

신경정신 의학분야의 방사성동위원소 표지 cDNA 마이크로어레이

고려대학교 의과대학 핵의학교실, 약리학교실, 정신과학교실, 생화학분자생물학교실
최재걸, 신경호, 이민수, 김명곤

Radioactive cDNA microarray in Neuropsychiatry

Jae Gol Choe, Kyung Ho Shin, Min Soo Lee, Meyoung-kon Kim

Department of Nuclear Medicine, Pharmacology, Psychiatrics,

Biochemistry and Molecular Biology, Korea University Medical School, Seoul, Korea

Abstract

Microarray technology allows the simultaneous analysis of gene expression patterns of thousands of genes, in a systematic fashion, under a similar set of experimental conditions, thus making the data highly comparable. In some cases arrays are used simply as a primary screen leading to downstream molecular characterization of individual gene candidates. In other cases, the goal of expression profiling is to begin to identify complex regulatory networks underlying developmental processes and disease states. Microarrays were originally used with cell lines or other simple model systems. More recently, microarrays have been used in the analysis of more complex biological tissues including neural systems and the brain. The application of cDNA arrays in neuropsychiatry has lagged behind other fields for a number of reasons. These include a requirement for a large amount of input probe RNA in fluorescent-glass based array systems and the cellular complexity introduced by multicellular brain and neural tissues. An additional factor that impacts the general use of microarrays in neuropsychiatry is the lack of availability of sequenced clone sets from model systems. While human cDNA clones have been widely available, high quality rat, mouse, and drosophilae, among others are just becoming widely available. A final factor in the application of cDNA microarrays in neuropsychiatry is cost of commercial arrays. As academic microarray facilitates become more commonplace custom made arrays will become more widely available at a lower cost allowing more widespread applications.

In summary, microarray technology is rapidly having an impact on many areas of biomedical research. Radioisotope-nylon based microarrays offer alternatives that may in some cases be more sensitive, flexible, inexpensive, and universal as compared to other array formats, such as fluorescent-glass arrays. In some situations of limited RNA or exotic species, radioactive membrane microarrays may be the most practical experimental approach in studying psychiatric and neurodegenerative disorders, and other complex questions in the brain. (**Korean J Nucl Med 2003;37:43-52**)

Received Feb. 9, 2003; accepted Feb. 9, 2003

Corresponding author: Jae Gel Choe, MD, Meyoung-kon Kim, M.D., Ph.D.

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Korea University Medical School, Seoul, 136-701 Korea

Tel; +82-2-920-6184, Fax; +82-2-923-0480

E-mail, jerrykim@korea.ac.kr

서 론

cDNA microarray는 동일한 실험 조건하의 체계적 방식으로 수천개의 유전자 발현 양상(gene expression profile)을 동시에 분석하여 그 결과를 비교하는 방법이다.^{1,9)} 그 용도는 유전자의 분자적 특징에 따라 단순히 primary screen 용으로 사용되는 분야에서부터 아직까지 밝혀지지 않은 인체의 성장 및 발달 과정과 질병상태의 복잡한 조절기전을 규명하기 위해 사용하는 분야까지 다양하다 할 수 있다. 또한 cDNA microarray의 적용범위도 cell lines 등을 이용하는 in vitro 실험²⁾ 혹은 단순 동물모델 (simple model system) 또는 임상실험에 이용되는 in vivo 실험에서 사용되고 있다¹⁾. 최근에는 뇌와 신경계 같은 더욱 복잡한 생물학적 조직의 유전자 발현 분석에 사용되는 추세라 할 수 있다.^{3,5,12)} Neuropsychiatrics 분야에서 cDNA microarray 기술의 활용은 다음과 같은 이유로 인해 다른 분야보다 발달 속도가 느리다고 평가된다. 1) 유리-형광 (glass- fluorescent) 기반 microarray system에서 많은 양의 RNA 프로브가 요구되고; 2) 뇌와 신경조직은 다른 세포 및 조직에 비해서 훨씬 복잡한 양상을 나타내며; 3) 동물모델로부터 신경계 관련 sequenced clone set을 이용하는 데 제한적인 결함이 있으므로 휴먼 cDNA clone은 쥐, 마우스, 초파리 등의 clone을 통해 우선 연구되고 있으며; 4) 다른 시스템에 비하여 neuroscience에서 cDNA microarray를 활용하는데 commercial array의 비용이 상대적으로 비싸기 때문이다. 복잡한 생물계에서 cDNA microarray를 사용할 때에는 통계적 유의성과 실험적 정확도를 증가시키기 위해서 수차례 반복실험 (multiplcated experiments)이 필요하여⁸⁾ 단순한 cell line을 이용한 실험방법과 비교해 보았을 때 commercial microarray를 사용하는 실험당 비용이 상대적으로 수십-수백배 소요된다고 할 수 있다. 하지만 앞으로는 대학 및 연구소에 cDNA microarray 시설 및 장비가 널리 보급됨에 따라 microarray는 저가에 널리 이용되고, 더 광범위하게 적용될 수 있을 것으로 예상된다.

