

심포지엄 초록

1

영양학의 분자생물학적 연구방법론

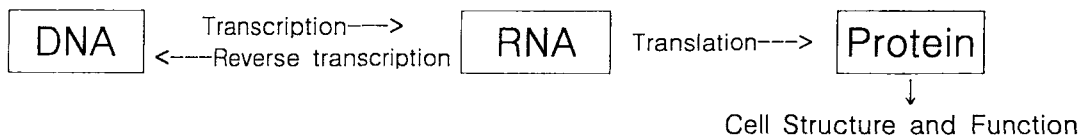
차 연 수

전북대학교 식품영양학과

영양학 분야의 다양한 연구에서 생명현상을 물리, 생화학 및 사회적 측면에서 이해하고자 했던 시도는 인체대사의 복잡성이나 인간유전체의 개인차이 때문에 실험결과를 명확히 설명할 수 없는 한계에 도달하게 되었다. 최근 인체게놈 프로젝트(Human Genome Project)의 연구결과와 생명과학 연구방법론의 혁신적인 개혁은 영양학 연구에서도 새로운 접근방법을 유도하고 있다. 즉, 지노믹스(genomics)의 등장은 생물정보학(bioinformatics), 마이크로어레이(microarray), 프로티오믹스(proteomics) 등의 관련 기술의 발달을 가져 왔으며, 이들로 인해 포괄적인 생명현상 네트워크에 대한 이해가 가능할 것으로 예상된다. 따라서 앞으로의 영양학 연구에 있어서 이들 기술의 도움이 필수적이며, 이를 통해 각종 영양소 및 식이성분이 특정 유전자 뿐 아니라 동시에 수천개의 유전자간의 상호작용과 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하고 이용하며, 개인의 유전자 차이가 식이 및 영양에 따른 표현형(phenotypes)의 차이에 미치는 영향을 연구할 수 있을 것으로 예상된다. 다음은 분자생물학의 기본기술과 형질전환동물생산 등의 응용기술 및 마이크로어레이 등의 최신 기술에 대하여 설명하였다.

I. Blottings

세포내 거대분자들(DNA, RNA and Protein)의 분석을 위한 기술이다.



1. 정의

Blots 은 target molecule에 의해 이름이 붙여졌다.

- Southern blot: DNA 와 방사능표지된 탐침(probe)-DNA와의 상호작용을 이용
- Northern blot: RNA와 방사능표지된 탐침(probe)-DNA와의 상호작용을 이용
- Western blot: 항원단백질과 항체단백질의 상호작용을 이용

2. 실험원리

1) 상보성(Complimentarity) 과 혼성화(Hybridization)

- 두 분자의 결합 시 서열 특이성 또는 형태 특이성 분자의 인식에 의한 결합을 상보성 결합이라 한다. ex) 서열 상보성에 의한 DNA 이중나선. 형태 상보성에 의한 항체와 항원 단백질분자와의 결합.
- 탐침자(probe molecule)와 목표 분자 사이의 상보성은 probe-target간의 복합체를 형성하고, 이 복합체는 탐침분자에 방사능 또는 효소를 표지하여 목표 분자에 대한 정보를 얻을 수 있다.

2) 혼성분자 복합체의 형태:

- DNA-DNA : 만약 탐침자의 서열이 목표 분자 서열과 상보성이 있다면 탐침 단일가닥 DNA 분자는 목표 단일가닥분자와 이중 가닥을 형성할 수 있다.
- DNA-RNA : 단일가닥의 탐침 DNA분자가 목표 RNA 분자와 상보적이면 이중나선에 DNA-RNA 복합체를 형성한다.
- Protein-Protein : 탐침 항체 분자가 목표 항원 단백질과 결합하여 항원-항체 복합체를 형성한다.

3. 실험과정

1) 전기영동 (Gel electrophoresis)

(1) 크기에 의한 분리:

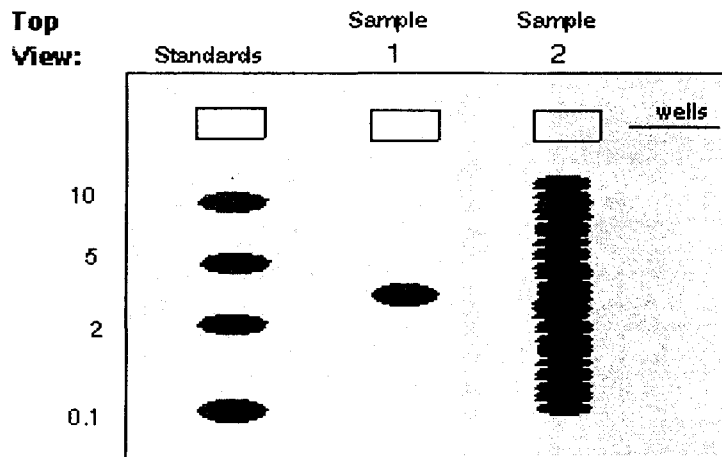
· Southern blot을 위한 DNA 준비: DNA 분자를 제한 효소로 처리하여 이중나선의 단편으로 만든다.

· Northern blot을 위한 RNA 준비: 비록 RNA 분자가 단일가닥이기는 하지만 RNA 분자는 가끔 염기쌍을 형성하는 2차구조를 갖는 부위가 생기기 때문에 RNA 분자를 formaldehyde로 처리한다.

· Western blot을 위한 단백질 준비: SDS(sodium dodecylsulfate)로 처리함으로써 고차구조를 1차구조로 만들고 단백질의 전체 하전을 음의 하전으로 통일한다.

(2) 염색(Staining)

· 아래의 그림은 맨 왼쪽 well에는 DNA, RNA, 혹은 단백질의 표준 혼합물(standards)을 loading 하고, 시료 1, 2를 각각의 well에 loading 하여 전기영동 실시 후 염색시킨 gel이다.



Blot에 따라 다른 염색과정이 필요함:

- DNA: ethidium bromide(EtBr)로 염색. EtBr은 핵산에 특이적으로 반응하여 DNA-EtBr복합체를 형성하고 자외선상에서 형광빛을 낸다.
- RNA: ethidium bromide(EtBr)로 염색. EtBr은 핵산에 특이적으로 반응하여 RNA-EtBr복합체를 형성하고 자외선상에서 형광빛을 낸다.
- Protein: Coomassie Blue(CB)로 염색. 복합체는 가시적인 진한 푸른색을 나타낸다.

