

여러 질병의 발병 메커니즘 및 세포분화 제어를 연구하는

## Epigenetics 분석을 위한 시약

후성유전학(Epigenetics)이란, DNA 염기서열 변화는 수반하지 않고 DNA의 methylation 및 histone 단백질의 아세틸화 (acetylation) 등의 후천적인 수식에 의해 유전자 발현이 제어되고, 그 현상이 후대에까지 유지되는 현상을 나타내는 용어이다. 그 주요한 방법 중 하나인 「DNA 메틸화」는 유전자 발현의 억제에 관여하고, 「histone 화학수식」은 전사 제어나 chromatin의 구조 변환 등을 통해서 유전자 발현의 활성화 또는 억제에 관여한다.

최근, 이러한 후성유학적 제어가 여러 가지 질환의 발병 메커니즘 및 세포의 분화 제어 등과 연관성이 있다는 사실이 차례로 밝혀지고 있어, 다양한 연구 분야에서 【epigenetic】 분석의 중요성이 증대되고 있다. Takara Bio에서는 DNA 메틸화 해석을 위한 제품을 비롯하여, 배 (胚) 발생, 유전자 발현, chromatin 기능, genome imprinting, 암 등의 다양한 질병 연구에서의 【epigenetic】 연구를 지원하는 다양한 제품을 순차적으로 출시할 예정이다.

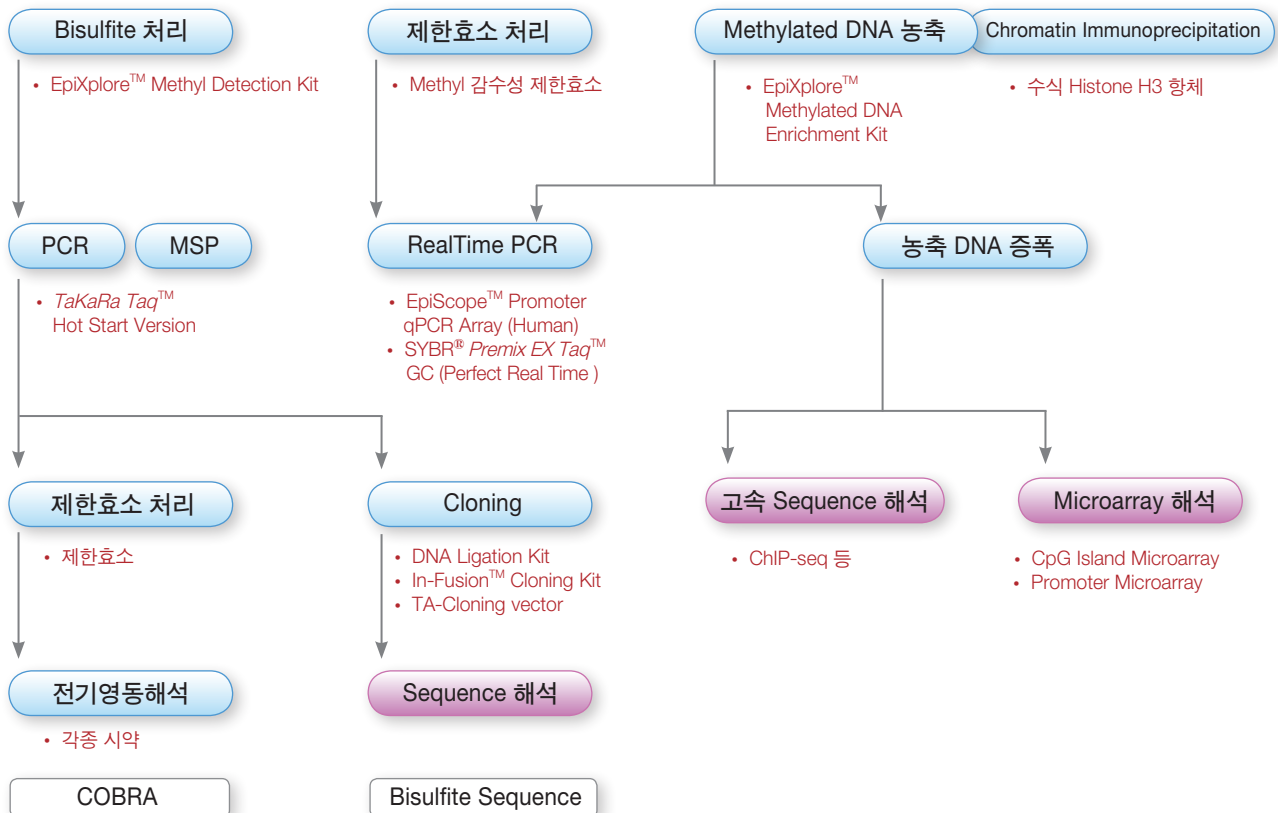
본 고에서는 【epigenetic】 연구에 관한 실험과정을 안내하고, 현재까지 출시된 【epigenetic】 연구와 관련된 신제품을 소개하고자 한다.