유전자 발현(gene expression)을 규명하는 microarray는 일반적으로 다음과 같이 네가지 종류가 사용된

다.^{11,14)} 1) 상업적으로 제작된 oligonucleotide chips (manufactured oligonucleotide chips). 2) 형광 프로브를 이용해서 유리 matrix에 찍히는 cDNA microarray (cDNA arrays spotted on glass slides using fluorescent probes). 3) 나일론 멤브레인 필터에 찍히는 cDNA microarray (cDNA arrays spotted nylon membranes). 4) 최근 긴 oligonucleotide를 찍는 방법 (spotted longer oligonucleotides with 60-90 mers). 이들 네 가지 종류의 방법에는 각각의 장단점이 있으나 본 종설에서는 위의 1)과 4)의 oligonucleotide 유전자 발현 microarray에 관해서는 논하지 않고 2)와 3)의 cDNA microarray에 대하여 살펴보고자 한다. 또한 형광으로 표지된 cDNA 프로브로 도포된 유리 현미경 슬라이드 위에 찍힌 cDNA PCR 생성물은 다른 시스템에서도 사용되고 있으므로 나일론 멤브레인 필터 system 과 비교하는 목적 외에는 특별히 언급하지 않을 것이다.

방사성동위원소로 표지된 복잡한 프로브를 함유한 멤브레인 필터를 이용한 cDNA libraries의 감별은 1983년 이후 생화학분자생물학 실험의 일부로 성공적으로 수행되어 오고 있다.¹³⁾ 이러한 접근은 다양한 멤브레인에서 hybridization 경향을 비교하는데 단일 방사성동위원소 표지(single radioactive label)를 사용했다는데 그 의미가 있다. 유리-형광 접근이 두 가지 형광물질 (예: Cy3와 Cy5)을 이용한 hybridization 방법을 사용하는 것과 대조적이라 할 수 있다.¹⁾ 유리-형광을 기초로 한 microarray system은 멤브레인-방사성동위원소를 기초로 하는 것과 비교했을 때 네 가지 장점이 있다. 1) 점 사이의 거리가 매우 가까워 밀도가 높다. 2) 동시에 두 가지 색 발현이 가능하다. 3) 낮은 hybridization 부피로 프로브 표지의 고집적이 가능하다. 4) 방사선 동위원소를 사용하지 않기 때문에 안전하다. 반면 멤브레인-방사성동위원소 system은 유리-형광을 기초로 한 microarray system과 비교할 때 다음과 같은 장점을 가지고 있다. 1) 방사성동위원소로 표지된 cDNA는 높은 hybridization 효율을 보여 프로브의 예민도가 상대적으로 높다. 표지당 총 RNA가 10-100배 작게 사용되어도 실험이 가능한데(1-10 ug with [P-33] vs 50-200 ug Cy-3, Cy5), 이는 RNA가 제한되어있

을 때 통계적 유의성을 위해 여러 번 실험할 수 있다는 장점이 된다.⁶⁾ 2) 방사성동위원소 표지법은 dual label system과 비교할 때 single label system이다. 이것은 직접적으로 두 cDNA 프로브의 비교가 가능하다. 반면 Cy-3과 Cy-5-dUTP는 [P-33]-dCTP보다 nucleotide incorporation rates이 낮을 뿐 아니라, 둘 사이의 incorporation rates이 다르기 때문에 표지된 두개의 형광 프로브 간의 직접비교가 어렵다. 3) 나일론 멤브레인 필터는 3-5회 재사용이 가능하다. 이것은 경비를 줄일 수 있고, 같은 microarray에서 직접 비교가 가능할 뿐만 아니라 비용의 감소로 여러 차례 hybridization을 통한 반복 실험을 할 수 있다. 4) 실험절차와 접근이 상대적으로 용이하여 대학 및 연구소에 널리 보급될 수 있다. 적은 비용의 방사성동위원소 표지법 및 나일론 멤브레인 필터 기술은 널리 이용될 수 있고, 보편적인 실험시약과 하드웨어 및 소프트웨어의 사용으로 좀 더 용이하게 접근할 수 있어 대부분의 경우 데이터 분석에 비용이 적게 들고 시간도 절약할 수 있다.

결론적으로, 전체적인 시각에서 살펴보면 방사성동위원소 프로브와 결합한 나일론 멤브레인을 사용하는 것은 유리-형광 프로브와 비교했을 때 microarray 양상에 많은 영향을 준다. 즉, 멤브레인 제조, 실험적 전략, 데이터 분석, 이미지 처리과정, 양적분석, 보정(normalization), 통계적 분석, 생물학적 분석, 데이터 표시, 데이터 발표 등이 있다. 본 종설의 다음 장에서는 현재 고려대학교 의과대학 생화학분자생물학교실 핵생화학 실험실에서 실행하고 있는 방사성동위원소 표지를 이용한 나일론 멤브레인에서 cDNA microarray의 생성물, 사용법, 분석 양상에 대해 논하고자 한다. 하지만 나일론 멤브레인의 hybridization에 관한 전 분야를 다루는 것은 아니고 cDNA microarray법에 대한 overview와 실험자에게 꼭 필요한 주요단계에 대하여 자세히 설명하고자 한다.