2) 고체지지체로의 운반(Transfer to solid support)

- 전기영동에 의해서 DNA, RNA, 또는 단백질이 분자 크기별로 분리된 후에 혼성화 이전에 고체의 지지체에 옮겨져야 한다. 왜냐하면 혼성하는 gel상에서는 잘 이루어지지 않기 때문이다. 고체의 지지체는 일반적으로 nitrocellulose 혹은 nylon막을 사용한다.
- DNA, RNA, 혹은 단백질은 아래의 둘 중 하나의 방법으로 nitrocellulose이나 nylon막으로 옮겨진다.

3) Blocking

- Gel로부터 DNA, RNA, 혹은 단백질을 고체지지체로 운반 후 막을 고농도의 DNA, RNA 혹은 단백질이 들어있는 용액(blocking solution)에 담근다. 이 과정은 탐침자(probe)가 목표 분자가 아닌 막의 blank part에 달라 붙는 것을 방지한다.

4) 혼성화(Hybridization)

(1) 탐침자(Probe)의 제조

① Southern and Northern blotting을 위한 DNA-probe 제조:

- 이중나선 DNA가 방사성 물질로 표지되게 한다.
- 탐침자 DNA는 Random Hexamer labeling방법으로 방사성 물질이 부착되어 있다.

◆ Random Hexamer Labeling 방법 이란?:

· Labeling 하기위한 DNA를 열변성시켜 단일가닥으로 만들고 모든 가능한 서열을 갖는 Hexamer DNA혼합물을 가하여 염기쌍을 형성하도록 한다.

· dATP, dGTP, dTTP, 그리고 방사능(보통 P³²)이 붙어있는 dCTP와 DNA polymerase를 첨가한다.

· 막에서 target DNA 혹은 RNA 와 혼성화 시키기 위해 탐침자 DNA를 단일가닥으로 만든다.

② Western blotting을 위한 항체 단백질의 방사능 물질 표지:

· 항체 단백질에는 I¹²⁵를 화학적 방법에 의하여 Tyrosine에 붙인다. 비방사능적 방법으로 발색시키기 위하여 화학적 방법으로 항체 단백질에 효소 단백질을 결합시키기도 한다.

5) Washing

· 목표 분자와 탐침자 분자간의 혼성화 후 막위의 비목표분자 위치에 붙어 있을 수 있는 탐침자 분자를 제거하는 일이 필요하다.

· Washing 과정이 부실하면 특이적인 혼성화에 의한 분자 검출이 어렵다. 왜냐하면 막 전체가 방사능 활성을 보일 수 있기 때문이다.

6) Detection of probe-target hybrids

Autoradiography : X-ray film에 일정시간 동안 노출 시킨 뒤 현상한다.

● The important properties of the three blots

	Southern blot	Northern blot	Western blot
What is separated by molecular weight? (target)	DNA cut with restriction enzymes	RNA denatured with formaldehyde	Protein denatured with SDS
Probe	Radioactive gene X DNA	Radioactive gene X DNA	Antibody against protein X, labeled with radioactivity or enzyme
What do you learn from it?	Restriction map of gene X in chromosome	- how much gene X mRNA is present? - how long is gene X mRNA?	- how much protein X is present? - how big is protein X?

◎ Summary of Procedures

Southern Blot	Northern Blot	Western Blot
1) Extract DNA from cells	1) Extract RNA from cells	1) Extract protein from cells
2) Cut with restriction enzyme		
	2) Denature with formaldehyde	2) Denature with SDS
3) Run on gel(usually agarose)	3)Run on gel(usually agarose)	3) Run on gel (usually polyacrylamide-called 'SDS-PAGE')
3.5)Denature DNA with alkali		
4) Transfer to nitrocellulose (usually by capillary action)	4) Transfer to nylon (usually by capillary action)	4) Transfer to nitrocellulose (usually by electrophoresis)
5) Block with excess DNA	5) Block with excess RNA	5) Block with excess protein
6) Hybridize with labeled DNA probe	6) Hybridize with labeled DNA probe	6) Hybridize with labeled anti-body probe
7) Wash off unbound probe (use controlled stringency)	7) Wash off unbound probe (use controlled stringency)	7) Wash off unbound probe
8) Autoradiograph	8) Autoradiograph	8) Autoradiograph or develop with chromogenic substrate

II. PCR(polymerase chain reaction)과 RT-PCR

1. 개요

· PCR은 DNA의 양쪽 가닥을 주형(template)로 하여 동시에 primer extension을 일으킴으로써 primer annealing site 사이의 특정염기서열을 증폭하는 방법으로, Kary Mullis에 의해 개발되었다. 초기에는 polymerase로서 Klenow fragment를 이용하였으나 이 효소는 열에 약하기 때문에 매 cycle마다 새로 첨가해야하는 문제점이 있었다.

· 그러나 현재 *Thermus aquaticus*(Taq)와 같이 고온에서 번식하는 세균의 DNA polymerase를 이용하여 반응의 specificity 및 효율이 크게 향상되었으며, PCR은 분자생물학 연구에서 가장 중요한 기술이 되었다.

2. 원리

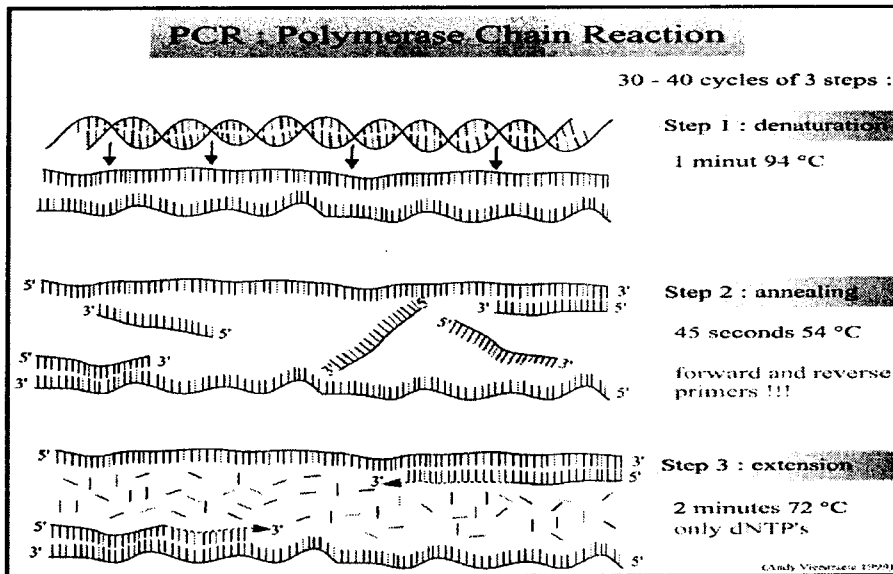
· PCR은 두개의 oligonucleotide primer가 필요하다. 이들 oligonucleotide는 DNA의 어느 부분이 증폭되어야 할 곳을 결정한다. PCR 증폭은 primer가 결합된 주형 DNA에 taq 중합효소가