### [1] Bisulfite 처리에 의한 염기 변환

EpiXplore™ Methyl Detection Kit (TaKaRa Code 631968)는 genomic DNA로부터 직접 cytosine 잔기의 methylation 위치를 확인하는 제품이다. Bisulfite에 의해 DNA를 변환하는 본 제품을 이용하면 높은 감도로 epigenetic 데이터를 얻을 수 있다.

- 신속 : DNA 중 cytosine 잔기의 변환부터 회수까지 불과 2 시간
- 고감도 : 50 pg의 genomic DNA로도 검출 가능
- 높은 변환 효율과 높은 변환 DNA 회수율
- 처리 후의 DNA는 컬럼 정제로 간편하게 회수

## Epigenetic 해석의 실험 과정



■ Bisulfite Conversion이란?

포유류 DNA에서는 전체 cytosine 잔기 중 2~5%가 5-methylcytosine (5/mC)으로 이는 변형된 염기 (base) 중 가장 많은 부분을 차지한다<sup>1)</sup>. Bisulfite conversion은 단일가닥 DNA 중 변형되지 않은 cytosine과 bisulfate 분자 사이의 반응을 이용한다<sup>2,3)</sup>.

Bisulfite를 처리하면 DNA 중 메틸화되어 있지 않은 cytosine (nonmethylated cytosine)은 uracil로 변환된다. 그러나 메틸화된 cytosine (mC)은 bisulfite 처리 시 변형되지 않기 때문에 bisulfite 가 처리되어 변형된 DNA를 PCR로 증폭하면 methylated cytosine과 nonmethylated cytosine이 구별되며 methylation의 위치를 확인할 수 있다 (그림 1).

■ 실험 방법 (50 pg~5 µg DNA의 처리)

- 1) 1.5 ml tube에 준비한 DNA 용액 (20 µl)에 3 M NaOH를 2.2 µl 첨가해 섞는다.
- 2) 37°C에서 15 분간 반응한다.
- 3) Reagent 1과 Reagent 2의 혼합액 220 µl를 첨가하여 섞는다.
- 4) 80°C로 45 분간 빛을 차단하고 반응한다.
- 5) (초기 시료량이 40 ng 이하면 Salmon sperm DNA를 첨가) Reagent 3을 240 µl 더해서 잘 섞는다.
- 6) Column에 전체 시료를 넣고 10,000× g, 1 분간 실온에서 원심분리한다.
- 7) 폐액을 버리고 Reagent 4 (에탄올 첨가 완료)을 0.5 ml 더한 후 10,000× g, 1 분간, 실온에서 원심 분리한다.
- 8) 폐액을 버리고 10,000× g, 2 분간, 실온에서 원심 분리한다.
- 9) Column을 새 tube에 장착하고, 미리 65~70°C로 데워둔 Reagent 5를 6~50 µl 첨가한 후, 실온에서 1 분간 반응한다.
- 10) 10,000× g, 1 분간, 실온에서 원심 분리한다.
- 11) 미리 데워둔 Reagent 5를 6~50 µl 첨가하는 9) 한번 더 수행 한다.
- 12) 95°C로 20 분간 반응한다.

※ 변형 완료 DNA를 -20 °C에서 보존이 가능하나 3 개월 이상 보존 시 -80 °C로 보존해야 한다.

■ Bisulfite 처리 후 적용 분야

(1) Bisulfite Sequence

Bisulfite 처리 후 methylated DNA와 nonmethylated DNA에 공통의 primer와 TaKaRa Taq™ Hot Start Version (TaKaRa Code R007A/B)를 이용하여 해석 대상 영역을 PCR 증폭하고 cloning하여 sequence 해석을 실시한다.