2. Radioactive cDNA microarray

1) Printing nylon membrane cDNA microarrays

Affymetrix 417 arrayer 등을 사용하여 나일론 멤브레인에서 cDNA microarray를 제작하는 방법은 빠르고 효과적이다. 일반적으로 유리-형광 microarray는 도포, 슬라이드 숙성, printing, 변성, 그리고 화학처리 과정(chemical processing) 등을 포함하여 약 1주일 정도의 시간이 걸리는데 비해 나일론 멤브레인 필터 위에 농축된 PCR 생성물을 정렬시키는 데는 약 하루정도의 시간이면 충분히 제작이 가능한데 여기에는 멤브레인 준비, arraying, 교차결합(cross-linking), 그리고 굳히는 과정 등이 포함된다. 나일론 멤브레인에 표지(printing) 하기위해 cDNA 산물을 준비하고 농축하는 것은 유리 microarrays에서 적으려고 했던 cDNA 산물이 PCR로 증폭되어 사용하는 것과 유사하다 할 수 있다. 이 과정을 통하여 PCR 생성물의 수율을 증가시키고, 조작단계, 재료비, 오차, 준비 시간을 줄일 수 있다. cDNA inserts를 함유하고 있는 정제된 plasmids는 96 well plate에서 표준 PCR 조건과 library specific primers를 이용한 low profile MJ Research PCR format을 사용하여 증폭된다. Sucrose (0.06%)와 cresol dye (0.0075 mg/ml)는 각각 완충용액과 gel 확인 단계의 염색약으로서 PCR 반응 초기에 첨가 된다. 또한 각 PCR 반응의 분획은 하나의 밴드 정제를 위해 테스트 되고, gel 전기영동에 의해 상대적인 양을 측정한다.

전통적 PCR법의 주요 문제점은 amplicons의 PCR 반응 후에 나타나는데, 총 160 ul의 PCR 반응물은 증폭시키기 위해 사용되는 low profile 96 well PCR plate에서 72 °C로 덮개가 없고 뚜껑이 열려있는 상태에서 증발되므로 약 1-2시간 내에 총 부피가 40-50 ul까지 감소된다. PCR block의 불균일한 열처리로 인해 Plate는 PCR 기계에서 증발하는 동안 한 두 차례 180 °C까지 높인 다음 차게 식히고 덮어서 -20 °C에서 저장한다. Microarray에 표지하기 전에 plate는 42 °C PCR 기계에서 녹이고, 응축을 막기위해 따뜻한 뚜껑으로 덮어서 얼음에서 식힌다.

최종 농도가 0.2 N 이 되게 1 N NaOH 10 ul를 첨가하고, Plate는 플라스틱 cover (Edge Bio-Systems)로 덮어 천천히 vortex 한다. 이 과정을 한 번 더 반복한다. Plate는 deep well plate carriers를 갖춘 Sorvall T 25 centrifuge에서 3000 RPM으로 원심분리하고, PCR 기계로 옮겨서 42 °C에서 4-5분간 배양한 후, 얼음에 놓고 식힌 다음 print 할 준비를 하는데 변성된 PCR 생성물의 최종 농도는 약 100 ug/ml 이다. PCR 생성물의 에탄올 침전 혹은 column 정제와는 달리, 증발은 더 많은 transfer 혹은 amplicon의 조작이 필요 없고 약 1-2시간 이면 끝나므로 재료비, 시간, PCR 수율에서 오차를 줄일 수 있다. 유리와는 달리 나일론 멤브레인은 free nucleotide, 효소, residual PCR primers와 같은 spotting 혼합에서 오염을 줄일 수 있다.

Affymetrix 417 arrayer는 7 glass slides를 공급하는 printing plates가 6 부분으로 되어있어 총 42 glass slides 용량이다. 6 개의 스테인레스스틸 형태는 각 유리 슬라이드를 거는 부분을 교체함으로써 표면 인쇄에 적합하도록 제작되었는데 이러한 형태는 약 160mm × 80mm × 3mm 이다. Nytran Supercharge (S&S, Inc., cat # 10416296) 나일론 멤브레인은 멤브레인 필터 위에 덮힌 red paper를 보호하기에 적합하도록 제단 되어 있고 Krylon repositionable adhesive (cat # 7020)는 각 형태별로 얇게 뿌리는데 이는 수 분 이내에 마른다. 너무 풀칠을 많이 하면 다 찍힌 후 틀(form)에서 제거될 때 멤브레인 면이 바뀔 수 있고 너무 작게 칠하면 막이 분리되어 핀(혹은 링) 머리에 꼬여서 arrayer의 print head에 상해를 줄 수 있다. 잘려진 나일론 막을 깨끗한 곳에 놓고, 틀은 풀칠한 쪽이 아래로 가도록 위에 놓고 전체 틀에 고른 압력이 가해지게 하여 표지한 후 멤브레인 모서리는 면도칼로 다듬는다. 틀/멤브레인/종이 단위는 arrayer 경사면에 놓여지고, 왼쪽으로 밀고 모서리가 경사면 꼭대기에 갈 때 까지 위로 미는데, 이 과정을 전체 plates가 채워질 때 까지 반복하면 총 42 개의 현미경 슬라이드 사이즈의 멤브레인이 인쇄된다.

