Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit를 사용한 microarray 시료의 direct chemical Labeling

Microarray는 수천 개의 유전자들을 hybridization 으로 정량할 수 있도록 해준다. Microarray는 유리 slide 등에 알려진 유전자의 capture sequence가 2차원적으로 되어 있다. Microarray를 검출하고 확인하기 위해서는 probe를 표식하여야 한다. Mirus 의 *Label* IT® 기술은 간단한 화학반응을 이용하여 공유결합 방식으로 probe를 nucleic acid에 부착시킨다. *Label* IT® 제품은 hybridization 동안 염기 간 결합에 관여하지 않는 부위의 nucleic acid 시료 내 guanine염기에 직접 표식을 하여, RNA와 DNA시료를 간단하고 재현성 있고, 균일하게 표식 할 수 있어 hybridization에 가장 이상적인 제품이다.

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit는 single-channel microarray hybridization(그림 1)에 사용되는 biotin-label nucleic acid 시료를 준비하는데 최적이다. Probe로 biotin을 사용하려면 hybidization 이후 검출을 위하여 형광물질의 도입이 필요하다. Biotin 표식 시료들은 상용화되어 있는 다양한 biotin 검출 시약과 증폭 kit들 중에서 선택 할 수 있다. 본 고에서는 다양한 microarray 응용분야에 *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit를 사용한 예를 보여주고자 한다.

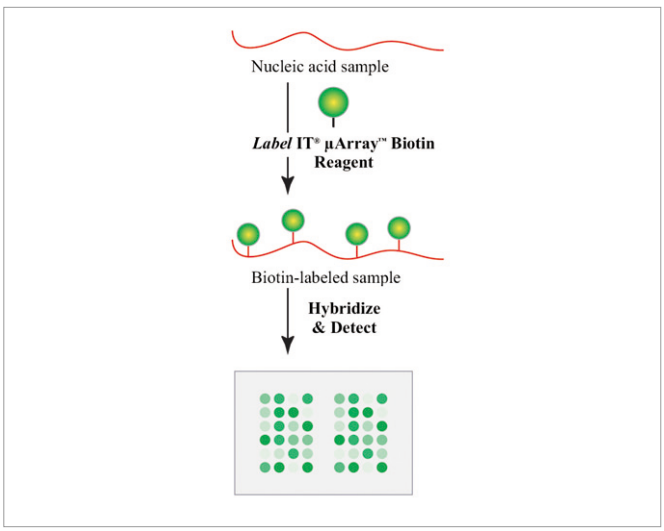


그림 1. *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit에 대한 개요
Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit는 microarray 응용에 있어서 간단하면서도 다양한 표식 과정을 제공한다. 어떤 nucleic acid 시료(RNA나 DNA)든지 *Label* IT® Biotin으로 표식할 수 있다 (37 ℃에서 1시간 동안 반응). 화학 반응은 enzymatic replication이나 표식된 nucleotide와의 첨가 없이 공유 결합으로 표식되며, 표식된 시료는 정제하여 hybridization에 사용한다. Hybridization 후 2차 검출 단계로 signal를 나타내는 형광을 도입 한다. 예를 들어 streptavidin-Cy™3 conjugate를 사용하면 대부분의 microarray scanner를 사용할 수 있다.