가해지고 새로운 상보적 DNA 가닥이 합성됨으로써 시작된다.

- 끝이여 이 반응액에 94°C의 열이 가해짐으로써 새롭게 합성되었던 가닥들이 분리된 후 primer들이 새롭게 합성된 사슬상의 특정위치를 포함하여 주형 DNA 상의 해당 위치에 결합할 수 있도록 냉각된다.

- 다른 DNA 중합효소와는 달리 열에 의해 불활성화 되지 않는 Taq 중합효소에 의해 두 번째 DNA 합성이 일어난다.

이와 같이 변성-혼성화-합성의 과정을 25~30회정도 반복함으로써 수백만의 증폭된 DNA 복사체가 합성될 수 있다.



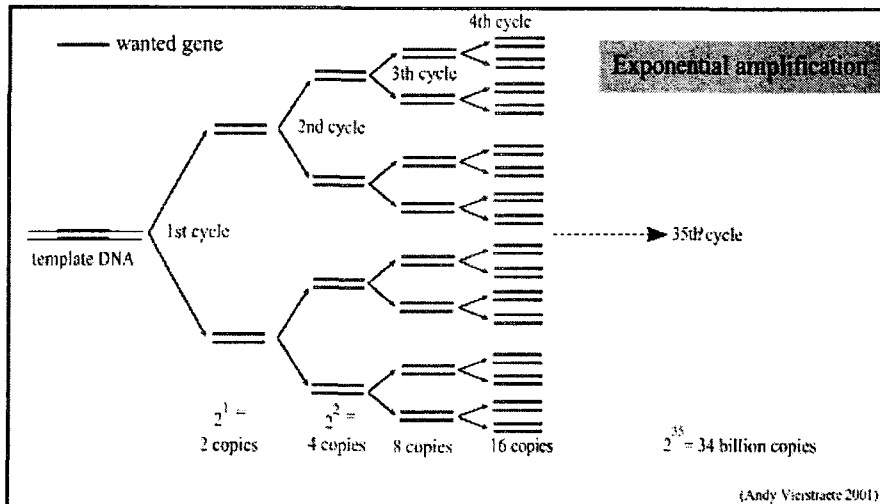
3. 필요사항

Primers : DNA합성에 있어 중합의 시작을 위한 작은 단편 DNA
dNTP's : dATP, dCTP, dGTP 그리고 dTTP의 혼합물
DNA polymerase : Taq polymerase
Template DNA
Buffer + Mg²⁺
Thermocycler

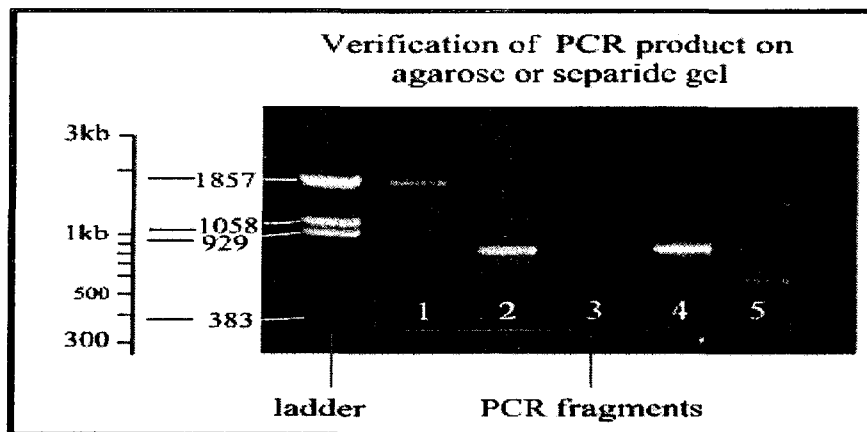
4. 실험과정

- PCR에는 4가지의 deoxyribonucleotide, 2가지의 primer, polymerase, template DNA, 그리고 Mg²⁺이 들어있는 reaction buffer가 필요하다. 우선 94°C에서 template를 변성시킨 다음 온도

를 낮추어 template DNA에 primers가 결합(annealing)이 일어나게 한다. Annealing temperature는 primer의 길이와 염기조성에 따라 다른데, 대략 55°C 정도가 일반적이다. Annealing 다음에는 Taq DNA polymerase의 최적 활성온도인 72-74°C에서 DNA 합성이 일어나게 한다. 이상의 cycle을 35번 반복하면 양 primer 사이의 DNA fragment의 수가 기하급수적으로 증가하여 2^{35} 로 늘어나게 된다.



5. 생성물의 확인



● RT-PCR: Reverse Transcription-PCR

1. 개요

· Cell 내에 발현된 RNA를 검출하고, 분석하는 효과적인 방법은 분자생물학 연구에 있어 매우 중요하다.

· P. Seeburg 등에 의해서 PCR 기술이 RNA를 찾고 분석하는데 도입되어 RT-PCR이 개발되었고, mRNA로부터 reverse transcription과정을 통해 얻어진 cDNA를 PCR로 증폭시킴으로써 다양한 형태의 연구가 가능하게 되었다.

· 이러한 PCR 방법의 변형은 RNA 검사의 sensitivity를 증가시켰을 뿐 아니라 소량의 RNA로부터 염기 서열을 분석할 수 있게 되었다.

