

## Technical Note 1

# Ovation™ RNA Amplification System V2

## 성능에 관한 연구

### 서론

NuGEN의 RNA 증폭 제품 시리즈를 이용하면 매우 적은 양의 RNA를 사용하여 탁월한 유전자 발현 결과를 얻을 수 있다. 많은 연구에 **Ovation Biotin RNA Amplification and labeling System** (Code 2300) 제품이 사용되었으며, 이 제품은 Affymetrix GeneChip arrays에 적용하기 위한 증폭(amplification), 단편화(fragmentation), 라벨링(labeling) 과정에 필요한 구성품을 모두 포함하고 있어 microarray 분석을 위한 cDNA 증폭 및 array 결과 검증을 위한 qPCR 분석에 사용되고 있다.

NuGEN은 결과의 일관성, 실험 시간과 비용 감소 등의 장점을 갖고 있는 다양한 제품을 갖추고 있다. 이들 제품 중 **Ovation RNA Amplification System V2** (Code 3100-12, 3100-60)를 사용하여 증폭한 cDNA는 바로 qPCR에 사용할 수 있으며 또한 이후에 **FL-Ovation cDNA Biotin Module V2** (Code 4200-12, 4200-60)를 사용하여 cDNA를 단편화와 라벨링 (F&L) 하면 GeneChip array 분석에 사용할 수도 있다. F&L 모듈은 간단하고 최적화된 방법으로 2시간 이내에 타겟을 준비할 수 있으며 별도의 정제 단계가 필요 없기 때문에 보다 쉽고, 보다 샘플준비의 자동화가 용이하며, 비용, 처리시간 및 에러율까지 줄일 수 있다.

NuGEN의 제품라인은 연구자가 최대한 다양하게 선택할 수 있도록 모듈식으로 구성되어 있다. 그 예로, 연구자가 처음에는 샘플을 이용하여 qPCR만을 수행하지만, 후에 동일한 샘플의 cDNA를 이용하여 microarray에 적용하고자 한다면, F&L 사용이 가능하도록 cDNA를 증폭하면서 당장은 초기 실험에 필요한 cDNA를 증폭 제품만을 구입할 수 있다.

이러한 NuGEN의 제품라인은 대형 공동 프로젝트에 사용하면 상당히 유용할 것이다. 왜냐하면 다양한 분야에서 공동연구를 진행하는 경우에 동일한 샘플을 사용하여 다양한 유전자발현 검출 시스템이나 분석방법을 사용해야 하는 경우가 있는데 이 경우에는 샘플의 균질성(homogeneity)을 유지해야 한다. Ovation System으로 증폭한 cDNA는 일관성(consistency)이 있으며, 안정적이고 표준화되어 있어 샘플 양이 적고 한정되어 있는 샘플을 공동연구에 사용하고자 할 때 적합하다.

이 보고서에서는 qPCR을 이용하여 Ovation RNA Amplification System V2 (Code 3100)의 효율을 나타내었고, FL-Ovation cDNA Biotin Module V2 (Code 4200)를 사용하여 GeneChip array 분석 결과를 보여주고 있다.

### 재료 및 방법

이 연구에 사용한 RNA는 다음과 같다.

|                     |                             |
|---------------------|-----------------------------|
| HeLa cell line RNA  | (Ambion, Cat. # 7852)       |
| UHR total RNA       | (Stratagene, Cat. # 740000) |
| Spleen total RNA    | (Ambion, Cat. # 7970)       |
| Placental total RNA | (Ambion, Cat. # 7950)       |

Ovation RNA Amplification System V2 (Code 3100)를 사용하여 모든 RNA를 증폭하였으며, 실험 프로토콜은 제품 사용자 가이드에서 설명한 절차에 따라 진행하였다.

Real Time PCR 실험은 Universal ProbeLibrary와 프라이머 제작 소프트웨어를 이용하여 설계하였다. 프라이머는 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)에 의뢰하여 합성하였으며, multiple assay의 경우 프라이머를 각 유전자의 5' 부분, 중간 부분, 3' 끝부분에 디자인하여 진행하였다. 데이터 선택 기준은 efficiency가 100%에 가깝고, slope가 1 +0.1 인 경우로 하였다. 실험에 사용한 프라이머 및 probe의 정보와 accession number는 요청시 제공 가능하다.

qPCR 반응에는 단순히 증폭한 cDNA를 정제 없이 1/10로 희석(1 X TE (PH 8. 0)이용)한 cDNA와 정제한 cDNA 20 ng을 사용하였으며, 사용한 프라이머와 probe는 아래와 같다.

1. 5 nM forward & reverse primer, 100 nM ProbeLibrary probe
2. Assays-on-Demand primer and probe mix (ABI)

반응 시약은 TaqMan Fast Universal PCR master mix를 사용하였으며, 최종반응 양은 20  $\mu$ l로 하였다. qPCR 기기는 ABI7500의 fast block installation을 사용하였으며 반응은 기본 프로토콜로 진행하였다.

