

Multiplex QZyme Assay를 이용한 Human Cytochrome P450의 정량

Clontech Laboratory

QZyme Assay는 DNAzyme(촉매활성이 있는 DNA 서열)의 활성에 기반을 둔 새로운 Real Time 정량 PCR system이다. 이 system을 사용하여 human cytochrome P450의 3종류의 transcripts(CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4) 활성을 측정하였다. Triplex 정량 PCR assay(1 tube에서 3가지 반응)는 cytochrome P450의 발현 정량, housekeeping gene의 표준화 및 전체 PCR 효율(template를 이용한 합성을 모니터링 할 수 있다. Real Time PCR을 이용하여 정량한 CYP1A2, CYP2B6 및 CYP3A4의 유도량은 기존의 효소를 이용하여 분석한 결과와 유사하다. Triplex Qzyme Assay는 drug를 처리하여 cytochrome P450을 유도한 human primary hepatocyte를 이용하여 cytochrome P450을 측정하는 방법으로 신속, 정확하면서도 재현성이 있다.

머리말

Cytochrome P450의 효소 활성은 신약개발과정에서 CYP450 isozyme(e.g., CYP1A2)의 transcription과 이것으로 생성된 nascent mRNA의 translation으로 유도된다. CYP450 효소는 대부분의 경우, 환자가

복용하고 있는 약물의 대사를 촉진하거나 억제시키는 활성을 갖고 있으며²⁾, 이는 약물 간의 상호작용 및 내성과 밀접한 관계가 있어 신약개발에서 걸림돌로 작용하고 있다. 현재 CYP450의 활성을 측정하기 위하여 class-specific 효소활성을 이용한 분석 및 Real Time 정량 PCR(qPCR)법이 이용되고 있다. 본 연구에서는 Clontech의 Triplex Qzyme Real-Time qPCR Assay(그림 1)을 이용하여 CYP450 효소활성을 측정하고 기존법과 비교하였다. 또한 Human primary hepatocytes 사용하여 다양한 drug에 의한 CYP450, CYP2B6 및 CYP3A isozymes의 유도에 관하여 분석하였다.

CYP450 유전자 발현의 sensitive와 accurate의 분석

1st strand cDNA를 사용하여 3종류의 CYP450 isozymes(CYP1A2, CYP2B6, 3A4), housekeeping 유전자의 18S ribosome 단백질(18S), template의 발현량을 triplex 정량 PCR을 이용하여 분석하였다(그림 2). 모든 분석은 Powerscript Reverse Transcriptase(Cat. No. 639500/639501) 및 Q^{Taq} DNA Polymerase Mix(Cat. No. 639651)를 사용하였다.