· 세포내에 발현된 mRNA의 정성적인(Qualitative) 분석 뿐만 아니라 정량적인(Quantitative) 분석에도 RT-PCR법이 이용되고 있다. PCR 법의 높은 sensitivity 때문에 정량적 분석이 어렵기는 하지만 정교한 control 실험을 통하여 정량적인 실험의 신뢰도를 높일 수 있다.

2. 실험과정

1) RNA 분리과정 : Northern blot과 동일한 방법

2) cDNA 합성과정: Reverse transcription reaction 과정

(1) primer의 디자인

- primer의 디자인은 RT-PCR의 성공에 있어서 중요한 열쇠가 된다.
- primer 염기 서열은 주형 분자상의 목표 부위 근처의 염기 서열과 일치해야 하는데, 각각의 primer는 혼성화가 일어날 수 있도록 주형사슬에 상보적이어야 한다.
- primer의 길이가 너무 짧으면 이들이 주형에 비특이적으로 결합하여 원치 않는 증폭 산물이 생산되어 질 수 있다. 또 너무 길면 주형 DNA에서의 결합률이 낮아질 수 있다.

3) PCR amplification 과정

III. 유전자 (Gene) cloning

1. Gene cloning의 중요성

· Gene cloning의 중요성은 세포에 포함되어 있는 다른 모든 유전자에서 분리된 개개의 순수한 유전자를 제공 받는 것이다.

· 일반적으로 단 하나의 재조합 DNA 분자가 하나의 숙주세포 속으로 운반되어지며, 최종적인 클론 집합체는 다른 재조합 DNA 분자를 많이 포함하고 있어도 각 개개의 클론은 단 한가지 분자의 다중 사본물을 가지고 있다. 따라서 한 유전자가 다른 유전자 혼합물로부터 분리되어 그것의 특징을 자세히 연구할 수 있다.

2. 실험방법

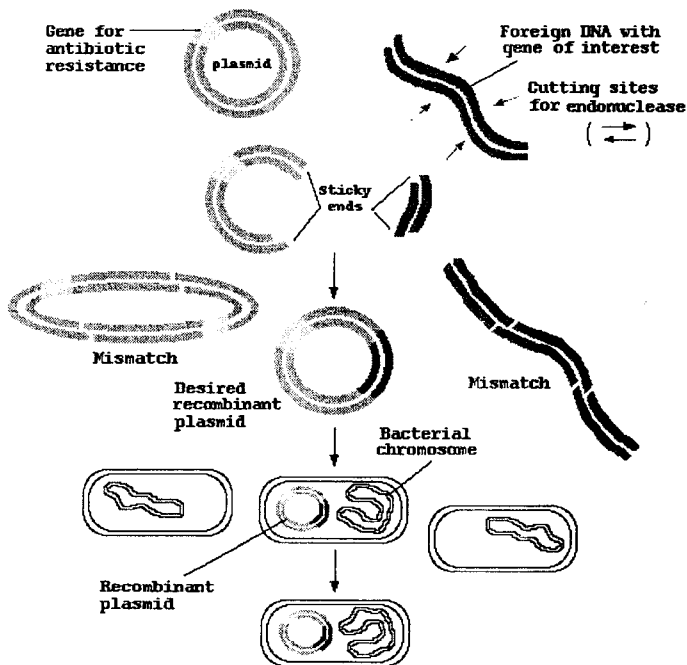
유전자 클로닝 실험의 기본적인 단계는 다음과 같다.

- 1) 클론 되어질 유전자를 포함하고 있는 DNA 단편은 restriction endonucleases를 이용하여

절단되고 키메라(chimera), 혹은 재조합 DNA 분자(recombinant DNA molecule)를 생산하기 위해 DNA ligase(DNA 연결효소)를 이용하여 벡터(Vector)라는 원형 DNA 분자 속으로 삽입된다.

- 2) 벡터는 유전자를 숙주세포로 운반하는 운반체(vehicle) 역할을 하며, 숙주세포로는 여러 형태의 세포가 있으며, 그 중에 박테리아가 일반적으로 사용된다.
- 3) 숙주세포 속에서 벡터는 복제되어, 자신과 원전히 동일한 다량의 벡터뿐만 아니라 그것이 운반하는 유전자도 다량 복제된다.
- 4) 숙주세포가 분열될 때, 재조합 DNA 분자의 복제물이 자손에게 전달 되며, 거기서 벡터 복제가 일어난다.
- 5) 수많은 세포 분열이 일어난 후에, 동일한 숙주세포의 콜로니(colony), 혹은 클론이 생성된다. 클론의 각 세포는 하나, 혹은 그 이상의 동일한 재조합 DNA 분자를 포함하며, 재조합 분자에 의해 운반된 유전자를 소위 '클론'되었다고 말한다.

Plasmid Insertion



<유전자 cloning Flow>

Ⅳ. 리포터(Reporter)를 이용한 유전자 발현연구

· 포유동물 세포 내에서 일어나는 유전자의 발현을 연구하는데 있어서, reporter를 이용하면 유전자의 전사나 번역의 조절과 변화를 쉽게 확인할 수 있어 매우 유용하다. Assay하기 쉬운 유전자 산물의 발현정도로 세포 내의 특정 환경이 전사나 번역과정을 촉진하거나 억제하는 것을 알아볼 수 있기 때문이다.

1. Reporter로 쓰이기 위한조건

첫째, 진핵세포 내에서 이 reporter와 유사한 효소활성을 가지는 단백질이 있는 경우, 그것과 구분될 만한 특성을 가져야 한다.

둘째, 세포 내에서 다른 효소적 활성과 경쟁이 되거나 방해받지 말아야 한다.

셋째, Assay하는 효소의 활성이 빠르고, 간편하며, 민감하고, 결과의 재현이 가능해야 한다.

2. 리포터 활용의 실제

· 현재 위의 특성을 가진 reporter들이 개발되었고, 정상적인 조건에서 세포의 종류나 transfection 방법 등에 관계없이 잘 발현되도록 고안되었다. 그러므로 여러 reporter를 발현 가능한 벡터에 클로닝 하여 transfection한 후, 여러 실험 조건을 가하였을 때 일어나는 reporter 발현 변화의 정성적, 정량적인 측정이 가능하다.

· 특별히 전사과정을 연구하고 싶을 때에는 이러한 reporter를 발현하는 벡터 내의 promoter 위치에 여러 유전자 조각들을 넣어 reporter의 발현을 assay 할 수도 있다. 대부분의 경우, reporter들의 발현을 측정하는 assay들은 매우 간단하고 쉬우며 안전한 장점을 지니고 있다.