(2) COBRA법

Bisulfite 처리 후 methylated DNA와 nonmethylated DNA에 공통의 primer를 이용해 해석 대상 영역을 PCR 증폭한다. 증폭된 단편을 methylated DNA와 nonmethylated DNA의 서열을 다르게 인식하는 제한효소로 절단 한 후, 전기영동으로 해석한다. 그 외에 Methylation Specific PCR (MSP) 등이 있다.

■ 실험 Tip

(1) Bisulfite Sequence

Bisulfite 처리 후 PCR 단계에서는 TaKaRa Taq™ Hot Start Version (TaKaRa Code R007A/B)를 추천한다. Bisulfite를 처리한 DNA에는 uracil이 포함되어 있어 α 형의 DNA polymerase에서는 증폭 효율이 좋지 않기 때문에 주의가 필요하다. 또한, bisulfite sequence로 올바른 분석 결과를 얻으려면, 다수의 클론에 대하여 sequencing을 실시할 필요가 있다. 정성적인 분석의 경우에도, 적어도 24 개 이상의 클론을 분석하는 것을 추천한다.

(2) Real Time PCR 해석

DNA 메틸화 해석에서는 유전자 발현과 강한 상관성이 인정되는 전사 개시점 상류 영역 (~300 bp 정도)의 정량을 실시한다. 이 영역에는 CpG island가 존재하며, GC 함량이 높은 sequence를 가진 시료가 많아진다. 그 때문에 methylated DNA를 해석하기 위한 Real Time PCR에는 60~70 %의 GC 함량을 가진 시료에 해석에 적합한 SYBR® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time) (TaKaRa Code RR071A/B)를 추천한다.

Bisulfite 처리와 PCR 증폭



그림 1. Bisulfite conversion을 이용한 methylated DNA 확인

[2] 간편한 Methylated DNA 농축

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit (TaKaRa Code 631963) 는 Methyl-CpG binding domain protein2 (MBD2)와 magnetic bead를 이용해 sonication 등의 방법으로 단편화한 genomic DNA로부터 저밀도 (hypo) 및 고밀도 (hyper)의 메틸화된 DNA 영역을 효율적이고 간편하게 농축·분획할 수 있다 (그림 2).

Methylated DNA 샘플의 농축으로 인하여 DNA 메틸화 해석 시 background가 낮아지고, sequence 해석 외의 다양한 분석으로 보다 확실한 해석 결과를 얻을 수 있다<sup>4)</sup>.

- MBD2와 magnetic bead를 이용해 DNA 메틸화 영역을 간편하고 신속하게 농축
- 메틸화의 빈도에 따라 저밀도 (hypo) 및 고밀도 (hyper)의 methylated DNA를 분획하여 회수
- 고효율 : 95% 이상의 회수율

■ 농축된 메틸화 DNA 샘플의 활용 분야

- Methylation sites의 mapping
- Methylation에 감수성이 있는 제한효소를 이용한 실험
- Real Time PCR, end-point PCR 및 DNA microarray 해석
- 메틸화 부위의 분류 : bisulfite sequencing
- High-throughput sequencing을 위한 library 조제

[3] Real Time PCR (qPCR)에 의한 promoter 영역의 DNA 메틸화 해석

EpiScope™ Promoter qPCR Array (Human) (TaKaRa Code 5301) 제품은 EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit (TaKaRa Code 631963)나 Chromatin Immunoprecipitation에 의해 genomic DNA의 목적 영역을 농축한 후 DNA 메틸화에 의한 발현의 조절이 보고되고 있는 유전자 25 종 (splice variant를 포함한 30 종)의 genomic DNA 영역을 SYBR® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time)을 사용하여 Real Time PCR로 정량하기 위한 primer 세트이다 (표 1). 해석 Tool은 홈페이지에서 무료로 다운로드하여 사용할 수 있으며, 타겟 유전자의 메틸화 상태를 Input-Bound 혹은 Bound-Unbound로 나타내는 그래프를 간단하게 작성할 수 있다.