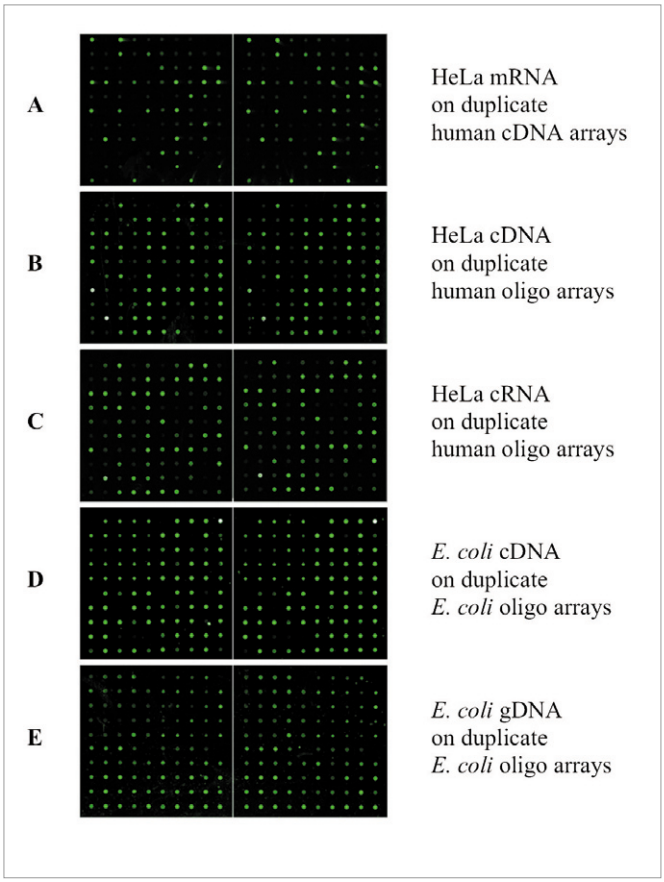


그림 2. 다양한 nucleic acid 시료의 direct labeling
Label IT® μArray™ Biotin 시약을 이용하여 표식하였다: (A) HeLa mRNA를 Human cDNA array 에 hybridization; (B) HeLa cDNA와 (C) sense-strand human oligo array에 hybridization하기 위한 cRNA, (D) *E.coli* cDNA와 (E) sense-strand *E.coli* oligo array에 hybridization하기 위한 genomic DNA(gDNA). Hybridization 후 형광을 검출하기 위하여 streptavidin-Cy™3 conjugate가 사용되었다.

실험 결과 및 토의

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit는 microarray에 hybridization를 하기 위한 여러 가지의 nucleic acid 시료들을 표식 할 수 있는 특징을 가진다 (그림 2). 일반적으로 유전자 발현 profiling을 작성할 때, RNA 시료를 표식된 nucleotide가 있는 상태에서, cDNA 또는 cRNA로 enzymatic replication으로 변환한 후, hybridization 하게 된다. *Label* IT® μArray™ 제품은 nucleic acid에 direct chemical modification을 하기 때문에,

cDNA와 cRNA derivatives (그림 2B, C)뿐 아니라 original mRNA 시료에 표식이 가능하며, microarray(그림 2A)에 직접 hybridization 할 수 있다. 또한 *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit는 microarray실험용으로 prokaryotic mRNA(data not shown), prokaryotic cDNA(그림 2D), 그리고 genomic DNA(그림 2E)도 표식 할 수 있다.

효소를 이용한 biotin 표식과 비교한다면, *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit는 보다 지속적이고 우수한 hybridization 결과를 만들어낸다 (그림 3). 또한 *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit를 사용하면 mRNA를 이용한 증폭 과정이 필요하지 않아 고감도의 hybridization 결과를 얻을 수 있으며, original 시료에서 직접적인 결과를 얻을 수 있다. mRNA를 직접 표식함으로써 cell 당 10 copy 정도의 낮은 transcript도 검출할 수 있다 (그림 4).

표식된 mRNA, cDNA 시료(그림 5: 유전자 A04, C09)로 상대적인 gene expression을 실험하고자 할 때 나타나는 차이는 cDNA 시료 준비를 위해 필요한 enzymatic replication에 의한 차이로, 이는 microarray 분석에서 *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit로 mRNA를 직접 표식하는 장점을 보여준다.