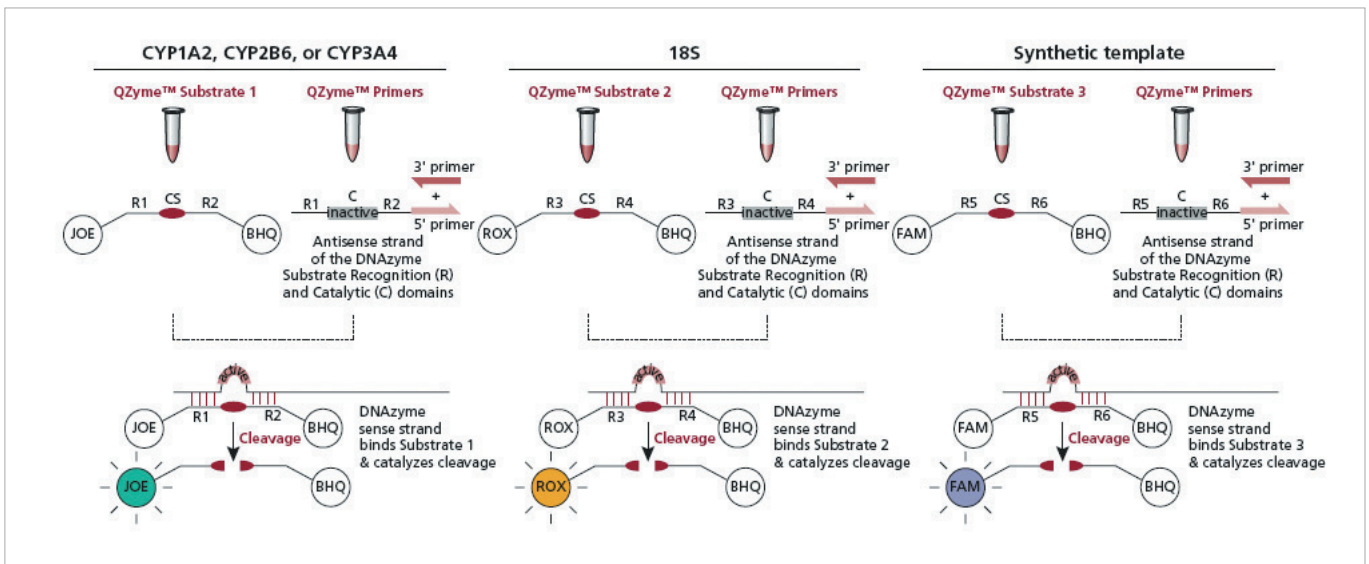


그림 1 Triplex 분석에도 적용 가능한 QZyme Assay

Triplex primer design에서 bioinformatics tool을 사용하여 unique recognition sequence(R1, R2, R3, R4, R5 및 R6)와 substrate에 따른 형광물질(JOE, ROX 및 FAM)로 specificity를 유지하고 gene-specific target의 차이를 볼 수 있었다. QZyme Assay의 메커니즘에 관한 자세한 정보는 당사 홈페이지 eshop.takara.co.kr을 이용하시기 바란다.

QZyme 시스템은 매우 높은 강도를 갖고 있어 유도되지 않은 human primary hepatocytes와 유도된 human primary hepatocytes의 차이를 명확하게 검출할 수 있다(그림 2, Panel A). 모든 replicates에서 18S ribosome 단백질이 얻어졌고, 이 데이터를 전사산물 간에 normalization 하기 위하여 사용하였다. 이미 테스트 된 CYP450 isozymes에 대하여 6개의 replicates 모두에서 동등한 증폭효율을 확인하였다(그림 2, Panel B). 각 반응에서 CYP1A2, CYP2B6 및 CYP3A4에 대해 각각 90.5%, 91.5% 및 90.3%의 PCR효율을 나타내었다.

