

IntelliGene® HS Human Expression CHIP을 이용한 전사인자 도입 배양세포의 유전자 발현해석

유전자 발현의 종합적 해석 기술은 이미 몇 차례 소개한 바 있지만, 특히 human에서는 유전자 데이터베이스가 충실해짐에 따라 oligo DNA 또는 cDNA microarray를 이용하는 방법이 주류를 이루고 있다. 이에 따라 기존의 microarray도 다수 시판되고 있지만, 비용면이나 해석 가능한 유전자 총수, 재현성 등의 제품간 특성을 둘러싼 문제로 여러 연구자들이 적잖이 고민한 경험이 있을 것이다. 우리들은 전사인자 기능을 조사할 목적으로 다양한 배양세포에 활성화 전사인자를 도입해 유전자군을 모색하고 있으며, 본 고에서는 IntelliGene® HS Human Expression CHIP (TaKaRa Code X121 A/B)를 이용해 발현을 해석한 예를 소개한다.

재료 및 방법

[재료]

활성화 *fl-1* 유전자 도입 및 비도입 사람 유방암 세포주 (MCF-7), ATF6 유전자 도입 및 비도입 간암 세포주 (HLF), 간암 조직, 정상 간조직을 시료로 이용하였다.

[세포로부터 RNA 추출]

세포주 및 조직으로부터 ISOGEN을 이용하여 일반적인 방법으로 RNA를 추출하였다. RNA 추출 마지막에 ethanol 침전을 반복하여 남아있는 phenol류를 확실하게 제거하였다. 이 밖에 추출한 total RNA의 integrity를 agarose gel 전기영동과 ethidium bromide 염색에 의해 확인하였다.

[형광표식 antisense RNA target 제작]

Total RNA (각 4 µg)로부터 RNA Transcript SureLABEL™ Core Kit (TaKaRa Code TX815)를 이용하여 Cy3, Cy5 표식 target RNA를 제작하였다. 260, 550, 650 nm의 흡광도에서 측정하여 정해진 방법으로 labeling 효율을 계산하여, 용량당 형광 강도를 맞춰 hybridization에 이용하였다.

[Hybridization]

Prehybridization과 hybridization은 TaKaRa Spaced Cover Glass XL과 TaKaRa Hybridization Chamber를 이용하여 정해진 방법에 따라 항온수조 (70°C 12~16시간) 내에서 실시하였다. 세정은 microarray chip을 slide rack에 세우고 65°C의 washing buffer 안에서 세정하였다. Cy3과 Cy5의 형광 signal을 비교하면 낮은 발현영역의 Cy5 형광 강도가 외견상 강하게 비추기 쉬우므로, 2색의 형광차에서 교차된 signal을 제외하고 hybridization의 재현성을 확인할 목적으로 Cy5, Cy3 labeling을 시료간에 바꾸는 2회의 실험을 실시하였다.

[Scanning]

DNA chip의 washing buffer를 air dry시킨 후, scanner (PerkinElmer, ScanArray Express)에 세팅하여 형광 signal을 관독한 후, 각 spot의 형광 중앙 수치를 기준으로 데이터를 해석하였다. 표식된 target의 비활성은 각 microarray chip에서의 signal 중간 형광수치를 기준으로 보정하였다.

IntelliGene® HS Human Expression CHIP을 이용한 전사인자 도입세포의 유전자 발현 비교

fl-1 도입, 비도입 MCF-7 세포 유래의 RNA 시료를 Cy3, Cy5로 labeling한 후, IntelliGene® HS Human Expression CHIP에 hybridization 시켜, scanner로 각 형광 signal을 scanning 하였다. 그림 1은 각 형광을 중첩시킨 화상이다. 먼저 spot 강도에 비해 background가 아주 낮은 것으로 확인되었다.