Pin head 는 유리 슬라이드 위의 Affymetrix 417 arrayer 계산과 유사한 형식으로 틀/멤브레인 단위

의 표면을 계산한다. 최종 농도가 0.2 N NaOH 가 되도록 NaOH를 첨가하는 것은 3 개의 plate (10 ul of 1 N NaOH/well)의 최초 표지 전에 끝내고 가볍게 흔든다. 처음 3 개의 plate는 arrayer에 놓여지는데, 한번 찍힌 plate는 NaOH를 첨가할 필요가 없고, 증발된 양을 보정하기 위해 증류수를 5-10 ul 첨가한다. 방사성동위원소 프로브를 사용하기 위해 우리는 spot 중심간의 거리가 665 um인 300 micron pin을 사용해서 spot 하는데, 그 결과 25 x 75 mm 현미경 슬라이드 사이즈에 2,304 spot이 표현된다. 16개의 규명된 12 x 12 grid 혹은 subarray (24개 96 well plate로부터 2,304 개의 spot이 만들어짐)가 생성되고, 대부분 두 반복으로 12 plate를 찍을 수 있으므로 이는 1,152 spot이 정렬되게 하는 것이다. 동일한 42 개의 microarray의 표지를 실시하는데 약 8시간이 소요된다. 일반적으로 3 개의 plates를 한 세트로서 하여 96-well plate가 arrayer로부터 제거한 후, 플라스틱 plate sealer로 밀봉하고 -20 °C 냉동고에서 장기간 저장하여 사용한다.

틀/멤브레인 단위는 한번에 하나씩 arrayer로부터 제거 하여, 그들의 print 위치는 1-6으로 오른쪽 위의 모서리에 번호를 매긴다. 전체 unit은 120 millijoules/sec로 stratalinker 2400 (Clonetech, Inc.)을 사용하여 두 번 UV cross-link 된다. 멤브레인은 어떤 missing spot을 기록하기 위해서 현미경으로 관찰되어지고, 한편 멤브레인에 결과가 나타나지 않은 지점은 시료가 링(ring)에 의해 찍혀지지 않았고 DNA가 침전되지 않았음을 의미한다. 용액 없는 핀(pin)으로 찍힌 것은 나일론 멤브레인에 표지되지 못하고 쉽게 보여질 수 있다. 이 지점은 필터로 저장하기 위해서 array map에 표시 되어져야 하는데, 이후 멤브레인을 핀셋으로 조심스럽게 스테인레스스틸 틀로부터 제거한다. 1 부터 42까지 각각의 필터는 00/03 width Koh-I Noor rapidograph 와 rapiddraw 3084-F ink를 사용하여 이름, 날짜, 숫자 등을 기재 한다. 그리고 면도칼로 각각 잘라서 사용할 때까지 실온에서 blotting paper 사이에 저장해 둔다. Stainless steel array form은 100% 에탄올로 씻고 공기 중에 말린 다음 microarray 사용이 가능하다.

본 실험실에서는 microarray, cross-link, 그리고 incubation 까지 대략 10 시간 정도 2,304 clones의 set 을 제작하는데, 이후 pre-hybridization과 hybridization 과정을 통하여 즉시 사용할 수 있다. 각각의 printing round는 동일한 42 array를 생산하고 각각의 array 실행 중에 대략 4 ul product를 소비한다. 처음 44 ul 용액의 96 well V-bottom plates에서 PCR products 는 보통 약 200 - 300 개의 array를 print 한다. 하나의 PCR preparation으로부터 생산되어진 array 수는 저장, print, 그리고 processe 동안 PCR 생성물의 증 발량에 의존하므로 건조한 계절에 수분을 가해주면 총 array 수를 증가 시킬 수 있다.

2) cDNA probe labeling and membrane hybridization

cDNA labeling 과 filter hybridization에 대한 분자 생물학 실험은 비교적 표준화 되어있어서 효과적으로 널리 이용되고 있다. 시판되는 hybridization solution은 hybridization 신호를 증가시키고, hybridization 시간을 줄일 뿐만 아니라 [P-33] dCTP를 함유한 well을 쓰는 등 다양한 labeling 전략이 있다. cDNA 프로브는 다음에서 설명한 대로 준비 한다.³⁾ 총 RNA의 3-10 ul에 1 ug/ul의 10-20-mer poly(dT) primer (Research Genetics Cat # Poly T.GF) 1 ul를 혼합하고 H₂O 15 ul를 첨가한다. 이 혼합액은 65 °C에서 5 분간 열처리 하고 얼음 위에서 2 분간 방치한 후 역전사반응 혼합액을 첨가한다.

8 ul of 5 X first strand buffer (LTI, Inc. Cat # 1864014),

4 ul of 20 mM dNTPs (-dCPT) (LTI, Inc. Cat # 10297018),

4 ul of 0.1 M DTT (LTI, Inc. Cat # 1864014),

1 ul (40U) of RNaseOUT (LTI Cat # 10777-019),

5 ul of 3000 Ci/mmol α-[P-33] dCPT (ICN Cat # 58430)

H₂O to a final volume of 38 ul.

이후 superscript II reverse transcriptase (LTI, Inc. Cat # 1864014) 2 ul를 첨가하고, 42 °C에서 35분간 배양한 후 이어 superscript II reverse transcriptase를 2 ul 첨가하고 다시 42 °C에서 35분간 배양한다.

0.5 M EDTA 5 ul는 이가 양이온 킬레이트로 첨가 된다. 0.1 M NaOH 10 ul 첨가 후 시료는 주형 RNA를 가수분해하기 위해 65 °C에서 30 분간 배양 한다. 이어서 pH 8.0인 1 M Tris 25 ul를 첨가한 후 Bio-Rad 30 정제 칼럼 (Bio-Rad, Inc. Cat # 732-6223)을 이용하여 정제한다. 약 75 ul의 labeled product가 생성되고 1ul는 liquid scintillation counter 에서 계산된다. 일반적으로 labeled된 수율은 75 ul 당 총 3-5 x 10⁷ cpm 범위이다.