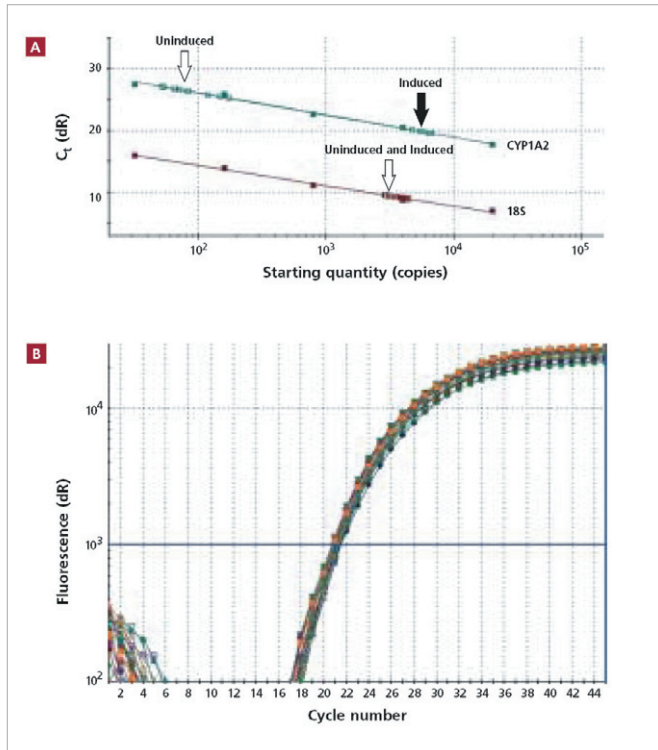


그림 2 QZyme 정량 PCR assay로 human primary hepatocyte에서의 CYP450 유전자 발현 측정

Human primary hepatocyte(24 well plate)는 Hepato-STIM hepatocyte cell culture medium에서 2일에 한번 씩 배지를 교환하면서 배양하였다. 배지는 필요한 성분(20 uM β -naphthoflavone[β -NF], 2 mM phenobarbital[PB], 20uM rifampicin[RIF], DMSO[β -NF와 RIF의 control], 또는 1xPBS[PB에 대한 control])이 포함된 배지로 24시간 마다 교환해주었고, 72시간 동안 배양하였다. Total RNA는 triplicate well을 사용하여 준비하였다. 시료는 random nanomer primer와 PowerScript Reverse Transcriptase(Cat. No. 639500)를 사용하여 역전사반응을 하였다. CYP450 transcript(CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4), 18S ribosomal protein(18S), template에 대한 first-strand cDNA의 발현은 triplex QZyme assay로 측정하였다. Triplex assay는 3개의 well에 동일한 시료를 넣고 duplicate로 측정하였으며, QZyme DNA Polymerase Mix(Cat. No. 639651)와 Stratagene Mx3000P 기기를 사용하였다. dR unit는 시료에 ROX passive reference dye를 넣고 측정된 것을 의미한다. R² 값은 0.994(CYP1A2), 0.999(CYP2B6), 0.970(CYP3A4)이었다. Panel A, 18S(red)와 일치하는 CYP1A2 transcript(green)에 대한 raw 데이터. 실험데이터(open squares)는 각 triplex assay(solid squares)에 대한 standard curve 위에 나타내었다. Standard curve는 human liver random-primer cDNA를 이용하여 작성하였다. 출발량(x-axis)은 first-strand cDNA의 copy수와 동등한 total RNA를 나타낸다. QZyme system의 dynamic range에서는 유도되지 않은 시료(open arrow)와 유도된 시료(solid arrow) 간의 발현량의 차이를 명확히 검출할 수 있다. 18S의 발현량은 모든 replicates에 대하여 일정했다. Panel B. CYP1A2 triplex assay에서 template의 분석은 6개의 replicates에서 PCR 효율이 일정함을 보여주었다. CYP2B6, CYP3A4에서도 비슷한 결과를 볼 수 있었다(data not shown).

효소를 이용한 분석의 비교

정량 PCR 분석과 cytochrome P450을 유도한 human primary hepatocytes과 유도하지 않은 human primary hepatocytes에서 cytochrome P450 발현에 대해서 기존의 효소를 이용한 분석을 사용하여 비교하였다. β -naphthoflavone(β -NF), phenobarbital(PB), rifampicin(RIF)은 각각 CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4를 유도하는 화학물질로 사용되었고, 72시간 동안 실험하였다. 기존의 효소를 이용한 분석도 Real Time 정량 PCR로 측정된 결과와 밀접한 관계가 있었다(그림 3).

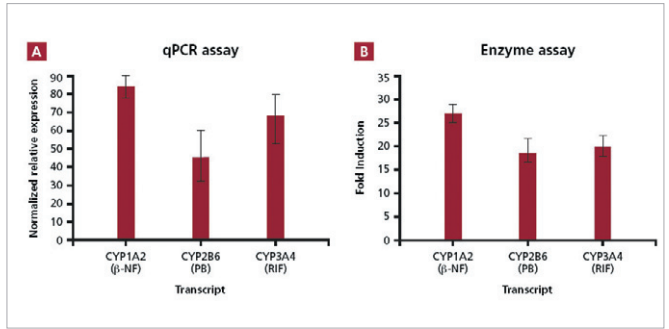


그림 3 QZyme qPCR과 일반적 효소를 이용한 분석에서 측정된 CYP450 유도결과 Panel A. Human primary hepatocyte(24-well plate)를 그림 2에서 제시한 방법으로 각종 유도체로 처리하여 triplex qPCR을 이용하여 정량하였다. Panel B. Replicate well은 probe 기질(CYP1A2: 100 uM phenacetin, CYP2B6: 100 uM S-mephenytoin, CYP3A4: 200 uM testosterone)과 세포를 37°C에서 각각의 시간(CYP1A2: 1시간, CYP2B6: 4시간, CYP3A4: 30분) 동안 incubation 하여 CYP450의 효소활성을 측정하였다. 그리고 각각의 효소분석은 stop solution을 이용하여 반응을 정지하고, HPLC 분석을 하였다. 유도 비율은 유도군을 비유도군으로 나누어 구하였다. Control 시료의 유도는 무시할 수 있는 정도였고, target 유전자 모두 유도되지 않았다(data not shown).