ScanArray Express를 이용한 데이터 관독에서는 가장 높은 형광 signal을 가진 spot이 한계점이 되지 않는 범위에서 여기 레이저 출력을 설정하여 200,000 count 이상의 형광 signal을 보이는, 대략적으로 인식 가능한 지점만을 비교 대상으로 이용하였다.

Cy3, Cy5 label을 시료 간에 교환하여 2회의 실험을 수행하여 얻은 Cy5 염색 (각각 *fl-1* 도입세포 및 비도입세포 유래의 RNA)의 형광 spot만을 histogram으로 그리면 Cy5 channel로부터 살아있는 spot 16,629개 중 200,000 count를 넘는 것은 모두 2,900정도 (17.3%) 존재하였다. 그 signal 강도는 *fl-1* 도입, 비도입 세포 간에 거의 비슷하게 분포하며, hybridization까지의 과정에서 세포 시료 간에 큰 편차는 보이지 않았다 (그림 2).

각 실험에서의 지점별 *fl-1*/MCF-7 발현비 (Cy3/Cy5 또는 Cy5/Cy3)를 가로축, 세로축으로 하고 scatter plot을 그리면 (그림 3A, B), 변동폭이 2분의 1에서 2배 이내로 줄어드는 것 (회색 spot) 외에 2배 이상 또는 2분의 1 이하의 발현 변동을 확실하게 나타내는 것 (적색 spot)이 존재하였다.

또한 발현 상황을 상세히 검토한 결과, 형광 signal이 200,000 count를 넘는 2,869 유전자 중 97.6%는 실험 1과 2에서의 발현 비율차가 2배 이내로 좁혀졌다 (그림 4). 양 실험에서 모두 2배 이상의 변화를 나타내며, 발현 비율에 명백한 재현성을 나타내는 것으로 생각된 것은 해석대상으로 한 유전자 중 53종이었다. 이러한 사실로부터 독립적 실험에서의 재현성은 정상적인 경우에 매우 양호함을 암시하였다.