25mm x 75mm 나일론 멤브레인은 DNA 면이 위로 향하도록 하여 50 ml Falcon tube (Falcon Cat # 35-2098)에 넣는다. 하나의 프로브로 사용되기 위해 50 ml tube에는 3 개의 멤브레인 까지 가능하다. 2 X SSC 50 ml로 filter를 전세척 (pre-wash) 하고, 멤브레인을 tube 벽에 붙인 후 파이펫을 굴려가면서 버블을 제거한다.

cDNA microarray는 4.0 ml Microhyb (Research Genetics, Cat # Hyb250.GF), 1 mg/ml human Cot 1 DNA 10 ul (사용 전 95 °C에서 5 분간 변성시킴; (LTI, Inc., Cat # 15279-001)), 8 mg/ml poly(dA) (Sigma, Inc. Cat # P-9403) 10 ul (사용전 95 °C 에서 5분 간 변성시킴) 함유된 hybridization buffer에서 pre-hybridization 된다. Pre-hybridization 과 hybridization은 42 °C 표준 hybridization oven (HybAid, Inc. # HS 9360)에서 4시간 행해지고, pre-hybridization 4 시간 후 전체 label 프로브는 95 °C에서 5분간 변성되고, pre-hybridization solution을 약 4 ml 첨가한 후 42 °C에서 12-18시간 배양한다. Hybridization 후 4 ml solution을 버리고, 50 ml 2 X SSC 와 미리 50 °C로 예열된 1 % SDS 혼합액으로 빠르게 세척하고, 2 X SSC 와 0.1 % SDS 혼합액으로 50 °C에서 15분간 세척하는 것을 1-2회 반복한다. 각 세척단계는 survey meter로 관찰되어야 하고 세척 정도는 경험으로 판단되어야 한다. 만약 더 강한 세척이 필요하다면 filter를 1 X SSC 와 0.1 % SDS로 65 °C에서 5-15분 간 세척할 수 있다.

작은 멤브레인은 유리 혹은 metal plate에 정렬하고 모든 수분과 미세한 방울은 제거해야 한다. 멤브레인은 랩으로 매우 단단하게 싸고, 습기를 유지하기 위해 축축한 blotting paper 조각을 바닥에 놓아두기

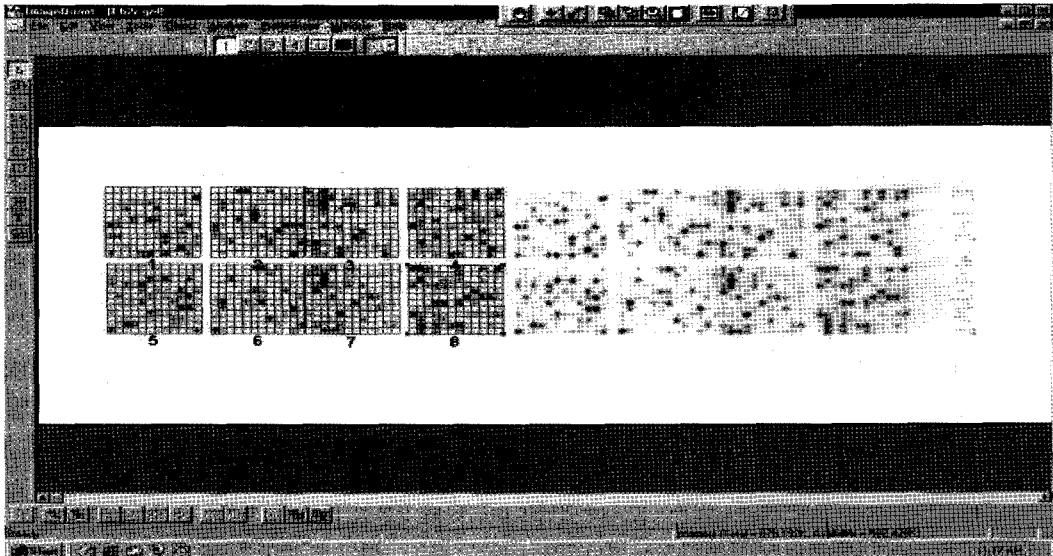


Fig 1. Primary acquired image of radioactive cDNA microarray

도 한다. 멤브레인을 재사용하려면 마르지 않게 해야 한다. Microarray는 1-3일간 phosphorimager screens에 노출된다. screen은 50 um 해상도의 Molecular Dynamics STORM PhosphorImager에서 조사된다. 멤브레인의 재사용을 위해서 65 °C의 0.4 N NaOH/0.1 % SDS 첨가된 200-300 ml 용액에서 30 분간 강하게 흔들어서 2번 세척한다. 상온에서 0.2 M Tris-HCL, 1 X SSC와 0.1 % SDS 혼합액에서 각 10 분간 2 번 세척 한 후 공기 건조, 제거 효율을 측정하기 위해 phosphor screen에 노출시킨다.

