

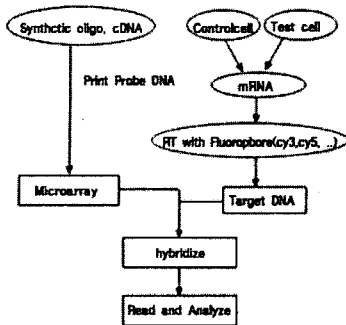
The Application of DNA Microarray in Functional Genomics

What is "Functional Genomics?"

최근에 생물학은 지식이나 실험적인 측면에서 거대한 변화의 물결 속에 있다. 이 분야는 정보가 빈약한 학문에서 정보가 넘쳐흐르는 학문으로 되어가고 있다. 이 정보들은 DNA와 단백질 분석의 기술적 발전에 기인한다. DNA의 경우 이러한 기술적 발전에 의해 막대한 양의 염기서열 정보가 축적되어 가고 있다. 과거 몇 년 동안 30개 이상의 생물체의 게놈 염기서열이 완전히 밝혀졌고, 다른 100개 이상의 생물체의 염기서열 확인이 진행 중에 있다. 인간의 게놈 염기서열도 이 삼 년 안에 Human Genome Project에 의해 완전히 결정될 예정이다. 그러나, 염기서열의 정보만으로는 그 유전자가 어떤 기능을 갖고 있는 지, 세포가 어떻게 작용하는 지, 세포들이 어떻게 생물체를 구성하는 지, 어느 질병에서 무엇이 잘못 되었는지, 노화가 어떻게 진행되는지, 또는 어떻게 신약을 개발하는지 등을 알 수 없다. 따라서 일단 어느 생물체의 염기서열이 결정되면, 그 유전자들의 기능을 밝히는 일이 'post-genomic' 시대에 생물학자들이 도전해야 할 업무이다. 이것을 'functional genomics'라 한다. 이의 목표는 생물체의 각각 유전자의 기능을 고효율이고 체계적인 방법으로 밝혀내는 것이다. 이 방법들에는 DNA microarray, proteomics, bioinformatics, 와 genetic fingerprinting등이 있는 데, 여기서는 DNA microarray를 이용한 functional genomics에 대해 설명하려한다.

What is DNA Chip?

최근에 그 양이 급속히 증가하고 있고 막대한 염기서열 정보를 이용하기 위해서는 새로운 기술이 필요하게 되었다. 이 중의 하나가 oligonucleotide나 cDNA의 고밀도 집적 array인 DNA chip이다. 이것은 cDNA, genomic DNA, 나 plasmid library로부터 나온 여러 DNA 조각들을 유리 표면에 robotics 기술을 사용하여 아주 작은 점으로 spotting한 것을 말한다. DNA chip에는 cm^2 당 적게는 수 백 개에서 많게는 수 만개의 DNA종류가 붙어 있고, 형광 물질 등으로 표지된 DNA나 RNA를 hybridization시킨다. 이는 기존의 Southern이나 Northern blot과 비슷하나, 하나의 chip에 여러 종류의 DNA가 부착되어 있어 많은 수의 유전자를 동시에 분석할 수 있고, 극히 소량의 샘플을 필요로 한다는 장점이 있다. DNA chip을 제조하는 데는 여러 변형된 방법을 사용할 수 있는 데, 예를 들면 hybridization 반응을 전기적 힘으로 일어나게 하거나, 형광 이외의 방법으로 탐지를 하거나, 유리이외의 플라스틱, 실리콘, 금, 젤, 또는 막을 DNA를 부착하는 고정체로 사용하는 방법이 있다. DNA chip으로부터 나오는 data의 양은 방대하기 때문에 사람이 일일이 분석하는 것은 매우 어렵다. 따라서 이러한 data를 분석하여 필요한 정보를 얻기 위한 여러 분석 software들이 나와 있다. 아래에서는 DNA 실험 과정에 대해 설명하였다 (그림 1.)



- 그림 1) DNA chip 실험 과정 -

Preparation of DNA Chip.