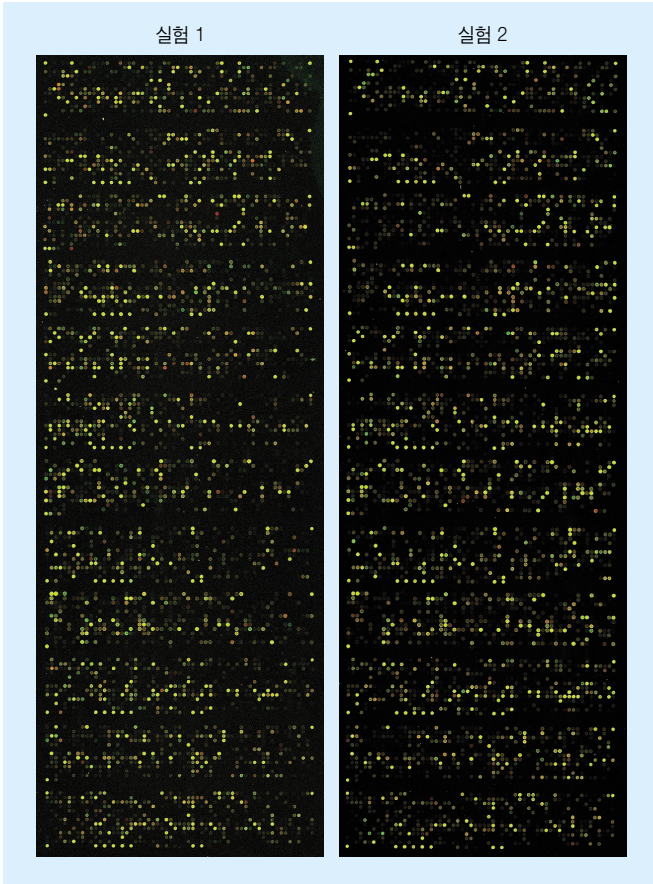


그림 1 ScanArray Express에 의한 Cy3, Cy5 중첩 화상

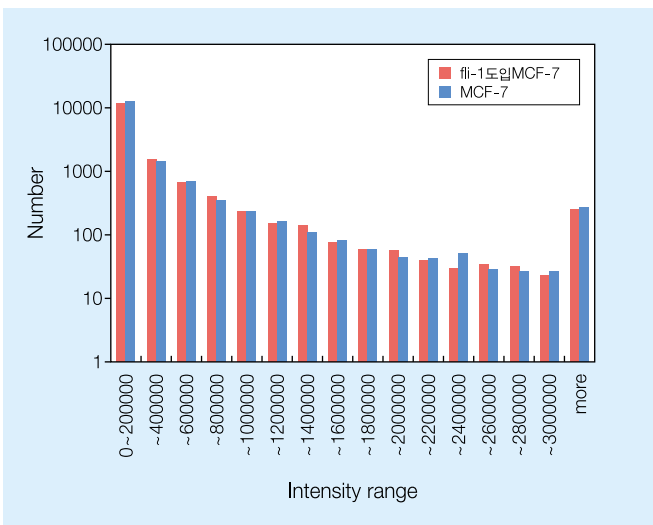


그림 2 fi-1 도입/비도입 세포 시료간의 spot 형광당의 Cy5 형광 signal을 기초로 작성한 histogram

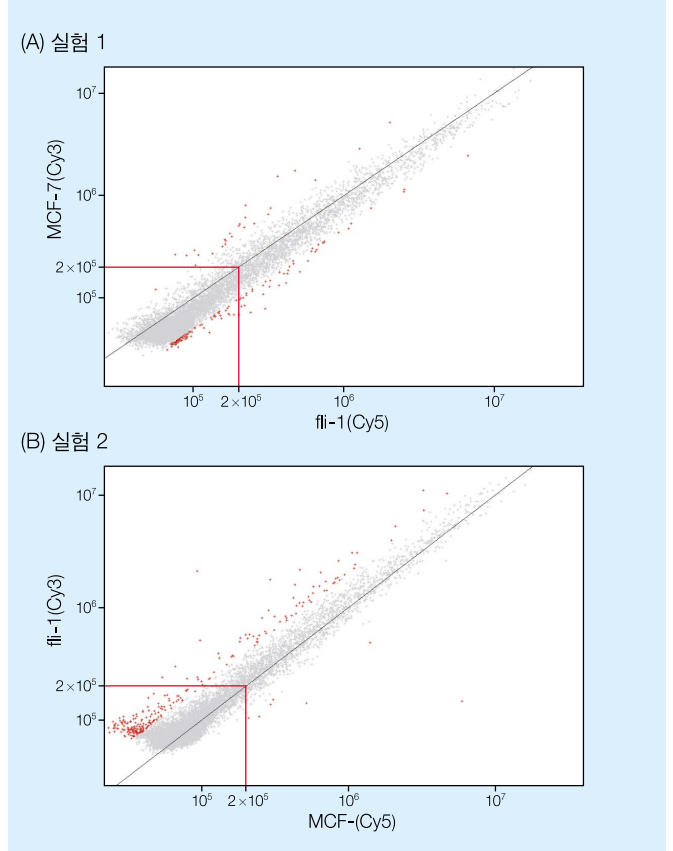


그림 3 fi-1 도입/비도입 세포의 발현유전자의 scatter plot

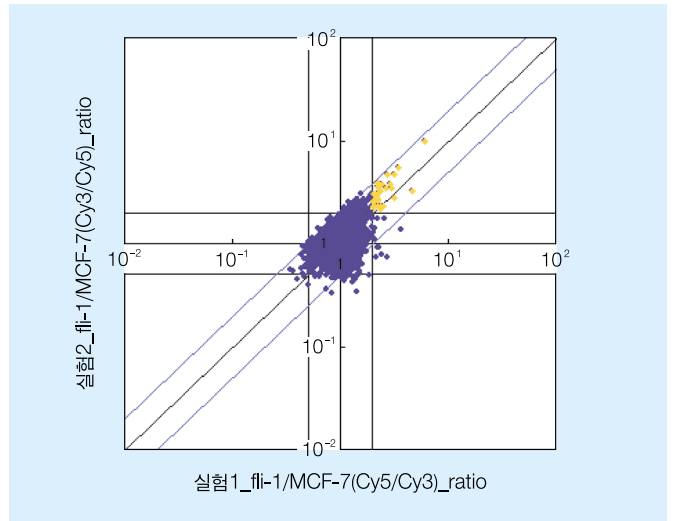


그림 4 실험 1과 실험 2에서 얻은 발현 profile의 비교
형광 signal이 200,000 count 이상의 spot에 의해서 plotting했다. 두 가지 실험에서 공통으로 2배 이상의 변화를 보이는 것을 노란색의 dot로 나타내었다.

IntelliGene® HS Human Expression CHIP과 타사 oligo DNA chip과의 비교

간암조직에서 활성화된 유전자군 및 간암세포주 (HLF)에 도입한 ATF6 (간암특이적으로 활성화하는 전사인자)에서 발현조절되는 유전자군의 발현을 IntelliGene® HS Human Expression CHIP (cDNA chip)을 이용해 조사하여, 이미 알려진 데이터 및 타사 oligo DNA chip을 이용하여 얻은 결과를 비교 검토하였다.

이번에 IntelliGene® HS Human Expression CHIP을 이용해 얻은 결과를 간암세포에서의 활성 또는 ATF6에 의한 조절이 이미 확인된 유전자의 발현양상 (문헌 데이터)을 비교한 결과, 16종류의 유전자에서 재현성이 확인되었다 (표 1A, B).