3) Image acquisition and signal quantitation

방사성 hybridization은 디지털 이미지 scanning에 의한 전형적인 autoradiography 혹은 최신 phosphorimager 기술에 의해 시각화 되는데, 본 실험실에는 50 마이크론 해상도에서 FLUORESCENT IMAGE ANALYZER FLA 8000 (FUJI PHOTO FILM)을 사용하였다. Fig. 1에서 보여 지는 것과 같이 이미지 결과는 multiple hybridization experiments로 보여 지는 것으로 디지털 강화 이미지는 보통 최상의 영상을 제공하지만 분석 결과에는 영향을 주지 않는다. Primary image를 얻은 후 그 고유의 이미지 파일로 각각 filter/hybridization을 분리하여 분석한다. 각각

분류된 이미지를 얻고 저장하는 과정에 L-process program (FUJI PHOTO FILM)를 사용한다. 또한 전체 이미지는 L-process program의 이미지 회전 기능을 이용하여 가로축을 따라 수평이 되게 하는데 이는 후에 정량분석 과정에서 필요하다.

이미지 자료는 L-process program software를 사용하여 얻어져서 회전된 이미지상에서 정량 된다. Fig. 1에서와 같이 grid는 이미지 주형 위에 놓여지고 각 grid 내의 모든 화소는 1-256 gray scale 지표로 계산된 후, 결과는 'volume report'의 형태로 산출되어 Excel spreadsheet format의 program 으로 이동되며 동시에 각 gene을 array 하는 subarray grid 위치로 전환된다. 전형적인 spreadsheet 자료는 gene difference 계산과 다음 단계의 보정을 위한 준비이다.

4) Normalization of array data

Multiple array hybridization에서 획득한 data를 보정하는 것은 nonspecific 배경 강도가 다를 때 특히 필요하다. 일반적으로 nonspecific background는 다음과 같이 두 가지로 분류할 수 있다. 1) 국소적이면서 일관적이지 않은(local nonuniform) background; 2) 전반적이면서 일관적인(entire uniform) background. Local non-uniform background는 반점, 선, 칩 등의 여러 형태로 나타날 수 있다. 일반적으로 널리 이용

되는 local background의 최고 해결책은 hybridization을 반복적으로 다시 시행하는 것이다. 본 실험실에서는 일반적으로 정교한 local background 수정을 위해 hybridization 혹은 전체 실험을 2회 이상 반복한다. Local background 수정을 포함한 cDNA array의 보정화 전략은 최근 발표에 자세히 설명되어 있다.⁷⁾ 후자에 언급한 보정이 요구되는 background는 entire background 문제는 대부분 최초 시작한 RNA의 품질(probe mixture에서 non-specific contaminants)에서 유래된 차이 또는 두 RNA population에서 true global transcriptional difference 때문이라 할 수 있다. 대부분의 보정화 전략은 두 이미지간의 차이가 작을 때만 가능한 것으로 어떠한 경우에도 두 이미지간의 차이가 크면 클수록 더욱 불균일하므로 대부분의 보정화 전략은 깨지기 시작하고 근본 데이터를 망가뜨릴 가능성이 있다. 또한 한번의 보정으로 microarray 이미지의 모든 실험적 변수를 보정할 수 있는 것이 아니므로 본 실험실에서 현재 사용되고 있는 실용적인 접근을 아래와 같이 소개한다.

단순 보정은 소수의 시료로 실험 할 때와 동일한 배경(uniform background) 차이의 경우에 무리 없이 실행된다. 이러한 접근은 다른 생물학적인 array에서 단순 보정과 같다. 서로 다른 전체 강도와 일정한 배경의 두 가지 이미지를 나타내는 경우, 데이터는 각각의 이미지로부터 정량화 되고 전체적인 강도의 값은 각각의 이미지로부터 얻어진다. 보정지수(normalization factor)는 평균 총 강도를 실제 총 강도로 나누어 구하고 각 original column은 그 보정지수로 곱해지며 비율(ratio)은 보정된 값으로부터 계산된다. 단순 보정 작업은 간단한 실험일 경우엔 가능하지만 복잡한 배경 문제와 다수의 시료를 가진 실험에는 적합하지 않다. 또한 단순 보정에서 보여준 것처럼, 보정된 강도의 비는 각 array에 대한 비율의 평균에서 구해진다. 소수의 array dataset은 큰 변수를 초래할 수 있고 array 간에 이들 값의 조작은 거짓 결과를 생성할 수도 있으므로 array 간에 상대적인 강도는 노출 시간, labeling 효율, hybridization, 세척 상태와 같은 요소에 영향을 받을 수 있다는 것을 감안하여 실행한다. 본 실험실에서는 Z-score 보정 방법(각 array를 보정하기 위해 평균 간 차이를

Z-ratio에 기초를 둔 방법)을 채택하고 있는데¹⁰⁾ 간략히 요약하면, 각 array에서 모든 유전자의 Z-score의 분포도를 계산 한다(평균 유전자 발현 sets 은 0 이고 표준 편차는 1이다). Z 보정법은 유전자 발현에서 차이를 계산하기 위해 둘 혹은 그 이상의 array에서 Z-scores의 차이 (Z-difference)를 이용한다.