1. Microarray 제작

Chip을 제작하는 방식은 기판 위에 oligonucleotide를 직접 합성하는 방식과 합성 또는 증폭된 탐침 DNA (oligonucleotide 또는 cDNA)를 기판 위에 심는 방식으로 나뉜다. 전자는 반도체 chip을 제작하는 방식에서 유래된 photolithographic 방법을 근간으로 개발된 것으로 고 밀도 집적이 가능한 반면 probe DNA의 길이가 20 nucleotides 내외로 제한되는 단점이 있다. 이는 질병의 진단 혹은 SNP의 연구 등에 많이 응용되고 있다. 반면 cDNA microarray는 유전자 발현의 차이를 연구 (differential gene expression) 하는데 많이 응용되며 poly L-lysine, amine, 혹은 aldehyde로 coating된 슬라이드 위에 탐침 DNA를 심는다. 각 슬라이드의 반응 기전을 그림 2에 표시하였다. 탐침 DNA는 PCR로 증폭된 1 μ M 정도의 DNA를 2 nano liter 내외로 심는다. aldehyde로 coating된 슬라이드에 사용되는 primer는 5' 말단을 amino 그룹으로 바꾼 PCR primer를 사용하고, 그 외의 슬라이드는 일반적인 primer를 사용한다. 탐침을 준비하는 PCR 증폭과정은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation시키고 이후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 30초로 30cycles, 다음 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension시키는 프로그램을 이용 할 수 있다. PCR 반응 조성 예은 다음과 같다 : template 50~100 ng, 2.5mM dNTP mix 10 μ l, 10X 완충액 10 μ l (25mM MgCl₂ 포함), 100 μ M C6-linked NH₂-modified T7 primer 1 μ l, 100 μ M C6-linked NH₂-modified T3 primer 1 μ l, 그리고 Taq polymerase 1 μ l(1U/ μ l)와 3차 증류수로 50 μ l를 채운다. 탐침을 심는 방법은 piezoelectric 방법을 이용한 inkjet 방식의 micropipetting법 (Gesim, Nano-plotter), pin 형태의 spotter (Bio-Robotics, Cartesian)등이 있으며 이때 spot의 직경 크기는 150 μ m 내외가 되며 약 1000 spots/cm² 정도가 심어진다. 일반적으로 binding 용액으로는 3X SSC용액을 사용하나 최적의 probe binding을 위한 실험 조건을 확립하여야 한다.

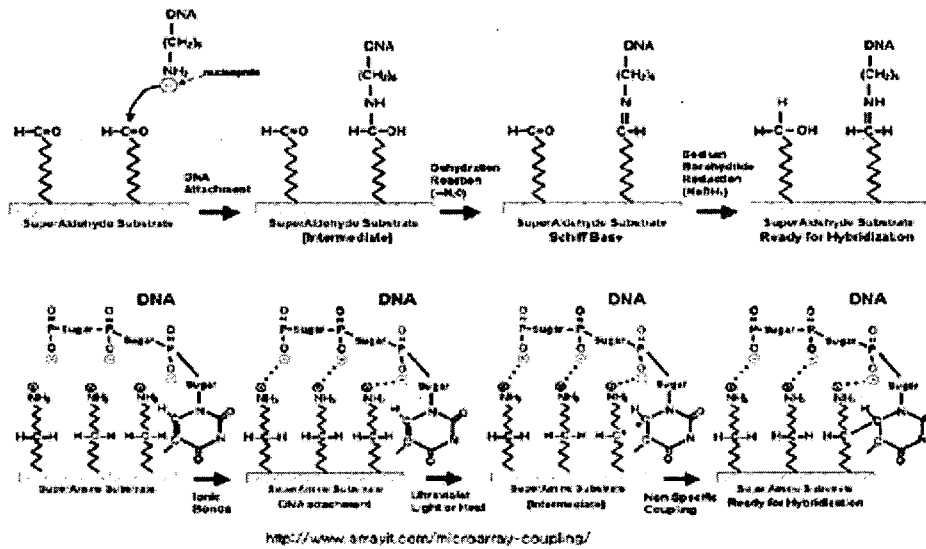


그림 2. DNA와 슬라이드 위의 coating 물질과의 반응 기전.