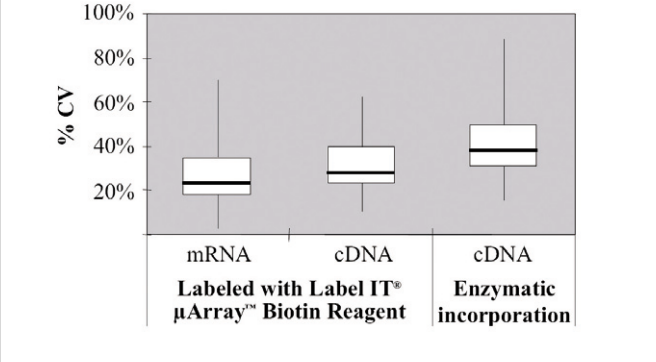


그림 3. Technical Replicates의 reproducibility

Gene expression quantification 의 reproducibility를 다음과 같이 준비된 probe로 비교 검토하였다; 즉 *Label* IT® μArray™ Biotin 으로 표식된 HeLa mRNA(왼쪽)과 cDNA(가운데), biotinylated nucleotide의 enzymatic incorporation으로 표식된 HeLa cDNA를 사용하였다. 각 유전자의 CV(Coefficient of variation)는 replica(하나의 microarray에서 하나의 유전자에 4개씩의 replica를 이용)의 background-signal로 계산하였다. Box는 CV값들의 분포에서 중간 50% 가 되는 부분을 나타내고, 두꺼운 수평선은 CV값의 중앙치를 나타내며, 수직선들은 Microarray 상에 양이 표시된 모든 유전자를 보여주는 CV 값들 전체 범위를 나타내고 있다.

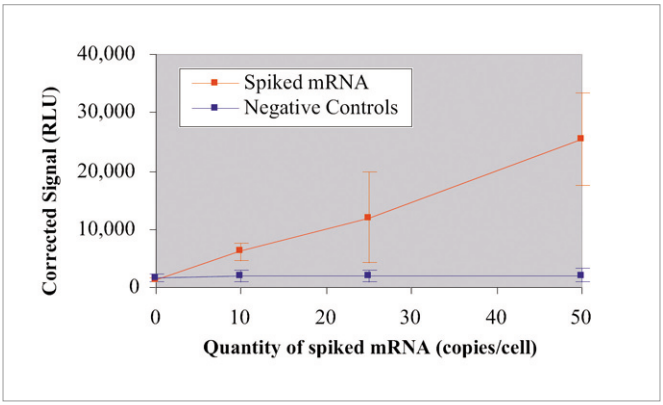


그림 4. mRNA 검출의 sensitivity

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit를 사용하였을 때의 sensitivity는 표식하기 전에 일정한 양의 Arabidopsis mRNA 서열을 HeLa mRNA 시료에 첨가하여 결정하였다. Cell 당 10 개까지의 mRNA (1 μg HeLa mRNA 안에 Arabidopsis mRNA 30 pg)는 non-specific hybridization signal (negative controls) 위 쪽에서 검출될 수 있다. Spiked mRNA와 negative controls 의 fluorescent signal은 중간 부위의 background value를 제거하여 설정한다. Error bar는 1 standard deviation으로 나타내었다.