Z-ratio를 계산하기 위한 식은 worksheet에서 행해질 수 있는 단순한 단계들로서 Low intensity data에 log 10을 취하는 것은 값의 차이를 줄이기 위함이다. 각 시료당 log 10 점수의 평균과 표준편차는 계산되어지고 Z-score 보정 공식으로 들어간다.

$$Z_{(gene1)} = \log_{10} [\text{raw intensity}_{(gene1)}] - \log_{10} [\text{mean raw intensity}_{(all genes)} / \text{standard deviation}_{\log_{10} [\text{raw intensity}_{(all genes)}]}]$$

어떤 두 array에서 같은 유전자간에 유전자 발현 차이는 다음과 같은 방법으로 계산되어진다.

$$Z\text{-Diff}_{(gene1)} = Z_{(gene1,array1)} - Z_{(gene1,array2)}$$

전형적인 차이를 비교하는 방법으로 Z-score differences는 아래 식에 따라 Z-ratio로 전환된다.

$$Z\text{-Ratio}_{(gene1)} = Z\text{-Diff}_{(gene1)} / Sdev_{(Z\text{-Diff}_{all genes})}$$

Z-보정은 반복적인 실험에 관계없이 array 결과를 비교할 수 있고 보정 후 array format은 각 array에 내재되어 있고 주어진 생물학적 시료와는 무관하다. False positive 수준에 의존한 것은 이러한 비교에서 기꺼이 받아들여지고 0.01, 0.05, 0.1등의 역치는 채택될 수 있다. 결과의 반복성은 통계적 수정에 의존하기보다 믿을 수 있는 data를 얻는데 큰 의의를 둔다. 각각의 실험에서 gene difference가 반복될 때 실험 결과를 더욱 신뢰 할 수 있는데, 예를 들면 microarray에서 1,000 개의 유전자가 프로브 될 때 유전자의 하나는 50 개의 유전자가 유의하게 up- 또는 down- regulation에 관여한다는 가설이나 2회 실험의 반복성 (0.05)² 혹은 2.5 개의 유전자가 다르게 조절되는 것을 의미하므로 2-3회 반복 실험은 확인 연구 전에 시간과 노력을 절약할 수 있다.

Microarray data의 신뢰도를 평가 하는 또 다른 방법으로는 반복실험 값의 scatter plot을 그리는 것이

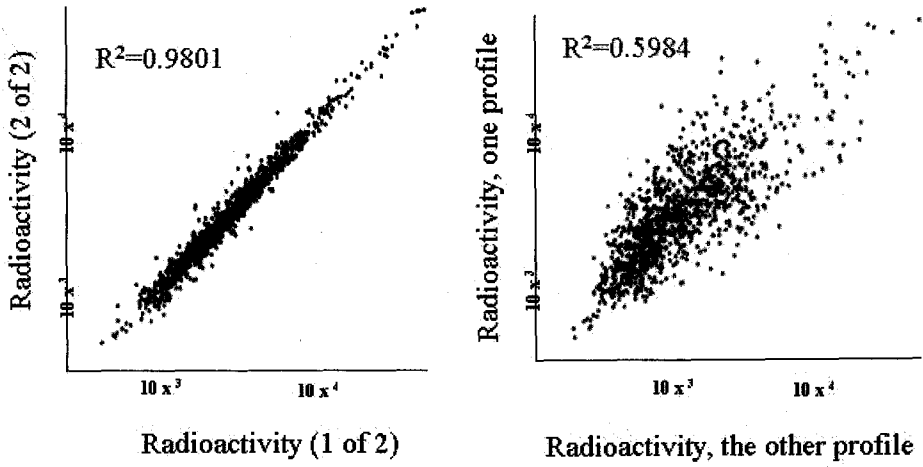


Fig. 2. Scatter plots with higher (A) and lower (B) correlation efficiency.

다 (Fig. 2). 일단 scatter plot이 그려지면, correlation coefficient (r^2)를 사용하여 data의 직선선이 squares regression solution을 이용하여 구하게 된다. 또 다른 반복실험의 신뢰도를 평가하기 위한 방법으로 coefficient of variation (CV)가 있는데, CV는 반복 실험의 표준편차 / 반복실험의 평균으로 구해지고 %로 표현하기 위해 100을 곱하여 구한다. 반복실험의 array point로 CV 사용은 사용자에게 의해 data가

역치를 넘어서는지를 결정하는데 필터로 이용되는데, CV 값이 20% 이하가 되면 바람직하고 microarray에서 가장 믿을 수 있는 범위는 2~10%라 할 수 있고, CV 값이 그 이상이라면 신뢰할 수 없다. 요약하면 이러한 방법은 각 data point 간의 장점을 밝히는 빠른 방법이고 통상적으로 microarray 실험에서 실시되어야 한다.