2. Target DNA 준비

Target DNA는 probe DNA의 염기 서열과 서로 상보적인 서열을 갖고 있어 이들의 결합정도가 유전자의 발현량을 결정한다. 효율적인 target DNA를 준비하기 위해서는 깨끗한 mRNA의 준비가 필수적이며 이 목적으로 상용화된 mRNA 분리 kit를 사용하는 것을 권장한다. 분리된 mRNA의 양에 따라 직접 검출 방법, 간접 검출 방법, 혹은 cRNA target 등의 방법을 이용할 수 있다. 1 μ g 내외의 mRNA를 사용할 수 있으면 형광으로 표지된 핵산을 직접 역 전사 반응을 이용하여 target DNA에 넣어 사용할 수 있고, total RNA의 양이 4 μ g내외로 준비되면 간접 검출 방법으로 Tyramide Signal Amplification (TSA, NEN)을 사용할 수 있다. 또한 promoter 지역을 포함한 target cDNA를 준비하면 cRNA를 제조하는 과정에서 적은 양의 RNA 한계성을 다소 극복할 수 있다. 역 전사 반응은 상용화된 kit (예 ; Copy kit of Invitrogen)을 아래와 같이 다소 조절하여 사용한다. Eppendorf tube에 약 1 μ g 정도의 mRNA, 5 μ l (0.2 μ g/ μ l)의 oligo (dT) primer, 아래의 첨가물을 제외하고 50 μ l가 되도록 3차 증류수를 넣는다. 이것을 65 $^{\circ}$ C에서 10분간, 상온에서 2분간 방치한 후 1 μ l의 dNTP(25mM, dCTP 제외), 2 μ l dCTP(1mM), 2 μ l의 Cy3-dCTP(1mM) 혹은 Cy5-dCTP(1mM), 10 μ l의 5x 역전사 완충액, 2 μ l의 MMLV 역 전사 효소 (25U/ μ l), 1 μ l의 RNase inhibitor (10U/ μ l)를 넣은 후 42 $^{\circ}$ C에서 5시간 반응시킨다. 2.5 μ l의 2N NaOH와 1 μ l의 50 mM EDTA를 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 RNA를 제거하고 에탄올 침전 후 20 μ l의 3차 증류수에 녹여서 hybridization 반응에 사용한다. 표지 형광 물질은 scanner의 레이저 종류에 따라서 선택 할 수 있다. 즉 excitation wavelengths, emission wavelengths 및 emission filters를 고려하여 Cy3, Cy5 이외에 Fluorescein, Tetramethylrhodamine, Rhodamine등도 사용이 가능할 것으로 사료된다.

3. 혼성화 반응 (Hybridization)

Cover glass 밑에서 소량의 target을 사용하여 이루어지므로 시험 도중 target의 건조를 방지하여야 한다. probe DNA의 양이 target DNA 보다 약 10배 이상 유지되어야 발현되는 양과 형광 intensity 사이의 linearity를 확인할 수 있다. 혼성화 온도는 염기 서열, ionic strength, destabilizing agent (예를 들면 formamide), 점성도 (dextran의 첨가)등을 고려하여 경험적으로 결정하여야 하나 일반적으로 oligonucleotide microarray (25 - 42 °C)가 cDNA microarray (55 - 70 °C)보다 낮은 온도에서 진행된다. 5X SSC, 0.2% SDS, 1mg/ml herring sperm DNA가 포함된 혼성화 용액을 사용할 경우 cDNA array의 경우 60 - 65°C에서 15시간 내외의 혼성화 반응을 시킬 수 있다. Target DNA를 95 - 100°C에서 5분간 가열하고 65°C로 식힌 후, 65°C에서 2 시간 동안 혼성화 용액으로 pre-hybridization 시킨 DNA chip에 넣어 혼성화를 시킨다. 혼성화 후 슬라이드를 65°C의 2X SSC, 0.1%SDS 용액에서 5분간 2회 세척하고, 실온의 0.2X SSC 용액에서 1분간, 실온의 0.1X SSC 용액에서 1분간 세척 후 3차 증류수에 행군 다음 건조시켜 분석한다.

4. DNA Chip의 분석

Microarray를 읽는 장치는 CCD camera system, non-confocal laser scanner, confocal laser scanner (그림 3)로 나뉘며, 각각의 장치는 장단점이 있고 각 실험의 목적에 따라 적절한 기종을 선택하여 사용한다. CCD camera system은 빠르지만 numerical aperture가 낮은 단점이 있고, nonconfocal은 작동이 간단하나 background artifact가 높다. 현재로는 artifact의 문제나 background 측면에서 볼 때 confocal system이 가장 바람직하다. Scanner에서 정밀도가 높은 상을 얻기 위해 레이저의 종류 이외에 excitation power, numerical aperture, transmission filters, PMT voltage level등을 충분히 고려하여야 한다. 또한 DNA chip의 분석 시 spot의 형태에 따라 정량 법을 달리 하여야 한다. Spot의 균일성, 모임 현상, 먼지 등 이물질의 존재 여부에 따라 histogram, fixed circle 방법, adaptive법이 응용될 수 있다. Adaptive 법은 동일한 spot내에 밝고 어두운 점이 같이 존재할 때 유용하며, spot 내에 noise가 존재할 때는 fixed circle 법이 우수하다. 이외에 black hole, 도넛모양, 퍼진 모양 등의 상태에 따라 적합한 정량 법을 사용하여야 한다. 이를 위한 프로그램은 QuantArray (GSI Lumonics), Imagen (Biodiscovery)등이 사용되고 있다. 실험 결과 (그림 4)는 발현 차이의 기준을 정하여 (threshold) 유의성있게 변화한 유전자를 모아서 (clustering), 주석을 달아 발현 양상의 차이를 살펴본다. 필요한 경우 데이터를 모으는 기준을 변화시켜 더 연구할 유전자의 수를 조절할 수 있다.