· 효소 활성의 결과로 발생하는 빛의 세기로 발현정도를 정량화 하는데 널리 쓰이고 있는 것으로는 chloramphenicol acetyl transferase (CAT), luciferase, β -galactosidase, secretion-enhanced alkaline phosphatase (SEAP) 등이 있고, 효소 활성의 필요 없이 단백질 그 자체가 특정파장의 빛을 받아 형광을 나타낼 수 있는 green fluorescent protein (GFP)의 경우와 같이, 정량적인 발현 정도 뿐만 아니라 살아 있는 세포 내에서 발현 결과를 직접 현미경을 통하여 볼 수 있는 reporter도 있다.

· 대개의 경우, reporter assay를 하려면 외부의 유전자를 세포 내로 transfection 하는 과정이 필요하다. 따라서, reporter 발현 정도의 차이가 의도한 실험 조건의 결과인지, 유전자를 세포 내로 전달하는 과정에서의 효율 차이인지 구분해 내어야 한다. 그러므로, reporter를 이용한 실험을 할 때에는 실험 조건에 관계없이 정상적으로 발현될 수 있는 제 2의 reporter를 co-transfection 하고, 그 결과를 반드시 보정 해주어야 한다.

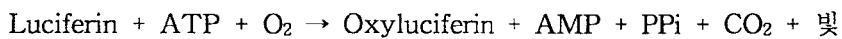
3. Reporter system의 이론적인 원리와 실험 방법

1) chloramphenicol acetyl transferase (CAT) assay

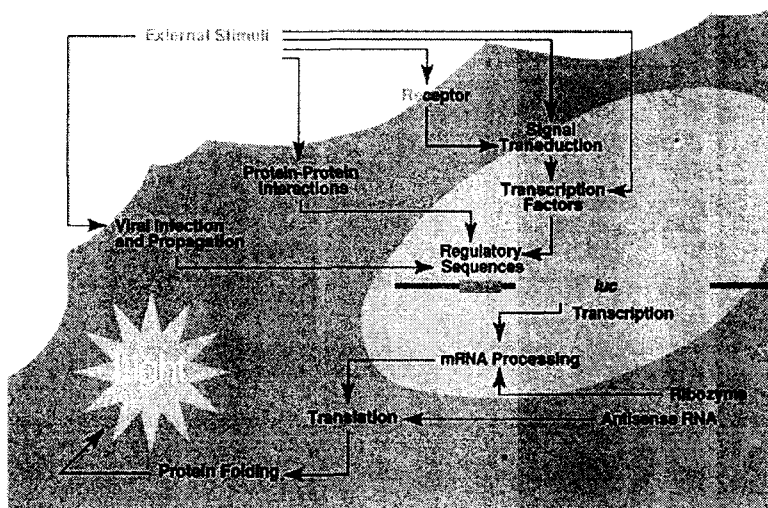
· Transposable element Tn9에서 유래된 CAT은 항생제 중 하나인 chloramphenicol 에 mono- 혹은 di-acetylation을 일으킴으로써 그 효과를 억제시키는 효소이다. CAT은 위에서 나열한 reporter로서의 조건을 잘 만족시키고, assay 방법이 비교적 간단하여, 유전자 발현의 여러 과정들을 연구하기 위한 reporter로서 널리 이용되어 왔다.

2) Luciferase assay

· 반딧불의 luciferase는 61kDa의 효소 단백질로서 beetle luciferin의 ATP-dependent 산화과정을 촉진시키는데, 이 과정에서 생성되는 빛을 측정하여 luciferase의 활성을 알아볼 수 있다.



· 이 과정으로 생기는 빛은 빠른 시간 내에 (1-10초) 측정할 수 있고, 매우 민감하기 때문에, 유전자 발현을 연구하는데 reporter로서 널리 쓰이고 있다.



<Reporter (*luc*)를 이용한 발현 연구 Flow>

3) β -galactosidase assay

· *E.coli*의 LacZ 유전자가 코드하는 β -galactosidase는 116kDa의 단백질이다. 친핵 promoter에 의해 잘 발현되어 reporter로 유용하다.

· 최근에는 효소활성의 인지감도를 높여 줄 수 있는 1,2-dioxetanes 계열의 chemiluminescent substrate가 개발되어 colorimetric substrate 대신 사용되기도 한다.

4) SEAP assay

SEAP (secreted form of human placental alkaline phosphatase) reporter 유전자는 placental 효소의 절단된 형태로, membrane anchoring domain이 제거되어 있어서 transfection

된 세포 밖으로 잘 분비된다.

· Chemiluminescent 혹은 fluorescent 기질이 SEAP과 반응하면서 나타내는 빛을 luminometer로 측정함으로써, SEAP reporter 유전자의 발현정도를 알아볼 수 있다. 배양액에서 관찰되는 SEAP의 활성정도는 세포내 SEAP mRNA와 그 단백질 농도에 비례하기 때문에 진핵 유전자 발현 연구의 reporter로서 적당하다.

5) GFP

· 이 방법은 기존에 사용되던 항체 염색 기술과 비교해서 고감도와 더 나은 해상도를 나타내며, 고정, permeabilization, antibody incubation 과정 없이 바로 관찰이 가능하다. 또한, 살아있는 상태에서 관찰하므로 단백질 위치나 이동에 대한 kinetics study도 가능하다.

6) 여러 가지 tag를 이용한 항체 염색 방법

· 세포 내 특정 단백질의 발현정도나 위치를 직접 연구하기 위해서는 해당하는 단백질에 대한 항체를 많이 이용한다.

· 단백질의 항체가 없는 경우에는 10개 내외 정도의 아미노산으로 이루어진 tag를 결합시켜 tag에 대한 항체를 대신 이용하기도 한다.

· Tag들은 크기가 매우 작아 결합된 단백질의 구조형성이나 기능에 영향을 주지 않는 경우들이 많아서 조사하고자 하는 유전자의 기능 연구에 흔히 이용된다.