- DNA 메틸화 해석의 타겟이 되는 25 종의 유전자에 대한 primer를 탑재
- SYBR® Premix Ex Taq™ GC와 조합한 Real Time PCR로, CpG island 부근의 GC rich 영역에서도 고감도 검출
- 메틸화 상태를 시각화하는 그래프 작성 프로그램 제공

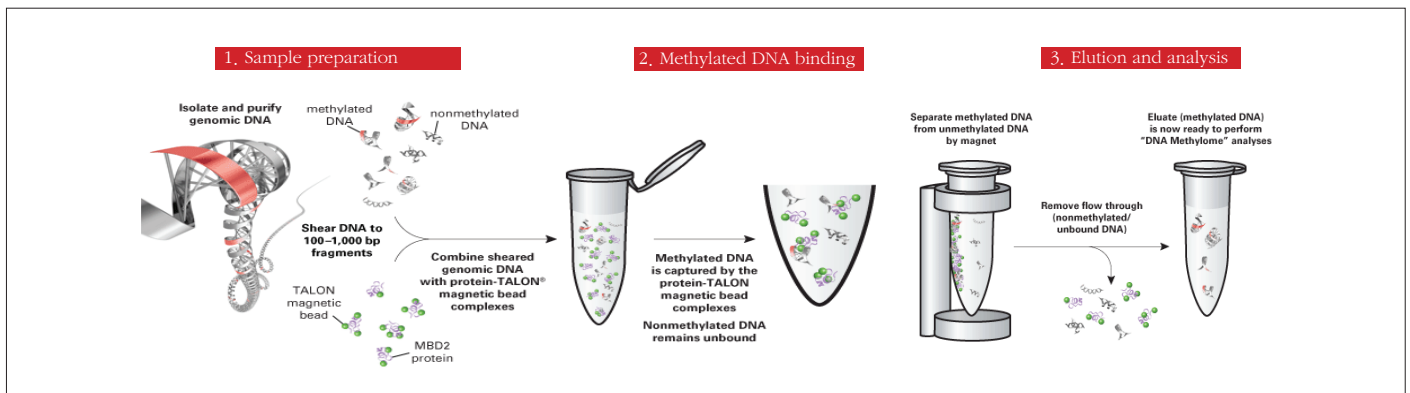


그림 2. The simple EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit protocol

표 1. Array 내 탑재된 유전자 정보:

Symbol	RefSeq	Symbol	RefSeq	Symbol	RefSeq
APC	NM_001127510	CDKN2B	NM_004936	RARB	NM_000965
APC	NM_001127511	CHFR	NM_001161344	RASSF1	NM_007182
BNIP3	NM_004052	DAPK1	NM_004938	RASSF1	NM_170712
BRCA1	NM_00729	DKK3	NM_013253	RASSF1	NM_170713
CADM	NM_001098517	ESR1	NM_000125	RB1	NM_000321
CCNA1	NM_003914	FHIT	NM_002012	SFRP1	NM_003012
CCNA1	NM_001111046	GSTP1	NM_000852	VHL	NM_000551
CCND2	NM_001759	LOX	NM_002317	WT1	NM_000378
CDH1	NM_004360	MGMT	NM_002412	LINE-1	-
CDKN2A	NM_000077	MLH1	NM_000249	GAPDH	NM_002046
CDKN2A	NM_058195	PTGS2	NM_000963		

**[4] ChIP 면역 염색에 의한 수식 histone 국지 분석**

수식 histone H3 monoclonal antibody 시리즈 (각 제품코드는 표 2 참조)는 후성유전학 (epigenetics) 연구를 위한 필수 불가결한 genome 상의 수식 histone 해석을 위한 ChIP에 사용할 수 있다. 광범위하게 이용되어온 기존 polyclonal antibody를 이용한 chromatin immunoprecipitation (ChIP; 크로마틴 면역 침강)은 항체의 제조 lot에 따른 차이 때문에 재현성 높은 결과를 얻기 어려웠다. 본 항체는 높은 특이성을 갖는 mouse monoclonal antibody이며, ChIP 해석 뿐만 아니라 genome 상의 수식 histone의 위치 해석, 면역 염색에 의한 수식 histone의 핵내 국지 해석, Western blot 등에 적용할 수 있다(그림 3).