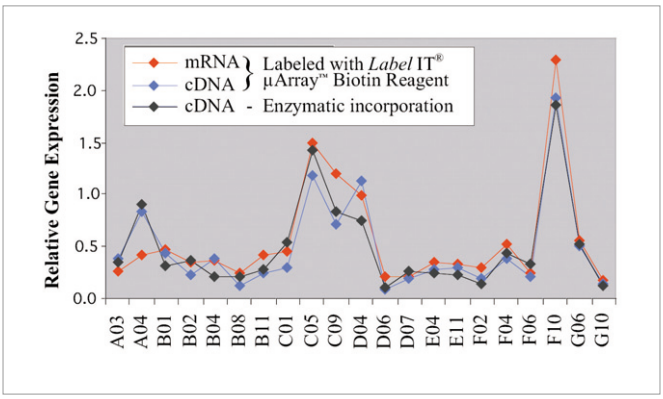


그림 5. 표식된 mRNA와 cDNA 시료의 gene expression profile

Label IT® μArray™ Biotin 시약으로 표식된 HeLa mRNA와 cDNA 시료는 biotinylated nucleotide의 효소 결합을 가지고 표식된 cDNA 시료들과 동일한 gene expression profile을 생성한다. 각 표식 방법에 대한 상대 유전자 발현값들은 human cDNA Microarray로 4개의 Technical Replicates hybridization된 것의 평균을 표시한 것으로 (각 Microarray hybridization에서 얻은 데이터를 평균하기 전에 먼저 표준화하였다), Microarray 상의 21개 유전자(Research Genetics well number로 표시된)에 대하여 나타낸 값들이다.

Summary

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit는 Microarray 분석을 위한 biotin-labeled nucleic acid 시료준비에 최적으로, 고감도의 결과를 제공하여, 기존방법을 대체할 만한 방법으로 주목 받고 있다. 본 제품은 높은 signal:noise ratios, gene expression결과의 consistent를 나타내며, Microarray hybridization에서 low copy number transcript의 고감도 검출이 가능하다.

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit의 가장 큰 장점은 mRNA 시료에 직접 표식하여 hybridization하는 것으로, non-enzymatic chemical labeling으로 enzymatic replication과 표식된 nucleotide의 결합이 필요 없어 original 시료를 분석할 수 있다는 것이다.

실험방법

Microarray

모든 Microarray는 QArray^{lite} robotic arrayer(Genetix Ltd., www.genetix.co.uk)와 표준 프로토콜을 사용하여 Mirus Bio에서 제작되었다. Human cDNA Microarray는 human housekeeping gene I.M.A.G.E gene(Research Genetics의 cDNA clone/Invitrogen Life Technologies www.invitrogen.com)으로 구성되어 있으며, Takara slide glass(amine-coated slide; Takara Mirus.Bio, www.takaramirusbio.com)에, Human과 *E. coli* sense-strand oligo Microarray(MWG Biotech, www.mwg-biotech.com)는 Takara Hubble Glass slide(Takara Mirus Bio) 에 제작되었다.

시료 준비

Total RNA는 HeLa cell(ATCC# CCL-13)에서 TriReagent(Molecular Research Center, Inc., www.mrcgene.com)를 사용하고, RNeasy column purification를 사용하여 추출하였다. mRNA 표식을 위하여, mRNA 정제 Kit를 사용하여 HeLa cell에서 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 oligo dT primer와 SuperScript™ II 또는 III, RNaseH- reverse transcriptase을 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. RNA template는 가수분해하고, cDNA는 biotin 표식을 하기 전에 정제하였다(*Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit, Protocol #ML0331에 따라). 마찬가지로 cRNA는 kit의 manual에 따라 biotin으로 표식하였다. 비교 실험에 사용되는 효소로 표식한 cDNA와 cRNA는 각각의 protocol에 따라 reverse transcription 또는 RNA polymerase amplification step에서 biotinylated nucleotide를 준비하였다. Technical Replicates (biotin-labeled mRNA와 cDNA 시료)는 동일한 HeLa total RNA 시료로부터 준비하였다.

검출 실험의 감도를 높이기 위하여 특정한 양의 exogenous Arabidopsis thaliana mRNA 서열(Stratagene SportReport™ system)을 사용하여, 표식하기 전에 HeLa mRNA 시료들을 준비하였다.

Total RNA를 *E. coli* DH10b로부터 분리하였다. *E. coli* mRNA는 MICROBExpress™ Kit(Ambion)를 사용하여 준비하고, bacterial first-strand cDNA는 random hexamer과 SuperScript™ II 또는 III, RNaseH- reverse transcriptase(Invitrogen)를 사용하여 합성하였다. RNA template는 가수분해 하고, cDNA는 biotin 표식을 하기 전에 정제하였다(*Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit protocol에 따라).