V. 형질전환(Transgenic) 과 유전자 녹아웃(Knockout) 동물

1. 정의

· 외래의 유전자를 인위적으로 원하는 동물의 염색체로 도입하여 그 형질의 일부분을 변화시킨 동물을 형질전환동물(transgenic animal)이라고 한다. 또한 유전자 결손이 유발된 DNA를 외부에서 도입시킨 후 상동 재조합을 일으키면 정상유전자에 큰 결손과 동시에 완전 불활성화를 유도할 수 있는데, 이를 knockout 이라 한다.

· 이러한 동물을 생산하기 위해서는 우수한 유전자들을 확보하고 이들을 효율적으로 발현시키기 위한 프로모터와 재조합시키는 유전자 재조합기술, 그리고 재조합된 유전자를 수정란의 핵에 미세주입하고 대리모에 이식하여 최종적으로 형질전환동물을 얻는 방법이 요구된다.

2. 실험방법

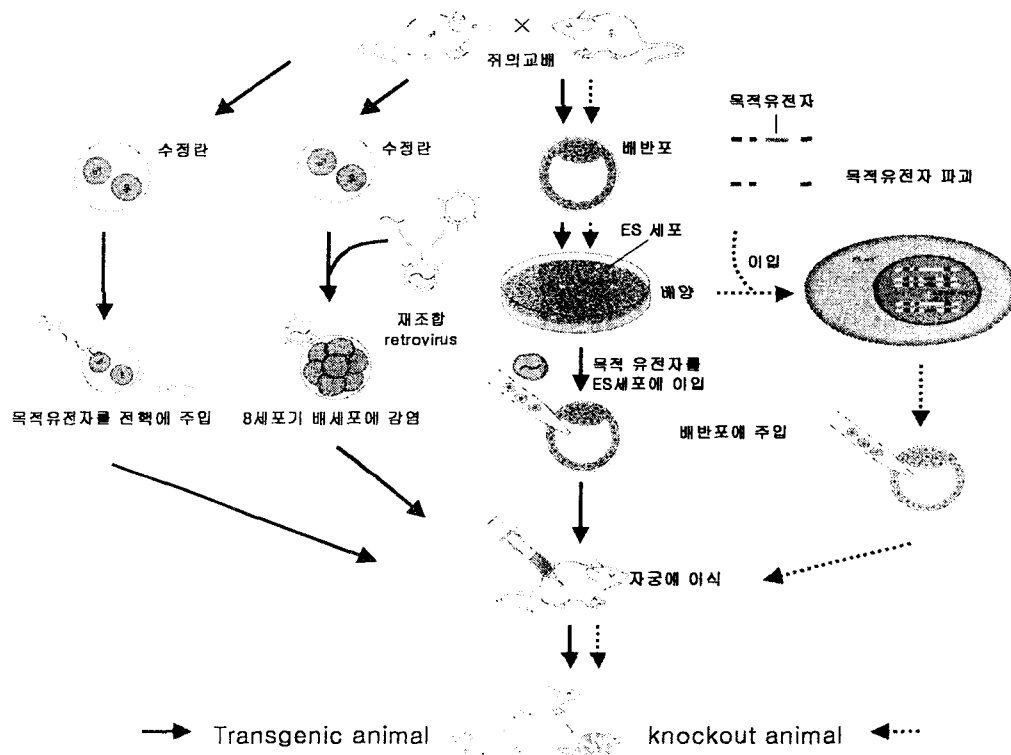
· 외부의 유전자를 도입하는 방법으로 미세주입법, retrovirus를 이용한 방법, embryonic stem cell을 이용하는 방법 등, 여러 가지 방법이 있다.

1) 미세주입법(microinjection) : 수정란의 응성전핵에 미세침을 이용하여 DNA를 직

접 주입하는 방법으로, micromanipulator를 이용하는 기술이 까다롭기 때문에 숙련이 필요 하나, 오늘날 가장 널리 이용되고 있다.

2) Retrovirus를 이용하는 방법: 이 경우는 감염시키기가 쉬운데 비해 2세포기 이전에는 retrovirus가 감염되지 않기 때문에 얻어지는 형질전환 생쥐는 모자이크 형태로 이루어지며 삽입되는 DNA의 크기도 제한을 받는다.

3) ES cell을 이용하는 방법: Gene targeting등에 이용될 수 있어 특정 유전자를 knock out시키는 데 이용될 수 있으나 지금까지 생쥐외에 다른 동물에서 ES cell이 개발되어 있지 않기 때문에 그 활용에 한계가 있다.



<형질전환과 유전자 녹아웃 동물의 생산방법 Flow>

3. 영양학분야에서의 형질전환 동물의 이용

1) 특정 영양물질의 생산

- 유아에게 제공되는 조제분유는 여러 특수한 처리를 거치게 된다. 그러나 유전자 조작된 소는 인간의 모유와 유사한 우유를 제공할 수 있게 된다.

- 정상적인 모유 이외에도 특정 단백질을 소의 우유 단백질과 전환시켜 특별한 소비자에게는

영양성분이 변경된 우유를 공급할 수 있다.

2) 치료용 생체물질의 생산

· 알부민, 인터페론, 인터류킨 등의 치료용 단백질과 생체활성물질들은 질병 치료에 유익한 수단으로 이용되고 있으나 그 공급은 부족한 상태이다.

· 세포배양기술로 이러한 단백질을 생산할 수는 있으나 생산량이 극소량에 불과하며 세균이나 효모를 유전자 조작기술로 변형시켜 대량생산하는 방법도 있으나 그렇게 생성된 단백질은 정제가 쉽지 않다. 이에 비해 형질전환 동물의 유즙에서는 이런 치료용 생체활성물질을 저렴한 가격에 대량으로 생산이 가능하다.

· 여러 가지 결점은 유전자적중(gene targeting)방법에 의해 동물의 동등한 유전자 부위를 인간의 알부민 유전자로 대체하는 방법으로 해결할 수 있을 것이다.

3) 장기이식용 동물 생산

· 장기부족 문제를 해결하는 데는 의공학적 접근법에 의한 인공장기의 개발과 형질전환 동물의 생산 등이 있다.

· 문제가 되는 이종항원을 유전자조작기법으로 사전에 파괴하거나, 이식 후 인간면역세포와 반응하는 장기 세포의 반응도를 떨어뜨리는 유전자를 주입하거나 해서 인간에게 이식해도 별 문제가 없는 형질전환동물을 만들 수 있다.