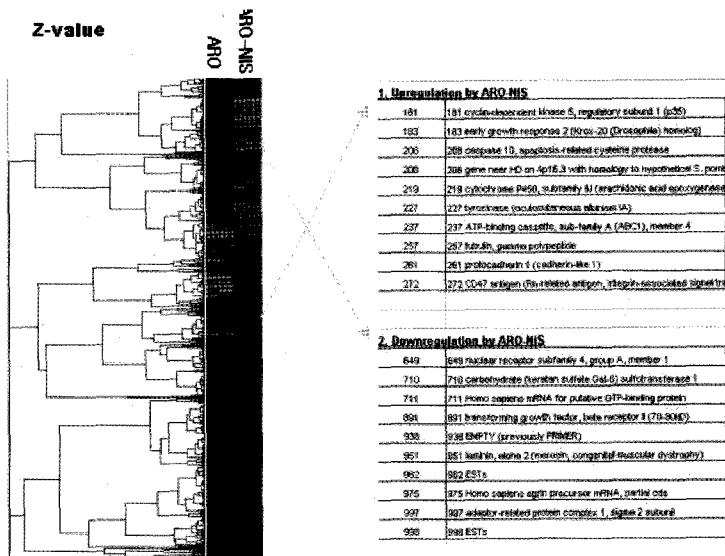


Fig 3. Clustergram representing up-and down-regulation of genes

5) Data analysis and visualization

일단 intensity data는 microarray 실험에 기초를 둔 나일론 멤브레인에서 얻어진 후 표준화되고, 더 심도 있는 data 분석은 다른 array formats에 기인한 분석과 유사하다. 즉 intensity 값, 단순 비율, Z-value, Z-ratio 등은 clustering (Fig. 3), self-organizing maps, 다차원적 표현, array data 분석을 위한 일반적 접근을 위해 쉽게 소프트웨어로 이동한다. 일부 정량 프로그램이 단독으로 실행된다면 방사선 이미지가 표준화되고 통계화 되어 얻어지는 intensity 값을 위해 다른 software program이 제작되어 있는데, data process와 시각적인 표현은 멤브레인 microarray 역시 다른 microarray와 유사하며 이미지 처리, 데이터 획득, 통계, 시각적 표현은 부록 1에 열거하였다.

3. Conclusion

cDNA microarray는 많은 생의학 연구 분야에서 빠르게 확산되어 영향을 주고 있다. 나일론 멤브레인을 이용한 radioactive cDNA microarray는 다른 microarray 형태와 비교했을 때 더욱 예민하고, 탄력적이며, 저렴하고 대중적이다. 제한된 양이나 조건의 RNA 혹은 특별한 시료의 경우에도 멤브레인 microarray는 가장 적합한 실험법이 될 수 있다. Genomic-scale array가 neuropsychiatrics 분야에서 더욱 빈번히 이용됨으로서 해당분야의 오랜 의문인 신경퇴행성질환, 정신분열병, 우울증, 발달장애, 등과 관련된 다른 복잡한 생화학분자생물학적 기전과 관련되어 밝혀질 것으로 기대된다.

4. References

- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14:457-60.
- Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 1999;46:425-8.
- Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH, 3rd, Becker KG, Ko MS. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9127-32.
- Colantuoni C, Purcell AE, Bouton CM, Pevsner J. High throughput analysis of gene expression in the human brain. *J Neurosci Res* 2000;59:1-10.
- Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Peck K, Jordan BR. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet* 1999;8:1715-22.
- Schuchhardt J, Beule D, Malik A, Wolski E, Eickhoff H, Lehrach H, Herzog H. Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E47.
- Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y. High-density cDNA filter analysis : a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene* 1995;156(2):207-13.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet Jan* 1999;21(1suppl):10-14.
- Guiford JP, Fruchter B. *Fundamental statistics in psychology and education*. 1973;Fifth edition. McGraw-Hill: New York.
- Khan J, Simon R, Bittner M, Chen Y, Leighton SB, Pohida T, Smith PD, Jing Y, Gooden GC, Trent JM, Meltzer PS. Gene expression profiling of avian rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res* 1998;58(22):5009-5013.
- Luo L, Salunga RC, Guo H, Bittner A, Joy KC,

Galindo JE, Xiao H, Rogers KE, Wan JS, Jackson MR, Erlander MG. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuroal subtypes. *Nat Med* 1999;5(1):117-22.

13. Sargent TD, Dawid IB. Differential gene expression in the gastrula of *xenopus laevis*. *Science* 1983;222(4620):135-9.
14. Wawter NP, Barrett T, Cheadle C, Sokolov Bp, Wood WH, Donovan DM, Webster M, Freed WJ, Becker KG. Application of cDNA microarrays to examine gene expression differences in schizophrenia. *Brain Research Bulletin* [In press] 2000.

5. Appendix

다음의 계산, 시각화 프로그램들이 cDNA array 데이터와 복합적인 gene expression 패턴의 분석과 획득에 이용되고 있다. Shareware나 저렴한 가격으로 이용 가능한 software는 *로 표시하였다.

1) Image processing/Data acquisition

ImageQuant

<http://www.mdyn.com/products/ImageQuant/default.htm>

IPLab

<http://www.scanalytics.com/sos/product/gen/IPLab.html>

Adobe Photoshop

<http://www.adobe.com/products/illustrator/main.html>

Adobe Illustrator

<http://www.adobe.com/products/illustrator/main.html>

Imagene

<http://www.biodiscovery.com/products/ImaGene/imagene.html>

DeArra-YiDong Chen NHGRI *

<http://www.nhgri.nih>

[.gov/DIR/LCG/15K/HTML/img_analysis.html](http://www.nhgri.nih.gov/DIR/LCG/15K/HTML/img_analysis.html)

PSCAN *

<http://absalpha.cit.nih.gov/pscan>

Array Pro Analyzer

<http://www.mediacy.com/mediahm.htm>

QuantArray

<http://www.packardinstrument.com/index2.htm>

2) Data storage and manipulation

Microsoft Excel

<http://www.microsoft.com/catalog/display.asp?site=797&subid=22&pg=1>

Microsoft Access

<http://www.microsoft.com/catalog/display.asp?site=769&subid=22&pg=1>

Axum

<http://www.mathsoft.com/asum/>

3) Data visualization and analysis

Spoffire

<http://www.ivee.com/>

Cluster *

<http://rana.stanford.edu/software/>

Tree view *

<http://rana.stanford.edu/software/>

Gene Spring

<http://www.sigenetics.com>

BRB Array Tools *

<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>

MAExplorer *

<http://www-lecb.ncifcrf.gov/mae/maeDoc.html>

<http://www-lecb.ncifcrf.gov/mare/>