

## cDNA 유전자집을 이용한 식품영양학 연구

박 건 구 Ph.D

파마코제네칩스

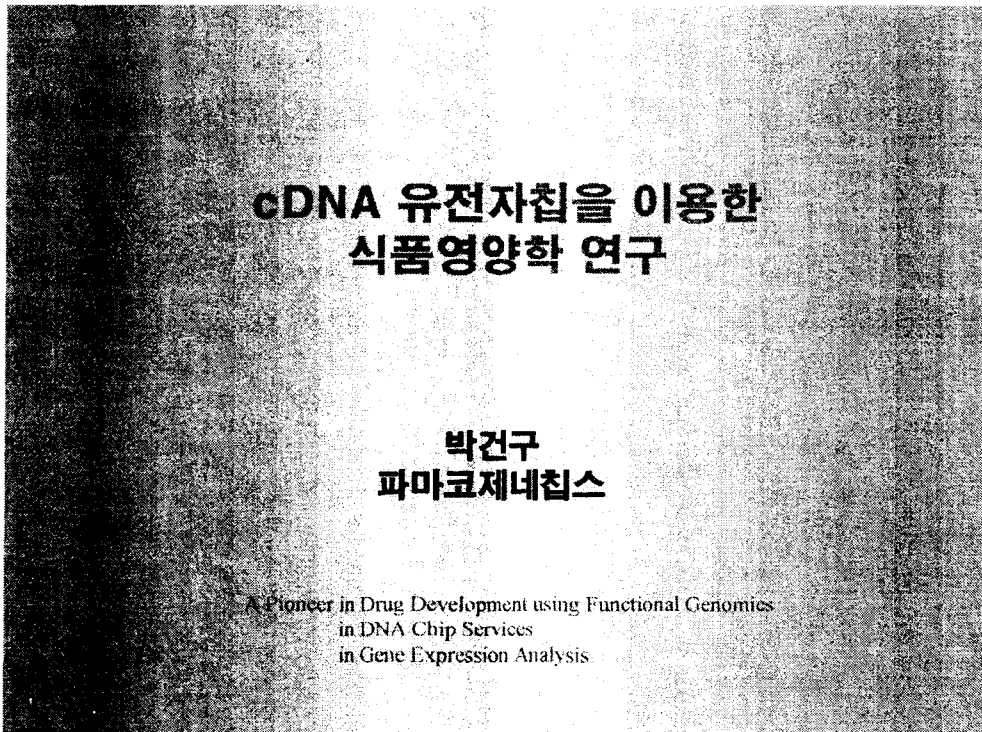
2001년 2월 사람의 genome sequence가 해독되어 발표된 것은 식품영양학적으로도 역사적인 사건이다. 약 29.1억 base pair로 이루어진 사람의 전체 유전자 염기서열 중 단지 1.1%에 해당하는 부분만이 exon에 해당하는 염기서열 이었고, 24%가 intron에 해당하는 부분이었으며, 나머지 75%는 유전자의 사이에 위치하는 부분이었다. 특이한 결과는 단백질을 coding하는 유전자가 26,000개 정도에 불과하다는 것과 single-nucleotide polymorphism (SNP)가 1250 bp마다 1개씩 존재한다는 사실이다. 이러한 사실은 SNP와 유전자의 발현 패턴이 영양분의 작용에 매우 중요하다는 것을 암시한다. 개개인마다 같은 영양 물질에 대한 감수성이 다른 것은 SNP 때문일 것이고, 한 사람에게 섭취된 같은 영양 물질이라도 장기마다 작용이 다른 것은 각 장기마다 유전자의 발현 패턴이 다르기 때문일 것이다.

사람의 전체 유전자 수가 생각보다 훨씬 적은 것은 어떤 영양 물질에 1가지 유전자만 관여하여 작용이 나타나지 않을 것이란 추측을 하게 한다. 이제는 한가지 영양물질에 의하여 변화되는 유전자가 수백개이든 수천개이든 High-Throughput Screening (HTS)로 검색하는 방법이 일반화되고 있다. 기존의 방법으로 수백 년 걸리던 일이 단 며칠만에 분석이 가능하게 되었다. 이 방법 중에 한가지가 microarray이다. microarray는 크게 oligonucleotide microarray와 cDNA microarray로 대별 할 수 있다. 전자는 주로 염기서열의 변화를 측정할 수 있고, 후자는 유전자의 발현을 측정한다. 식품에 의한 돌연변이나, SNP차이에 의한 섭취 독성물질에 대한 감수성의 차이는 oligonucleotide microarray를 사용하고, 유전자 발현의 패턴 변화는 cDNA microarray를 주로 사용한다. 이론적으로 모든 영양물질에 대한 각 조직에서의 모든 유전자 발현 패턴을 분석해서 Data Base를 구축하는 것이 가능하다. 이렇게 되면 유전자 발현 패턴의 변화 자체가 마커가 될 수 있다. 이러한 다수의 유전자를 조합하여 영양소의 작용을 평가함으로써 보다 정확한 마커를 기대 할 수 있다.

