낸 gate에서 회수한 beads 중에서 각 gate당 192 clone을 sequencing 하였다. 얻은 서열 데이터의 filtering과 vector의 trimming을 실시한 후 clustering, assembling을 실시하였다. 다음으로 cluster consensus 서열만을 query 서열로서 선별한 후 염기서열 데이터베이스 BLAST에서 homology search를 실시하였다. 염기서열 데이터베이스는 NCBI의 RefSeq와 UniGene 데이터베이스를 사용하였다.

(4) PubMed 문헌검색

BLAST homology search에서 얻은 유전자 정보에서 RefSeq Accession No.와 UniGene Accession No.를 얻은 후, 각 Accession No.에서 LocusID를 얻고, NCBI LocusLink 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>)에 등록되어 있는 명칭 (Official Gene Symbol, Name, Product, Alternate Symbol, Alias, Alias product)을 Key word로서 PubMed 문헌검색을 실시하여 검색된 문헌 수를 정리하였다.

(5) 결과

표 2에서 얻은 유전자와 PubMed 검색 결과를 나타낸다. Clustering의 결과, 74종류의 유전자를 Contig (sequence를 여러 개 얻은 유전자)로 얻을 수 있었으며, BLAST homology search에 의해 LocusID를 얻을 수 있는 35종류의 유전자에 대해서 PubMed 검색을 실시한 결과, 19종류의 유전자에 대해서는 이미 당뇨병과 관련한 연구가 이루어지고 있었으며, 16종류의 유전자에 대해서는 당뇨병과 관련한 연구가 이루어지지 않고 있었다. 이와 같이 Megaclone® · Megasort® 기술을 이용함으로써 신규 유전자의 발견을 기대할 수 있다.

표2 Megasort® 해석결과와 PubMed 문헌정보 결과

채장

gene_id	gene_name	정상 Rat	II형 당뇨병에 걸린 Rat	PubMed 문헌 검색 hit수	comments
Contig27	Rattus norvegicus *****B		○	62	사람의 급성 채장염으로 분비 상승, 만성으로 분비 저하
Contig31	Rattus norvegicus *****2		○	23	사람의 당뇨병으로 분비가 항진.
Contig30	Rattus norvegicus ***** polypeptide		○	4	당뇨병성 neuropathy로 발현이 감소
Contig29	Rattus norvegicus pancreatic *****	○		997	비만을 수반하는 증상으로 발현이 상승.
Contig19	Rattus norvegicus *****1	○		266	사람의 당뇨병으로 혈중 농도 저하.
Contig25	Rattus norvegicus *****1	○		123	사람의 당뇨병으로 mRNA, 단백질 발현이 저하. 채도 이식에 의해 회복.
Contig15	Rattus norvegicus *****	○		40	사람의 당뇨병 marker 영역과 연결됨.
Contig12	Rattus norvegicus *****protein	○		7	*****의 형성과 분비 조절에 필수.
Contig20	"Rattus norvegicus ***** , group **"	○		4	인슐린 저항성이 높은 mouse로 저발현
Contig18	Rattus norvegicus *****		○	88	연관성 불명
Contig14	Rattus norvegicus *****		○	58	연관성 불명
Contig24	Rattus norvegicus pancreatic *****protein 1		○	9	연관성 불명
Contig21	Rattus norvegicus *****B1	○		4,216	연관성 불명
Contig1	Rattus norvegicus *****	○		672	연관성 불명
Contig23	Rattus norvegicus *****1	○		33	연관성 불명
Contig4	Rattus norvegicus pancreatic *****2	○		13	연관성 불명
Contig8	Rattus norvegicus *****protein	○		0	연관성 불명

간

gene_id	gene_name	정상 Rat	II형 당뇨병에 걸린 Rat	PubMed 문헌 검색 hit수	comment
Contig23	Rattus norvegicus *****		○	9,022	간 장애, 간경변, 급성 간염으로 혈액 검사 수치 이상.
Contig40	Rattus norvegicus ***** type I		○	1,492	사람의 당뇨병으로 혈중농도 저하.
Contig33	Rattus norvegicus ***** inhibitor		○	1,301	변이가 당뇨병 환자에게 많다.
Contig35	Rattus norvegicus *****	○		≥ 10,000	당뇨병성 신부전에서는 노중 증가.
Contig19	Rattus norvegicus *****1	○		1,458	ob/ob mouse에서는 발현 저하.
Contig30	Rattus norvegicus ***** alpha 1	○		1,390	당뇨병의 지표로 한 예가 있음.
Contig38	Rattus norvegicus ***** beta	○		280	사람의 genome mapping으로 glucose 혈중농도와 연결되는 영역에 있었다.
Contig39	Rattus norvegicus *****	○		239	사람 SNP와 관련성 보고 있음.
Contig36	Rattus norvegicus inhibitor of *****	○		168	ob/ob 마우스로 발현 상승.
Contig4	Rattus norvegicus *****1	○		107	6개월 GK Rat로 활성 저하.
Contig41	Rattus norvegicus *****1		○	1,078	연관성 불명
Contig25	Rattus norvegicus *****II		○	268	연관성 불명
Contig42	Rattus norvegicus *****1		○	6	연관성 불명
Contig34	Rattus norvegicus ***** inhibitor type II		○	0	연관성 불명
Contig21	Rattus norvegicus *****	○		676	연관성 불명
Contig17	Rattus norvegicus *****	○		23	연관성 불명
Contig27	Rattus norvegicus *****10	○		0	연관성 불명
Contig28	Rattus norvegicus *****2	○		0	연관성 불명

