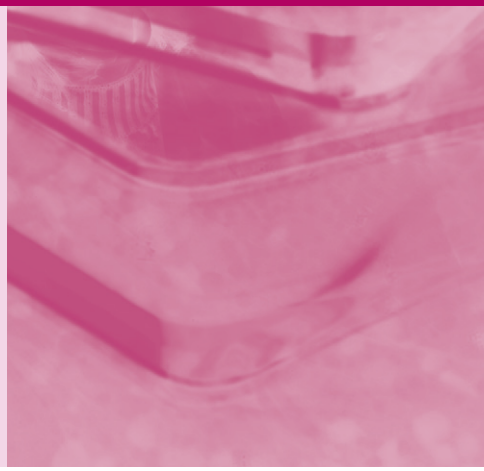
–small RNA의 종합적 발현해석서비스– MPSS®기술을 이용한 microRNA(miRNA)의 종합적인 탐색과 해석



Micro RNA(miRNA)[1,2]는 18~26 base의 single strand RNA로 목표가 되는 messenger RNA(mRNA)의 3'–UTR에 결합하여 전이를 억제하고 발생, 분화, 증식, apoptosis, stress response와 관련된 유전자 발현을 조절 하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 많은 생물의 miRNA(수 십 ~수 백 종류)가 데이타베이스(miRBase)에 등록되어 있다(http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml). 그 target이 되는 mRNA나 제어 기작에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 부분이 많고, miRNA 전체 종류와 기능을 밝히는 연구는 현재 많은 연구자가 주목하고 있는 분야이다.

miRBase에 등록되어 있는 miRNA 중에는 단순히 컴퓨터에 의한 종간 비교 동정(comparative approach)만으로 예측된 것도 있으므로 실험으로 동정하는 것은 매우 중요하다.

당사에서는 유전자 발현빈도 해석에 매우 효과적인 결과를 나타내고 있는 MPSS®(massively parallel signature sequencing) 기술을 활용하여 miRNA를 포괄적으로 해석하는 방법을 개발하여 소개하고자 한다.

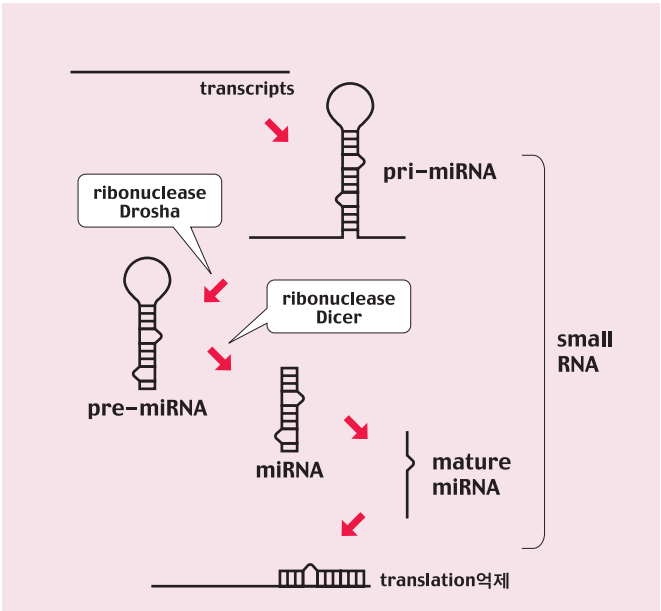


그림 1 micro RNA 생성의 분자기능
Gonome에서 전사된 pri-miRNA는 핵 내에서 Drosha에 의해 절단되어 pre-miRNA가 되며 세포질 내에서 Dicer에 의해 성숙된 miRNA가 된다.

miRNA의 특징

miRNA는 22 base가 가장 많이 알려져 있으며 mature 과정(그림 1)에서 hairpin 구조의 전구체(pre–miRNA)를 거친다. Pre–miRNA에는 다음과 같은 구조적 특징이 있다[3].

- Genome 서열과 완전히 일치한다.
- 자유에너지가 최소가 되는 구조는 아래와 같은 stem & loop 구조로 이루어진다.
  - Stem 부분의 22 base 중 16 base 이상이 base pair를 형성한다(GU pair 포함).
  - Stem 부분에 큰 내부 loop 구조나 bulge 구조(double strand의 한 쪽에 base가 남은 상태)가 없다.
- Stem 서열과 hairpin 구조가 종간에 보존되어 있다.