4) 질병모델 동물의 생산

· 인간을 대상으로 한 질병 연구는 한계가 있으므로 연구자들은 각종 동물 모델을 만들어 그 병을 연구하려는 노력을 오래 전부터 해 왔다. 지금까지는 돌연변이나 우연에 의지해 왔지만 유전자조작기법을 적용하면 우리가 원하는 동물에서 원하는 질병모델동물을 얻을 수 있다.

· 예컨대 특정 암을 가진 쥐나 당뇨병, 파킨슨병을 가진 생쥐 등을 만들어 이를 체세포복제기법으로 대량생산한다면 연구에 쓸 수 있는 질병 모델을 얼마든지 얻을 수 있으며 이는 해당 질병의 연구와 치료제의 개발에 엄청난 가치를 지닌다.

· 또 동물을 대상으로 실험을 할 때 각 개체간의 다양한 유전형질의 차이로 인해 의미 있는 차이가 발생할 수 있다. 지금까지는 근친교배로 순계혈통의 실험동물을 얻어 이런 문제를 해결해 왔지만 체세포복제기술은 한결 쉽고 간단하게 동일한 유전형질을 가진 실험동물을 대량생산함으로써 보다 정확한 실험과 연구를 가능하게 할 것이다.

5) 세포, 유전자 치료

· 현재 백혈병, 파킨슨병, 당뇨병 등에 걸린 환자에게 장애가 생긴 세포를 대신하는 정상 세포를 외부에서 배양, 주입하여 치료하려는 시도가 행해지고 있다.

· 그러나 면역학적 거부반응의 문제 때문에 주입하는 정상 세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell)로부터 얻은 것을 사용한다. 이 단계의 세포는 아직 면역 반응을 일으킬 만큼 성숙하지

않았기 때문이다.

- 인간 세포가 난자 없이도 재 프로그래밍 되는 과정을 이해하게 되면 환자 자신의 세포를 역 분화시켜 사용할 수 있으므로 면역학적 거부반응의 문제나 배아 세포를 사용하는 데 대한 윤리적인 문제를 줄일 수 있다.

- 이 과정을 더욱 완벽하게 이해한다면 심지어는 손상된 장기나 신체 부분을 세포 하나로부터 재발생 시킬 수 있다는 기대도 해볼 수 있다.

VI. 마이크로어레이 (Microarray)

1. 개요

- 생물체에서 수천개의 유전자와 그들의 산물(RNA 와 proteins)이 복잡하고 조화로운 방식에 의해 기능을 함으로써 생명의 신비를 유지하고 있다. 기존의 전통적인 분자생물학에 의한 연구방법은 "one gene one experiment"에 근거하여 진행되어서, 그 결과물은 매우 제한적이고 유전자의 전체움적임 (whole picture) 을 보기에는 어려운 점이 많았다.

- 지난 수년간, DNA microarray 란 새로운 개념의 기술이 도입되면서 생물학자들의 엄청난 관심을 끌게 되었다. 마이크로어레이 기술을 통하여 하나의 마이크로어레이상에서 전체 지놈 (genome) 을 탐색할 수 있게 되었고, 동시에 수천 개의 유전자간의 상호작용도 알 수 있게 되었다. 현재 DNA 마이크로어레이 기술을 지칭하기 위하여 여러 가지 용어(Biochip, DNA chip, DNA microarray, gene array 등...) 가 사용되고 있다.

- 최근에는 "Genome chip" 이라는 용어도 사용하며, 이것은 하나의 chip상에서 전체 genome 을 검색할 수 있다는 의미를 나타낸다.

- 마이크로어레이의 종류에는 앞에서 언급한 DNA 마이크로어레이와 Protein 마이크로어레이 그리고 tissue 마이크로어레이등이 있다.

2. 원리

- DNA 마이크로어레이의 가장 기본적인 원리는 염기 결합 (즉, DNA의 경우 A-T, G-C; RNA의 경우 A-U, G-C)이다. 어레이라 함은 sample 이 순서대로 잘 정렬된 것을 말한다. Array는 염기결합 법칙에 근거하여 알려지거나 알려지지 않은 유전자들을 결합시키는 매개체이고, 알려지지 않은 유전자를 밝혀내는 과정을 자동화하는 매개체를 제공한다. 어레이 실험은 microplates 나 기존의 blotting membrane 같은 일반적인 assay system의 사용이 가능하고, sample 을 손으로, 혹은 robotic machine 을 이용하여 심음으로써 만들 수 있다.

3. 분류

1) 크기에 의한 분류

- 일반적으로 array 는 sample spot 의 크기에 따라 macroarray 혹은 microarray 로 나눌 수

있다.

(1) Macroarray 란 sample spot size가 300 micron 이상인 경우를 말하며 scanner 에 의해 쉽게 이미지화 될 수 있다.

(2) Microarray 의 경우 sample spot size가 직경이 200 micron이 되지 않는다. 이러한 어레이는 수천개의 spot을 찍을 수 있다. 마이크로어레이는 고속의 robotic system에 의해 제작되어진다. 일반적으로는 glass위에 만들어지나, 때로는 nylon membrane상에 제작된다.

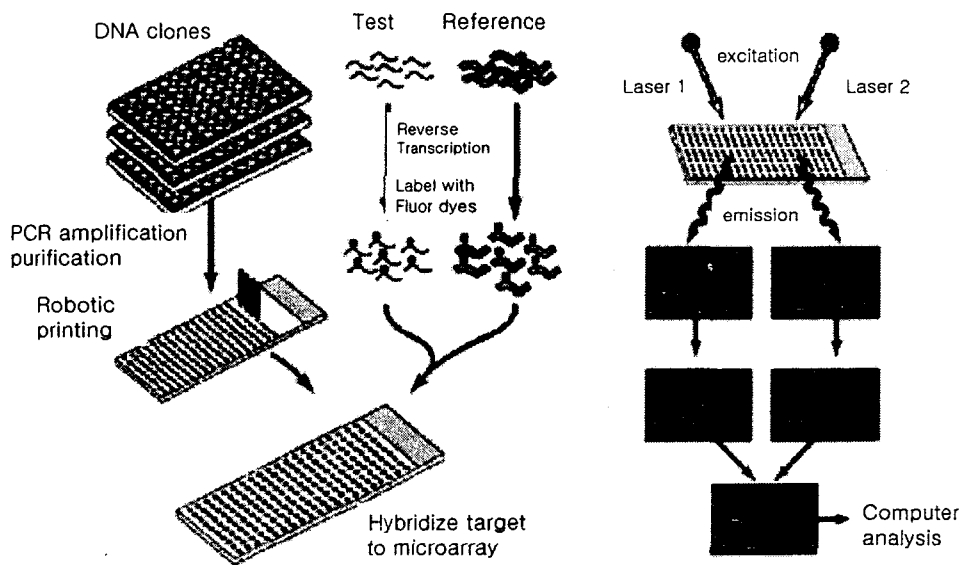
· 따라서 알고있는 probe를 사용하여 상보적인 결합을 탐색함으로써 동시에 대량의 유전자 발현과 유전자 탐색 등의 연구를 가능하게 한다. 하나의 chip을 사용하여 동시에 수천개의 유전자에 대한 정보를 얻을 수 있으면 상당한 양의 결과를 얻을 수 있다.