- ChIP용 mouse monoclonal antibody
- Polyclonal antibody에서는 높은 재현성을 실현
- Antitrimethyl Histone H3 (Lys9), mouse monoclonal antibody 의 총 10 종

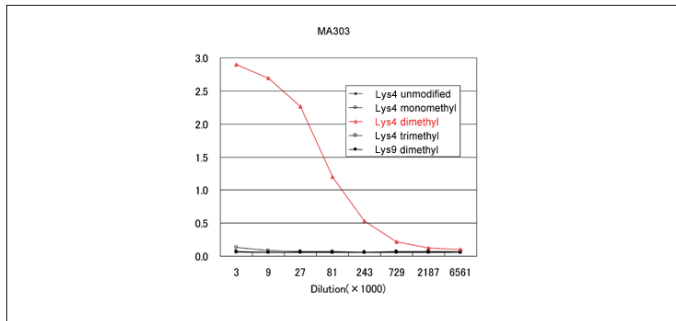


그림 3. Antidimethyl Histone H3 (Lys4)의 특이성을 ELISA법으로 확인

**■ 실험 예1: ChIP 해석에 의한 수식 Histone의 genome 상의 국지 분석**

**[방법]**

HeLa 세포에서 cross link 법에 의해 chromatin을 조제한 후, chromatin immunoprecipitation (ChIP; 크로마틴 면역 침강)을 실시했다. 항체는 Anti-dimethyl Histone H3(Lys9) (TaKaRa Code MA307B), Anti-dimethyl Histone H3 (Lys4) (TaKaRa Code MA303B), Anti-acethyl Histone H3 (Lys9) (TaKaRa Code MA305B)의 3 종류를 이용하였다. Input chromatin 및 각 항체에 의한 면역 침강물에 대해서 타겟 영역의 존재량을 Real Time PCR로 정량하여 input에 대한 %를 구했다 (그림 4).

**■ 관련제품**

제품명	용량	TaKaRa Code
EpiXplore™ Methyl Detection Kit	10 회	631968
EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment and Detection Kit	10 회	631967
EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit	10 회/20 회	631963/631962
Magnetic Stand	1 set	631964
EpiScope™ Promoter qPCR Array (Human)	1 Set	5301
SYBR® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time)	200 회 (50 µl 반응)	RR071A
	200 회 (50 µl 반응)	RR071B

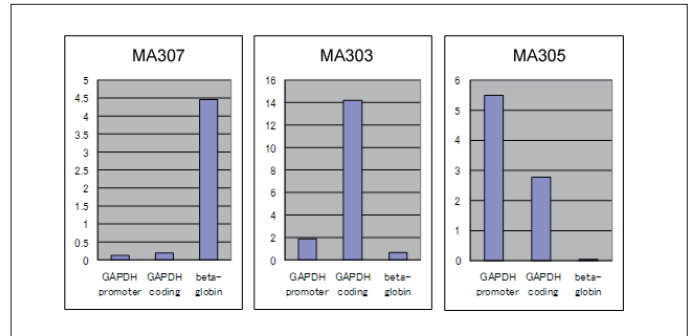


그림 4. ChIP 해석 결과

※ 본 실험 데이터는 Osaka 대학의 Kimura Hiroshi께서 제공해 주셨습니다<sup>5)</sup>.

**[결과]**

Anti-dimethyl Histone H3 (Lys9) 항체에서는 전사가 억제되고 있는 β-globin의 회수율이 높고, Anti-dimethyl Histone H3 (Lys4), Anti-acethyl Histone H3 (Lys9)에서는 전사가 활성화 되고 있는 GAPDH의 회수율이 높아졌다.

표 2. 수식 Histone H3 antibody (Mouse monoclonal antibody) 제품 리스트

제품명	용량	TaKaRa Code
Anti-Histone H3	100 µl	MA301B
Anti-monomethyl Histone H3 (Lys4)	100 µl	MA302B
Anti-dimethyl Histone H3 (Lys4)	100 µl	MA303B
Anti-trimethyl Histone H3 (Lys4)	100 µl	MA304B
Anti-acethyl Histone H3 (Lys9)	100 µl	MA305B
Anti-monomethyl Histone H3 (Lys9)	100 µl	MA306B
Anti-dimethyl Histone H3 (Lys9)	100 µl	MA307B
Anti-trimethyl Histone H3 (Lys9)	100 µl	MA308B
Anti-acetyl Histone H3 (Lys27)	100 µl	MA309B
Anti-acetyl Histone H3 (Lys9/27)	100 µl	MA310B

※ 본 제품은 (주)MBA Institute Inc.의 제품입니다.

**■ 참고문헌**

1. Bird, A. (1992) *Cell* **70**(1):5-8.
2. Frommer, M., et al., (1992) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**(5):1827-1831.
3. Hayatsu, H., et al. (1970) *Biochemistry* **9**(14):2858-2865.
4. Yegnasubramanian, S. et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**(3):e319.
5. Kimura H., et al., *Cell Struct. Funct.* (2008) **33**(1):61-73.