또한 CYP3A4의 시간에 따른 전사산물(RIF로 유도)의 변화는 기존의 효소를 이용한 분석에서는 72시간 지났을 때 발현량이 가장 높았고, QZyme에 의한 분석에서는 48시간 지났을 때 가장 높았다(그림 4). 이것은 유도된 CYP3A4 검출에서 QZyme을 이용한 정량 PCR이 높은 감도이며 기존의 효소보다 QZyme의 정량 PCR이 더 효율적이고 정확함을 제시할 수 있다.

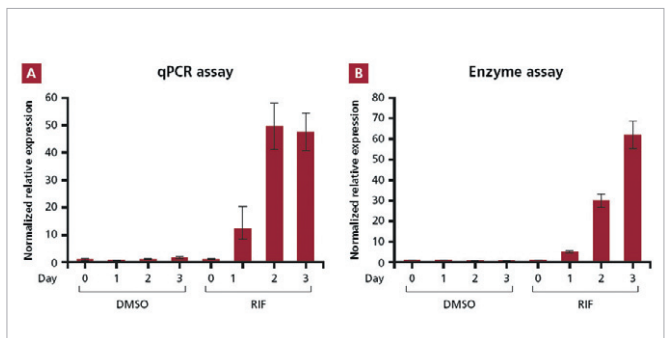


그림 4 QZyme qPCR에서는 기존의 효소를 이용한 분석보다 감도가 뛰어나다. Human primary hepatocyte(24-well plate)를 그림 2에서 제시한 방법으로 RIF로 처리하였다. 유도 및 비유도 hepatocyte를 각각 3개씩 well에 넣고 triplex QZyme 정량 PCR 및 효소활성 분석으로 24시간마다 CYP3A4의 유도를 측정하였다(그림 2, 그림 3 참조). Panel A. 전사발현 peak는 triplex 정량 PCR로 측정하여 연속 48시간 처리한 후 확인하였다. Panel B. 효소활성 분석은 전사발현이 72시간 처리한 후 최대가 되었다.

맺음말

지금까지 살펴본바와 같이 QZyme qPCR assay는 human primary hepatocytes에서 cytochrome P450 isozyme이 유도된 세포와 유도되지 않은 세포의 차이를 효율적으로 검출할 수 있고 감도와 정확성이 우수하다. CYP 450의 3가지 다른 chemical 유도체를 통하여 분석한 결과, QZyme을 이용한 분석은 기존의 효소를 이용하는 방법과 매우 밀접한 연관이 있었다. 또한 CYP3A4의 발현량(RIF로 유도)은 기존의 효소를 이용하는 방법보다 빨리 검출되었으며, 이것은 threshold 검출 범위보다도 빨랐다. QZyme 정량 PCR 분석법은 앞으로 신약개발 screening에 응용할 수 있는 강력한 tool이 될 것이다.

주의: QZyme에서 이용 가능한 유전자는 당사 홈페이지(www.takara.co.kr/lifetech)의 technical info 항목을 참고해주시기 바랍니다.

* 제품 구매를 위해선 License를 작성하셔서 다카라코리아 연구지원영업부로 접수해 주시기 바랍니다.

구성물

- 50× Primer Mix
- 100× Universal Substrate

관련제품

제품명	Size	Code
QTag DNA Polymerase Mix	200 rxn/ 10×200 rxn/2,000 rxn	639651/ 639652/639655
PowerScript Reverse Transcriptase	30 rxn/100 rxn	639500/639501
qPCR Human Reference cDNA, random-primed	25 rxn/100 rxn	639653/639654
qPCR Human Reference cDNA, oligo(dT)-primed	25 rxn/100 rxn	636692/636693
qPCR Human Reference Total RNA	25 ug	636690

【참고문헌】

1. Yan, Z. & Caldwell, G. W.(2001) *Curr. Top. Med. Chem.* 1(5): 403-425
2. Cupp, M. J. & Tracy, T. S. (1998) *Am. Fam. Physician* 57(1): 107-116
3. Seglen, P. O. (1973) *Exp. Cell Res.* 76(1): 25-30
4. Silva, J. M. & Nicoll-Griffith, D. A.(2001)
In: *Drug-Drug Interactions*, Ed. Rodrigues, A. D. (Marcel Dekker, Inc., New York), p. 189

Clontech 독자적인 정량 PCR 기술로 인정받고 있는 QZyme™ Assay for Quantitative PCR