2) 유전자 특성에 의한 분류

· DNA 마이크로어레이는 array에 배열되는 유전자의 특성에 따라 두 가지 형태로 나눌 수 있다.

(1) Format I (cDNA microarray) : Probe cDNA(500-5,000bp)가 glass와 같은 solid 표면에 고정화되고 일련의 target에 노출시킨다. 이러한 방법은 전형적인 DNA microarray로서 Stanford 대학교에서 개발되었다.

(2) Format II (oligoDNA microarray) : Oligonucleotide(20-25mer) 혹은 peptide nucleic acid(PNA) probe가 chip상에서 (in situ) 합성되거나 합성된 후에 chip상에 고정화 된 다음, 라벨된 sample DNA에 의해 hybridization되면 상보적인 유전자의 염기서열이나 발현정도가 결정된다. 이러한 방법은 역사적으로 "oligoDNA chip" 이라고 불리며 affymetrix 사에 의해 개발되었고, Gene Chip이라는 이름으로 상품화되고 있다.



[cDNA 마이크로어레이 실험 Flow]

4. DNA microarray의 활용분야

1) 유전자의 발견

2) 질병의 진단 : 많은 "microfluidics" 기구가 이 범주에 속한다. 비록 이것은 전통적인 gene chip 이나 마이크로어레이에 속하지는 않지만, 여기서는 gene chip과의 깊은 연관성이 있다.

3) 약물 개발 : Pharmacogenomics - 왜 약은 어떤 환자에는 효과가 있고 다른사람에게는 효과가 없을까? 그리고 어떤약은 심지어 어떤 환자에게는 독성마저 가질까? Pharmacogenomics 는 functional genomics 와 molecular pharmacology의 합성어이다. Pharmacogenomics의 최종목표는 약에 대한 치료반응과 환자의 유전자의 profile과의 상호관련을 찾아내는 것이다.

4) 독성학 연구 : Toxicogenomics는 functional genomics와 molecular toxicology의 합성어이다. Toxicogenomics의 최종목적은 독성물질에 대한 독성반응과 이러한 독성물질에 노출된 사람에게 대한 유전자 profile의 변화의 관계를 찾는 것이다.

Ⅶ. 생물정보학(Bioinformatics)

생물정보학은 Genome에 대한 총체적인 연구를 하는 학문으로, Genome을 문자로 나타낸 서열(sequence)에 대한 연구뿐만 아니라, 단백체를 연구하는 proteomics, 단백질의 2D, 3D 구조 연구, 가장 핵심적인 functional genomics, 계통 연구, 정상 세포와 병든 세포(대표적인 것 : 암세포)의 비교 연구 등 많은 다양한 분야들을 포함하는 학문이다.

결 언

영양학 연구에 있어 Southern, Northern, Western blots, PCR, RT-PCR, reporter gene system 등을 이용한 분자생물학적 방법의 도입은 실험결과의 수준을 한단계 끌어올리는 결과를 가져왔으며, 이로 인해 영양소 및 식이 성분의 효과를 유전자 수준에서 이해할 수 있게 되었다. 최근에는 마이크로어레이 기술이 도입되면서, 전통적인 분자생물학적 방법으로는 풀 수 없었던 전체 지놈의 탐색 및 수천개의 유전자간의 상호 작용, 또한 개개인의 유전자 차이와 식이 및 영양성분의 유전자 발현에 미치는 영향을 전체적으로 볼 수 있게 되었다. 영양학 연구에서도 이와 같이 급속도로 발전되고 있는 최신방법의 도입은 필수적이라 생각되며, 전통적인 분자생물학적 방법은 개개의 연구실 수준에서 시행될 수 있어야 할 것으로 생각된다. 또한 마이크로어레이 형질전환 동물을 이용한 실험등의 접근방법을 도입하기 위한 영양학자들간의 아이디어 논의가 활발하게 이루어져서 심도 있는 연구 시도가 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

- 1) 강종백, 김정국, 이광호 역(1998) 유전자 클로닝 입문(제 3판). 월드 사이언스
- 2) 유옥준(1996) Bio medical Research. 신기획
- 3) 정해영, 김규원 역(1997) 생명과학을 위한 비주얼 생화학·분자생물학, 해돋이
- 4) 엄수종(2002) 식품과 영양에서 유전체학의 중요성 및 응용. 식품과학과 산업 35(1): 26-32
- 5) Ekins R, Chu FW. (1999) Microarrays ; their origins and applications. *Trends in Biotechnolmgy*, 17: 217-218
- 6) Chemical & Engineering News, February 22, 1999, 77(8); 27-36
- 7) Coctett M, Dracopoli N, Sigal E.(2000) Applied genomics; integration of the technology within pharmaceutical research and development. *Curr. Opin Biotechnol* 11: 602-609
- 8) Zeisel SH, Allen LH, Loburn SP, Erdman JW, Failla ML, Freake HC, King JC, Storch J.(2001) A reservoir for integrative science. *J. Nutr.* 131: 1319-1321
- 9) Fields S, Kohara Y, Lockhart DJ.(1999) functional genomics. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 96: 8825-8826
- 10) Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells *Genes & Devel.* 1: 1183-1200
- 11) Luehrsen KR, Walbot V (1991) Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells *Mol. Gen. Genet.* 225: 81-93
- 12) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(1989) Molecular cloning: a laboratory annual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press