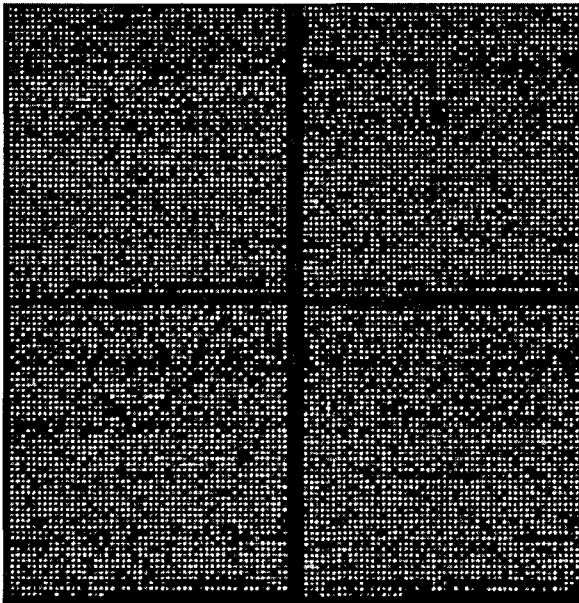
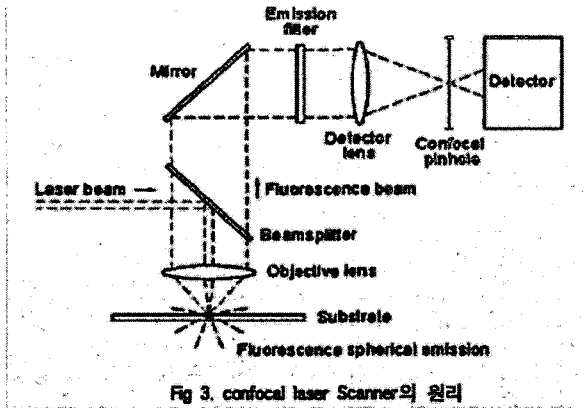


그림 4. DNA microarray 실험 결과의 예.

Application

DNA microarray의 첫 번째 응용 분야는 gene discovery이다. mRNA들의 발현 정도가 얼마나 연관이 되어 있는가에 따라 그들이 encoding하는 단백질간의 functional linkage를 유추할 수 있다. 따라서 기존에 그 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자를 발견할 수 있다. 다음으로 DNA chip은 질병 진단에 사용할 수 있다. 즉, 유전자 발현이 특이한 질병에서 변하는 marker들을 이용하여 진단을 할 수 있는 데, 한 유전자로만은 확실히 진단을 할 수 없으나, 약 50개 이상의 유전자들을 사용하면 정확한 진단이 가능하다. 또 하나의 응용 분야는 drug discovery이다. 이것은 어떤 약에 대한 치료 효과와 유전자 발현 프

로필의 관계를 알아내어 그 질병에 맞는 약을 개발하는 데 사용할 수 있다. DNA chip은 독성 연구에도 사용되어 진다. 즉, 어떤 독물에 대한 독성 반응과 그 독물에 노출된 유기체의 유전자 프로필 변화 사이의 관계를 이용하여 임의의 물질의 독성을 측정할 수 있다. 또한 어느 개인의 유전자 프로필을 DNA microarray로 검사하여 어떤 약이 그 개인에 대한 독성이 없이 적합한 지를 알아내어 각 개인에 맞는 맞춤형의 조제가 가능하게 된다.

결론

DNA microarray는 최근에 개발된 기술로 아직 초보적인 상태이나 점점 발전함에 따라 보다 많은 분야에 사용되어 질 것이다. 그 기술은 궁극적으로는 단 하나의 세포에서 추출된 RNA로 그 유기체의 모든 유전자의 발현 상태를 검사할 수 있는 단계까지 발전될 것이다. DNA microarray는 전통적인 생물학이나 bioinformatics등과 함께 모든 유전자와 단백질의 기능을 알아내고 세포 내에서 어떤 과정이 일어나고 있는 지와 이 과정 중에서 어떤 부분이 잘못되어 질병이 발생하게 되는 지를 발견함으로써 그 질병의 예방 및 치료 방법을 개발하는 데 커다란 기여를 할 것이다.

참고문헌

1. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):15-19.
2. Ramsay G. DNA chips: state-of-the art. *Nat Biotechnol.* 1998 Jan;16:40-44.
3. Bertrand Lemieux, Asaph Aharoni and Mark Schena Overview of DNA Chip technology *Molecular Breeding* 1998 4:277 - 289
4. Juan Enriquez Genomics and the world's economy *Science* 1998 281 : 925 - 926
5. Chris Sander Genomic medicine and the future of health care *Science* 2000 287 1977 - 1978
6. Joos, B., Kuster, H., and Cone R. Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports. *Anal. Biochem.* 1997 247, 96-101
7. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown P., O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995 270, 467-470