영양 물질에 대한 마커로 유전자 발현패턴의 변화를 이용하려면 cDNA microarray를 만들어야 한다. cDNA microarray를 제작하는데는 우선 각각의 유전자를 PCR하고 정제하여 특수하게 coating된 slide glass에 pin방식이나 ink-jet방식으로 고정화 한다. 지름이 약 150 um의 크기로 각각의 유전자를 22mm x 22mm 영역에 1만개 정도까지 배열 할 수 있다. 이중 영양 물질의 노출에 의하여 변화되는 유전자를 측정 하려면 대조군과 영양 물질을 처리한 측정군에서 mRNA를

---

정제하고 대조군을 Cy3 그리고 측정군을 Cy5로 labelling 한다. 이 두가지 probe를 혼합하여 hybridization하고 각각의 유전자에 대한 두가지 형광의 양을 측정하고 상대적인 비율을 산출하여 영양 물질에 의한 발현의 증감을 측정하고, 다수의 유전자를 동시에 분석하여 다음의 발현 패턴을 도출 할 수 있다. 1. signal은 있지만 영양 물질에 의하여 전혀 발현에 영향이 없는 유전자 2. 발현이 감소되는 유전자 (이 유전자의 기능이 없어져서 영양소의 작용이 나타남) 3. 발현이 증가되는 유전자 (이 유전자의 기능이 증강됨으로써 작용이 나타남) 4. signal이 없는 전혀 발현이 되지 않는 유전자. 즉 위의 4가지 경우의 수를 1000개의 유전자를 동시에 분석해 조합하면  $4^{1000}$ 가지의 경우의 수가 나온다. 이론적으로 모든 영양 물질에 대하여 서로 다른 발현 패턴을 대응 시킬 수 있다.

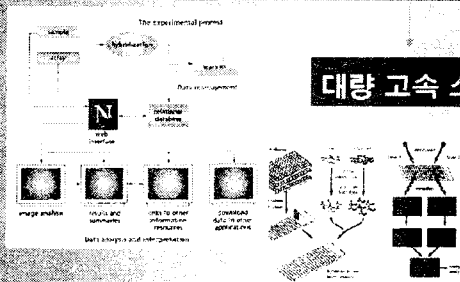


## 이 가 게놈 프로젝트

인간 게놈 프로젝트

인간 유전자 염기서열  
29.1 억쌍의 해독  
(2001.2)

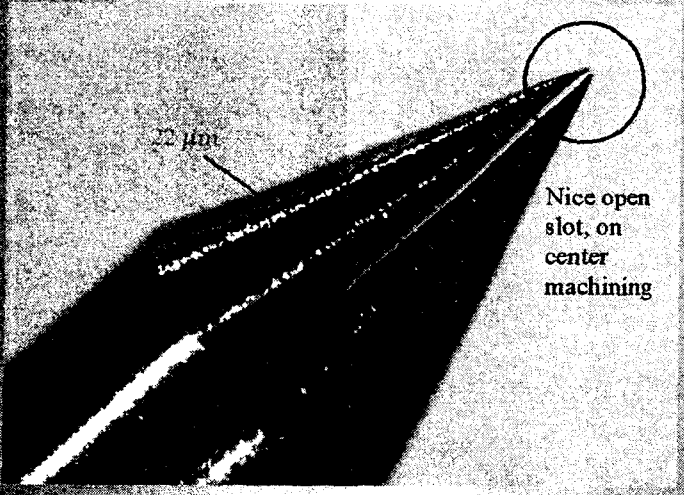
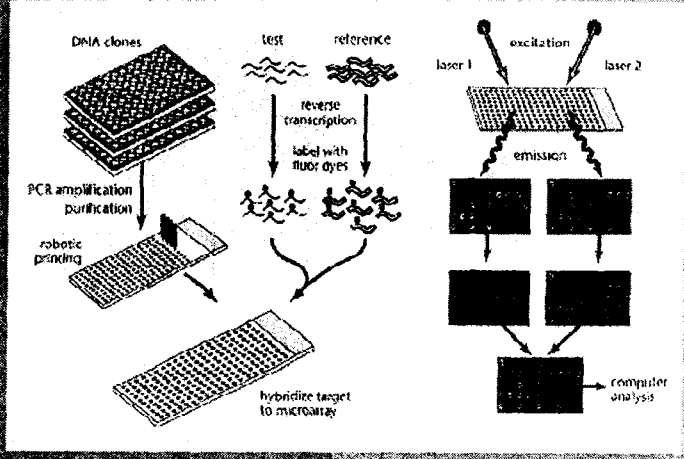
영양 표적유전자의 대폭적인 증가



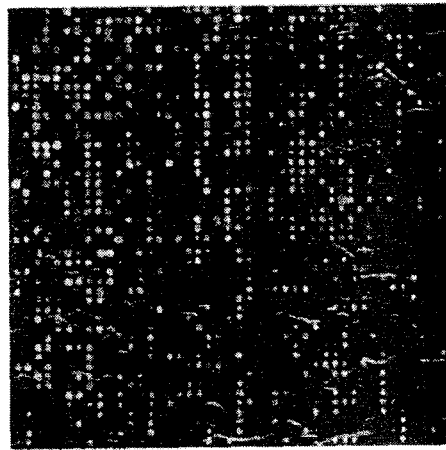
## Microarray를 이용한 영양학 연구

1. Treat Cell with Material. Harvest tissue.
2. Make cDNA libraries (Control and Treated)
3. Cloning of clones by subtractive hybridization to remove most common expressed cDNAs.
4. Begin high throughput sequencing of unidentified clones.
5. Determine EST frequency by counting clones identified by sequencing and hybridization.
6. Make cDNA microarrays using unique clones.
7. Search for gene expression patterns. Test models of function.
8. Apply custom microarrays to additional nutraceutical exposures.

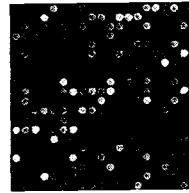
# 유전자칩 원리 및 유전자칩 제작



## cDNA microarray Data



### Data Analysis



## PCR-Select cDNA Subtraction protocol