Megaclone® · Megasort®로 얻었던 발현차이가 있는 유전자와 그 유전자를 Key word로 검색한 PubMed 문헌의 hit수를 나타내었다. ○표는 정상 Rat와 III형 당뇨병에 걸린 Rat와의 비교에서 발현이 높았던 쪽을 나타내었다. 게다가 검색된 문헌으로부터 각 유전자의 기능을 조사한 결과를 comments로 나타내었다.

맺음말

병의 상태와 유전자 발현 관련성에 관한 연구를 진행할 경우, 다양한 각도에서 정보를 얻어 보충해 가는 것이 중요하다. 그러나 PubMed 문헌검색에 검색된 문헌의 정보는 관련된 연구동향을 크게 보기위한 유용한 방법의 하나이다. 이번에 수행한 Megaclone® · Megasort®에서는 사용한 beads 수도 적고, 각 beads에서 발현차가 있는 clone을 384 clone씩 밖에 sequencing을 하지 않았다. 그러나 beads 수, sequence 수를 더욱 늘림으로써 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

당사에서는 여기에서 소개한 정상 Rat와 II형 당뇨병에 걸린 Rat의 채장, 간에서 얻은 DNA microbeads를 이용한 유전자 발현해석 수탁서비스를 실시하고 있다 (Quick Sort). Quick Sort는 Ready-made DNA microbeads를 사용하여 유전자 발현해석을 실시하는 수탁(Life Science & Biotechnology 24호 참조)이다. 이 서비스는 신속하게 결과를 얻을 수 있으며, 또한 비용도 저렴하고 손쉽게 Megasort®를 수행할 수 있다. 그리고 II형 당뇨병에 걸린 Rat의 다른 장기 (뇌, 신장)와 정상 Rat의 다른 장기 (뇌, 신장, 심장, 비장, 소장, 폐, 정소, 골격근)로 제작한 DNA microbeads, 사람 (뇌, 배양세포 HL60)과 Rat (간, 신장)에서 제작한 DNA microbeads도 line up하고 있으며, 이것을 이용한 Quick Sort 해석 수탁 서비스도 실시하고 있다. 자세한 사항은 아래로 문의하기 바란다.

참고문헌

1) Brenner S. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 1665-1670.

(Megaclone® · Megasort®를 이용한 유전자 발현해석 수탁서비스)
다카라코리아바이오메디칼
연구지원서비스 상담: 02-575-7409, Fax: 02-577-3691

TaKaRa 합성 DNA

1. **고품질** - 귀하의 소중한 실험을 위해 TaKaRa 합성 DNA는 정품의 시약 및 컬럼만을 사용합니다.
2. **신속** - 전국 어디서나 빠르고 정확한 택배서비스로 납품하여 드립니다.
3. **다양한 서비스** - 50 nmol, 200 nmol, 대량합성, 수식합성 등 고객이 원하는 대로 합성합니다.
4. **편리한 주문** - 지역별 전문대리점, e-mail 또는 인터넷을 이용하여 온라인으로 주문할 수 있습니다.
5. **믿을 수 있는 기술지원 서비스** - 언제 어디서나 무엇이든 전문가가 상의하여 드립니다.

Grade	Size	가격
HQ-PCR grade 50 nmol (2 OD 보증)	1~250 mer	1,000원/base
	251~2,000 mer	800원/base
	2,001 mer 이상	600원/base
HQ-PCR grade 200 nmol (8 OD 보증)	1~250 mer	1,400원/base
	251~2,000 mer	1,300원/base
	2001 mer 이상	1,200원/base
HQ-SEQ. grade 200 nmol (1 OD 보증)	정제로 30,000원 추가	

* 주문 scale (50 nmol, 200 nmol)은 합성 scale 이므로 primer의 최종농도는 길이와 염기서열에 의해 달라질 수 있습니다.
 * 개당 primer의 길이가 36 mer 이상인 경우는 200 nmol, 41 mer 이상은 Seq. Grade 합성만 가능합니다.
 * 대량합성, 특수합성, 임상용 GMP grade 합성의 경우는 별도로 문의하여 주시기 바랍니다.
 * 품질보증기간은 6개월입니다.