MPSS® 기술을 이용한 miRNA의 종합적인 해석

MPSS®[4~7]는 microbeads를 사용하여 mRNA의 발현빈도를 해석하는 획기적인 기술이다. 해석 대상이 되는 mRNA를 cDNA로 하여 그 fragment 각각을 microbeads에 고정화한 후, beads를 모아 해석한다. 즉, target이 되는 RNA 시료로 조제한 cDNA fragment는 vector(Tag vector)에 클로닝하고, Tag vector의 각 fragment를 microbeads에 고정화하여 library를 제작, 전용 해석장치(Gen Ⅲ Instrument)를 사용하여 각 beads의 fragment 서열을 sequencing 한다. Microbeads 1 개에는 1 clone의 cDNA fragment가 고정화되기 때문에, 각 microbeads로부터 얻은 서열 정보에서 그 개수를 합산함으로써 발현빈도를 알 수 있다. Tag vector에 클로닝이 가능하다면, 어떠한 DNA fragment라도 MPSS®로 해석할 수 있다.

그림 3은 MPSS®에 의한 miRNA 해석 방법을 나타내고 있다. Total RNA는 전기영동하여 18~26 base 정도의 small RNA를 분리하고 Tag vector에 클로닝하여 MPSS®로 해석한다. 얻은 데이타는 18~26 base 정도에 존재하는 small RNA에 관한 서열로, miRNA 이외에 sn/snoRNA, rRNA, tRNA, siRNA와 같은 small RNA나 mRNA, genome, mitochondria genome과 같은 fragment도 포함되어 있을 가능성이 있다. 데이타는 앞서 소개한 miRNA의 구조적 특징인 pre–miRNA 서열을 가지고 있는지 몇 개의 필터와 2차 구조를 예측하여 최종적으로 miRNA 후보를 얻는다.

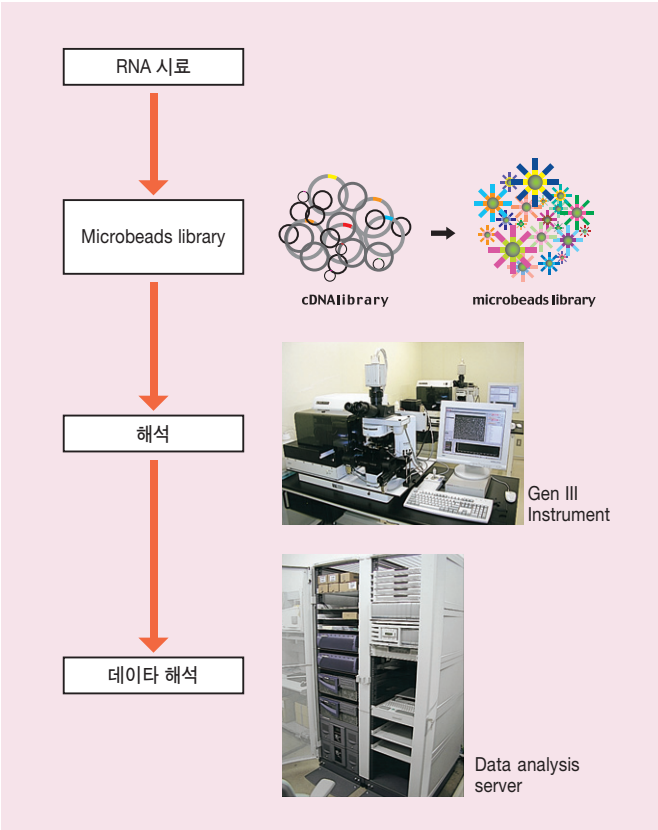


그림 2 MPSS® 공정 과정
시료(RNA)는 Tag vector에 클로닝되어 cDNA library가 되며 각각의 plasmid 유래의 cDNA fragment가 microbeads 표면에 고정화되어 microbeads library가 된다. Microbeads library의 cDNA fragment은 Gen III Instrument로 sequencing 되며 각 beads 유래의 데이타는 data analysis server에 의해 해석된다.