한편 완전히 동일한 RNA 시료를 타사 oligo DNA chip으로 해석한 결과, Cy3, Cy5 label을 교환하여 2회의 실험을 수행해 재현성을 나타낸 유전자를 선별했음에도 불구하고 결과는 IntelliGene® HS Human Expression CHIP 결과 쪽이 훨씬 정확하였다. 또한 개개의 발현 비율도 대체로 후자 쪽이 큰 경향을 보였다. 이상의 결과로 IntelliGene® HS Human Expression CHIP에서 얻은 결과는 타사 oligo DNA chip에 비해 충분히 신뢰성이 높다는 것을 시사하였다.

결론 및 고찰

- 1) 일반적으로 microarray를 이용한 실험에서는 Cy3, Cy5 labeling을 바꾸어 여러번 실험을 수행하여 결과를 보정하는데, IntelliGene® HS Human Expression CHIP을 이용해 얻은 결과는 높은 재현성을 나타내어 실질적으로 1회의 실험에서도 신뢰성이 매우 높음이 입증되었다.
- 2) Oligo DNA chip에 비해 cDNA chip은 hybridization의 조건 검토가 용이하며, 안정된 결과를 얻을 수 있었다. 또한 signal 강도가 높아 oligo

DNA chip 취급시 문제가 되었던 발현이 낮은 영역에서의 Cy3, Cy5 형광 강도의 변형도 확인되지 않았다. 또한 signal 강도가 높기 때문에 실질적으로 검색 가능한 유전자의 수 (여기서는 200,000 count를 넘는 것은 17.3% 정도 존재하였다)가 증대할 것으로 기대되었다.

3) DNA chip은 크게 나눠 oligo DNA를 고정한 type과 IntelliGene® HS Human Expression CHIP처럼 긴 cDNA를 이용한 type이 있다. 일반적으로 oligo DNA chip의 경우, 높은 특이성을 가질 것으로 기대되는 경향이 있으며 특수한 시스템을 채용하고 있는 Affymetrix®사의 GeneChip®처럼 높은 특이성과 신뢰성을 나타내는 것도 있다. 그러나 본 고에서는 일반 oligo DNA chip은 signal의 약함이 그 특이성을 감소시켜 결과가 불안정해지는 요인이 되는 것으로 확인되었다.