GeneChip array 분석을 위하여, 증폭한 cDNA의 단편화와 라벨링에는 FL-Ovation cDNA Biotin Module V2(25  $\mu$ l 반응에 3.75  $\mu$ g의 cDNA이용)를 사용하였으며, array는 HG-U133A 2.0. GeneChip arrays (Affymetrix, Cat.# 900469)를 이용하였다. 실험에 사용한 cDNA 최종농도는 17 ng/ $\mu$ l였다. Array 결과는 Affymetrix GCOS software(GeneChip Operating System, 1.4.0.036)를 이용하여 분석하였다.

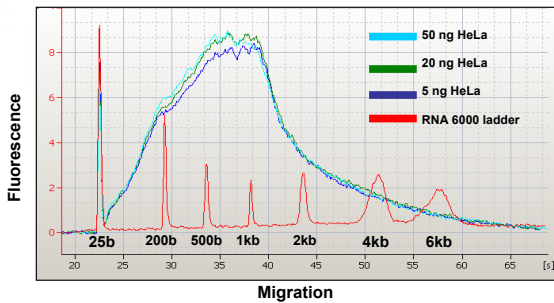
Total RNA 정량은 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Wilmington, DE)을 사용하였으며, 증폭한 cDNA 검정은 RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Cat. # 5065-4476)과 Eukaryotic Total RNA Nano program (Nano assay in the Expert 2100 software)을 이용하였다.

**결 과**

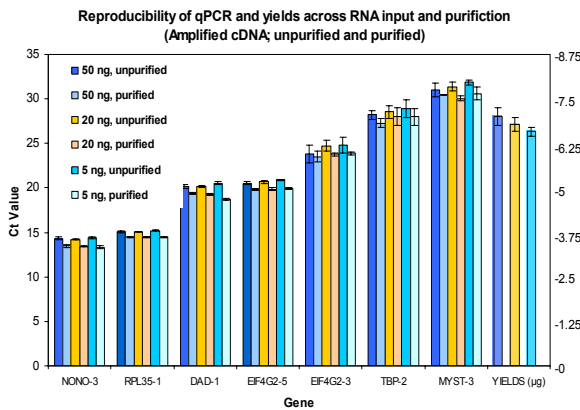
**초기 RNA양에 상관없는 재현성과 최고의 증폭 효율**

50, 20, 5 ng의 total HeLa RNA를 사용하여 증폭한 cDNA를 Agilent Bioanalyzer를 이용하여 비교하였고, 그 결과 초기 RNA양에 상관없이 유사한 양상을 나타내었다(그림 1). 이 cDNA를 정제한 cDNA와 정제하지 않은 cDNA로 나누어 7개의 유전자의 발현을 qPCR로 분석하였다. 이 결과 또한 초기 RNA양은 물론, 전사산물transcript의 양에 상관없이 매우 민감하고 재현성이 높게 증폭되었다(그림 2).

증폭된 UHR과 HeLa RNA의 cDNA 양은 그림 2, 3에 표기하였다. 다른 조직에서 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 증폭한 경우에도 일정하게 4~8 µg 정도의 cDNA가 증폭되었고, RNA를 추출하기 어려운 태반placenta이나 전혈whole blood에서도 최소 4~5 µg의 cDNA가 증폭되었다.



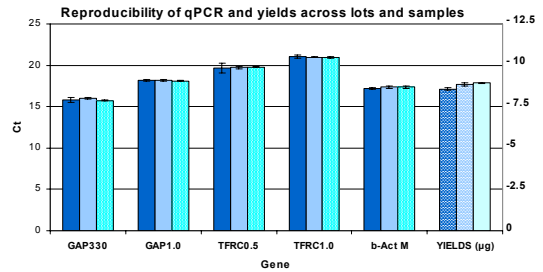
**그림 1.** Size distribution of amplified cDNA across total RNA input. Amplified cDNA using 50, 20, and 5 ng of total HeLa RNA show consistent profile and size distribution across RNA input range upon analysis of Agilent Bioanalyzer traces.



**그림 2.** qPCR and yields reproducibility across total RNA input and transcript abundance. 50, 20, and 5 ng of HeLa total RNA were amplified in triplicate. qPCR results for 7 transcripts show reproducible and consistent results with and without purification of amplified cDNA. Yields, shown on the left axis of the graph, also show highly reproducible degrees of amplification across inputs

**제품 lot에 상관없이 재현성과 최고의 증폭 효율**

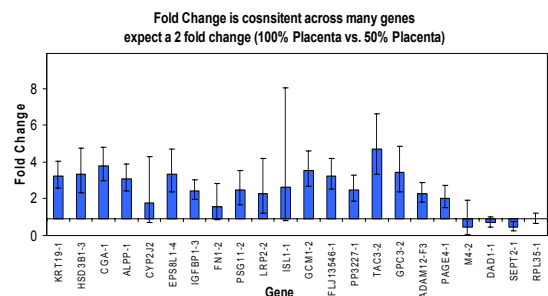
Ovation RNA Amplification System V2의 lot에 따른 결과를 비교하기 위해 서로 다른 3개 lot을 사용하여 실험을 진행하였다. UHR RNA(5 ng)를 Ovation RNA Amplification System V2를 사용하여 증폭하고, 2반복duplicate으로 5개의 유전자의 발현량을 비교하였다. cDNA 증폭량과 3개 lot의 qPCR 결과는 거의 일치하였으며, 재현성도 나타내었다(그림 3).