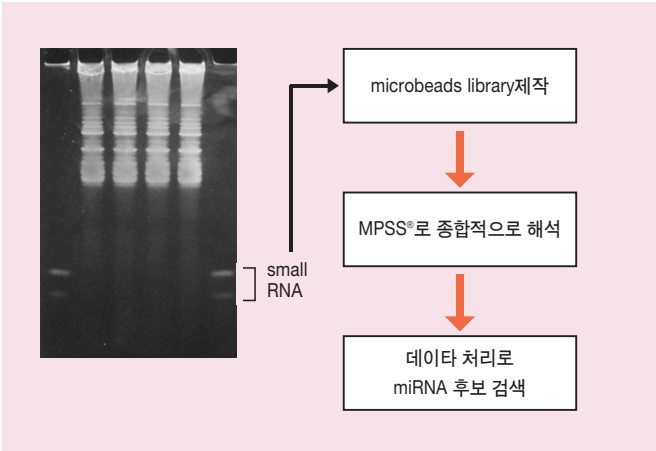


그림 3 MPSS®에 의한 miRNA 해석방법
Total RNA를 전기영동하여 small RNA 부분을 제거한 후, microbeads library를 제작하고 sequencing 하여 자료를 처리한다.

해석 예

우선 사람 신장에서 유래한 293 cell의 total RNA에서 MPSS®를 사용하여 전체적으로 miRNA를 해석하였다. 해석 방법의 유효성 검증을 위해 얻은 miRNA 후보 중 이미 데이타베이스에 등록되어 있는 miRNA에 대해 본 방법으로 얻은 전구체와 등록되어 있는 전구체의 구조를 비교하였다(그림 4). 모든 서열과 등록되어 있는 구조가 일치 하였으며, miRNA의 해석에 유효한 방법임을 알 수 있었다.

miRNA는 발생, 분화와 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으며, mouse embryo total RNA를 이용하여 miRNA-MPSS®로 해석하였