한편 cDNA chip은 상당히 강한 signal을 나타내며, 일정량의 형광 signal을 넘는 지점에서는 결과가 안정적이지만 매우 드물게 수십 배나 되는 발현량이 chip 상에서 확인되었음에도 불구하고 RT-PCR의 결과에서는 몇 배 정도의 차이만 보이는 경우가 있었다. 이런 경우에는 splicing variant 등도 고려하면서 CHIP probe 탑재영역과 RT-PCR 증폭영역을 갖춰 probe 염기서열을 참고로 특이적인 PCR primer를 설계하는 등의 보조적인 검토가 필요하다.

표 1 간세포암/정상간조직 (HCC/NL) 및 ATF6 도입/비도입 간암세포주 (ATF6/HLF)에서 발현이 변화하는 기지의 유전자

(A) HCC/NL

| 재현성 | | 발현 비율 | | 문헌에 발현 변화가 보고된 유전자 | 문헌 |
|--------|-----|--------|-----|---|----|
| TaKaRa | X 사 | TaKaRa | X 사 | | |
| ○ | ○ | 3.3 | 2.3 | Galactoside-binding, soluble, 4 (Galectin 4) (LGALS4) | 1 |
| ○ | ○ | 2.2 | 6.2 | Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1) | 1 |
| ○ | ○ | 2.1 | 3.9 | UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4 (UGT2B4) | 1 |
| ○ | × | 3.6 | 1.4 | Vitronectin (VTN) | 1 |
| ○ | ○ | 3.7 | 1.7 | Ribosomal protein S8 (RPS8) | 3 |
| ○ | ND | 2.4 | - | Ribosomal protein L30 (RPL30) | 3 |
| ○ | ND | 5.6 | - | 78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78) | 4 |
| ○ | ND | 33.3 | - | 94 kDa glucose-regulated protein (GRP94) (gp96 homology) | 2 |

(B) ATF6/HLF

| 재현성 | | 발현 비율 | | 문헌에 발현 변화가 보고된 유전자 | 문헌 |
|--------|-----|--------|-----|---|----|
| TaKaRa | X 사 | TaKaRa | X 사 | | |
| ○ | × | 3.6 | 1.4 | 94 kDa glucose-regulated protein (GRP94) (gp96 homology) | 5 |
| ○ | ○ | 1.6 | 1.6 | Protein disulfide isomerase-related protein (P5) | 5 |
| ○ | × | 3.5 | 0.9 | Tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS) | 5 |
| ○ | × | 2.3 | 0.9 | Calreticulin (CALR) | 5 |
| ○ | ND | 4.2 | - | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble) (HMGCS1) | 5 |
| ○ | ND | 3.5 | - | 78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78) | 5 |
| ○ | × | 0.3 | 0.9 | Solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5 (SLC1A5) | 5 |
| ○ | × | 0.6 | 0.8 | Four and a half LIM domain 2 (FHL2) | 5 |

문헌: 1) *Cancer Res.*, **59** (19), 4990-6 (1999), 2) *Biochim Biophys Acta.*, **1536** (1), 1-12 (2001), 3) *Anticancer Res.*, **21** (4A), 2439-33 (2001), 4) *J Hepatol.*, **38** (5), 605-14 (2003), 5) *Biochem J.*, **366** (Pt2), 585-94 (2002).

문헌에 HCC(A)나 ATF6 도입세포 (B)에서 발현변화가 보고된 유전자를 IntelliGene® HS Human Expression CHIP 및 타사 oligo DNA chip을 이용하여 검출 과정을 조사하였다. 발현 비율은 HCC 또는 ATF6에서 촉진되는 것을 1이상, 억제되는 것을 1이하로 표시하고 있다. 이미 보고되어 있는 발현양식에 대해 재현성이 있는 것 (1.5배 이상 또는 0.6 이하)을 C, 재현성이 부족한 것을 X로 표기하였다 (ND: no data).