**그림 3.** qPCR and yields reproducibility across multiple product lots. 5 ng of UHR total RNA was amplified in triplicate for 3 different lots of the Ovation RNA Amplification System V2. qPCR results for 5 genes show reproducible and consistent amplification. Amplified cDNA yields, shown on the left axis of the graph, also show very consistent amplification across multiple lots.

**증폭된 cDNA는 일관된 fold change를 보임**

태반, 비장spleen 조직을 이용하여 다중혼합 RNA를 준비하였다(자세한 내용은 별도문의). cDNA 증폭에는 100% 태반 RNA 5 ng과 태반/비장 RNA(50 : 50) 5ng이 사용되었다. cDNA 증폭 후에 qPCR을 이용하여 태반에서만 발현되는 18개의 유전자를 분석하여 fold change를 비교하였다. 2-fold change는 100% 태반 RNA와 1대1로 태반과 비장 RNA가 섞인 RNA를 비교하였을 때 나타날 것으로 예상되었다. qPCR 실험결과 대부분의 유전자에서 약 2배 차이를 나타냈다(그림 4). 에러바의 높이가 일정한 것은 증폭한 샘플에서 일정하고 정확하게 fold change가 일어났음을 보여주는 것이다. RPL35-1은 Ct 값의 nomalizer로 사용되었으며, M4-2, DAD1-1, SEPT2-1은 housekeeping 유전자로 사용하였고, 이 유전자들은 비장에서 조금 더 높은 발현을 보였다.



**그림 4.** qPCR data shows expected and consistent fold change: Using a tissue mixing model, amplification of 5 ng of a 100% Placenta RNA sample vs. a 50% mix of Placental and Spleen RNA and consequent qPCR assays of a panel of 18 Placenta-specific genes showed that the expected 2 fold changes observed and maintained across the different transcripts. The rightmost 4 genes in the graph are housekeeping genes, and the very rightmost gene, RPL35-1 was used as a normalization gene.

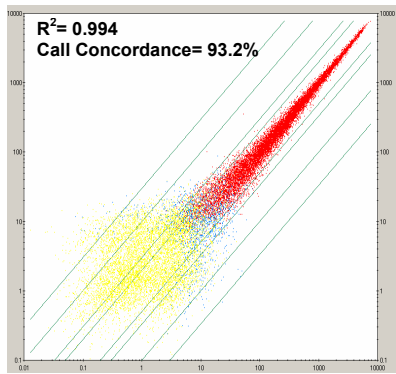
**높은 array metrics와 높은 signal correlation, call concordance를 나타냄.**

5 ng의 HeLa RNA를 2회 증폭하여 얻은 cDNA를 다편화와 라벨링 과정을 거쳐 GeneChip array에 hybridization시켰다. 그림 5의 표에 array의 결과를 나타냈다. Scaling factor, Background, % present calls, 3'/5' 비율 등이 모두 허용 가능한 수준으로 나타났다.

그림 6에서는 5 ng HeLa RNA를 이용하여 GeneChip array 결과를 분석한 결과, 중복duplicate 실험에서 0.994의 signal correlation과 93.2%의 call concordance 값을 보여주었다. 이 결과는 증폭된 cDNA 타겟이 높은 수준의 재현성과 일관성을 가지고 있음을 보여준다.

| Raw Q | Scaling Factor | Back-ground | % Present | (3'/5') GAPDH | 3'/5' Actin |
|-------|----------------|-------------|-----------|---------------|-------------|
| 0.97  | 0.69           | 34.5        | 64.1      | 1.30          | 4.1         |
| 0.98  | 0.59           | 34.4        | 65.6      | 1.21          | 3.8         |

and labeled in duplicate, and hybridized to HG-U133A 2.0 GeneChip arrays, show robust and reproducible array metrics.



**그림 6.** High reproducibility demonstrated by signal correlation and call concordance : 5 ng of HeLa RNA, amplified, fragmented and labeled in duplicate, as previously described show high signal correlations of R<sup>2</sup> of 0.994 and call concordance of 93.2% demonstrating very high level of reproducibility between independently processed samples.

**결론**

Ovation RNA Amplification System V2를 사용하면 5 ng의 매우 적은 total RNA를 이용해서도 재현성 높은 증폭을 할 수 있다는 것을 보여주었다. 이와 같이 적은 양의 RNA만 필요하기 때문에 극미량의 샘플, 희소 가치가 높은 샘플, 샘플 중에 극소량만 사용해야 하는 실험 등에 쉽게 적용할 수 있다. 특히 대체할 수 없는 제한적인 임상 샘플 분석에 매우 중요한 툴로 사용할 수 있다.

간단하고, 빠르며, 자동화 과정에 쉽게 적용할 수 있는 Ovation의 특징은 높은 감도와 특이성 높은 cDNA를 증폭시켜 우수한 array 결과를 얻을 수 있어 대형 유전자 발굴 실험과 임상연구에 이상적이다.