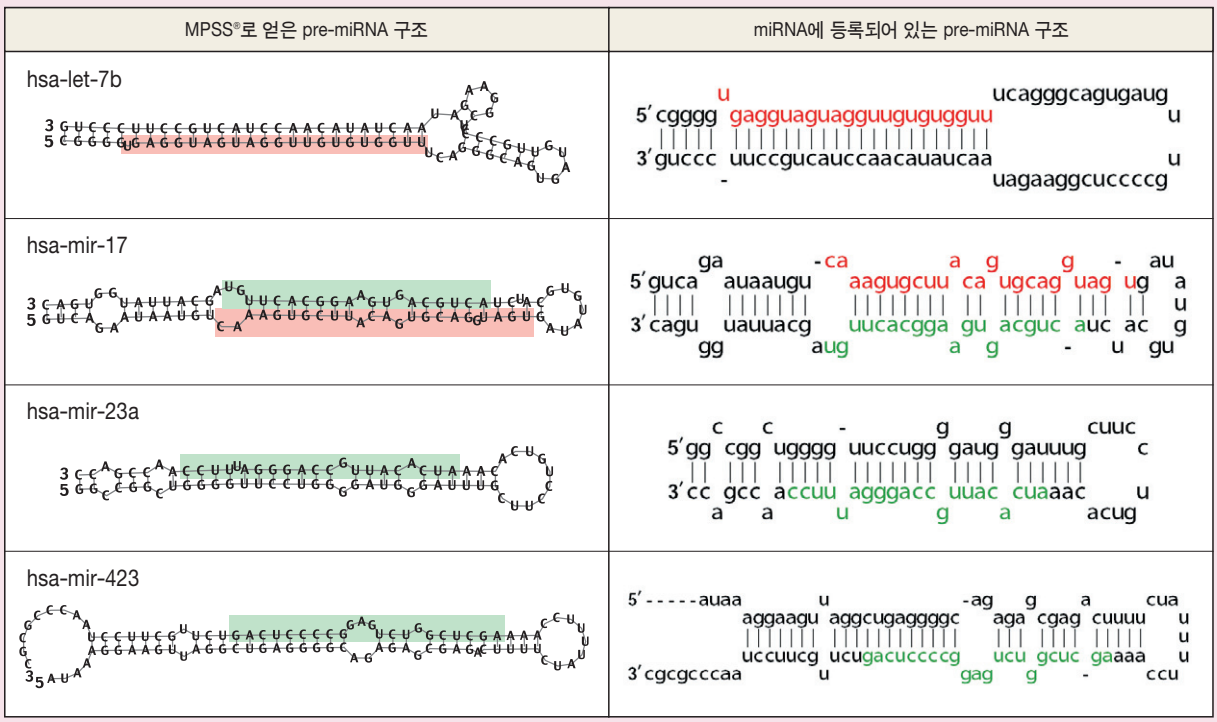


그림 4 해석방법의 검증
좌측 column은 본 방법으로 얻은 전구체 구조, 우측 cloumn은 등록되어 있는 전구체 구조. 각각의 stem과 loop 부분은 일치하였다.

다. 발생 3 단계인 mouse embryo에서 total 6,000,000개의 beads를 해석하고 약 200종류의 이미 등록된 miRNA signature 서열을 얻었다. 이것은 miRBase(release 7.0)에 등록되어 있는 miRNA의 약 85%가 검출된 것이다. 또한 약 200종류의 신규 miRNA signature 서열을 얻을 수 있었으며 등록된 miRNA 전구체의 stem 부분의 상보적인 서열과 다른 동물에서 발견된 homologous 서열 이외의 전혀 새로운 miRNA 후보를 약 100종류 얻을 수 있었다.

MPSS®는 매우 강력한 유전자 발현 정량 해석법으로, clustering 해석 등 일반적인 발현해석에 이용할 수 있다. 암을 분류할 때, 분화가 덜 진행된 암에서는 miRNA의 발현 profile에 의한 분류는 mRNA의 분류보다 분류가 정확하다는 보고도 있어[8] miRNA의 발현빈도 해석이 주목받고 있다.

서비스 내용

Total RNA에서 small RNA 추출, 회수하여 MPSS®로 서열 해석을 한다. 그리고 얻은 서열은 gemone mapping 또는 2차 구조 예측과 같은 bioinformatics 정보까지 포함하여 종합적인 miRNA 해석을 제공한다.

【Small RNA의 종합적인 발현해석 수탁】

· 필요한 시료

Total RNA 200 ㎍ 이상

· RNA 추출

Polyacrylamide gel 전기영동으로 약 18~26 base의 small RNA를 추출한다.

· 클로닝 방법

양 말단에 synthetic RNA adapter를 결합시키고 역전사반응, PCR 증폭 후 클로닝한다.

· 해석 서열 길이

5' 말단에서 18~22 base의 서열(signature)을 MPSS®의 원리로 해석한다.

· 해석 서열수

20만 서열 이상(2 base를 다른 2개의 해석장치로 해석한 signature 합계).

· 자료 처리

얻은 signature를 서열 별로 집계한 후, 시료간 발현빈도 비교가 가능하도록 표준화한다.

· 자료 해석

Signature 서열에 구입 가능한 공개 서열 데이타베이스 정보를 근거로 annotation 정보를 부여한다. Genome에 mapping된 signature에 대해서는 signature 부근의 genome 서열을 추출하여 2차 구조를 예측한 후, 신규 miRNA 후보를 모아서 결과를 발송한다.

【결과】

① 서비스 보고서(일부는 e-mail)

② 서열해석 자료 CD(Microsoft® access 파일: Windows)

【납기】

3 개월(시료 도착 후)

【가격】

당사 연구지원영업부(031-739-3320)로 문의하시기 바랍니다.

【참고문헌】

1) Kim, V. N.(2005) *Mol. Cells*, **19**, 1.
2) He, L., Hannon, G. J., *et al.*(2004) *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 522.
3) Ambros, V., *et al.*(2003) *RNA*, **9**, 277.
4) Brenner, S., *et al.*(2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1655.
5) Brenner, S., *et al.*(2000) *Nature biotechnology*, **18**, 630.
6) Meyers, B. C., *et al.*(2004) *Genome research*, **14**, 1641.
7) Lu, C., *et al.*(2005) *Science*, **309**, 1567.
8) Lu, J., *et al.*(2005) *Nature*, **435**, 834.