Genomic DNA는 MasterPure™ DNA Purification Kit(Epicentre Technologies)를 사용하여 *E. coli* DH10b에서 분리하고, 제한효소 Tsp5091로 절단하여, *Label* IT® μArray™ Biotin Labeling Kit의 cDNA labeling protocol에 따라 biotin으로 표식하였다.

Microarray hybridization와 biotin 검출

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit protocol에 따라 실험하였다. cDNA와 oligo Microarray hybridization는 서로 다른 hybridization와 세정 조건으로 실험하였으며, 모든 biotin Microarray hybridization은 Cy™3 competitive streptavidin를 사용하여 검출하였다. Microarray scanner로 Scanner로 Scanning하고 ImaGene Software로 분석 하였다.

Label IT® μArray™ Biotin Labeling Kit

TaKaRa Code	단위
MIR 8010	10 반응*
MIR 8050	50 반응*

* 각 반응은 nucleic acid 1㎍를 표식한다.

관련제품

Biotin과 형광 표식 시약을 가진 *Label* IT® μArray™ Dual Labeling Kit

TaKaRa Code	단위
MIR 8105	2 × 5 반응*
MIR 8050	2 × 25 반응*

* 각 반응은 nucleic acid 1㎍를 표식한다.
2차 검출 시약은 포함되어 있지 않다.

Mirus®

It All Begins at the Bench

Transfection Reagent

Successfully Transfected cell lines

A549, BHK-21, BNL.CL2, BRL-3A, C2C12, C6 *, CHO-K1*, Clone 9, COS-1*, COS-7*, Daoy*, DB-TRG-05MG*, DI-TNC1*, DU 145*, HCN-1A*, HEK 293*, HeLa*, Hepa 1-6, Hepa1cLc7, HepG2, HLF-a, Huh-7, HUVEC, Jurkat*, K562, KB, KLN 205, LL/2 (LLC1), LNCaP*, MCF-7, MEL, Neuro-2a*, NIH3T3*, OVCAR3, PC12*, PC-3*, RAW 264.7, SK-N-MC*, SKOV3, SVG p12*, SW900, THP-1,Vero, WRL-68.

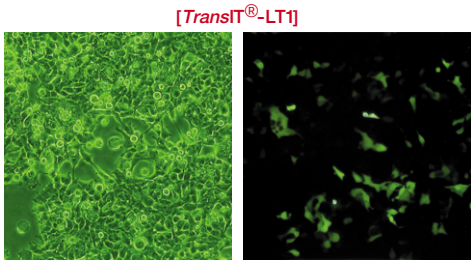
Primary cell types

Human astrocytes, human chondrocytes, keratinocytes, mouse and rat hepatocytes.*

* *Trans*IT® Cell Line Specific Transfection Reagent 이용 가능

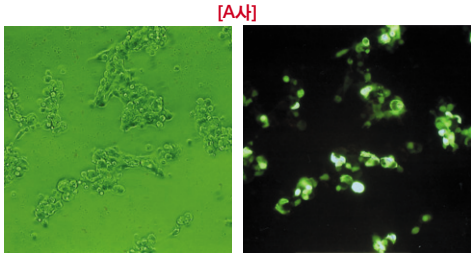
293 cell의 도입효율비교

[*Trans*IT®-LT1]



광학현미경 형광현미경

[A사]



광학현미경 형광현미경

Takara Technical Support Line

462-120 경기도 성남시 중원구 상대원동 66-2 생명공학커뮤니티 Bio21 TEL 031-739-3320 FAX 031-739-3321 E-mail support@takara.co.kr

[지역별 전문대리점] 다인바이오(주)(서울, 인천, 경기, 강원) 031-748-8166 (주)라인바이오(대전, 충청) 042-861-6602 (주)브니엘바이오(대구, 경북) 053-381-3611

대한과학(부산, 경남) 051-245-6582 SNT(진주) 055-759-2522 (주)삼화교역(전주, 전북) 063-227-3700 (주)진성에스엠알(광주, 전남) 062-672-7631 한라바이오랩(제주) 064-726-3251~4